

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINA DEL FRUTO DEL AJÍ  
(*Capsicum frutescens*) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA  
RESOLUCIÓN (HPLC) Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS O-GLICÓSIDOS**

**CARMEN EUGENIA SOLARTE OROZCO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2004**

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINA DEL FRUTO DEL AJÍ  
(*Capsicum frutescens*) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA  
RESOLUCIÓN (HPLC) Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS O-GLICÓSIDOS**

**CARMEN EUGENIA SOLARTE OROZCO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
química**

**Director**

**JAIME MARTÍN F. Ph.D**

**Asesor**

**LUIS ALBERTO LENIS. Ph.D**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2004**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

**Director**

---

**JAIME MARTÍN F. Ph.D**

**Jurado**

---

**FABIO CABEZAS Ph.D**

**Jurado**

---

**JUAN CARLOS ARGOTI M. SC**

Fecha de Sustentación: Popayán, Octubre 20 de 200

## **AGRADECIMIENTOS**

Muchas personas participaron de una u otra forma en el desarrollo y culminación con éxito de este trabajo, por eso quiero de corazón agradecerles.

A Dios por permitirme terminar con éxito una más de las etapas de mi vida.

Al profesor JAIME MARTÍN FRANCO, por su paciencia, apoyo, enseñanzas y gran confianza.

Al profesor LUIS ALBERTO LENIS, por compartir conmigo su enseñanzas y su amistad.

A la profesora OLGA LUCIA HOYOS, por sus consejos, enseñanzas y cariño que siempre me expresa.

Al profesor RICARDO BENITEZ, por su colaboración y apoyo.

Al profesor JUAN CARLOS ARGOTI y al profesor FABIO CABEZAS, mis jurados por que sin su ayuda no lo hubiera logrado.

A cada una de los profesores del departamento de Química, ya que gracias a su sabiduría y experiencia aprendí mucho de ellos.

A mis padres Hugo y Rosalba, a mi hermano Jose, a mi Tío y mi Abuela, por que su apoyo y confianza me permitieron mantener siempre la meta propuesta.

A Rodrigo, por su paciencia y grandes consejos que siempre me ayudaron a no decaer en los momentos difíciles.

A mis mejores amigos Marta, Gaby, Alfaro, Mónica porque aunque me demore tanto en terminar este trabajo siempre me alentaron a seguir adelante, gracias por la confianza y los abrazotes que me llenan de energía.

A mis compañeros que cada día los quiero mas, Sandra; Lorena, Julian, Jordan, William, sin su ayuda las cosas no hubieran salido tan buenas; gracias porque los días de trabajo duro fueron más agradables con ustedes en mi camino.

Muchas gracias a todos lo que hacen parte de esta etapa de mi vida y que en este momento se me escapan, les agradezco cada una de las cosas y detalles que hicieron para que todo saliera tan bien como resultado.

*A Rosalba, Hugo, Jose y Rodrigo por permitirme  
pilotar mi vida y siempre apoyarme en mis  
decisiones.*

*A Jaime, Olga y Luis Alberto, por su confianza,  
apoyo y amistad.*

*Este es también su triunfo.*

## RESUMEN

El ají ha sido una de las especias más importantes que América ha dado al mundo. Su cultivo se ha extendido desde México hasta el norte de los Estados Unidos. Existen más de doscientas variedades de ajíes picantes las cuales reciben nombres muy variados especialmente tomados de la lengua Mexicana. Históricamente el ají ha sido utilizado de diferentes maneras, ya sea para realzar el sabor de comidas típicas especialmente de Centro y Sudamérica o dándole un uso medicinal.

La capsaicina, sustancia que hace al ají picante, es el más pungente del grupo de los llamados capsaicinoides que pueden ser aislados del fruto del ají. Esta sustancia ha sido utilizada durante muchos años en medicina tradicional y actualmente hace parte de medicamentos para el manejo del dolor. Sus efectos analgésicos se manifiestan por la reducción de la concentración de la sustancia P en neurotransmisores. No obstante esta aplicación ha demostrado que dosis altas e incluso las utilizadas en tratamientos tópicos tienen efectos citotóxicos en diversos puntos del organismo, pero su amplio rango de efectos biológicos, la sugieren como analgésico y antiinflamatorio, atrayendo de esta manera la atención de los científicos, al punto de promover investigaciones en la búsqueda de estructuras análogas con igual actividad clínica y reducción de su citotoxicidad.

En esta investigación se ha pretendido la síntesis de análogos O-glicósidos para reducir parcial o totalmente sus efectos secundarios. Para la transformación de la capsaicina en un derivado O-glicosido, fue necesario buscar las condiciones óptimas para el desarrollo de la reacción, realizando preliminarmente reacciones modelo con un análogo de la capsaicina conocido como Vainillilnonanamida. Los resultados obtenidos determinaron que la reacción de catálisis por transferencia de fase es una metodología adecuada para la síntesis de O-glicosidos obteniendo con estas reacciones más limpias, en menor tiempo y en condiciones suaves.

Se trabajó además en la búsqueda de condiciones para la extracción de capsaicina del fruto del ají, obteniendo resultados importantes que podrían ser retomados posteriormente en una investigación más exhaustiva.



## CONTENIDO

<b>RESUMEN4.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEORICO .....</b>	<b>3</b>
2.1    ORIGEN Y CLASIFICACIÓN DEL AJÍ.....	3
2.2    COMPOSICIÓN DEL FRUTO .....	4
2.3    CAPSAICINA .....	8
2.4    VAINILLILNONANAMIDA .....	13
2.5    PRODROGAS Y SÍNTESIS DE NUEVOS COMPUESTOS ANÁLOGOS A LA CAPSAICINA ...	14
2.6    CATÁLISIS POR TRANSFERENCIA DE FASE.....	17
<b>3. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>20</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
4.1    GENERAL.....	22
4.2    ESPECÍFICOS .....	22
<b>5. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>6. METODOLOGÍA .....</b>	<b>25</b>
6.1    REACTIVOS Y EQUIPOS.....	25

6.1.1	<i>Reactivos</i> .....	25
6.1.2	<i>Solventes</i> .....	26
6.1.3	<i>Equipos</i> .....	27
6.2	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINA DEL FRUTO DEL AJÍ.....	28
6.2.1	<i>Muestra</i> .....	28
6.2.2	<i>Extracción</i> .....	28
6.2.3	<i>Purificación</i> .....	29
6.2.4	<i>Análisis de extractos</i> .....	30
6.3	SÍNTESIS DE O-GLICÓSIDOS ANÁLOGOS DE CAPSAICINA .....	31
6.3.1	<i>ACETILACIÓN DE AZÚCARES</i> .....	31
6.3.2	<i>BROMUROS DE GLICOPIRANOSILOS PERACETILADOS</i> .....	32
6.3.3	<i>SÍNTESIS DE O-GLICÓSIDOS PERACETILADOS</i> .....	34
6.3.4	<i>DESPROTECCIÓN DE O-GLICÓSIDOS ACETILADOS</i> .....	38
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
7.1	EXTRACCIÓN DE CAPSAICINA Y ANÁLISIS POR HPLC.....	40
7.1.1	<i>Curvas de calibración</i> .....	42
7.1.2	<i>Análisis de extractos por HPLC</i> .....	46
7.2	SÍNTESIS DE ANÁLOGOS O-GLICÓSIDOS .....	54
7.2.1	<i>Reacción de acetilación de azúcares</i> .....	54
7.2.2	<i>Bromación anomérica de los azúcares peracetilados 17 y 18</i> .....	57
7.2.3	<i>Síntesis de O-Glicósidos</i> .....	61

7.2.4	<i>Reacción de desprotección de los grupos hidroxilos en los productos O-glicosilados</i> .....	84
8.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	92
9.	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	94

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.....	6
Esquema 2.....	54
Esquema 3.....	55
Esquema 4.....	58
Esquema 5.....	62
Esquema 6.....	63

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Composición proximal del fruto del ají por 100 g. ....	5
Tabla 2.	Clasificación de los capsaicinoides del ají de acuerdo al test Scoville...7	
Tabla 3.	Características físicas de la muestra de ají.....	28
Tabla 4.	Condiciones para la extracción de capsaicina. ....	40
Tabla 5.	Rellenos de EFS evaluados.....	41
Tabla 6.	Condiciones para análisis de capsaicina por HPLC.....	43
Tabla 7.	Datos para la curva de calibración de capsaicina .....	44
Tabla 8.	Datos para la curva de calibración de dihidrocapsaicina .....	45
Tabla 9.	Concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina extraída .....	46
Tabla 10.	Rendimientos para los bromuros <b>21</b> y <b>22</b> .....	59
Tabla 11.	$\delta$ 's y J's de los protones en los bromuros de glicopiranosilo .....	60
Tabla 12.	Señales de IR de los bromuros .....	61

Tabla 13.	Resultados de las reacciones de O–glicosidación en una fase.....	65
Tabla 14.	Señales por RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>26</b> .....	66
Tabla 15.	Condiciones utilizando catálisis por transferencia de fase .....	74
Tabla 16.	δ's y J's de los protones de los O –glicósidos .....	77
Tabla 17.	δ's y J's de los protones de los O –glicósidos <b>31</b> y <b>32</b> .....	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Subdivisión de la molécula de capsaicina en tres regiones .....	9
Figura 2.	Catálisis por transferencia de fase.. .....	18
Figura 3.	Espectro de absorbancia de capsaicina .....	42
Figura 4.	Cromatograma del patrón capsaicina dihidrocapsaicina .....	43
Figura 5.	Curva de calibración de capsaicina .....	44
Figura 6.	Curva de calibración de dihidrocapsaicina .....	45
Figura 7.	Comparación de cromatogramas de las extracciones con ultrasonido- acetona .....	47
Figura 8.	Comparación de cromatogramas de las extracciones con soxhlet- acetona.....	48
Figura 9.	Comparación de cromatogramas de las extracciones con ultrasonido- acetonitrilo. ....	49

Figura 10. Comparación de cromatogramas de las extracciones con soxhlet-acetonitrilo. ....	49
Figura 11. Comparación de los cromatogramas de extracción: ultrasonido-acetonitrilo, soxhlet-acetonitrilo y soxhlet-acetona .....	50
Figura 12. Comparación de cromatogramas de las extracciones con ultrasonido-metanol .....	51
Figura 13. Comparación de cromatogramas de las extracciones con soxhlet-metanol .....	51
Figura 14. Comparación de los cromatogramas de extracción: ultrasonido-metanol y soxhlet-acetona .....	52
Figura 15. Comparación de los cromatogramas de extracción: ultrasonido-metanol, y ultrasonido-acetona .....	52
Figura 16. Conectividades observadas en el COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ para <b>26</b> .....	67
Figura 17. Espectro RMN $^1\text{H}$ del compuesto de eliminación <b>26</b> .....	69
Figura 18. Espectro COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ para <b>26</b> .....	70
Figura 19. Espectro JMOD para <b>26</b> .....	71



Figura 20. Equilibrios en la reacción de O-glicosidación por catálisis por transferencia de fase .....	73
Figura 21. Conectividades observadas en el COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H para la región que contiene el monosacárido en los O-glicósidos <b>25</b> y <b>27</b> .....	79
Figura 22. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-glupiranosiloxi)bencil]nonanamida <b>25</b> .....	80
Figura 23. Espectro de HOMOCOSY N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-glupiranosiloxi)bencil]nonanamida <b>25</b> .....	81
Figura 24. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosiloxi)bencil]nonanamida <b>27</b> .....	82
Figura 25. Espectro de HOMOCOSY de N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosiloxi)bencil]nonanamida <b>27</b> .....	83
Figura 26. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-[3-metoxi-4-(β-D-glupiranosiloxi)bencil]nonanamida <b>31</b> .....	88
Figura 27. Espectro de HOMOCOSY N-[3-metoxi-4-(β-D-glupiranosiloxi)bencil]nonanamida <b>31</b> .....	89

Figura 28. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de N-[3-metoxi-4-( $\beta$ -D-galactopiranosiloxi)bencil]nonanamida **32** .....90

Figura 29. Espectro de HOMOCOSY de N-[3-metoxi-4-( $\beta$ -D-galactopiranosiloxi)bencil]nonanamida **32** .....91

## LISTA DE ACRÓNIMOS

ax – ax :	axial – axial
colab.:	colaboradores
CCD:	cromatografía de capa delgada
CCR:	cromatografía de columna relámpago
°C:	grado centígrado
d:	doblete
dd:	doblete de dobletes
EFS:	extracción en fase sólida
ec – ax:	ecuatorial – axial
eq:	equivalentes
g:	gramos
HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución
h:	hora
Hz:	Hertz
IR:	espectroscopia infrarroja
M:	molaridad
MHz:	mega hertz
min:	minutos
mL:	mililitros
mg:	miligramos

n:	entrada
nm:	nanómetros
ppm:	partes por millón
RMN $^1\text{H}$ :	resonancia magnética protónica
s:	singlete
$\text{S}_{\text{N}}^1$ :	sustitución nucleofílica unimolecular
$\text{S}_{\text{N}}^2$ :	sustitución nucleofílica bimolecular
t:	triplete
Uv-Vis:	ultravioleta – visible

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe gran demanda por la investigación sobre métodos que aumenten la eficiencia de las drogas y que a su vez reduzcan la toxicidad y efectos colaterales indeseables. Una sustancia con la configuración estructural óptima y propiedades fisicoquímicas especiales que permitan una respuesta terapéutica deseada, no necesariamente posee la mejor estructura molecular y propiedades que le permitan actuar sobre el objetivo; usualmente una pequeña porción de la droga suministrada alcanza el área objetivo mientras que la restante interactúa en sitios causando efectos colaterales indeseables. En esta área del conocimiento han surgido muchas propuestas tendientes a resolver el problema de la especificidad de las drogas.

Por su parte, los investigadores han logrado la síntesis de un gran número de derivados de drogas de origen natural y sintético que son utilizadas en diferentes tratamientos clínicos. Gran parte de estas síntesis implican transformaciones químicas, en varios casos asociadas con acoplamiento de las moléculas con actividad a carbohidratos, los cuales han demostrado ser buenos vehículos para el transporte y reconocimiento de estas drogas. Es el caso de la síntesis de C-glicósidos y O-glicósidos muy empleada en las últimas décadas para este fin.

Por otra parte, la capsaicina, componente pungente más importante del fruto del ají, distinguida por sus propiedades curativas, como antiinflamatorio y analgésico, y por los efectos tóxicos asociados como irritabilidad, insensibilización y/o destrucción de receptores en la piel, ha sido muy estudiada desde la perspectiva de la síntesis de análogos que incrementen su actividad terapéutica.

En esta investigación se ha pretendido la síntesis de análogos O-glicósidos para reducir parcial o totalmente sus efectos secundarios. Para la transformación de la capsaicina en un derivado O-glicósido, ha sido necesario buscar las condiciones óptimas para el desarrollo de la reacción, realizando preliminarmente reacciones modelo con un análogo de la capsaicina conocido como Vanillilnonanamida. Inicialmente se usó el carbonato de potasio como base en acetona, para generar el ión fenóxido de mejor comportamiento nucleofílico que su ácido conjugado. Igualmente se usó hidróxido de sodio, pero en ambos casos el rendimiento no fue muy bueno, generando también el producto de eliminación C1-C2. Examinando otras posibilidades se trabajó la metodología de catálisis por transferencia de fase, lográndose buenos rendimientos, en una reacción que resultó ser muy limpia. La capsaicina es una sustancia comercialmente muy costosa, por lo que se utilizó un compuesto análogo comercialmente más económico en las reacciones preliminares y además se trabajó en la búsqueda de condiciones para la extracción de capsaicina del fruto del ají, obteniendo resultados importantes que podrían ser retomados posteriormente en una investigación más exhaustiva.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 Origen y clasificación del ají

El ají es originario de Centro y Sudamérica, fue introducido en Europa a principios del siglo XVI por los españoles, adquiriendo rápidamente gran importancia en los países de este continente. Esta planta asociada históricamente con el primer viaje de Colón fue llamada inicialmente “red pepper” porque su fruto rojo imita la pungencia de la pimienta, *Piper nigrum.L.*

El ají se extendió rápidamente en el arte culinario de Europa, África, y de países como India, China y Japón, siendo una especie muy lujosa que únicamente los ricos podían adquirirla. Actualmente es la especie mas consumida en el mundo constituyéndose en un ingrediente esencial del sector alimenticio, empleado como saborizante y agente colorante de alimentos, y en otras áreas como ingrediente farmacéutico.

Esta planta es una hortaliza herbácea anual de la familia **Solanaceas**. Pertenece al genero *Capsicum* que contiene aproximadamente 22 especies silvestres, y 5 domesticadas conocidas como: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum pubescens*.

Varios términos como pepper, chile, chili, ají, paprika y capsicum son usados intercambiablemente para nombrar esta planta del género *Capsicum*. Algunos de estos nombres son variaciones de dialectos nativos, como la palabra chile que es una variación de “Chil” del dialecto Náhuatl (Azteca) y ají, una variación de “axi” del extinto dialecto Arawak del caribe<sup>1</sup>.

Varios autores simplifican la taxonomía del género *Capsicum* determinando que la planta de aj pertenece a la especie *Capsicum annuum* cuando es moderadamente picante o *Capsicum frutescens*, para identificar los ajes más picantes<sup>2</sup>.

Entre las variedades más representativas están el Tabasco, Jalapeo, Hungarian, Yellow Wax, Chile, Floral Gem, Red Chili, Roumanian Hot y Red Cherry Hot<sup>3</sup>.

## **2.2 Composición del fruto**

El fruto del ají posee un alto valor nutritivo, basado en un significativo contenido de nutrientes esenciales, como vitaminas, lípidos, ésteres, fenoles, glicósidos, etc., en la Tabla 1 se muestra la composición proximal de este fruto y su contenido de vitaminas.

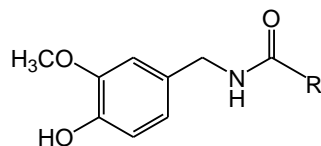


**Tabla 1.** Composición proximal del fruto del ají por 100 g.

<b>Composición</b>	<b>%</b>	<b>Composición</b>	<b>mg</b>	<b>Composición</b>	<b>mg</b>
Agua	81.10	Calcio	29	Tiamina	0.07
Proteína	2.20	Fósforo	65	Riboflavina	0.20
Grasa	1.60	Hierro	1.00	Niacina	1.60
Carbohidratos	9.90	Sodio	13	Ac. ascórbico	100
Fibra	4.20	Potasio	213	Vitamina A	4600 UI
Ceniza	1.00			Calorías	60

El atributo más típico e importante de las especies de ají es su pungencia, cuya proporción depende de la variedad del fruto. El sabor picante del ají es causado por un grupo de siete pseudo alcaloides análogos los cuales son denominados capsaicinoides. En el esquema 1 se muestran la estructura general y particular de cada uno de estos compuestos, los cuales se diferencian por el apéndice R. En las entradas 1 y 2 se muestra la capsaicina y la dihidrocapsaicina responsables del 90 % de la pungencia del ají<sup>4</sup>.

### Esquema 1



Estructura General

No	R	Nombre común	Nombre IUPAC
1		Capsaicina (1)	N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonenamida
2		Dihidrocapsaicina (2)	N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metilnonanamida
3		Nordihidrocapsaicina (3)	N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-7-metiloctanamida
4		Homocapsaicina I (4)	N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-9-metil-7-decenamida
5		Homocapsaicina II (5)	N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-7-decenamida
6		Homodihidrocapsaicina I (6)	N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-9-metildecenamida
7		Homodihidrocapsaicina II (7)	N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metildecenamida

Los capsaicinoides son clasificados según su nivel de pungencia mediante un método clásico desarrollado en 1912 por el químico Wilbur Scoville y conocido como “test organoléptico Scoville”<sup>5</sup>. En la Tabla 2 se muestra el nivel de pungencia de los capsaicinoides en unidades Scoville

**Tabla 2.** Clasificación de los capsaicinoides del ají de acuerdo al test Scoville.

<b>Capsaicinoide</b>	<b>Pungencia (unidades Scoville)</b>
Homocapsaicina I y II	8.600.000
Homodihidrocapsaicina I y II	8.600.000
Nordihidrocapsaicina	9.100.000
Dihidrocapsaicina	16.000.000
Capsaicina	16.000.000

El test organoléptico Scoville ha sido el método estándar ampliamente usado para el análisis de la pungencia. No obstante, el método tiene grandes limitaciones, con este método los catadores tienen la habilidad para probar muchas muestras en secuencia, sin embargo, esta destreza puede estar limitada por la pungencia de las soluciones del test, la fatiga de los catadores y porque ellos no pueden distinguir entre los diferentes capsaicinoides.

Por las razones anteriores, el test organoléptico Scoville ha sido desplazado por métodos instrumentales como espectrofotometría, cromatografía capilar miscelar electrocinética, cromatografía en capa fina<sup>6</sup>, cromatografía de gases<sup>7</sup> y cromatografía líquida de alta resolución<sup>6,8,9,10,11,12,13</sup> en muchos casos utilizando fase reversa, una metodología muy empleada por su confiabilidad y reproducibilidad.

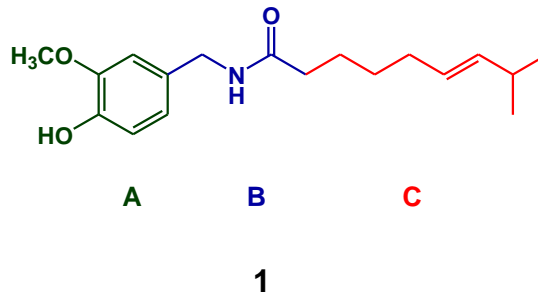
### 2.3 Capsaicina

La capsaicina es una sustancia derivada de la vainillilamina y el ácido-E-8-metilnon-6-enoico, su biosíntesis ocurre por la ruta del fenilpropanoide, en las glándulas de la placenta del fruto. Las semillas no son fuente de pungencia pero ocasionalmente absorben capsaicinoides al estar en contacto con la placenta<sup>14</sup>.

La capsaicina es el principal compuesto pungente del fruto del ají, fue aislada por primera vez en 1876<sup>15</sup> y caracterizada por Nelson en 1919<sup>16</sup>, identificándola como N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonenamida. La síntesis total de este producto natural fue reportada por primera vez por Crombie L, y colab. en 1955<sup>17</sup>.

Tiene un peso molecular de 305.42 y es insoluble en agua, pero soluble en aceite mineral y vegetal, etanol, éter, benceno y cloroformo. En su forma pura se presenta en cristales “monociclicos” translucidos que funden a 65 °C y ebulen a 210 – 220 °C<sup>18</sup>.

El análisis de la estructura de la capsaicina es más sencillo cuando se subdivide en tres regiones llamadas A, B y C (Figura 1)



**Figura 1.** Subdivisión de la molécula de capsaicina en tres regiones

La región B, contiene un grupo amido que es polar y hace de la capsaicina un compuesto de baja volatilidad y por ende completamente inodoro. Su larga cola hidrocarbonada de la región C es responsable del fuerte enlazamiento con la lipoproteína del receptor VR1 que contiene una cadena hidrocarbonada similar. Este nociceptor polimodal es sensible tanto al calor como a los estímulos mecánicos y químicos, que se encuentran en la piel y en las membranas mucosas. Como consecuencia de este acoplamiento la capsaicina produce un intenso sabor y una sensación de ardor muy persistente. La cola hidrocarbonada también permite a la molécula un desplazamiento por las membranas celulares ricas en lípidos, ocasionando por esto un ardor penetrante y persistente.

Finalmente la región A, corresponde al constituyente aromático, que produce un leve comportamiento hidrofílico de la molécula, porque presenta el grupo hidroxilo enlazado al anillo bencílico. Esta parte de la molécula es muy utilizada para la formación de derivados con la presencia de la función éter<sup>19</sup>.

La capsicina es una sustancia antiinflamatoria y analgésica, debido a que es un agente neuropéptido activo que produce dolor ardiente inicialmente, cuando estimula al receptor VR1, provocando la excitación de las neuronas y permitiendo a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  entrar a la célula nerviosa y liberar subsecuentemente neurotransmisores que generan la señal de dolor.

La exposición prolongada a esta sustancia insensibiliza los nociceptores terminales disminuyendo la actividad de las fibras sensoriales tipo C, para las cuales la capsicina es específica; afectando la síntesis, depósito y transporte de la sustancia P principal neurotransmisor del dolor desde la periferia hasta el sistema nervioso central (SNC)<sup>20</sup>.

La actividad antioxidante de la capsicina fue determinada por Henderson y Slickman<sup>21</sup> mediante un estudio comparativo con los antioxidantes: melatonina y butilato de hidroxitolueno (BHT). Ellos evaluaron por HPLC (fase reversa) los lípidos hidroperóxidos formados en la autoxidación del ácido linoleico, iniciada por el radical 2,2' - azobisisobutironitrilo, AIBN. Los resultados se registraron por absorción UV., detección electroquímica y luminiscencia. Ellos determinaron que la capsicina es un antioxidante más efectivo que la melatonina, suprimiendo la formación de lípidos hidroperóxidos, con menor eficiencia que la vitamina E.

También se ha demostrado experimentalmente que la capsicina es útil para controlar el dolor causado por la mucositis bucal encontrándose que después de

ingerir alimentos que contienen capsaicina o después de la aplicación de capsaicina en la mucosa oral inflamada, el dolor de la mucositis disminuye cuando mengua la sensación ardiente causada por ésta. Infortunadamente este estudio se limita a varios informes anecdóticos y a una serie de pequeños casos<sup>22</sup>.

Por su parte, Bhabadeb y colab.<sup>23</sup> encontraron que la capsaicina presenta una moderada actividad antifúngica, demostrada mediante la determinación de valores de concentración inhibitoria mínima de capsaicina (MIC) en diferentes dermatopías y hongos patógenos.

Según los resultados experimentales obtenidos por Abdel – Salam y colab.<sup>24</sup> la capsaicina crea un mecanismo de defensa local contra la úlcera gástrica mediante nervios sensoriales sensibles a esta. Experimentos que consistieron en la estimulación de nervios sensoriales sensibles a bajas concentraciones de capsaicina aplicada intragástricamente en ratas, demostraron que esta sustancia protege la mucosa gástrica contra daños producidos por diferentes agentes ulcerogénicos

Otra aplicación importante de este compuesto se refiere a su uso como insecticida y repelente; aplicación que le otorgó la clasificación de pesticida bioquímico por la EPA en 1991<sup>7</sup>, y el interés por su uso como sinergista con insecticidas organofosforados<sup>25</sup>.

A pesar de sus propiedades terapéuticas la capsaicina puede ser nociva en concentraciones altas e incluso en dosis terapéuticas. Al respecto Austin<sup>26</sup> describe que la capsaicina tiene efectos adversos sobre el sistema nervioso periférico, sobre varios centros importantes en el cerebro, y sobre el funcionamiento de enzimas y neuroproteínas. También son particularmente sensibles a los factores tóxicos de esta sustancia los vasos sanguíneos y el corazón. Una dosis de capsaicina es suficiente para destrozar casi toda la sustancia P de los ganglios de la raíz dorsal del sistema nervioso; esta pérdida conduce a la retención urinaria por parálisis parcial de la vejiga, así como a la disminución de la temperatura en el cuerpo o hipotermia.

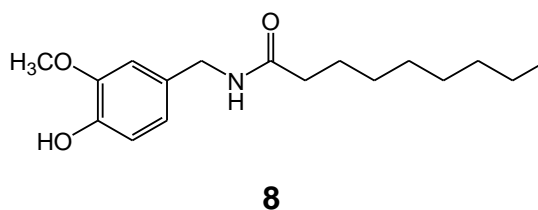
Aunque se han establecido dosis terapéuticas y tóxicas; Ko y colab.<sup>27</sup> determinaron que existen efectos citotóxicos con las concentraciones comerciales de capsaicina (0.025% y 0.075%) sobre queratinocitos y fibroblastos. Ellos desarrollaron queratinocitos y fibroblastos humanos en un cultivo de tejido y lo expusieron a varias concentraciones de capsaicina (0.025% a 0.2%). También sembraron en matrices de colágeno fibroblastos que fueron expuestos a la capsaicina para evaluar los efectos citotóxicos de este componente bajo la superficie de la piel. Los resultados obtenidos mostraron una reducción de queratinocitos entre el 21 y 31% en las diferentes concentraciones de capsaicina utilizada. Los fibroblastos también se redujeron entre el 5 y 10% durante las primeras seis (6) horas de exposición y hasta en un 30 % luego de transcurridas



veinticuatro (24) horas. Se estableció igualmente que a una concentración menor que 0.1%, la capsaicina penetra en la matriz de colágeno, degenerando los fibroblastos en la superficie y en el interior de la piel. Con estos experimentos se determinó que la capsaicina es tóxica a nivel de queratinocitos y de fibroblastos.

## 2.4 Vainillilnonanamida

La vainillilnonanamida (**8**) o también llamada nonivamida, es el capsaicinoide sintético análogo a la capsaicina conocido según la IUPAC como N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)nonanamida, que difiere de esta por la ausencia en la región C de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) en el carbono C-8 y un doble enlace en el carbono C-6 de la cadena carbonada.



Este compuesto es usado como adulterante en productos derivados del ají y en la industria farmacéutica. Posee el mismo grado de pungencia que la capsaicina. Según estudios realizados por Howard y Geoffrey, este compuesto hasta ahora conocido como sintético, fue aislado de la oleorresina del capsicum variando

desde 0.35 a 1.80 % comparado con el contenido total de capsaicinoides.

Usando modelos animales se ha demostrado que la nonivamida tiene una actividad de desensibilización similar a la capsaicina, sin embargo la efectividad de la capsaicina es mayor para la disminución de la respuesta del dolor<sup>28</sup>.

## **2.5 Prodrogas y síntesis de nuevos compuestos análogos a la capsaicina**

Como respuesta al desarrollo de la investigación sobre métodos para aumentar la eficacia de las drogas y reducir la toxicidad y efectos indeseables, surgió el concepto de Prodroga, una sustancia química derivada de una droga madre, biológicamente inactiva obtenida mediante transformaciones químicas y / o enzimáticas. Una vez dentro del cuerpo son liberadas y actúan en el sitio de interés. Las Prodrogas han sido ampliamente estudiadas como sustitutos de una gran variedad de drogas con el fin de eliminar sus efectos colaterales.

De otro lado, una variedad de carbohidratos, denominados O-glicósidos se encuentran en abundancia en los seres vivos, asociados a numerosos procesos bioquímicos. Estas sustancias son de interés en síntesis, medicina y especialmente en investigación farmacéutica; la O-glicosilación es un método útil para mejorar algunas propiedades de compuestos con actividad biológica. Particularmente permite convertir los compuestos hidrofóbicos en solubles, mejorando sus propiedades farmacológicas y reduciendo la toxicidad. Muchas

drogas que son aplicadas cutáneamente han sido modificadas para incrementar su efecto en el sitio de acción de la piel. En la década de los 80 Friend and Chang, prepararon glicósidos de un gran número de agentes antiinflamatorios, estos compuestos convertidos en moléculas hidrofílicas presentaron mejor acción sobre el sitio objetivo que los compuestos madre<sup>29</sup>.

El grado de toxicidad que presenta la capsaicina y su amplio espectro biológico han estimulado muchas investigaciones sobre la variación de la estructura química de la molécula para estudiar las características biológicas y la toxicidad de los análogos obtenidos.

En esta ruta Walpole, y colab.<sup>30,31,32,33</sup> han profundizado en el estudio de la citotoxicidad de capsaicinoides análogos, encontrando en algunos una actividad biológica semejante a la capsaicina, para esto se evaluó en cada uno la relación *insensibilización / irritación*. En la década pasada este grupo reportó diferentes actividades de análogos sintéticos, con variaciones modulares en la estructura de la capsaicina. En los productos evaluados se observó una respuesta positiva, mayoritariamente cuando estaba presente el extremo vainilloide.

Por otra parte, Katritzky A, y colab.<sup>34</sup> prepararon moléculas análogas con enlaces carbonato o éter. De los productos obtenidos evaluaron su descomposición bajo irradiación a 363 nm, determinando que los compuestos con enlace carbonato se descomponen a una relación mas baja que los compuestos enlazados mediante la

función éter; además las moléculas con dos grupos metoxi en sustituyente bencil se descomponen más lentamente que las moléculas con un grupo metoxi en dicho sustituyente. Al demostrar que se pierde la actividad del receptor vainilloide VR1, bloqueando el grupo fenol o modificando el tamaño de la cadena en la molécula de capsaicina, estas variaciones tienen como fin disminuir las propiedades irritantes de la capsaicina e incrementar la facilidad y seguridad de su uso mediante la síntesis de capsaicina fotoactiva que actúa cerca del sitio de acción causando una rápida y completa activación del receptor .

Teniendo en cuenta las glicosidaciones y en especial las O-glicosidaciones, Rosenberg y colaboradores, han desarrollado procedimientos para acoplar compuestos de platino con DNA, de igual manera Wang y colab.<sup>35</sup> sintetizaron y evaluaron la actividad biológica de un O-glicósido con una unidad de glucosa unida al cis-platino. Se demostró que esta molécula es tan activa como el cis-platino pero menos tóxico y más soluble en agua.

Otro procedimiento que involucra la O-glicosilación fue realizado por Mihara y colab.<sup>36</sup> Con N-vainillilnonanamida. En este artículo se describe la aplicación del producto obtenido como aditivo en alimentos y bebidas, mediante la reducción de la propiedad pungente, la capacidad de su liberación en el cuerpo por la acción de la glucosidasa y el incremento de solubilidad en agua.

En este mismo punto, el grupo de Kometani<sup>37</sup> ha contribuido al estudio de

compuestos con mejores características biológicas, mediante la biosíntesis de capsaicina- $\beta$ -D-glucopiranosido, el cual fue obtenido cuando se administró capsaicina en un cultivo de células en suspensión de *Coffe arabica*. Este estudio reveló la disminución de la pungencia y un incremento en la solubilidad en agua, marcando un posible uso de la capsaicina glicosilada como único ingrediente con actividad biológica en alimentos.

## **2.6 Catálisis por transferencia de fase**

En la síntesis orgánica, la catálisis por transferencia de fase es el principal camino para generar productos químicos con aplicaciones farmacéuticas, agentes de protección de plantas, colorantes, químicos fotográficos, monómeros, etc.

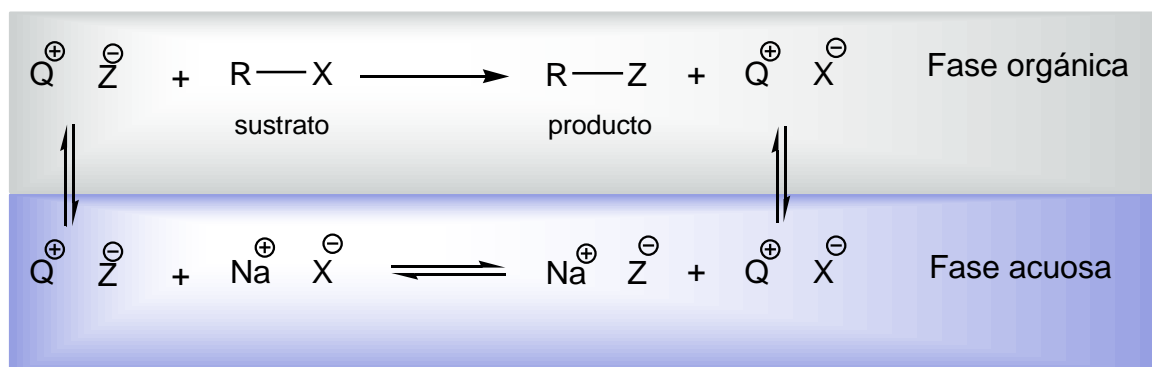
Esta metodología es aplicable a una gran variedad de reacciones en las que los aniones inorgánicos y orgánicos reaccionan con sustratos orgánicos. Consiste en el uso de un sistema heterogéneo de dos fases<sup>38</sup> en la que el sustrato permanece en la capa orgánica y el otro reaccionante que podría ser un nucleófilo se localiza en la fase acuosa.

Estas sustancias no reaccionarían en estas condiciones porque no podrían sufrir colisiones, para esto se añade una cantidad de catalizador denominado de transferencia de fase, que generalmente es una sal cuaternaria de amonio, un compuesto en el que se han reemplazado los hidrógenos del ión amonio por

grupos alquilo y por lo tanto es lipofílico, capaz de entrar en la fase orgánica.

Sin embargo, para equilibrar su cara positiva debe llevar consigo un anión, ocasionalmente su contraión original débilmente básico, que carece virtualmente de poder nucleofílico, de modo que no reacciona.

El nucleófilo tienen mayor probabilidad de ser conducido a la fase orgánica, donde estará medianamente solvatado y será muy reactivo, formando rápidamente el compuesto y liberando un ión halogenuro el cual es transportado a la fase acuosa por el catalizador de transferencia de fase en su migración de regreso. De esta manera el ión cuaternario de amonio se mueve entre las dos fases transportando el contraión original, los iones halogenuros y el nucleófilo. La catálisis se debe así a la transferencia del nucleófilo de una fase a otra (Figura 2)<sup>39</sup>.



**Figura 2.** Catálisis por transferencia de fase. El ión de amonio cuaternario ( $Q^+$ ) es tanto hidrofílico como lipofílico, se mueve entre la fase acuosa y la fase orgánica transportando un anión: el nucleófilo ( $Z^-$ ) o el grupo saliente ( $X^-$ ). En la fase orgánica el nucleófilo no está virtualmente solvatado y reacciona rápidamente con el sustrato ( $R-X$ ).

Uno de los trabajos iniciales utilizando transferencia de fase fue el propuesto por Krewster K y colaboradores<sup>40</sup> quienes sintetizaron ácido aril  $\beta$ -D-glucopiranosido y ácido aril  $\beta$ -D-glucopiranosidurónico con buenos porcentajes de rendimiento.

A finales de los años 80 la glicosilación a través de catálisis por transferencia de fase obtuvo especial atención, por el rendimiento, condiciones de reacción y alta estereoespecificidad. Por esta metodología Loganathan y Trivedi<sup>41</sup> en 1986 sintetizaron aril  $\beta$ -D-glucopiranosidos benzoilados y cinamatos  $\beta$ -D-glucopiranosil sustituidos con el propósito de entender la O-glicosidación por catálisis de transferencia de fase y extender esta metodología a la síntesis de esteres glicosilicos. En la misma línea, Roy y Tropper<sup>42</sup> bajo condiciones de catálisis por transferencia de fase obtuvieron aril- $\beta$ -D-N-acetilglucopiranosidos cuando trataron cloruro de 2-acetamida-3,4,6-tri-O-acetil-2-deoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosilo con una serie de fenóxidos.

### 3. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

El ají es un recurso agrícola que se encuentra difundido en varios países de Latinoamérica. En Colombia es explotado mayoritariamente por la industria alimenticia y su aplicación médica se limita netamente a la medicina tradicional. En el ají se encuentra el alcaloide conocido como capsaicina, una sustancia que potencialmente podría reportar beneficios por su acción analgésica. Sin embargo esta sustancia es tóxica, incluso en dosis terapéuticas, hasta el punto de causar la reducción en la concentración de queratinocitos y fibroblastos en la piel y la muerte de los nociceptores o la destrucción de sus terminales periféricos produciendo insensibilización permanente<sup>27</sup>. Estos efectos adversos han llevado a muchos investigadores a modificar la estructura de la capsaicina obteniendo diversos análogos que han sido evaluados en su actividad biológica y citotóxica

Dada la condición tóxica de la capsaicina, se planteó en este proyecto la exploración de metodologías sintéticas para la obtención O-glicósidos con modificación de la región A (Figura 1) por la adición de una unidad de azúcar, para lo cual se usaría D-glucosa y D-galactosa, dos monosacáridos con actividad biológica, considerando que los productos obtenidos podrían ser reconocidos y transportados hacia las células humanas.



Se pretende obtener compuestos, en conjunto con propiedades físicas y biológicas diferentes a las de la capsaicina, que podrían servir como prodrogas en el tratamiento del dolor, conforme actúa la capsaicina, una vez se haya producido la escisión del enlace O-glicósídico por hidrólisis del puente etéreo.

Otro punto que aborda esta investigación es la separación de la capsaicina de los demás componentes del fruto. En este documento, se recogen los resultados de la extracción y análisis por HPLC, en la búsqueda de un protocolo confiable para la separación y el análisis de capsaicina.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 GENERAL**

Sintetizar O-glicósidos análogos a la capsaicina, usando como material de partida la capsaicina aislada de la fuente natural.

### **4.2 ESPECÍFICOS**

Adecuar un método de extracción de capsaicina que garantice un buen rendimiento y un alto grado de pureza.

Sintetizar análogos O-glicósidos de la capsaicina, mediante reacciones de O-glicosidación, con diversos bromuros de glicopiranosidos peracetilados derivados, de monoazúcares con actividad biológica.

Caracterizar los componentes sintetizados mediante técnicas espectroscópicas convencionales de IR y RMN.

Mejorar las características de solubilidad de la capsaicina mediante la incorporación de monosacáridos.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El ají en Colombia es económicamente poco atractivo, al parecer por los pocos estímulos que el estado brinda para el fomento de su cultivo. Hasta ahora ha sido explotado principalmente como saborizante en la industria alimenticia, en este plano podría decirse que la producción de ají apenas está comenzando a extenderse con propósitos comerciales.

En otra perspectiva, en nuestro país el ají tiene algunas aplicaciones homeopáticas y su uso se ha limitado a esto, excluyendo el beneficio particular de los componentes activos como la capsaicina **1**, desaprovechándose su potencialidad, reconocida en el campo de la industria farmacéutica como analgésico y antiinflamatorio.

Desde el punto de vista biológico, es de interés particular la síntesis de complejos con diversos ligandos, partiendo de moléculas biológicamente activas, que se desean modificar especialmente para reducir riesgos de toxicidad, mejorar transporte, etc. Una parte de esta síntesis corresponde a los O-glicósidos que se proponen aquí y que constituyen una buena alternativa en el campo de las prodrogas. Estas sustancias serían obtenidas a partir de dos monosacáridos y la capsaicina, modificando posiblemente la acción de este producto natural. Estos

compuestos podrían ser muy útiles por su constitución y diversidad estereoquímica y además podrían resultar atractivos en el desarrollo de nuevas drogas.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

La metodología de este trabajo se desarrolló utilizando reactivos y solventes de grado reactivo, para análisis o grado HPLC, según lo exigiera el procedimiento. En la siguiente sección se listan los reactivos y solventes utilizados así como los instrumentos empleados para la caracterización de los compuestos obtenidos

#### 6.1.1 Reactivos

Ácido bromhídrico en ácido acético 30 %

Anhídrido acético

Bicarbonato de sodio

Bromuro de N-cetil, N,N,N-trimetilamonio

Capsaicina 65% - Dihidrocapsaicina 35 %

Carbón activado

Carbonato de potasio

Cloruro de calcio

Cloruro de sodio

Envicarb ®

Galactosa

Glucosa

Hidróxido de sodio

LC-18 ®

Metóxido de sodio

N-vainillilnonanamida

Piridina

Sulfato de sodio

### **6.1.2** Solventes

Acetato de etilo

Acetona

Acetonitrilo

Benceno

Cloroformo

Diclorometano

Éter de petróleo

Hexano

Metanol

### 6.1.3 Equipos

HPLC Hewlett Packard 1100, equipado con bomba cuaternaria G1311A y detector Uv-Vis G1314A, (Universidad del Cauca).

RMN BRUKER. 400 MHz, (Universidad Nacional - Bogotá)

RMN BRUKER. 300 MHz, (Universidad de Antioquia – Medellín)

Espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier ATI Mattson Géminis, (Universidad del Cauca).

Espectrofotómetro ultravioleta – visible. INTRALAB (Universidad del Cauca)

## 6.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINA DEL FRUTO DEL AJÍ

### 6.2.1 Muestra

La muestra de ají Cayenne se recolectaron en la zona norte del Cauca y presentó las siguientes características físicas:

**Tabla 3.** Características físicas de la muestra de ají

<b>Característica física</b>	<b>Descripción</b>
color	Rojo
forma	Alargado
tamaño	4 cm aproximadamente
estado	Maduro

Este material se secó en invernadero durante 5 días hasta garantizar una alta pérdida de agua, luego se molió incluyendo las semillas.

### 6.2.2 Extracción

La extracción de oleorresina se desarrolló mediante 2 métodos, evaluando 3 solventes: acetona, acetonitrilo y metanol.



### Extracción por Ultrasonido

Se pesó 1.5 g de muestra seca y molida, se adicionó 50 mL del solvente extractor y se llevó al ultrasonido por 1h manteniendo el baño de agua a 36 °C, terminada la extracción se filtró y se aforó a 50 mL con el solvente utilizado en la extracción.

### Extracción por soxhlet

Se pesó 1.5 g de muestra seca y molida, se adicionó 90 mL de solvente extractor y se llevó a reflujo en un sistema soxhlet convencional hasta que el solvente de la cámara del sistema de extracción estuviera incoloro. Se concentró y se aforó a 50 mL con el solvente utilizado para la extracción.

### **6.2.3** Purificación

La limpieza de las muestras se llevó a cabo mediante la extracción en fase sólida utilizando como fases estacionarias carbón activado, Envicarb® y LC-18. Los cartuchos se acondicionan con 2 volúmenes de acetonitrilo, seguidos de 2 volúmenes de agua y 1 volumen de acetonitrilo. Se eluyeron 2 mL de muestra y se lavó con 2 volúmenes de acetonitrilo. Las muestras recogidas se aforaron a 10 mL con acetonitrilo.

#### 6.2.4 Análisis de extractos

El análisis por HPLC se realizó bajo las siguientes condiciones:

**Equipo:** Hewlett Packard 1100, equipado con bomba cuaternaria G1311A y detector Uv-Vis G1314A

**Columna:** Hypersil ODS 4.0 x 250 /min x 5 $\mu$ m

**Longitud de onda:** 280 nm

**Fase móvil:** 70 % acetonitrilo 30 % agua

**Flujo:** 0.5 mL/min

**Tiempo de corrida:** 10 min

**Presión:** 37 bar

**Tiempos de retención:** 6.6 min capsaicina, 7.7 min dihidrocapsaicina

**Patrón:** Sigma capsaicina 65 % - dihidrocapsaicina 35 %

## 6.3 SÍNTESIS DE O-GLICÓSIDOS ANÁLOGOS DE CAPSAICINA

### 6.3.1 ACETILACIÓN DE AZÚCARES

**Procedimiento General.** En un balón de fondo redondo con barra magnética y rubber septum se mezcló a temperatura ambiente 1.00 mmol del glicopiranosido, 6.00 mmol de anhídrido acético en piridina. La mezcla se agitó durante 3 horas hasta que se observó la desaparición del glicopiranosido de partida por cromatografía de capa delgada (CCD), eluente n-butanol - ácido acético – agua (12 : 3 : 5).

Enseguida se adicionó 6 mL de agua acidulada y 6 mL de diclorometano. La fase orgánica se separó y rota-evaporó hasta eliminar totalmente el solvente, obteniéndose los glicopiranosidos pentacetilados correspondientes.

### 6.3.2 BROMUROS DE GLICOPIRANOSILOS PERACETILADOS

**Procedimiento General.** En un balón de fondo redondo con barra magnética y rubber septum se mezcló a temperatura ambiente y bajo agitación magnética 1.00 mmol del glicopiranosido peracetilado con 2.34 mL de solución de bromuro de hidrógeno en ácido acético al 30 %. La mezcla se agitó durante 4 horas hasta que se observó la desaparición del glicopiranosido de partida por cromatografía de capa delgada (CCD), eluyente acetato de etilo / éter de petróleo al 40 %.

Enseguida se depositó la mezcla de reacción en 6 mL de cloroformo frío, por cada mmol de sustrato y se neutralizó con solución saturada y fría de bicarbonato de sodio, presentándose evolución de gas. La capa orgánica más densa, se separó y se secó con sulfato de sodio, el solvente se eliminó por rota-evaporación. El crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna relámpago (CCR) con elusión por gradiente con acetato de etilo / éter de petróleo. Las fracciones de interés fueron colectadas y rota-evaporadas, obteniéndose el bromuro puro como un sólido blanco.

#### **Obtención de bromuro de 2,3,4,6 –tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo 21.**

Se usó 1.0 g (2.56 mmol) de penta acetato de  $\alpha$ -D-glucosa **17** y 6.0 mL de solución al 30 % en peso de ácido bromhídrico en ácido acético. Rendimiento: 94%. R<sub>f</sub> = 0.55 (40% acetato de etilo / éter de petróleo).

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.59 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz, **H-1**), 5.54 (dd, 1H,  $J = 9.6$ , 10.0 Hz, **H-3**), 5.14 (dd, 1H,  $J = 9.2$ , 10.8 Hz, **H-4**), 4.82 (dd, 1H,  $J = 4.0$ , 10.0 Hz, **H-2**), 4.32 – 4.25 (m, 2H, **H's-5,6**), 4.10 (d, 1H,  $J = 10.8$  Hz, **H-6**), 2.07 (s, **CH<sub>3</sub>**), 2.06 (s, **CH<sub>3</sub>**), 2.02 (s, **CH<sub>3</sub>**), 2.0 (s, **CH<sub>3</sub>**).

### **Obtención de bromuro de 2,3,4,6 –tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosilo 22.**

Se usó 1.0 g (2.56 mmol) de penta-acetato de  $\alpha$ -D-galactosa **18** y 6.0 mL de solución al 30 % en peso de ácido bromhídrico en ácido acético. Rendimiento: 92%.  $R_f = 0.55$  (40% acetato de etilo / éter d petróleo).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.68 (d, 1H,  $J = 3.9$  Hz, **H-1**), 5.50 (dd, 1H,  $J = 1.2$ , 3.3 Hz, **H-4**), 5.39 (dd, 1H,  $J = 3.3$ , 10.5 Hz, **H-3**), 5.04 (dd, 1H,  $J = 3.9$ , 10.5 Hz, **H-2**), 4.47 (ddd, 1H,  $J = 1.2$ , 6.3, 7.2 Hz, **H-5**), 4.16 (dd, 1H,  $J = 6.3$ , 11.2 Hz, **H-6'**), 4.08 (dd, 1H,  $J = 7.2$ , 11.2 Hz, **H-6**), 2.14 (s, **CH<sub>3</sub>**), 2.10 (s, **CH<sub>3</sub>**), 2.05 (s, **CH<sub>3</sub>**), 2.00 (s, **CH<sub>3</sub>**).

### 6.3.3 SÍNTESIS DE O-GLICÓSIDOS PERACETILADOS

#### 6.3.3.1 O-glicosidación del bromuro de 2,3,4,6 –tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo **21**

En un balón de fondo redondo de dos bocas se pesó 1 mmol. de carbonato de potasio y se conectó a un condensador de reflujo. Inmediatamente se inyectó 1.0 mL de acetona y se agitó hasta disolución. Posteriormente se adicionó 0.5 mmol de N-vanillilnonanamida **8** y se disolvió con agitación durante aproximadamente 10 minutos. Pasado este tiempo se agregaron 0.5 mmol. de Bromuro de 2,3,4,6 –tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo **21** disueltos en 1.0 mL de acetona y se colocó una trampa de cloruro de calcio. La mezcla se calentó a 55 – 60 °C con baño de glicerina y agitación constante, hasta que por CCD se observó el consumo del bromuro de glucopiranosilo **21** de partida.

Finalizada la reacción se adicionó salmuera y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica una vez separada se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta sequedad. El crudo se purificó mediante CCR obteniendo tres compuestos. Esta reacción se intentó de nuevo con algunas modificaciones, en cantidad de sustrato, temperatura, catalizador y base, estos parámetros son recopilados en la Tabla 6. Los datos espectroscópicos para los compuestos sintetizados se relacionan a continuación:

### 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-eno-glucopiranosilo 26

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.65 (s, 1H, **H-1'**), 5.60 (d, 1H, J = 4.3 Hz, **H-3'**), 5.25 (t, 1H, J = 5.0 Hz, **H-4'**), 4.45 (dd, 1H, J = 6.5, 11.4 Hz, **H-6'a**), 4.40 (,1H, J = Hz, H-5'), 4.25 (dd, 1H, J = 2.9, 11.4 Hz, **H-6'b**), 2.10 (3s, 12H, **OAc**).

### N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)bencil] nonanamida 25

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.05 (d,1H, J = 8.4 Hz, **Hc-arom**), 6.82 (d, 1H, J = 2.0 Hz, **Ha-arom**), (dd, 1H, J = 1.8, 8.2 Hz, **Hb-arom**), 5.72 (1H, **NH ancho**), 5.27 (m, 1H, J = 4.0 Hz, **H-3'**), 5.17 (d, 1H, J = 8.0 Hz, **H-2'**), 5.15 (dd, 1H, J = 4.8, 14.8 Hz, **H-4'**), 4.91 (d, 1H, J = 8.0 Hz, **H-1'**), 4.38 (d, 2H, J = 5.6 Hz, **H-1**), 4.27 (dd, 1H, J = 4.8, 12.8 Hz, **H-6'a**), 4.15 (dd, 1H, J = 2.4,12.4 Hz, **H-6'b**), 3.80 (s, 3H, **MeO**), 3.74 (ddd, 1H, J = 2.4, 4.8, 14.4, **H-5'**), 2.20 (t, 2H, J = 7.4 Hz, **H-3**), 2.08 (s, 3H, **OAc**), 2.07 (s, 3H, **OAc**), 2.03 (s, 6H, **OAc**), 1.66 –1.63 (m, 2H, J = 7.4 Hz, **H-4**), 1.31 – 1.21 (m, 10 Hz, **H-5 – H-9**), 0.87 (t, 3H, J = 6.8 Hz, **H-10**).

IR: δ 3200 (**NH st**), 2924 –2852 (**C-H sp<sup>3</sup>**), 1745 (**C=O st**), 1640 (**N-C=O st**), 1224 (**C-O st**), 1200 (**C-C**).

### 6.3.3.2 O-glicosidación por catálisis con transferencia de fase

**Procedimiento General.** En un balón de dos bocas equipado con barra magnética, se pesó 1.0 mmol. del bromuro de glicopiranosilo peracetilado, 2.0 mmol. de N-vanillilnonanamida y 1.0 mmol de bromuro N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (catalizador). El balón se conectó al condensador de reflujo provisto de una trampa de cloruro de calcio y enseguida se adicionó 3.65 mL de diclorometano, se agitó hasta disolución completa y luego se adicionó 3.65 mL de solución de hidróxido de sodio 1.0 M, se agitó a temperatura ambiente hasta que el bromuro de partida se agotó. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con hidróxido de sodio (2 x 15 mL), agua destilada (2 x 15 mL) y salmuera (1 x 10 mL), luego se secó con sulfato de sodio, y rota-evaporó hasta la eliminación total del solvente. El crudo se purificó por CCR utilizando un gradiente de acetato de etilo / éter de petróleo.

#### **Obtención de N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glupiranosiloxi)bencil]nonanamida 25**

Se usó 100.0 mg de bromuro de 2,3,4,6 –tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo **21** , 142.6 mg de N-vanillilnonanamida **8** y 88.56 mg de bromuro N-cetil-N,N,N-trimetilamonio. Se obtuvo un sólido de color amarillo claro. Rendimientos: 41%, 53%, 51%, 52%.  $R_f = 0.05$  (40% acetato de etilo / éter de petróleo).



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.05 (d, 1H, J = 8.4 Hz, **Hc-arom**), 6.82 (d, 1H, J = 2.0 Hz, **Ha-arom**), (dd, 1H, J = 1.8, 8.2 Hz, **Hb-arom**), 5.72 (1H, NH ancho), 5.27 (m, 1H, J = 4.0 Hz, **H-3'**), 5.17 (d, 1H, J = 8.0 Hz, **H-2'**), 5.15 (dd, 1H, J = 4.8, 14.8 Hz, **H-4'**), 4.91 (d, 1H, J = 8.0 Hz, **H-1'**), 4.38 (d, 2H, J = 5.6 Hz, **H-1**), 4.27 (dd, 1H, J = 4.8, 12.8 Hz, **H-6'a**), 4.15 (dd, 1H, J = 2.4, 12.4 Hz, **H-6'b**), 3.80 (s, 3H, **MeO**), 3.74 (ddd, 1H, J = 2.4, 4.8, 14.4, **H-5'**), 2.20 (t, 2H, J = 7.4 Hz, **H-3**), 2.08 (s, 3H, **OAc**), 2.07 (s, 3H, **OAc**), 2.03 (s, 6H, **OAc**), 1.66 – 1.63 (m, 2H, J = 7.4 Hz, **H-4**), 1.31 – 1.21 (m, 10 Hz, **H-5 – H-9**), 0.87 (t, 3H, J = 6.8 Hz, **H-10**).

IR: δ 3200 (**NH st**), 2924 – 2852 (**C-H sp<sup>3</sup>**), 1745 (**C=O st**), 1640 (**N-C=O st**), 1224 (**C-O st**), 1200 (**C-C**).

### **Obtención de N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosiloxi)bencil]nonanamida 27**

Se usó 100.0 mg de bromuro de 2,3,4,6 –tetra-O-acetil-α-D-galactopiranosilo **22**, 142.6 mg de N-vanillilnonanamida **8** y 88.56 mg de bromuro N-cetil-N,N,N-trimetilamonio. Se obtuvo un líquido muy viscoso de color amarillo claro. Rendimientos: 56%, 53%, 62%. R<sub>f</sub> = 0.06 (40% acetato de etilo / éter de petróleo).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.07 (d, 1H, J = 8.0 Hz, **H-c-arom**), 6.84 (d, 1H, J = 2.0 Hz, **H-a-arom**), 6.77 (dd, 1H, J = 2.0, 8.0 Hz, **H-b-arom**), 5.83 (t, 1H, NH), 5.49

(dd, 1H, J = 8.0, 10.4 Hz, **H-2'**), 5.43 (d, 1H, J = 2.4 Hz, **H-4'**), 5.09 (dd, 1H, J = 3.4, 10.8 Hz, **H-3'**), 4.87 (d, 1H, J = 8.0 Hz, **H-1'**), 4.38 (d, 2H, J = 5.6 Hz, **H-1**), 4.22 (dd, 1H, J = 6.8, 11.2 Hz, **H-6'a**), 4.15 (dd, 1H, J = 6.6, 11.4 Hz, **H-6'b**), 3.96 (dd, 1H, J = 7.2, 6.4 Hz **H-5'**), 3.81 (s, 3H, **OMe**), 2.21 (t, 2H, J = 7.6 Hz, **H-3**), 2.18 (s, 3H, **OAc**), 2.09 (s, 3H, **OAc**), 2.04 (s, 3H, **OAc**), 2.01 (s, 3H, **OAc**), 1.67 – 1.61 (m, 2H, J = 7.2 Hz, **H-4**), 1.37 – 1.22 (m, 10H, **H-5 – H-9**), 0.89 (t, 3H, J = 6.8 Hz, **H-10**).

#### 6.3.4 DESPROTECCIÓN DE O-GLICÓSIDOS ACETILADOS

**Procedimiento General.** En un balón previamente equipado con barra magnética se pesó 1 mmol del O- glicósido peracetilado y se adicionó 18.6 mL de la mezcla al 50% de metanol / benceno, la solución se agitó hasta disolución completa. Luego se adicionó 0.45 mL de metóxido de sodio en metanol 1.0 M y se continuó agitando hasta que el material de partida se consumió completamente. Finalizada la reacción se adicionó 20 mL de hexano, se congeló y el sólido que precipitó se recristalizó de éter etílico.

#### Obtención de N-[3-metoxi-4-(β-D-glupiranosiloxi)bencil]nonanamida 31

Se usó 95.7 mg de O-glucósido peracetilado **25**, 2.8 mL de mezcla 50 % metanol / benceno y 0.067 mL de metóxido de sodio en metanol 1.0 M. Rendimiento 88 %,

Rf = 0.56 (doble elusión:40% acetato de etilo / éter de petróleo y 80 % cloroformo / metanol).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) : δ 8.28 (t, 1H, **NH**), 7.04 (d, 1H, J = 8.4 Hz, **Hc-arom**), 6.89 (d, 1H, J = 2.0 Hz, **Ha-arom**), 6.76 (dd, 1H, J = 1.8, 8.2 Hz, **Hb-arom**), 4.89 (d, 1H, J = 7.2, **H-1'**), 4.22 (d, 2H, J = 5.6 Hz, **H-1**), 3.77 (s, 3H, **MeO**), 3.69 (d, 1H, J = 10.4 Hz, **H-4'**), 3.50 – 3.45 (m, **H-5' – H-6'**), 3.30 (**H-2'**), 3.20 (**H-3'**), 2.15 (t, 2H, J = 7.4 Hz, **H-3**), 1.56 – 1.53 (m, 2H, J = 6.8 Hz, **H-4**), 1.31 – 1.28 (m, 10H, **H-5 – H-9**), 0.89 (t, 3H, J = 6.8 Hz, **H-10**).

### **Obtención de N-[3-metoxi-4-(β-D-glupiranosiloxi)bencil]nonanamida 32**

Se usó 170 mg. De O-glucósido peracetilado **27**, 4.6 mL de mezcla 50 % metanol / benceno y 0.116 mL de metóxido de sodio en metanol 1.0 M. Rendimiento 91%, Rf = 0.57 (doble elusión:40% acetato de etilo / éter de petróleo y 80 % cloroformo / metanol).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) : δ 8.10 (t, 1H, **NH**), 7.03 (d, 1H, J = 8.4 Hz, **Hc-arom**), 6.85 (d, 1H, J = 2.0 Hz, **Ha-arom**), 6.76 (dd, 1H, J = 8.4, 2.0 Hz, **Hb-arom**), 4.79 (d, 1H, J = 8.0 Hz, **H-1'**), 4.24 (s, 2H, **H-1**), 3.83 (d, 1H, J = 3.2 Hz, **H-4'**), 3.79 (s, 3H, **MeO**), 3.70 (dd, 1H, J = 7.8, 9.4 Hz, **H-2'**), 3.65 (dd, 1H, J = 6.0, 10.4 Hz, **H-6'c**), 3.59 (d, 1H, J = 4.8 Hz, **H-5'**), 3.53 (dd, 1H, J = 6.0, 12.4 Hz, **H-6'b**), 3.47 (dd, 1H, J = 3.6, 9.6 Hz, **H-3'**), 2.16 (t, 2H, J = 7.4 Hz, **H-3**), 1.59 – 1.56 (m, 2H, J = 7.0 Hz, **H-4**), 1.35 – 1.19 (m, 10H, **H-5 – H-9**), 0.87 (t, 3H, J = 6.8 Hz, **H-10**).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 EXTRACCIÓN DE CAPSAICINA Y ANÁLISIS POR HPLC

Cumpliendo con el objetivo de generar una metodología para la extracción de capsaicina, se desarrollaron dos métodos: extracción soxhlet y percolación con ultrasonido. Con estas dos metodologías se evaluó la capacidad extractiva de tres solventes, acetona, acetonitrilo y metanol. Las condiciones utilizadas en cada uno de los métodos se exhiben en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones para la extracción de capsaicina por soxhlet y ultrasonido.

n	Método	Solvente (mL)	Tiempo (h)	Temp. (°C)	Características del extracto
1	Ultrasonido	Acetona 50	1	36	color anaranjado opaca
2	Ultrasonido	Acetonitrilo 50	1	36	color anaranjado translucido
3	Ultrasonido	Metanol 50	1	36	color anaranjado-rojizo
4	Soxhlet	Acetona 90	12	56	color anaranjado oscuro translucido
5	Soxhlet	Acetonitrilo 90	16	81	color anaranjado opaca
6	Soxhlet	Metanol 90	16	65	color anaranjada opaca mas que la anterior

Los extractos obtenidos presentaron un color anaranjado y al concentrarse un

color vinotinto, probablemente por la presencia de gran variedad de carotenoides. Para la purificación de la capsaicina se utilizó inicialmente CCR, empleando sílica y acetato de etilo / éter de petróleo con gradiente de concentración, logrando disminuir el contenido de pigmentos. Otra alternativa empleada fue la extracción con fase sólida (EFS). Inicialmente se evaluaron diferentes rellenos para determinar cual eliminaba mas color; los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla.

**Tabla 5.** Rellenos de EFS evaluados

Relleno	Retención de color
Sílica	-
Tierra diatomeas	-
Azúcar	-
Bentonita	-
Envicarb	+
Carbón activado	+
C18	+/-

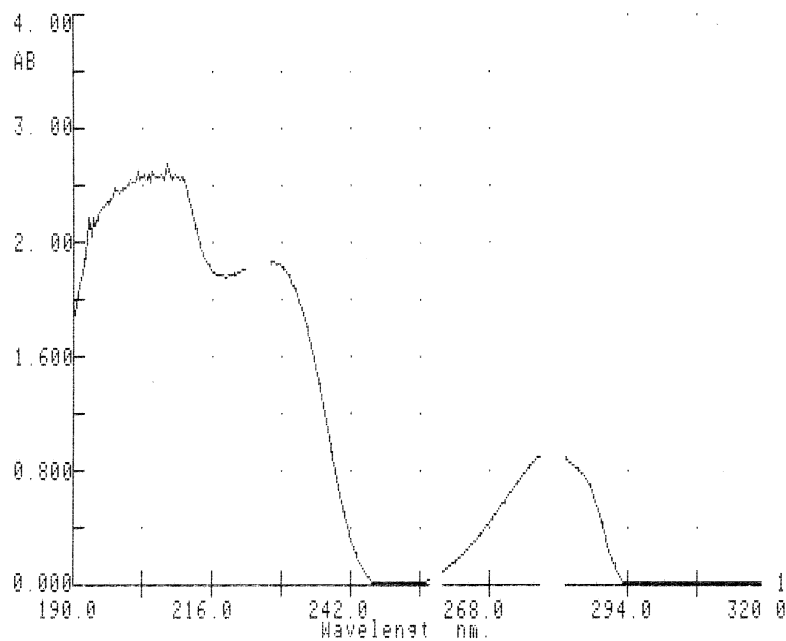
Los símbolos negativos indican que la retención de compuestos coloreados fue casi nula y las muestras obtenidas luego de la extracción con estos materiales presentan el mismo color encontrándose en ellas capsaicina, lo cual se comprobó mediante CCD. En cuanto al relleno C-18, aunque dejó un leve color amarillo, redujo notablemente el color inicial. Por su parte, el ENVICARB® dejó las muestras casi incoloras y el carbón activado las decoloró completamente. No obstante, cuando se evaluaron por CCD las extracciones obtenidas con estas tres fases estacionarias, no se observa presencia de capsaicina con el carbón

activado, sin embargo se incluyó en el análisis por HPLC.

### 7.1.1 Curvas de calibración

Para determinar la cantidad de capsaicina en las muestras se realizó la curva de calibración correspondiente. El patrón utilizado para este fin contiene 65 % de capsaicina y 35 % de dihidrocapsaicina por lo cual se decidió paralelamente construir la curva de dihidrocapsaicina.

Con el fin de determinar la mejor longitud de onda para la detección de capsaicina se registró su espectro de absorbancia en acetonitrilo y se escogió la mejor longitud de onda a 280 nm (Figura 3).

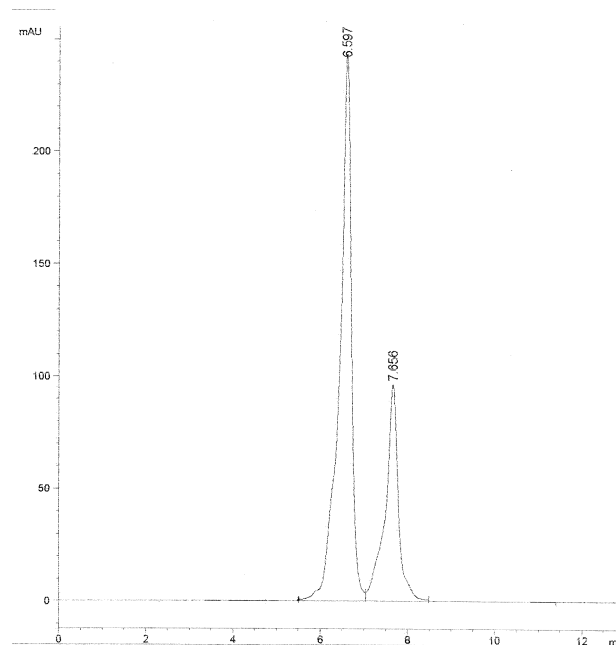


**Figura 3.** Espectro de absorbancia de capsaicina

Se realizaron ensayos para encontrar las condiciones adecuadas de separación y resolución de los picos en el cromatograma, en la tabla 6, se resumen estos valores.

**Tabla 6.** Condiciones para análisis de capsaicina por HPLC

Condición	Valores
Columna	C18
Flujo	0.5 mL/min.
Fase móvil	70% ACN – 30 % H <sub>2</sub> O
Detector	UV 280 nm
Temperatura	ambiente
Presión	37 bar

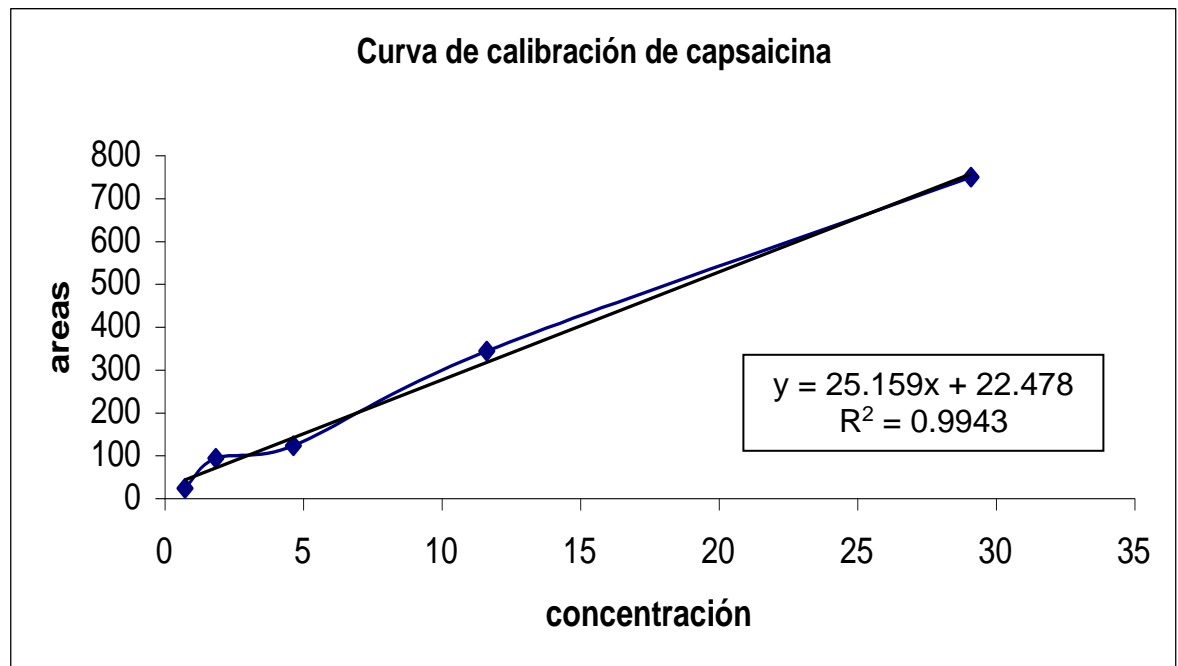


**Figura 4.** Cromatograma del patrón capsaicina 65 % (6.6 min.) - dihidrocapsaicina 35% (7.7 min.), bajo las condiciones resumidas en la Tabla 6.

A continuación se muestran los datos y las gráficas obtenidas para las curva de calibración de capsaicina y dihidrocapsaicina

**Tabla 7.** Datos para la curva de calibración de capsaicina

X	y
29.12	747.07
11.65	341.22
4.66	120.26
1.87	91.54
0.75	21.19
PENDIENTE	25.1590062
INTERCEPTO	22.4779506
R	0.99713997

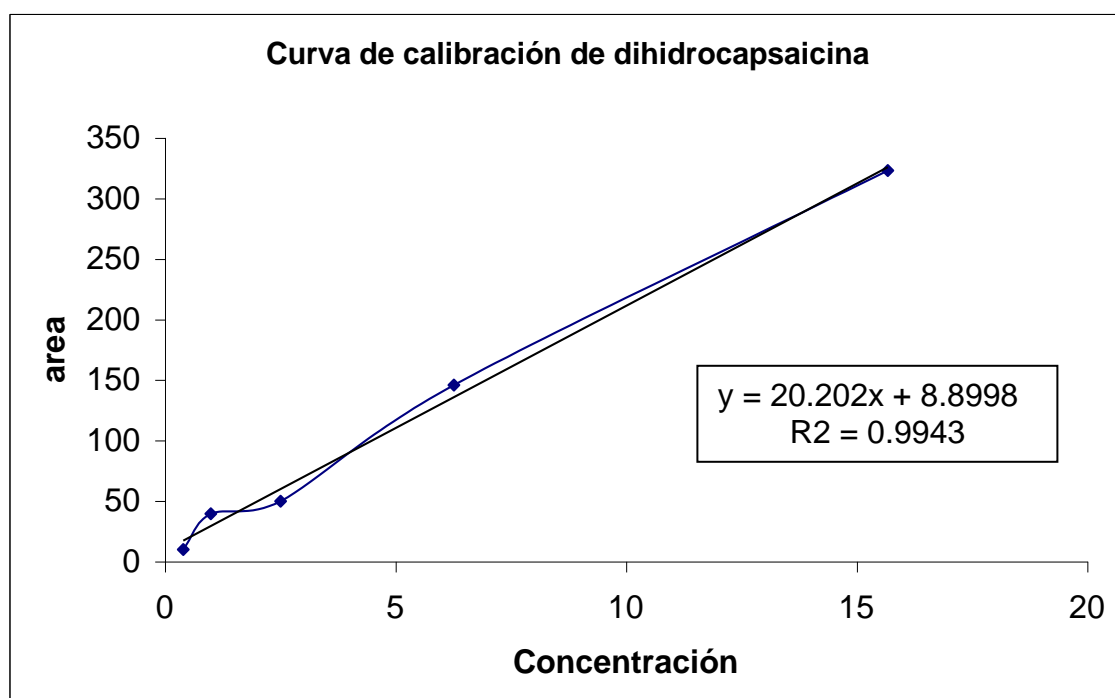


**Figura 5.** Curva de calibración de capsaicina



**Tabla 8.** Datos para la curva de calibración de dihidrocapsaicina

X	y
15.68	322.77
6.27	145.65
2.51	49.56
1	39.33
0.4	9.6
PENDIENTE	20.201505
INTERCEPTO	8.8998175
R	0.9971583



**Figura 6.** Curva de calibración de dihidrocapsaicina

### 7.1.2 Análisis de extractos por HPLC

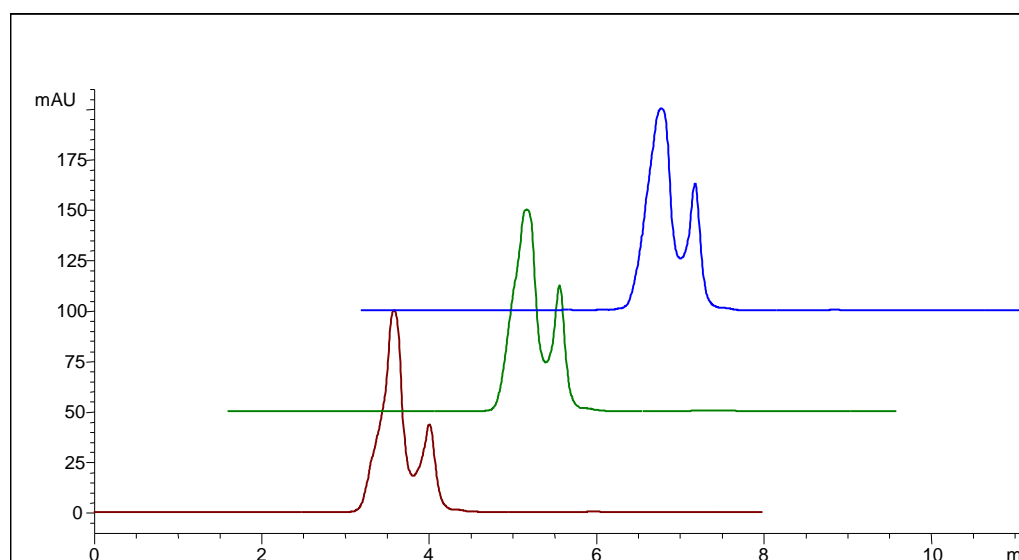
La concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina para las muestras extraídas y tratadas con EFS en mg/g de muestra seca se relacionan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina extraída por g de muestra seca

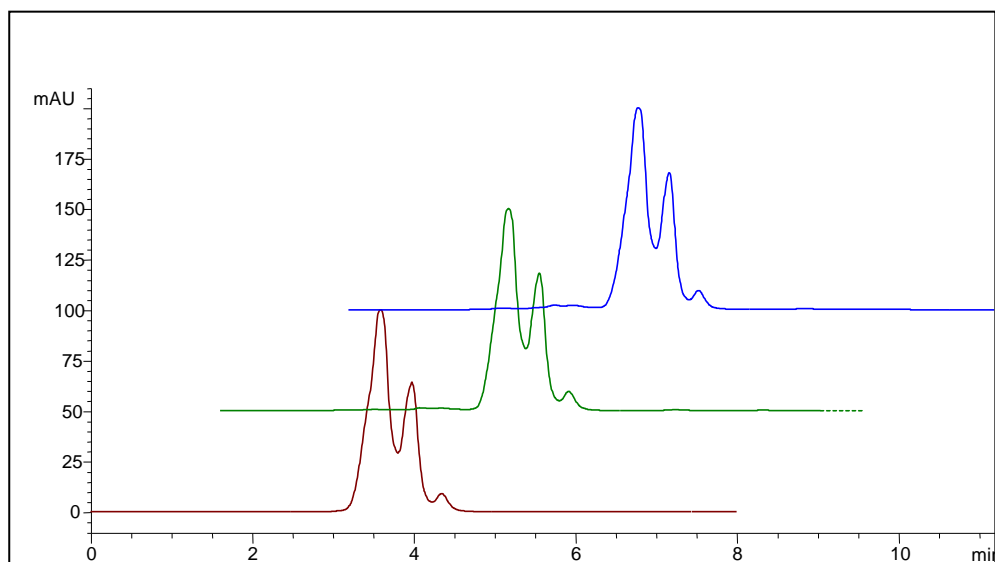
<b>Método extracción</b>	<b>Relleno EFS</b>	<b>Solvente extracción</b>	<b>Concentración Capsaicina mg/g</b>	<b>Concentración Dihidrocapsaicina mg/g</b>
<b>Ultrasonido</b>	Carbón activado	acetona	0.00	0.00
	Envicarb	acetona	0.20	0.46
	C-18	acetona	0.27	0.37
	Carbón activado	acetonitrilo	0.00	0.00
	Envicarb	acetonitrilo	0.43	0.38
	C-18	acetonitrilo	0.29	0.35
	Carbón activado	metanol	0.00	0.00
	Envicarb	metanol	0.72	0.58
	C-18	metanol	0.5	0.55
<b>Soxhlet</b>	Carbón activado	acetona	0.00	0.00
	Envicarb	acetona	0.69	0.50
	C-18	acetona	0.51	0.51
	Carbón activado	acetonitrilo	0.00	0.00
	Envicarb	acetonitrilo	0.82	0.63
	C-18	acetonitrilo	0.54	0.58
	Carbón activado	metanol	0.00	0.00
	Envicarb	metanol	0.64	0.98
	C-18	metanol	0.98	0.83

En la Tabla 9, se puede observar que para todas las muestras tratadas con los cartuchos fabricados con carbón activado, el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina es 0.00 mg/g de ají seco. Esto indica fuertes interacciones de estas sustancias y de los componentes del extracto con el adsorbente, de forma que los pigmentos y la capsaicina de la muestra quedan totalmente retenidos. Al analizarlas por HPLC, no se observa la presencia de ningún compuesto.

En los cromatogramas de todas las extracciones con acetona se observan interferencias debidas a los carotenoides, es importante tener en cuenta que las extracciones soxhlet muestran la presencia de tres picos en esta región (4.0 - 5.5 min.) lo cual no se observa cuando se trabajó bajo las condiciones de ultrasonido (Figura 7 y 8).

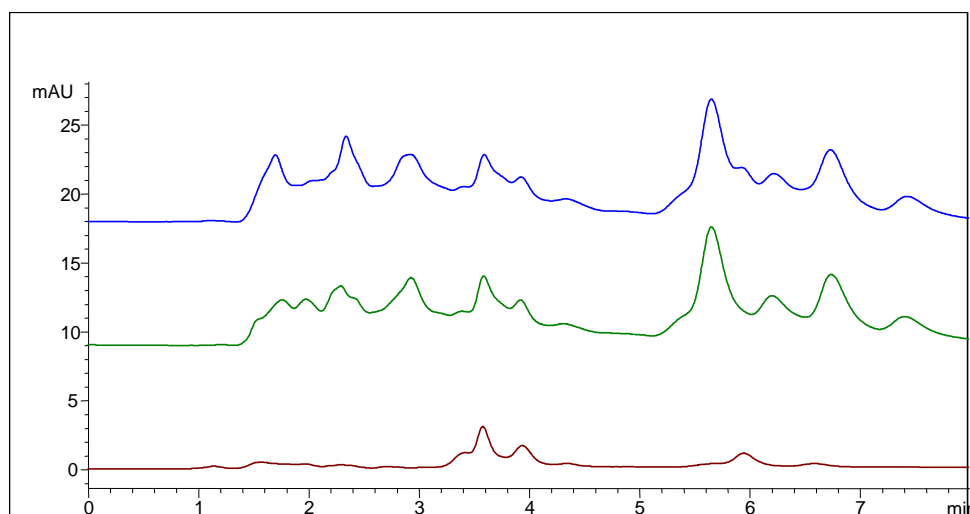


**Figura 7.** Comparación de cromatogramas de las extracciones con ultrasonido-acetona purificadas a través EFS con carbón activado (—), Envicarb (—) y LC-18 (—).

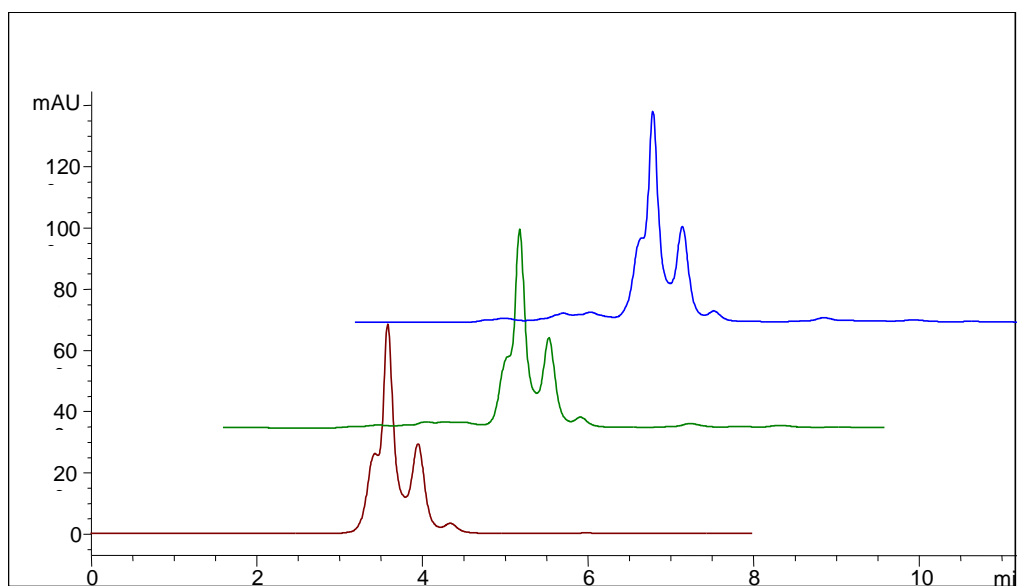


**Figura 8.** Comparación de cromatogramas de las extracciones con soxhlet-acetona purificadas a través EFS con carbón activado (—), Envicarb (—) y LC-18 (—).

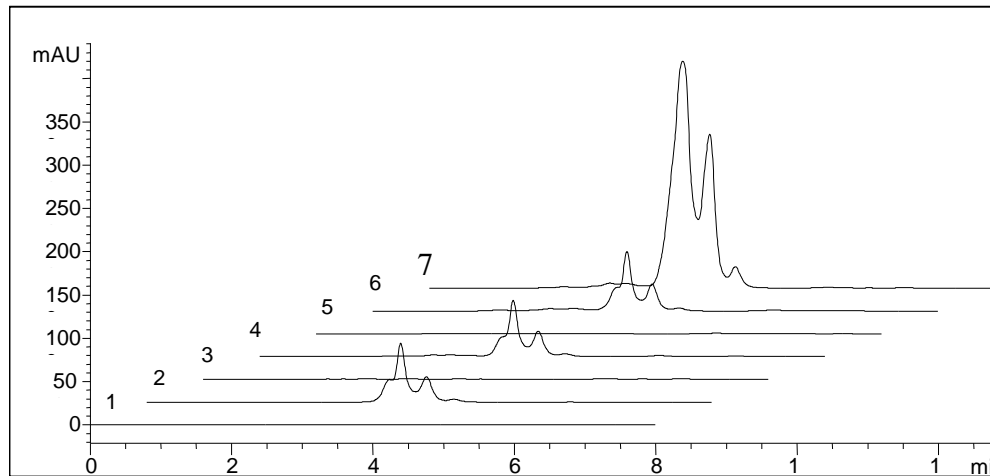
En los cromatogramas correspondientes a las extracciones con acetonitrilo la intensidad de las interferencias es menor comparada con las extracciones en acetona, sin embargo cuando se utiliza la metodología de ultrasonido las interferencias son menores que en las extracciones utilizando soxhlet. Al igual que en lo anterior para la extracción soxhlet hay presencia de tres picos interferentes contra dos que se observan en la extracción con ultrasonido (Figura 9 – 11).



**Figura 9.** Comparación de cromatogramas de las extracciones con ultrasonido-acetonitrilo purificadas a través EFS con carbón activado (—), Envicarb (—) y LC-18 (—).

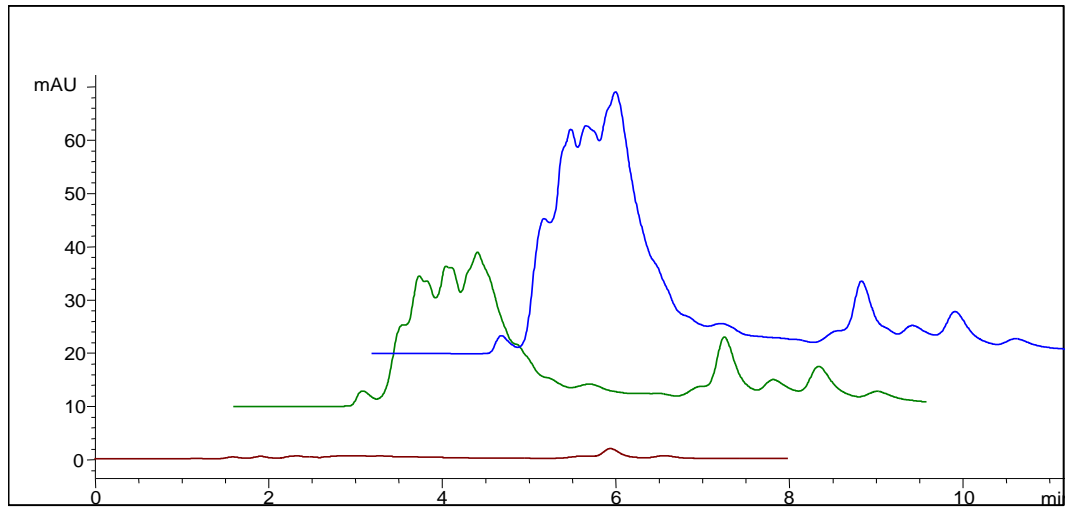


**Figura 10.** Comparación de cromatogramas de las extracciones con soxhlet-acetonitrilo purificadas a través EFS con carbón activado (—), Envicarb (—) y LC-18 (—).

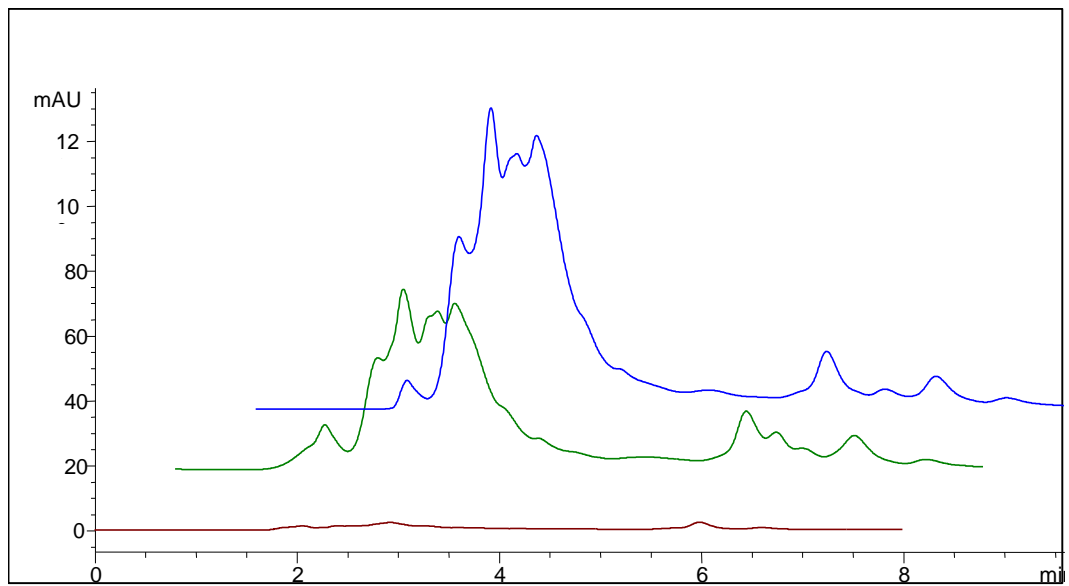


**Figura 11.** Comparación de los cromatogramas de extracción: ultrasonido-acetonitrilo (1, 3 y 5), soxhlet-acetonitrilo (2, 4 y 6) y soxhlet-acetona (7) purificados mediante EFS con carbón activado (1, 2), Encicarb (3, 4) y LC-18 (5, 6 y 7).

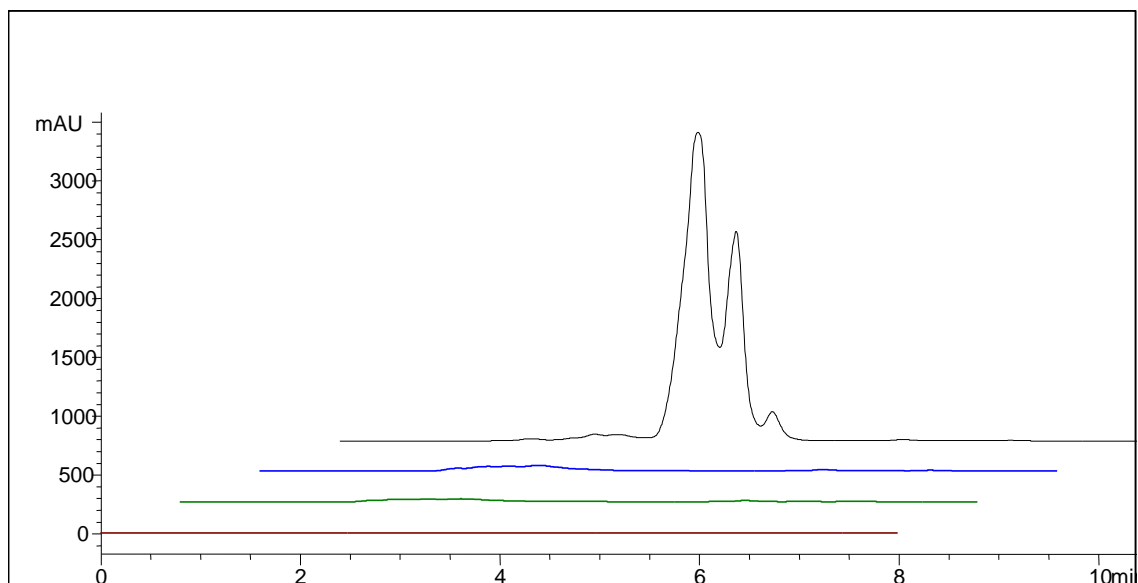
En los cromatogramas para las extracciones con metanol, las interferencias son menores que las registradas utilizando acetona, menores que las de extracciones soxhlet con acetonitrilo y mayores que las de extracciones con acetonitrilo – ultrasonido (figuras 12 –15).



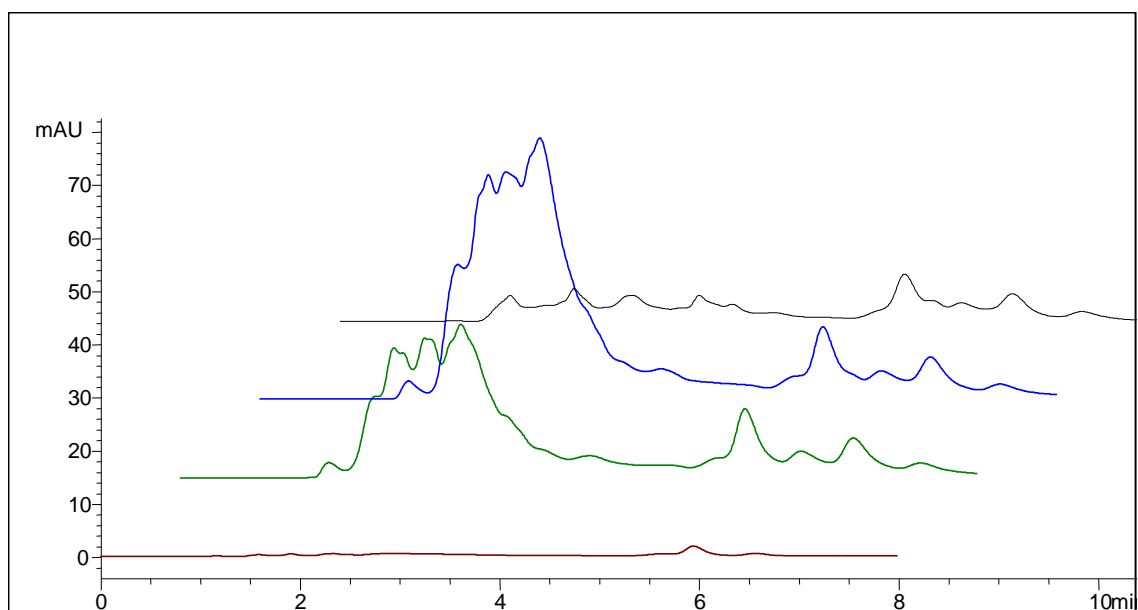
**Figura 12.** Comparación de cromatogramas de las extracciones con ultrasonido-metanol purificadas a través EFS con carbón activado (—), Envicarb (—) y LC-18 (—).



**Figura 13.** Comparación de cromatogramas de las extracciones con soxhlet-metanol purificadas a través EFS con carbón activado (—), Envicarb (—) y LC-18 (—).



**Figura 14.** Comparación de los cromatogramas de extracción: ultrasonido-metanol purificados mediante EFS con carbón activado (—), Envicarb (—) y LC-18 (—).y soxhlet-acetona (—).



**Figura 15.** Comparación de los cromatogramas de extracción: ultrasonido-metanol purificados mediante EFS con carbón activado (—), Envicarb (—) y LC-18 (—).y ultrasonido-acetona (—)



Teniendo en cuenta los datos de la Tabla 9 y lo discutido anteriormente acerca del contenido de impurezas presentes en los extractos, luego de los tratamientos realizados se concluye que la metodología soxhlet permite mayor extracción de capsaicina y dihidrocapsaicina comparada con la metodología ultrasonido, lo cual está relacionado con que en esta técnica el solvente se recupera constantemente evitando su saturación. Esta saturación sucede durante la extracción con ultrasonido puesto que la poca cantidad de solvente no se renueva con respecto a la cantidad de material extraíble. Sin embargo, es importante notar que la variedad y cantidad de interferencias aumenta con la extracción por soxhlet, debido seguramente a que en este proceso hay un mayor calentamiento del solvente que lo trabajado en las condiciones con ultrasonido.

Comparando los datos de concentración de capsaicina, se encuentra que el mejor solvente extractor es metanol. En el caso de extracción con ultrasonido el cartucho ENVICARB permitió mayor limpieza de la muestra y mayor concentración (0.72mg/g capsaicina y 0.58 mg/g dihidrocapsaicina). Para la extracción con soxhlet el cartucho con fase estacionaria C-18 permitió mayor extracción de capsaicina (0.98mg/g) y el cartucho relleno con ENVICARB mayor extracción de dihidrocapsaicina (0.98mg/g). También es importante resaltar que la técnica soxhlet se hace más costosa por el largo tiempo de extracción, comparada con la técnica de ultrasonido, sin embargo para poder aplicar esta última técnica se debe pensar en mejorar su eficiencia ideando una forma continua para renovar el solvente.

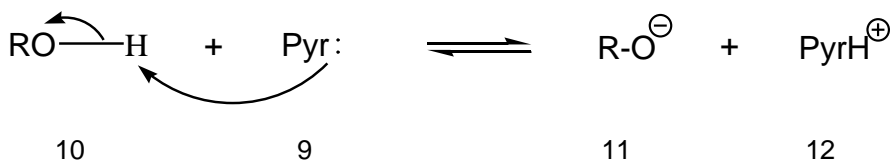
## 7.2 SÍNTESIS DE ANÁLOGOS O-GLICÓSIDOS

### 7.2.1 Reacción de acetilación de azúcares

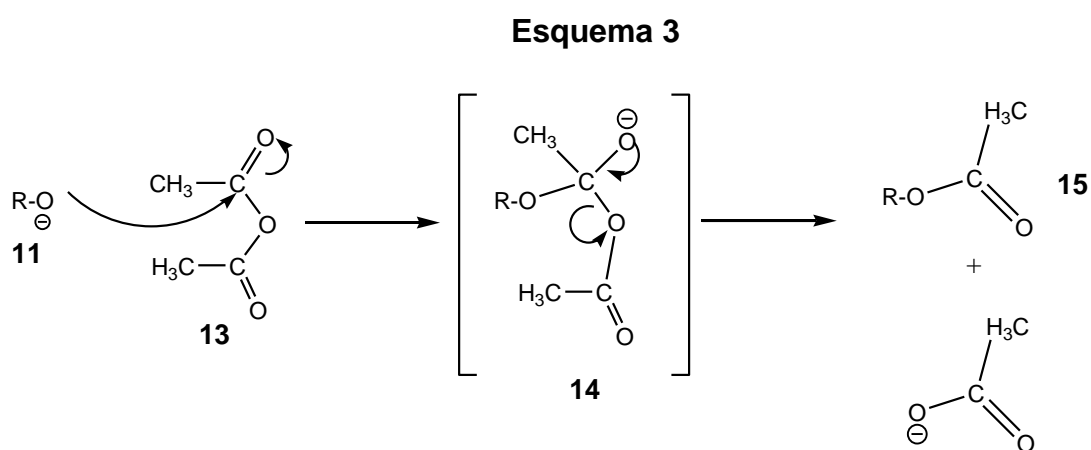
Usualmente, cuando una molécula polifuncional participa en una reacción sintética se pretende que ocurra la transformación específica de un solo grupo. Este propósito se podría alcanzar si se cuenta con un reactivo específico que seleccione solo el grupo funcional que reaccionará o a través de la protección de varios grupos, se consigue que uno de ellos reaccione como se desea. A menudo se adopta una combinación de estas dos estrategias.<sup>43</sup>

La acetilación de grupos hidroxilos de los azúcares usados será discutida en esta sección. Esta reacción se efectuó utilizando piridina y anhídrido acético. En el mecanismo general de la reacción, la piridina (**9**) se comporta como una base, sustrayendo el protón del grupo hidroxilo del alcohol (**10**). Se forma entonces el anión alcóxido (**11**), distinguido como un nucleófilo fuerte y el catión piridinio (**12**). (Esquema 2).

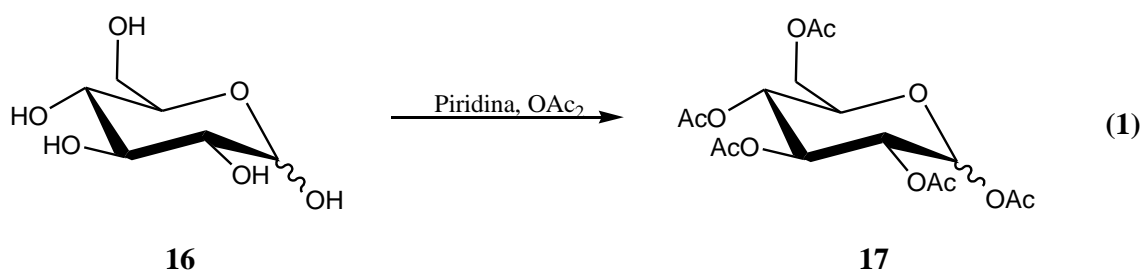
Esquema 2



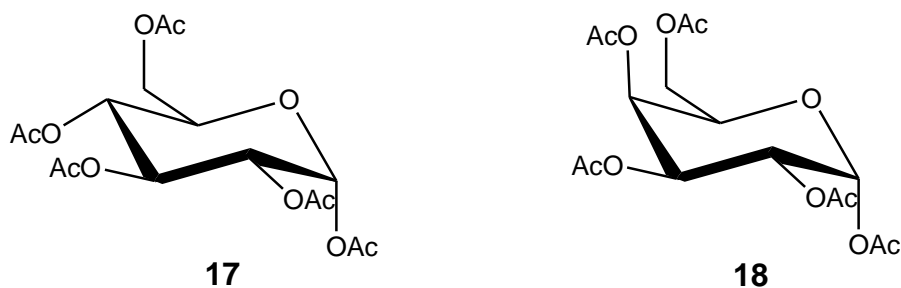
Por su parte, el nucleófilo **11** ataca al grupo carbonilo del anhídrido acético (**13**) desplazando el doble enlace del grupo carbonilo hacia el átomo de oxígeno. Se forma entonces el intermediario (**14**), estabilizado con la pérdida del ión carboxilato, de esta manera se consigue acetilar el grupo hidroxilo, formando el ester que es distinguido con el número (**15**) (Esquema 3).



Cuando la reacción ocurre con la glucosa, el mecanismo descrito ocurre con participación de cada uno de los hidroxilos presentes en la molécula, como se representa en la Ecuación 1.



Durante el desarrollo sintético de este trabajo se acetiló la glucosa y galactosa preparandose 1,2,3,4,6-penta O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosas (**17**) y 1,2,3,4,6-penta O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosas (**18**), respectivamente sus estructuras se exhiben a continuación.



Estos compuestos fueron utilizados directamente, sin su caracterización espectroscópica.

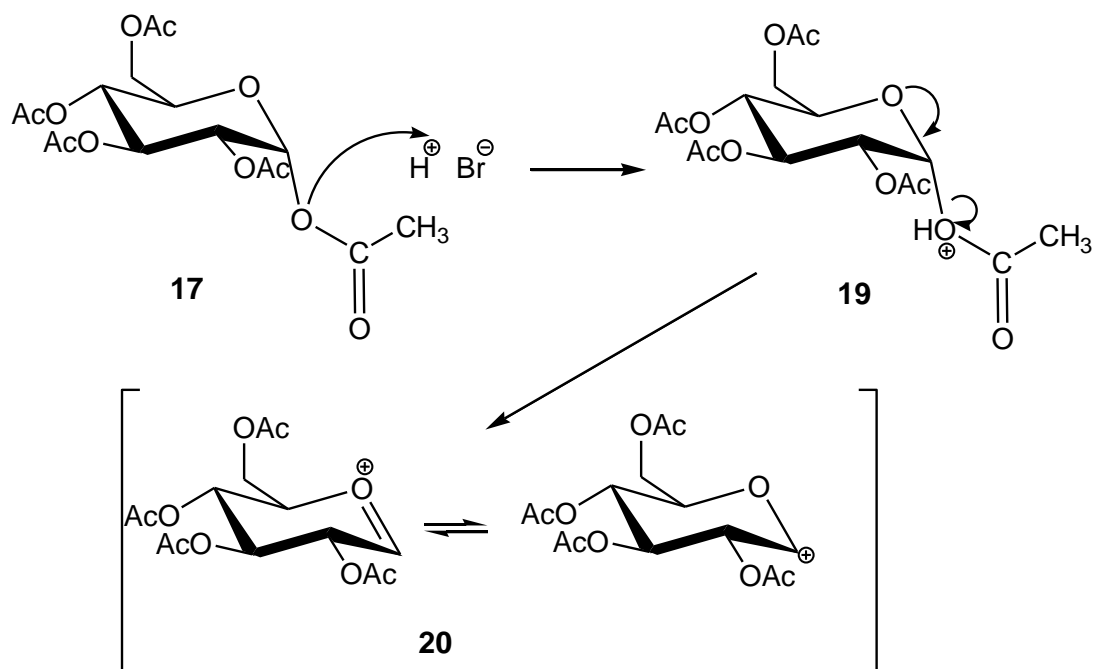
### 7.2.2 Bromación anomérica de los azúcares peracetilados **17** y **18**

La protonación es el método más común para convertir los grupos acetiloxi (MeCOO-) en buenos grupos salientes, transformados en ácido acético al desprenderse de la molécula. En el caso del carbono anomérico la salida de este grupo conlleva a la formación de un carbocatión. Particularmente, la bromación se realizó teniendo en cuenta la utilidad de este elemento en la química de carbohidratos, especialmente en reacciones de sustitución nucleofílica como grupos salientes en bromuros de 1- glicopiranosilos.

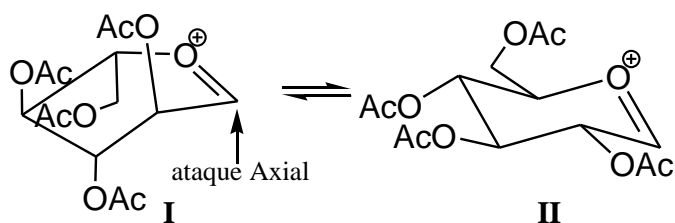
El mecanismo de reacción correspondiente a la etapa de bromación es consistente con una sustitución nucleofílica unimolecular ( $S_N1$ ). En el caso de la glucosa peracetilada **17**, el mecanismo se inicia con la protonación del oxígeno unido al carbono anomérico del azúcar protegido, generando consecuentemente el ácido acético. Con esto se origina el carbocatión en C-1 (**20**), estabilizado por resonancia y fuertemente electrofílico (Esquema. 4).

Aunque todos los átomos de oxígeno en el compuesto **17** también podrían ser protonados, solo se forma el carbocatión anomérico **20**, estabilizado por el par electrónico no enlazado del oxígeno piranósido, cuando la carga positiva se dispersa entre los átomos de carbono y oxígeno adyacentes.

#### Esquema 4



El bromuro proveniente del HBr ataca ahora al carbocatión **20**. Durante el ataque del ión bromuro, la conformación semisilla del carbocatión, identificada como **I** es la mas estable y favorece la entrada de este ión por el extremo axial. Cuando se forma el enlace C-Br el anillo piranósido adquiere la conformación silla **II** más estable. Para llegar a esta conformación, todos los grupos acetilos menos el del carbono C-1 cambian su orientación axial a ecuatorial.





Esta reacción se repitió varias veces con el fin de adquirir destreza en el manejo de esta clase de química. En uno de los intentos se consiguió la bromación de la glucosa peracetilada **21** en un rendimiento de 94% (entrada 3, Tabla 10). Por su parte, se realizó una vez, la bromación de la galactosa pentaacetilada obteniendo el producto con un rendimiento de 92% (entrada 5, Tabla 10).

Por otra parte, en la Tabla 11 se relacionan las señales observadas en los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los protones de los productos, al igual que los desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y los acoplamientos correspondientes (J, Hz)..

**Tabla 11.**  $\delta$ 's y J's de los protones en los bromuros de glicopiranosilo

Br-Gli	H-1 J(Hz)	H-2 J(Hz)	H-3 J(Hz)	H-4 J(Hz)	H-5 J(Hz)
<b>21</b>	6.59, (d) 4.0	4.82, (dd) 4.0 , 10	5.54, (dd) 9.6 , 10	5.14, (dd) 9.2 , 10.8	4.28, (m)
<b>22</b>	6.68, (d) 3.9	5.04, (dd) 3.9 , 10.5	5.39, (dd) 3.3 , 10.5	5.50, (dd) 1.2 , 3.3	4.47, (ddd) 1.2, 6.2, 7.3

En el análisis de las señales de la Tabla 11, se consideraron los protones anoméricos, desplazados a campo bajo por el efecto desprotector del bromo. Estos protones generan señales con desplazamiento químico y constantes de acoplamiento muy parecidas, producidas por acoplamiento ecuatorial – axial entre los protones H-1 y H-2 en ambos azúcares.

Igualmente se distingue el protón H-4 acoplado con H-3 y H-5 y por tal motivo generando un doblete de dobletes (dd). El valor de las constantes de



acoplamiento en la glucosa **21** es mayor porque ocurre un acoplamiento H-4 - H-3 y H-4 - H-5 axial –axial. En la galactosa el acoplamiento es ec – ax en ambos casos, por lo que las J's son menores.

De otro lado, en la Tabla 12, se presentan las bandas de IR más importantes que distinguen a los grupos funcionales en los bromuros sintetizados.

**Tabla 12.** Señales de IR de los bromuros obtenidos

N	$\nu_{cm^{-1}}$	Asignación de grupo
<b>21 – 22</b>	2800 –3000	C-H
	1747	C=O éster
	1221	C-O éster

Como se muestra en la Tabla 12, las señales de IR para ambos compuestos son idénticas, esto demuestra la utilidad de la espectroscopia de RMN para la caracterización de estas sustancias.

### 7.2.3 Síntesis de O–Glicósidos

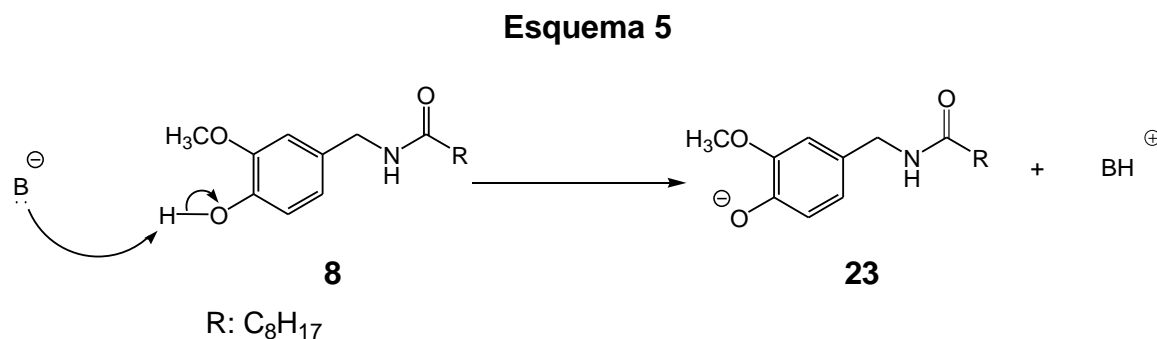
La reacción de Koenigs Knorr es un procedimiento clásico para la síntesis de O-glicósidos partiendo de un haluro de 1-glicopiranosilo y de un alcohol o fenol, en presencia de una base o un ácido de Lewis.

Para llevar a cabo esta reacción se utilizaron los bromuros **21** y **22** que fueron

sintetizados y la N-vainillilnonanamida **8**, un análogo de la capsaicina, también con un grupo hidroxilo en el anillo aromático. La reacción se efectuó primero en una sola fase con muy bajos rendimientos y generando también el producto de eliminación. Posteriormente, con base en los resultados alcanzados en los intentos anteriores, se procedió a realizar la catálisis por transferencia de fase, obteniendo mejores resultados.

El mecanismo de esta reacción en medio básico ocurre vía sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N^2$ ). Inicialmente la base sustrae el protón del grupo hidroxilo formando el ión fenóxido, un nucleófilo fuerte.

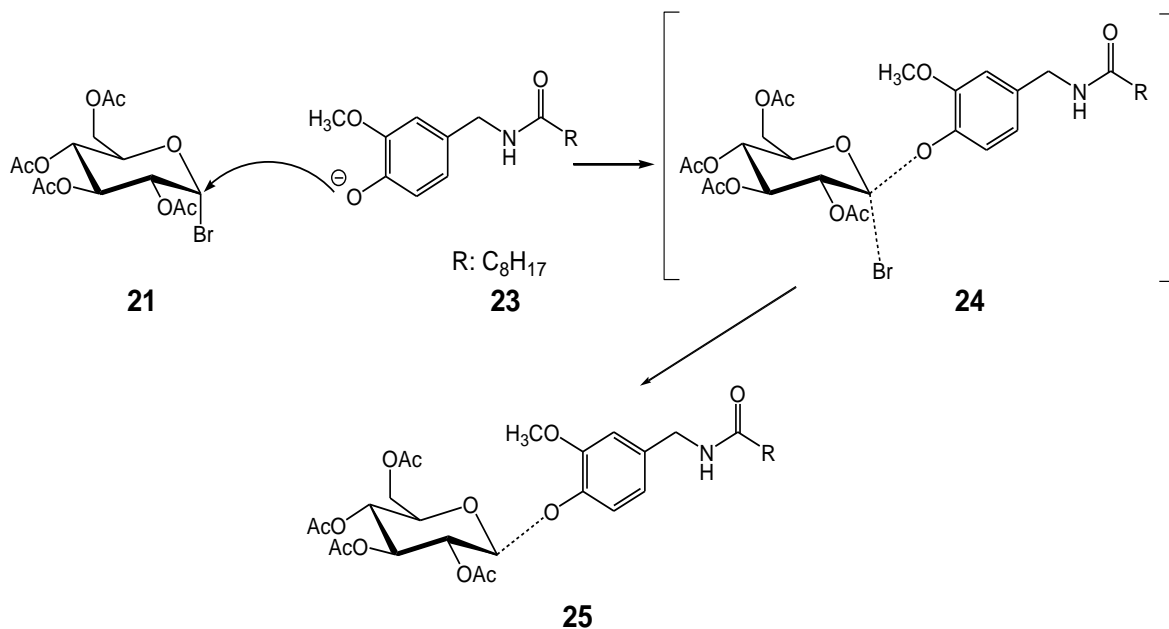
En el Esquema 5 se observa que la base abstrae un protón del fenol, generando el ión fenóxido correspondiente.



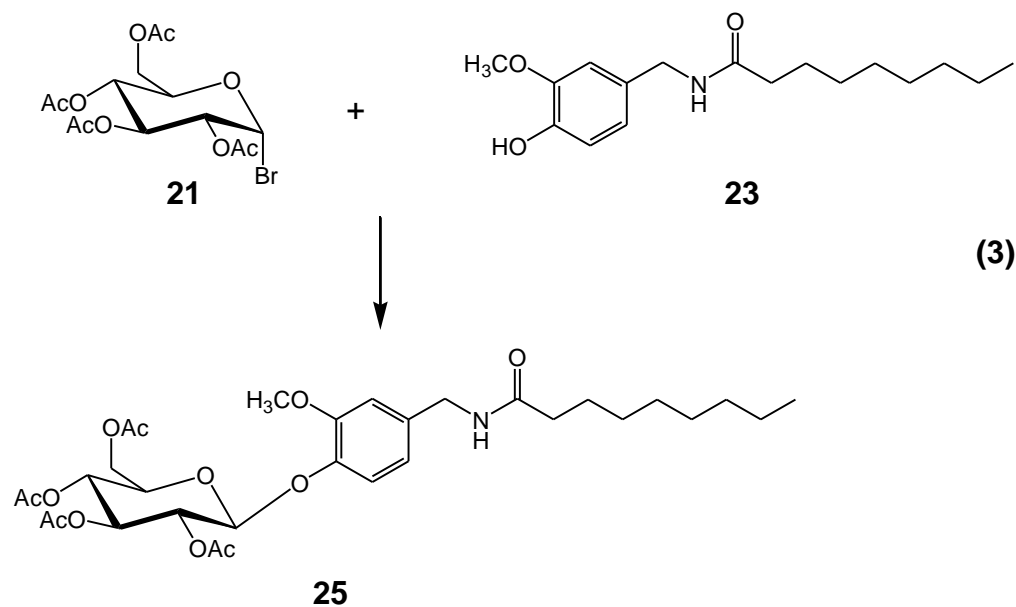
El bromo por su parte es buen grupo saliente y al salir se lleva el par de electrones con los que se enlazaba al átomo de carbono. Como se muestra en el Esquema 6, con la salida del bromuro se forma el O-glicósido que tiene en el carbono C-1

una configuración inversa a la configuración del bromuro de partida, de ahí que los productos obtenidos presenten una configuración anomérica  $\beta$ .

**Esquema 6**

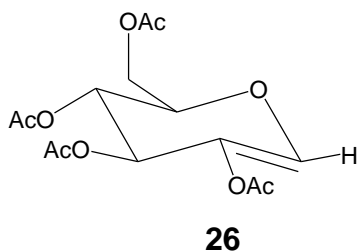


En la Ecuación 3, se presenta la reacción general para la obtención del N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glupiranosiloxi)encil]nonanamida (**25**) mencionado anteriormente.



Como ya se mencionó con esta metodología se realizaron varios intentos de o-glicosidación usando N-vainillilnonanamida **8** análogo de la capsaicina y bromuro de glucopiranosilo con el fin de encontrar las mejores condiciones de reacción, obteniéndose el O-glicósido **25** en diferentes rendimientos, que son presentados en la Tabla 13.

Al concluir las reacciones de O-glicosidación después de separar por CCR se observó por RMN  $^1\text{H}$  la presencia del producto O-glicósido, el material de partida N-vainillilnonanamida **8** y glucal **26** como producto colateral. Parte del reactante límite **8** se recuperó debido a que el bromuro de glucopiranosilo sufrió eliminación produciendo el glucal **26**, con doble enlace entre los carbonos C-1 – C-2.



**Tabla 13.** Resultados de las reacciones de O-glicosidación en una fase

n	Br-Glic (eq)l	<b>8</b> (mmol)	Base (eq)	Solvente (mL)	Condiciones de reacción			%
					t (h)	Temp. (°C)	Cat. (eq).	
1	1.1	0.466	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0)	Acetona 2.0	4	50	0	<b>26</b> (0%) <b>25</b> (16)
2	1.5	0.323	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0)	Acetona 2.0	4	50	0	<b>26</b> (47%) <b>25</b> (20)
3	1.1	0.470	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0)	Acetona 2.0	19	amb.	0.2	<b>26</b> (13) <b>25</b> (21)
4	1.1	0.232	NaOH (1.0)	2.0 MeCN 2.0 H <sub>2</sub> O	15	amb.	2.28	<b>26</b> (0%) <b>25</b> (21)
5	1.1	0.464	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2.0)	MeCN 2.0	19	amb.	0.04	<b>26</b> (13%) <b>25</b> (32)

Este compuesto se identificó por RMN H<sup>1</sup> por la señal vinílica del protón H-C1 desplazada a campo bajo. Para este caso, aunque la base era débil, probablemente se vio favorecida la formación de este producto por el

calentamiento y la ausencia de catalizador. Cuando se usó como solvente el acetonitrilo, se permitió una mayor libertad al nucleófilo para atacar al bromuro, debido que es un solvente mas polar que la acetona y facilita la salida del bromo, posiblemente vía  $S_N^1$ , pero con mayor posibilidad de un ataque ecuatorial del oxígeno, por el tamaño voluminoso del grupo saliente, en este caso el bromo

Efectivamente al utilizar acetonitrilo (entrada 5) el porcentaje de O-glicósido creció. Pero como la reacción seguía siendo lenta, se pensó en otras opciones, como las mostradas en la entrada 4. Estas promovieron una reacción más limpia, sin la presencia del producto interferente **26**, con un rendimiento relativamente alto respecto a los otros intentos. Este resultado abrió las puertas para utilizar la catálisis con transferencia de fase, buscando no solo mejorar el rendimiento, si no también disminuir el tiempo de reacción y reducir las posibilidades de generar producto de eliminación.

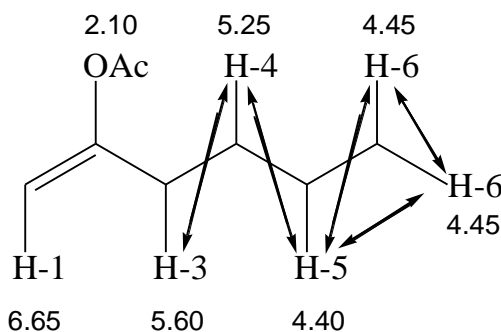
En la Tabla 14 se muestran las señales de RMN  $^1H$  para cada uno de los protones del compuesto de eliminación obtenido en esta reacción

**Tabla 14.** Señales por RMN  $^1H$  del compuesto **26**

protón	$\delta$ ppm	multiplicidad	J (Hz)
H-1	6.65	S	---
H-3	5.60	D	4.3
H-4	5.25	T	5.0
H-5	4.40	M	----
H-6	4.45	dd	6.5, 11.4
	4.25	dd	2.9, 11.4
CH <sub>3</sub> acetil	2.10	S	---

Se observa la presencia del protón anomérico (C-1), como un singlete, con desplazamiento químico consistente con el de un protón vinílico a 6.65 ppm (entrada 1, Tabla 14). El protón de C-3 por su parte, se encuentra desplazado mas a campo bajo, por el efecto anisotrópico del doble enlace, que se encuentra en posición  $\alpha$ . Igualmente se puede indicar la presencia de 3 grupos metilo de los acetato a 2.10 ppm. La ausencia de un cuarto metilo se explica por el solapamiento de una de las señal, al resonar en la misma frecuencia.

Con el experimento COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 18), se logra establecer las conectividades de los protones para este compuesto. Así, se observan entre los protones H-3 (5.60 ppm) y H-4 (5.25) acoplamiento para protones metínicos, igualmente entre H-4 y H-5 (4.40), este último protón se acopla con dos protones metilénicos H-6 a y H-6 b (4.45, 4.25). una evidencia importante en este experimento lo constituye la ausencia de conectividad para el proton vinílico que resuena a 6.65 ppm el cual se establecía como H-1. Estos acoplamiento se resumen en la Figura 16.

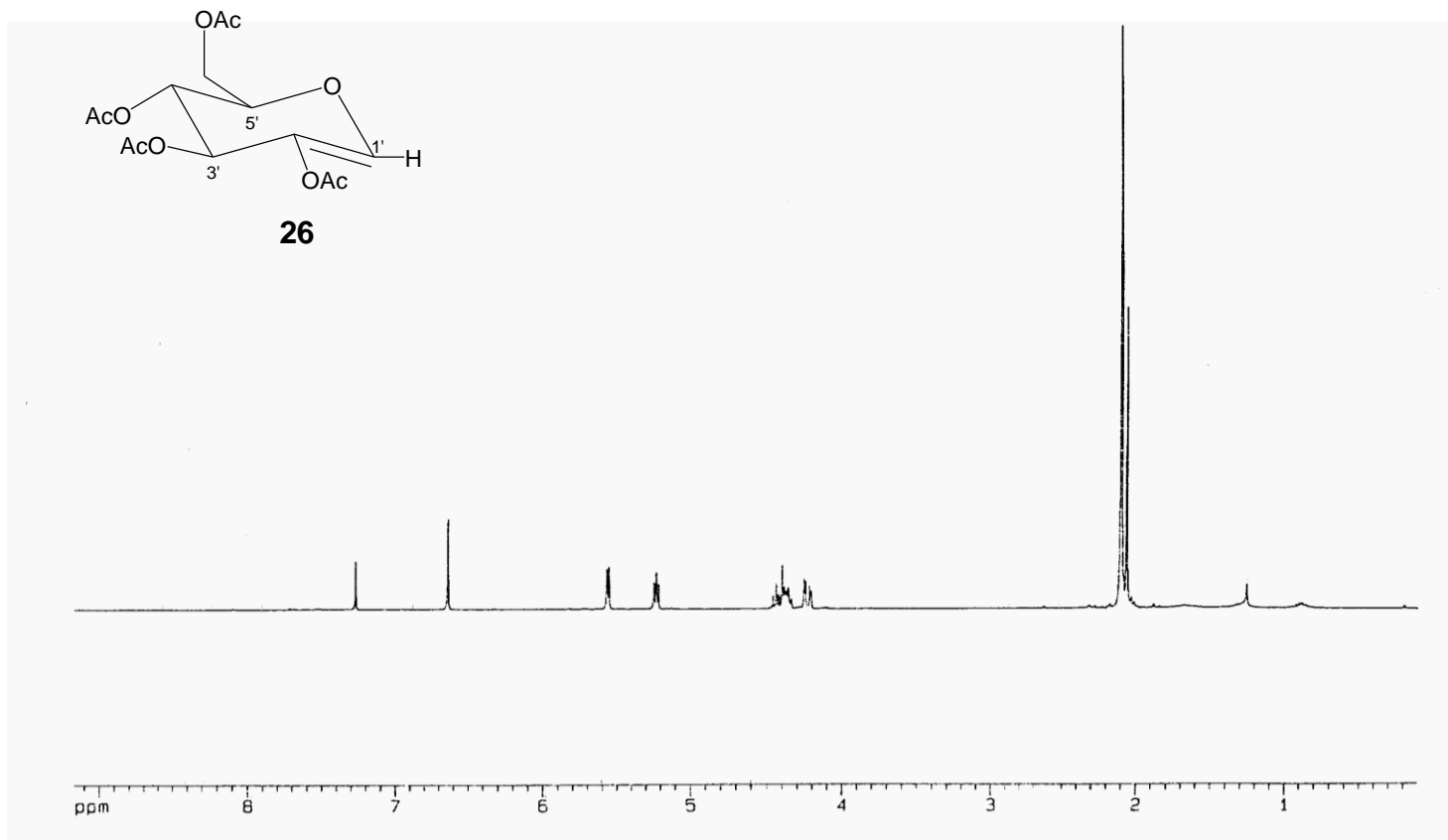


**Figura 16.** Conectividades observadas en el COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para **26**

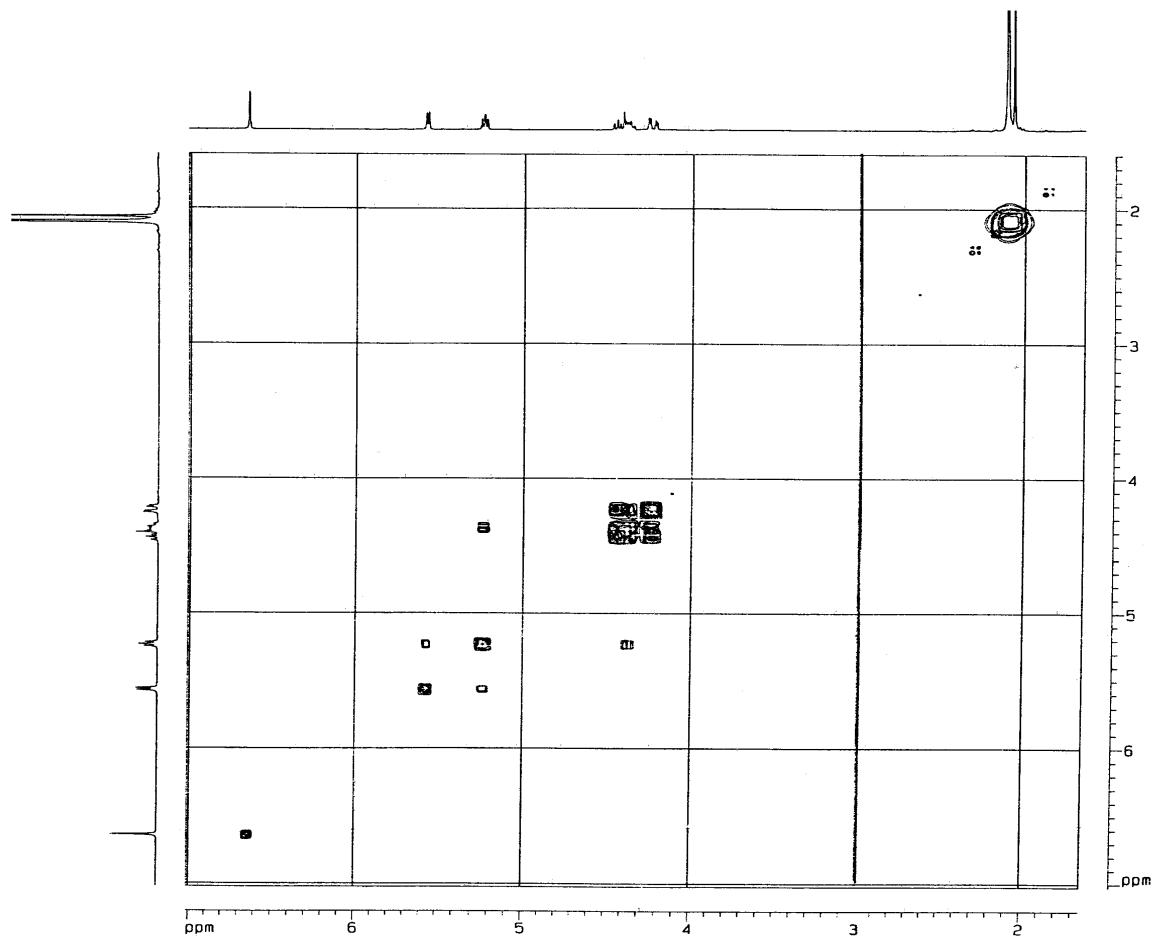
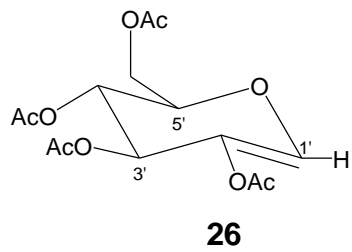
Mediante el experimento JMOD (Figura 19), se observa los cuatro (4) carbonos cuaternarios correspondientes a los grupos acetatos que resuenan entre 170 – 169 ppm. Además se distingue el carbono vinílico cuaternario asignado como C-2.

Los otros desplazamientos químicos están en concordancia con los descritos en la literatura para este tipo de compuestos acetilados.

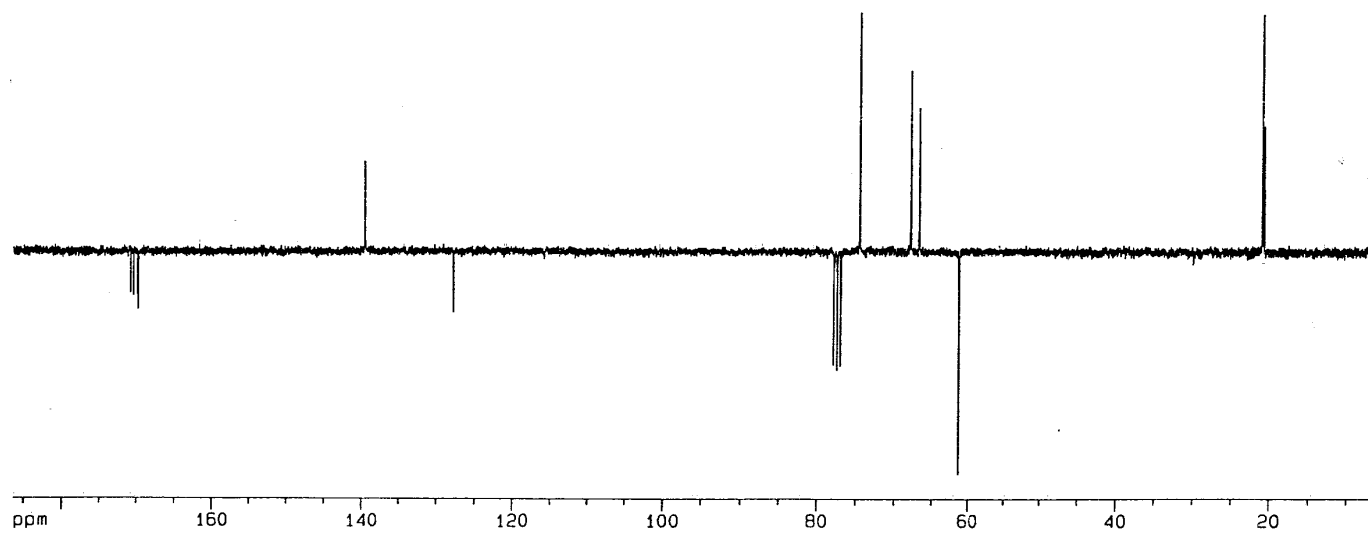
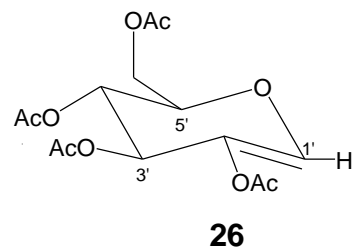




**Figura 17.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto de eliminación **26**



**Figura 18.** Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para **26**

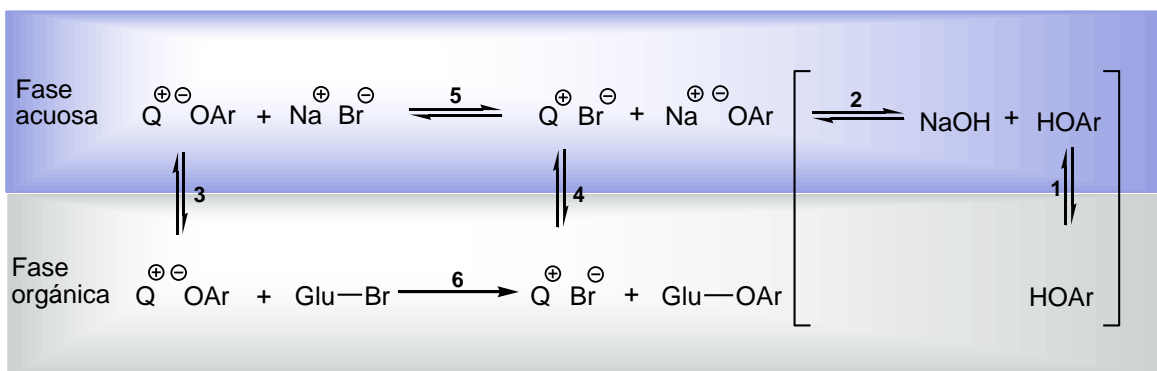


**Figura 19.** Espectro JMOD para 26

La catálisis por transferencia de fase implica una reacción vía mecanismo  $S_N2$ . Con esta metodología se trabajó usando dos fases agua y diclorometano. En ellas estaban repartidos los reactivos y productos según su afinidad. El bromuro (Gli-Br) se encuentra en la fase orgánica y el nucleófilo formado por la extracción del protón del grupo hidroxilo de la vainillilnonanamida ( $^-OAr$ ) por el hidróxido de sodio se encuentra originalmente en la fase acuosa.

La reacción se inicia cuando es adicionado el catalizador de transferencia de fase  $Q^+Br^-$  (Q: cetil trimetil amonio). En el proceso se presentan tres equilibrios importantes. Cuando el ión  $Na^+$  permanece en la fase acuosa, el ión  $Q^+$  cruza la interfase transportando el ion  $^-OAr$  en equilibrio. Una vez el ión  $OAr^-$  entra a la fase orgánica, comienza la reacción de O-glucosidación, produciendo además del o-glicósido la sal  $Q^+Br^-$  que es introducida en la fase acuosa

Con este conjunto de equilibrios se garantiza la presencia del ión  $^-OAr$  en la fase orgánica y la posibilidad que reaccione con el bromuro de glicopiranosilo en la etapa determinante de la velocidad, ya que todos los equilibrios ocurren mas rápidamente que la reacción. (Figura 20).



**Figura 20.** Equilibrios en la reacción de O-glicosidación por catálisis por transferencia de fase Q: cetiltributilamonio

Empleando la transferencia de fase se realizaron varios ensayos para escoger las condiciones óptimas de reacción, con el bromuro de glucosa. Las condiciones trabajadas y los resultados obtenidos con esta metodología son recopiladas en la Tabla 15.

Efectivamente el cambio de las condiciones mejoró notablemente el rendimiento al doble del valor obtenido antes y los tiempos de reacción disminuyeron sustancialmente. Se utilizó el hidróxido de sodio porque es una base fuerte soluble en agua, también se utilizó un exceso de vainillilnonanamida, para que todo el bromuro reaccionara.

Por otra parte, la cantidad de base utilizada en la reacción es importante, ya que influye en el tiempo de reacción y en el rendimiento.

**Tabla 15.** Condiciones utilizando catálisis por transferencia de fase

n	Br-Glic (mmo)l	8 (Eq.)	NaOH (eq)	2 mL (1:1) solventes	Condiciones de reacción			%
					t (h)	Temp. °C	Cat. Eq.	
1	Br-Gluc (0.26)	2.0	0.001	H <sub>2</sub> O CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5	amb.	1.0	<b>26</b> (0%) <b>25</b> (42)
2	Br-Gluc (0.28)	2.0	3.7	H <sub>2</sub> O CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4	amb.	1.0	<b>26</b> (0%) <b>25</b> (54)
3	Br-Gluc (0.28)	2.0	3.7	H <sub>2</sub> O CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.40	amb.	1.0	<b>26</b> (0%) <b>25</b> (52)
4	Br-Gluc (0.28)	2.0	3.7	H <sub>2</sub> O CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.50	amb.	1.0	<b>26</b> (0%) <b>25</b> (53)
5	Br-Gal (0.28)	2.0	3.7	H <sub>2</sub> O CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.50	amb.	1.0	<b>26</b> (0%) <b>27</b> (57)
6	Br-Gal (0.29)	2.0	3.7	H <sub>2</sub> O CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.50	amb.	1.0	<b>26</b> (0%) <b>27</b> (55)
7	Br-Gal (0.28)	2.0	3.7	H <sub>2</sub> O CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.50	amb.	1.0	<b>26</b> (0%) <b>27</b> (64)

Obtenidas las condiciones para la O-glicosidación con catálisis por transferencia de fase utilizando el bromuro de glucosa, se realizó las reacciones para obtener el derivado o-galactósido respectivo, los porcentajes fueron muy similares a los obtenidos para el o-glucósido.

Los desplazamientos químicos de las señales de los O-glicósidos obtenidos por

transferencia de fase se exhiben en la Tabla 16. Para el análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  se dividió la molécula en tres regiones representativas, la región alifática que contiene el grupo amido, la región aromática y la región que contiene al monosacárido.

En la región alifática, los desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm), y las constantes de acoplamiento (J, Hertz) de los o-glicosidos acetilados obtenidos son muy parecidas. Se observa la señal ancha característica del H-N del grupo amido desplazada a campo bajo por la acción desprotectora del grupo carbonilo y parcialmente desdoblada por la presencia del metileno contiguo. El carbono adyacente al grupo amido por el átomo de nitrógeno, presenta dos protones los cuales están ligeramente desprotegidos por el anillo aromático y el grupo amido, desplazándose de esta manera a campo bajo (4.38 ppm), la señal que se obtiene es un doblete por la interacción con el protón del H-N.

Más hacia campo alto se encuentran los protones H-3 unidos directamente al grupo carbonilo lo que hace que estén más desplazados a campo bajo que el resto de los protones en la cadena alifática, resuenan a 2.20 para el o-glucósido y 2.21 para el o-galactósido, formando un triplete. Los protones H4 hasta H-9 por múltiples interacciones unos con otros se encuentran formando multiplete. El H-10 tiene su desdoblamiento característico a triplete y es el protón que se encuentra más protegido por lo cual presenta el menor desplazamiento (0.89 ppm).

Los anteriores acoplamiento son corroborados mediante el HOMOCOSY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  donde se observa claramente que el H-3 acopla con H-4 y este a su vez con el protón vecino que esta en el multiplete (entrada 5), finalmente este presenta una acoplamiento con los protones del  $-\text{CH}_3$  (H-10).

Los tres (3) protones aromáticos presentes en el anillo se observan claramente en el espectro con sus desdoblamiento bien definidos. Los desplazamientos químicos a campo bajo  $\approx 7$  ppm son característicos de estos protones. El protón Ha se presenta como un doblete con una  $J = 2$  Hz se desdobla por la presencia de Hb, pero el desdoblamiento no esta evidente y esto es posiblemente a que la distancia entre ellos ya comienza a ser muy grande. La señal del protón Hb se presenta como un doblete de dobletes debido a que se acopla con Ha ( $J_{ab} = 2.0\text{Hz}$ ) a distancia y con Hc ( $J_{bc} = 8\text{Hz}$ ) adyacente, este se encuentra mas despalzado a a campo bajo que las señales de los otros dos protones debido a la desprotección que ejercen los átomos de oxigeno cercanos a este protón.

La presencia del grupo metoxilo se observa como un singlete que integra para 3 H a 3.8 ppm. En el HOMOCOSY no se observa ningún acoplamiento como es de esperarse.

En la región del monosacárido se destaca la señal del protón anomérico, que corresponde a un doblete con desplazamiento  $\delta = 4.9$  ppm. El valor tan grande de la constante de acoplamiento, cuyo  $J = 8.0$  Hertz, es característica de

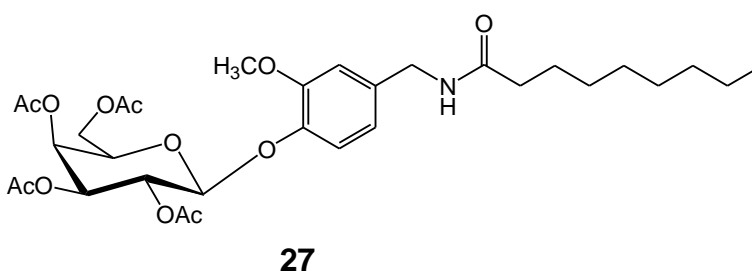


acoplamiento ax – ax, en este caso de H-1 axial y H-2 axial, cuyos valores son reportados como los mas altos.

**Tabla 16.**  $\delta$ 's y J's de los protones de los O –glicósidos

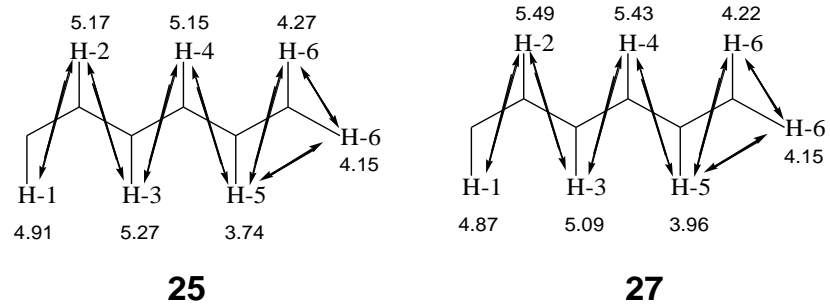
PROTÓN	O-GLUCÓSIDO 25 $\delta$ , J (Hz)	O-GALACTÓSIDO 27 $\delta$ , J (Hz)
<b>Región alifática</b>		
H-1	4.38 (d) 5.6	4.38 (d) 5.6
H-2	5.72 ---	5.83 (t) ---
H-3	2.20 (t) 7.4	2.21 (t) 7.6
H-4	1.66 – 1.63 (m) 7.4	1.67 – 1.61 (m) 7.2 Hz
H-5 – H-9	1.31 – 1.21 (m) ---	1.37 – 1.22 (m) ---
H-10	0.87 (t) 6.8	0.89 (t) 6.8
<b>Región aromática</b>		
Ha	6.82 (d) 2.0	6.84 (d) 2.0
Hb	6.76 (dd) 1.8, 8.2	6.77 (dd) 2.0, 8.0
Hc	7.05 (d) 8.4	7.07 (d) 8.0
Hd	3.80 (s) ---	3.81 (s) ---
<b>Región monosacárido</b>		
H-1'	4.91 (d) 8.0	4.87 (d) 8.0
H-2'	5.17 (d) 8.0	5.49 (dd) 8.0, 10.4
H-3'	5.27 (m) 4.0	5.09 (dd) 3.4, 10.8
H-4'	5.15 (dd) 4.8, 14.8	5.43 (d) 2.4
H-5'	3.74 (ddd) 2.4, 4.8, 14.4	3.96 (dd) 7.2, 6.4
H-6'a	4.27 (dd) 4.8, 12.8	4.22 (dd) 6.8, 11.2
H-6'b	4.15 (dd) 2.4, 12.4	4.15 (dd) 6.6, 11.4
CH <sub>3</sub> acetil	2.09 (s)	2.10

La diferencia entre los derivados de la glucosa **25** y galactosa **27** se observa en la región del monosacárido por el acople del protón H-4' con H-3' y H-5'. El valor para el O-glucósido es mayor por el acoplamiento axial – axial entre H-4' – H-3' y H-4' – H-5'. Por su parte, en el N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosiloxi)encil]nonanamida **27** el acoplamiento es ec – ax en ambos casos, en este caso las J's son menores.

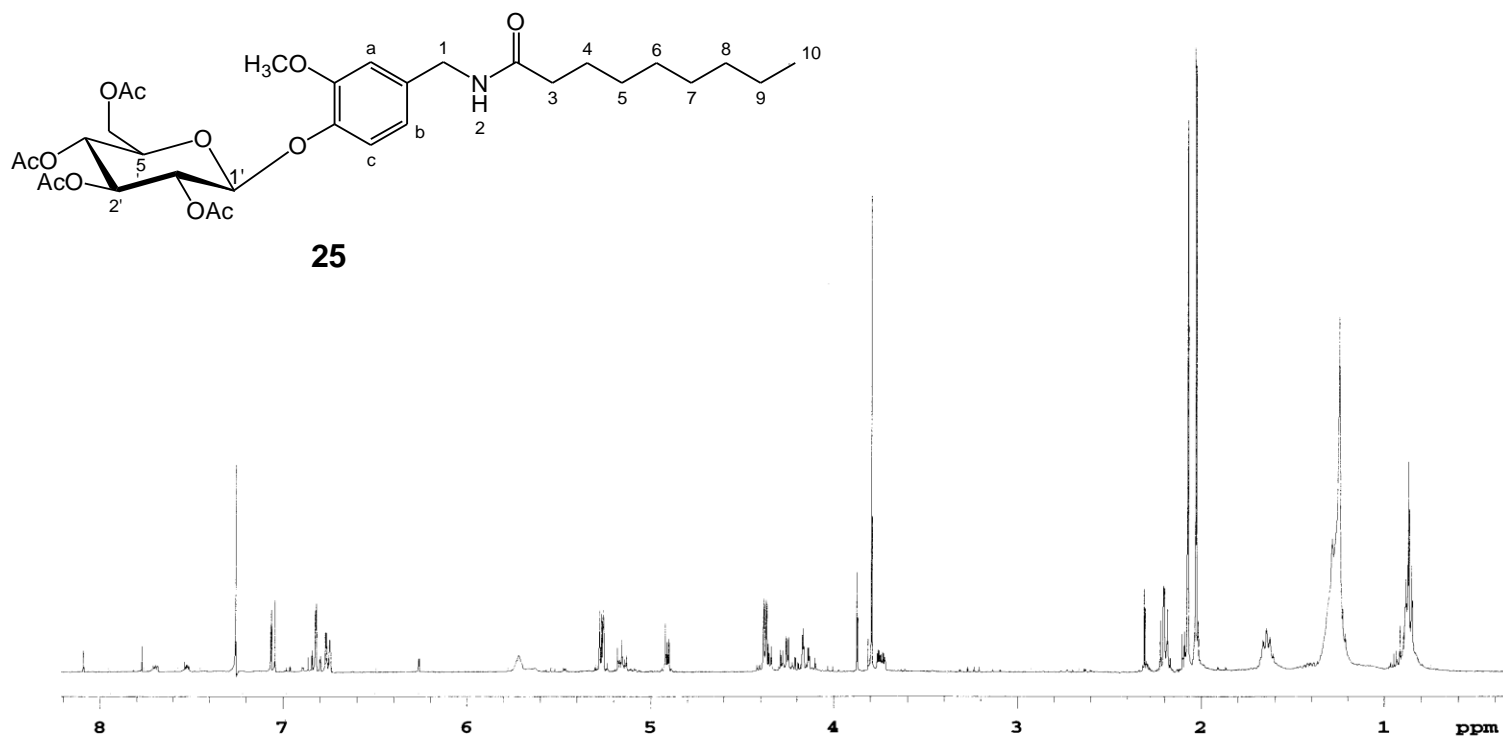


Para ambos compuestos es importante resaltar , las señales producidas por los protones diasterotópicos H-6 los cuales en el O-glucósido se observan como ddd y en el O-galactósido como dd.

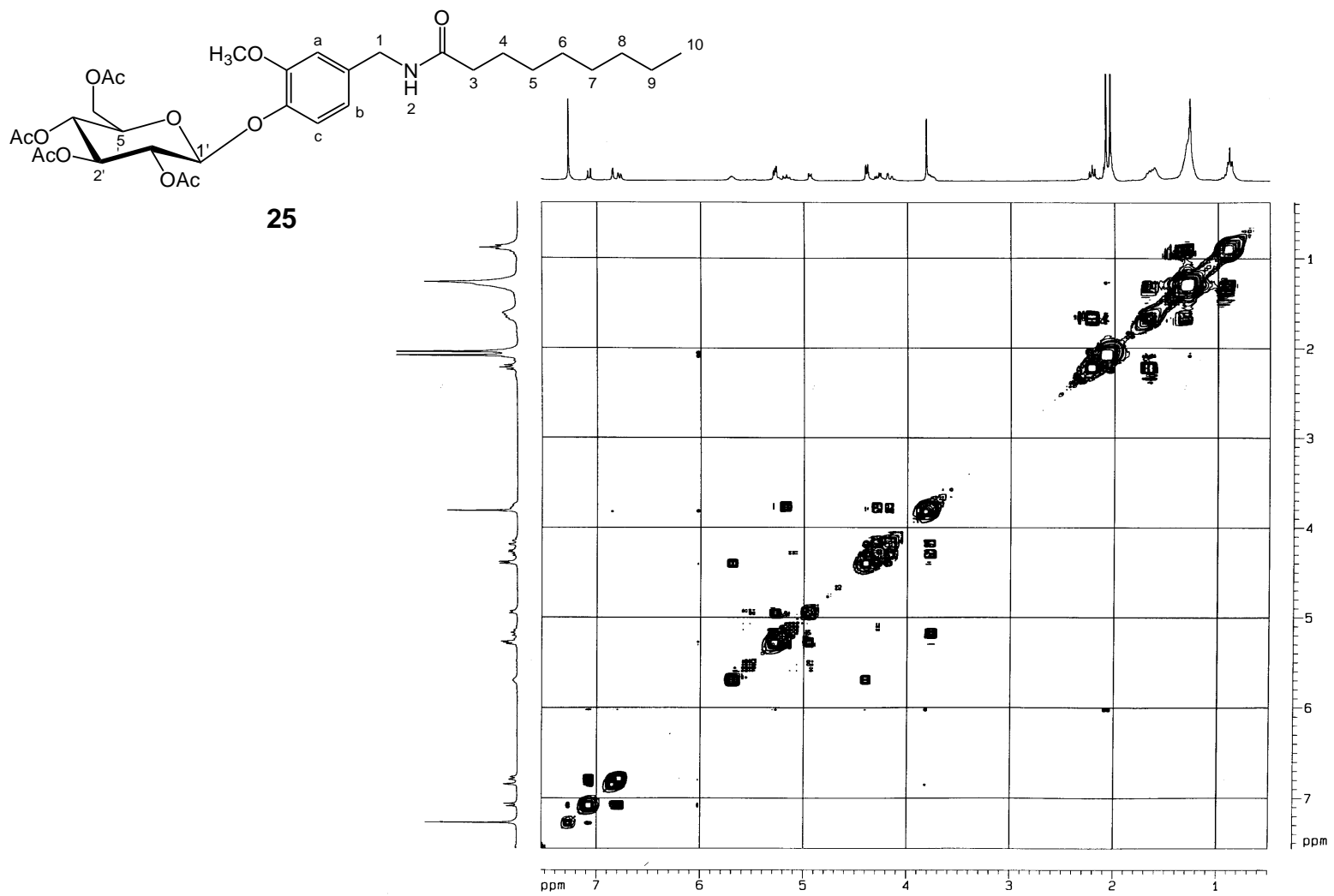
Mediante las señales observadas en el espectro COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  se establece claramente el sistema de espines para los monosacaridos, Con este se dedujo la posición del carbono anomérico como el inició de este sistema de espines y los protones metilénicos H-6a y H-6b (4.27, 4.15) con los protones metilénicos como el final.(Figura 22-25)



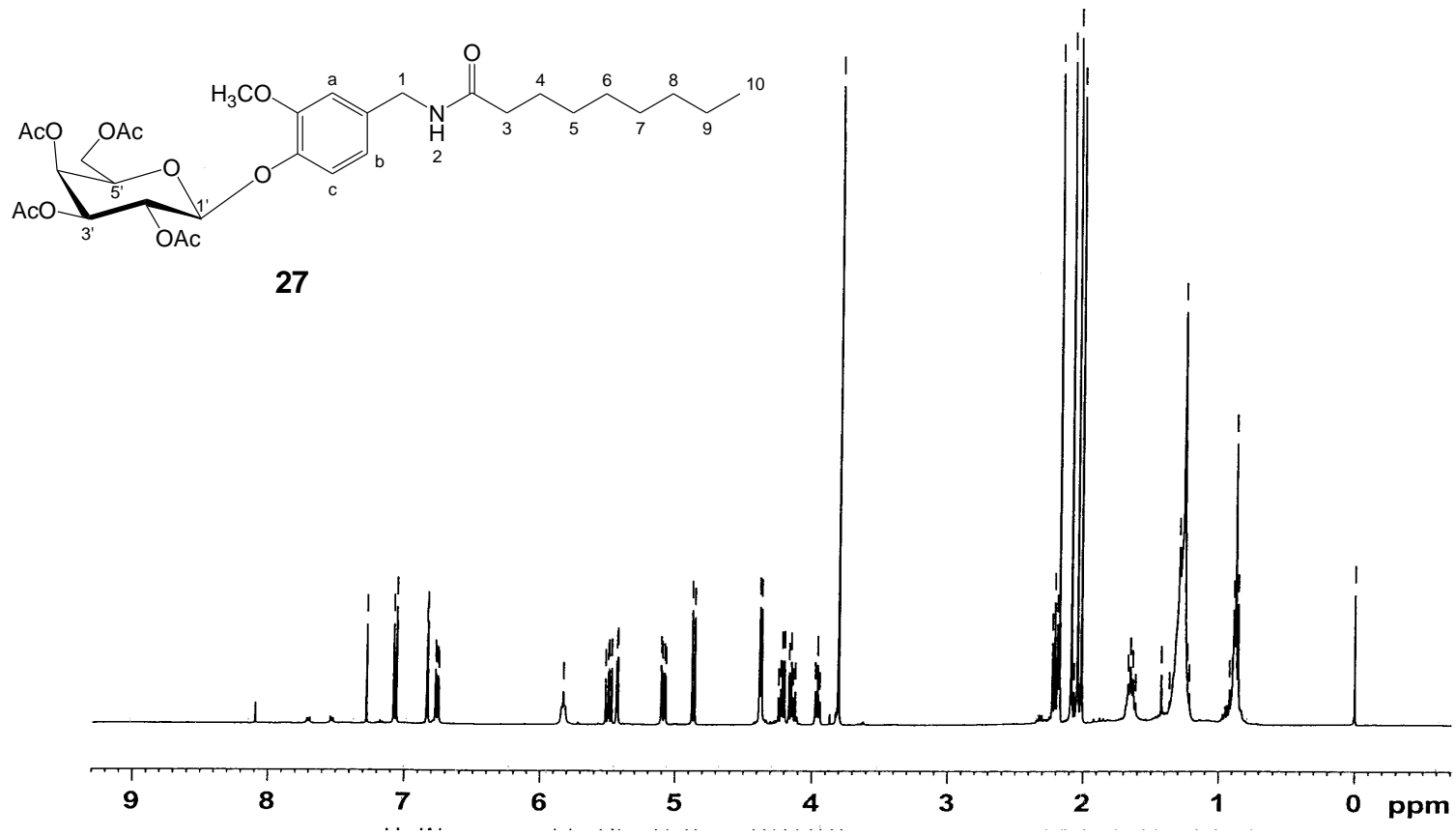
**Figura 21.** Conectividades observadas en el COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para la región que contiene el monosacárido en los O-glicósidos **25** y **27**



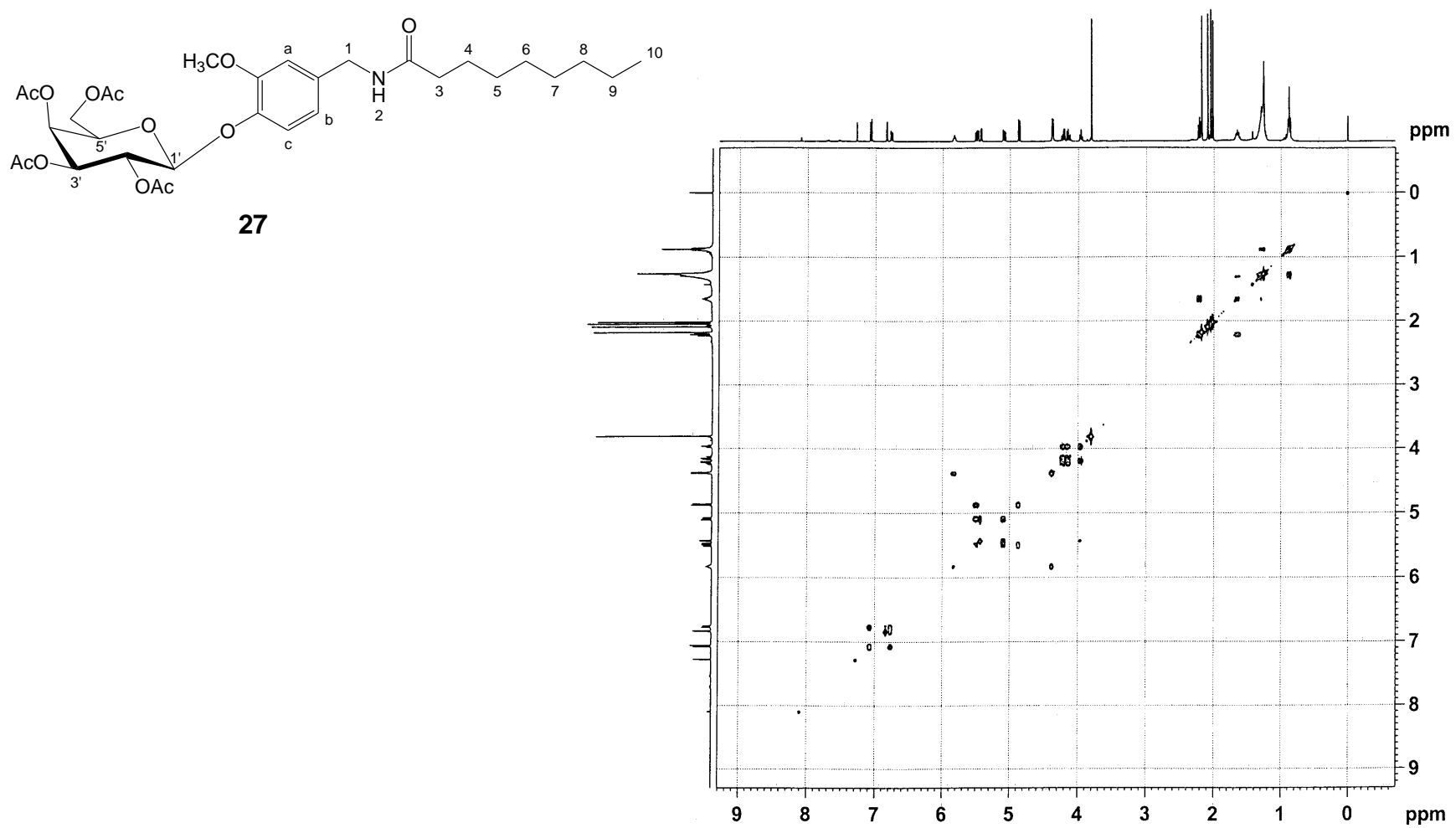
**Figura 22.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-glupiranosiloxi)encil]nonanamida **25**



**Figura 23.** Espectro de HOMOCOSY N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-glupiranosiloxi)bencil]nonanamida **25**



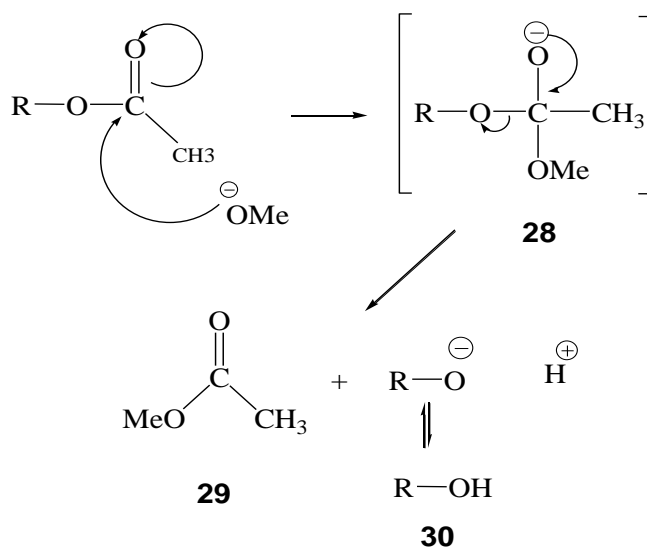
**Figura 24.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosiloxi)encil]nonanamida 27



**Figura 25.** Espectro de HOMOCOSY de N-[3-metoxi-4-(tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosiloxi)encil]nonanamida 27

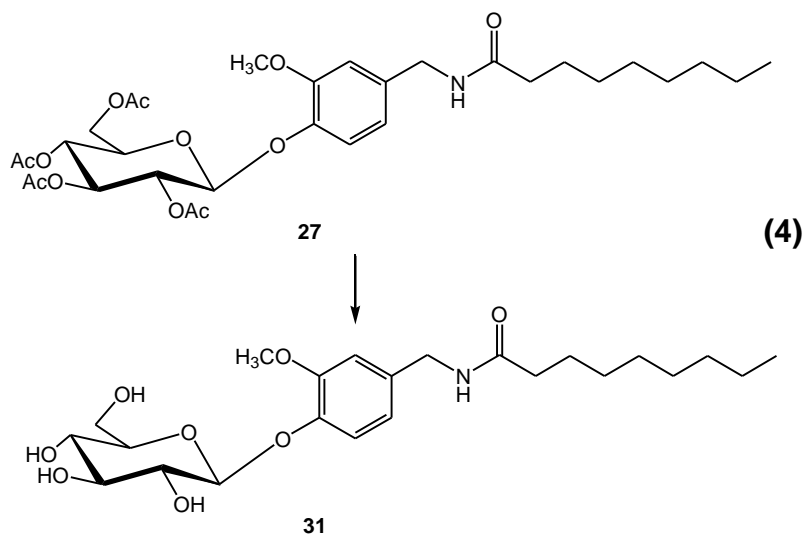
### 7.2.4 Reacción de desprotección de los grupos hidroxilos en los productos O-glicosilados

La reacción de desprotección implica la transformación de los grupos acetilos (OAc) del azúcar contenida en el O-glicósido a grupos hidroxilo. En esta reacción se utiliza metóxido de sodio en metanol, donde el carbono del grupo carbonilo al tener una carga parcial positiva es electrofílico y fácilmente atacado por el ión metóxido, nucleofilo fuerte, formando de esta manera un intermediario con carga negativa (**28**). La estabilización del intermediario se lleva a cabo con la pérdida del grupo R-O, con lo cual se regeneran los grupos hidroxilos en la fracción monosacárido del O-glicósido sintetizado.

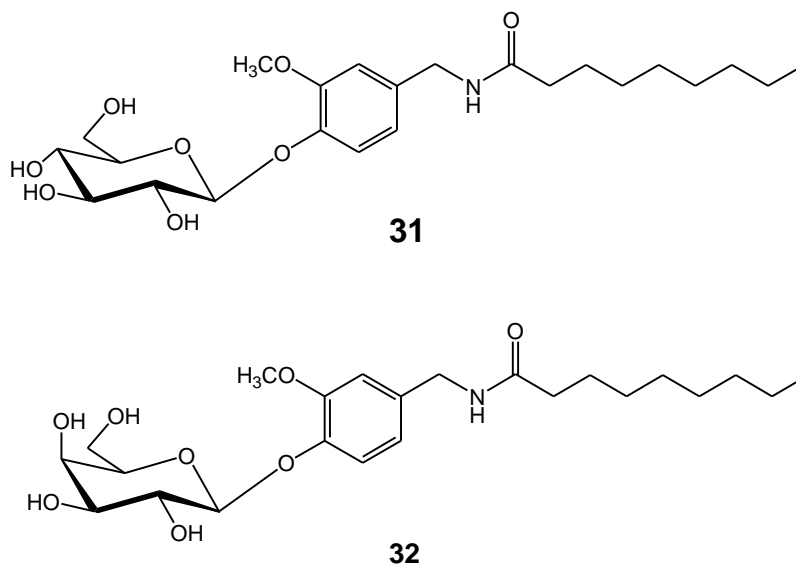


La ecuación 4 se representa la reacción general de desprotección para el O-glucósido **25**





Las estructuras de los O-glicósidos desprotegidos son exhibidas a continuación:



Las señales de los protones de los O-glicósidos sintetizados se recopilan en la Tabla 17.

**Tabla 17.**  $\delta$ 's y J's de los protones de los O –glicósidos **31** y **32** desprotegidos

PROTÓN	O-GLUCÓSIDO <b>31</b>	O-GALACTÓSIDO <b>32</b>
	$\delta$ J (Hz)	$\delta$ J (Hz)
<b>Región alifática</b>		
H-1	4.22 (d) 5.6	4.24 (d) 5.6
H-2	8.28 ---	8.10 (t) ---
H-3	2.15 (t) 7.4	2.16 (t) 7.4
H-4	1.56 – 1.53 (m) 6.8	1.59 – 1.56 (m) 7.0 Hz
H-5 – H-9	1.31 – 1.28 (m) ---	1.37 – 1.19 (m) ---
H-10	0.89 (t) 6.8	0.87 (t) 6.8
<b>Región aromática</b>		
Ha	6.89 (d) 2.0	6.85 (d) 2.0
Hb	6.76 (dd) 1.8, 8.2	6.76 (dd) 2.0, 8.4
Hc	7.04 (d) 8.4	7.03 (d) 8.0
Hd	3.77 (s) ---	3.79 (s) ---
<b>Región monosacárido</b>		
H-1'	4.89 (d) 7.2	4.79 (d) 8.0
H-2'	3.30 ---	3.70 (dd) 7.8, 9.4
H-3'	3.20 ---	3.47 (dd) 3.6, 9.6
H-4'	3.69 (d) 10.4	3.83 (d) 3.2
H-5'		3.59 (d) 4.8
H-6'a	3.50 – 3.45	3.65 (dd) 6.0, 10.4
H-6'b		3.53 (dd) 6.0, 12.4

En la tabla 17 se observa que para la región aromática y la región alifática incluyendo el grupo amido los  $\delta$ 's y J's de los protones son similares a los valores correspondientes de estos compuestos protegidos. Las principales diferencias radican en la región del monosacárido, donde al igual que lo discutido en la sección de O-glicosidación, los acoplamientos ax – ax entre protón H-4' – H-3' y H-4' – H-5' en el O-glucósido son mayores que los encontrados en la O-galactosa, donde los acoplamientos de estos mismos protones son ax – ec. Es importante también resaltar que los desplazamientos en los protones del monosacárido se disminuyen notablemente debido a que ya no cuentan con el efecto desprotector del grupo acetilo.

En los experimentos COSY para los dos compuestos desprotegidos se observan los mismos sistemas de espines ya establecidos en el apartado de O-glicosidación (sección 6.2)

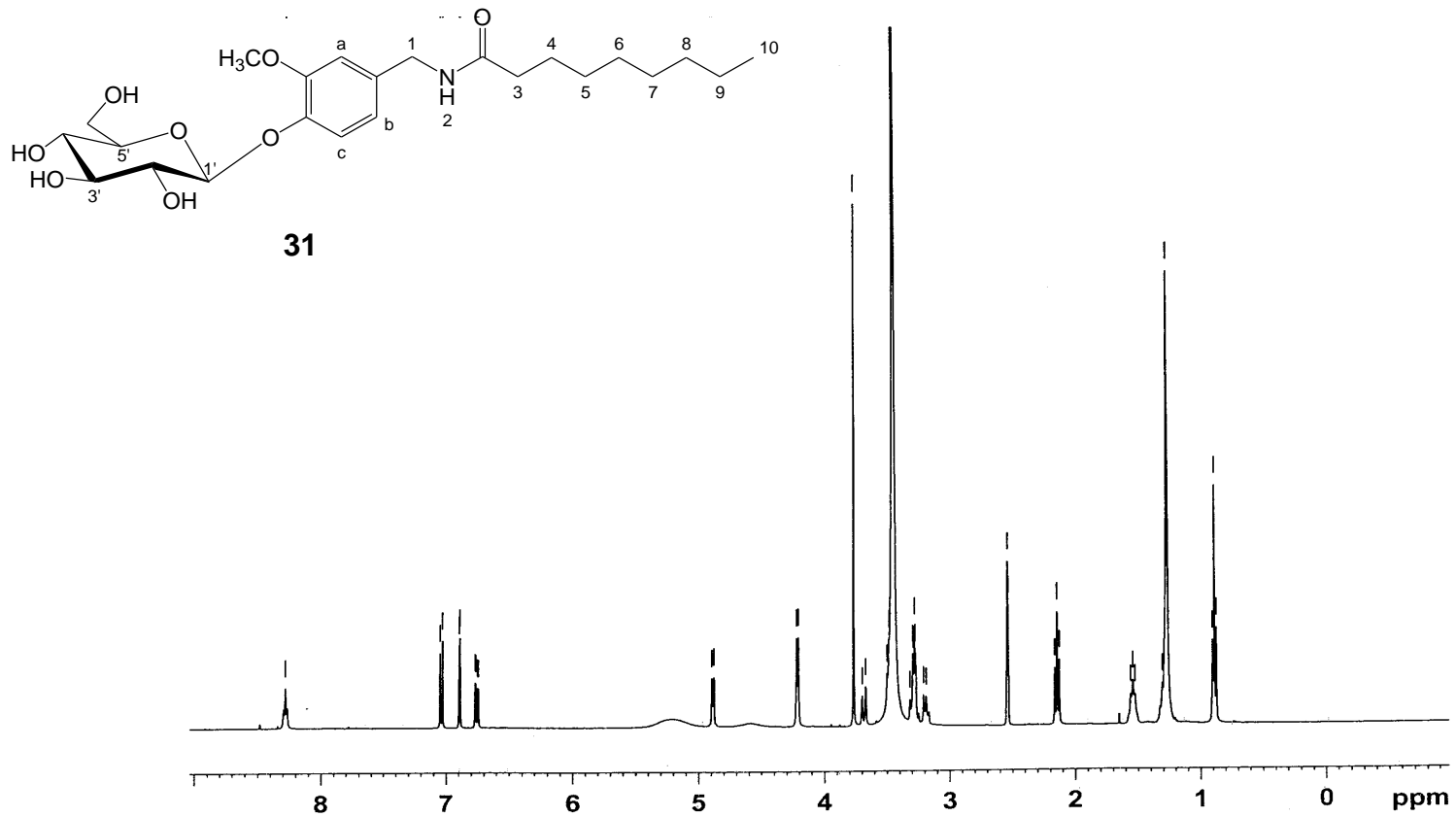
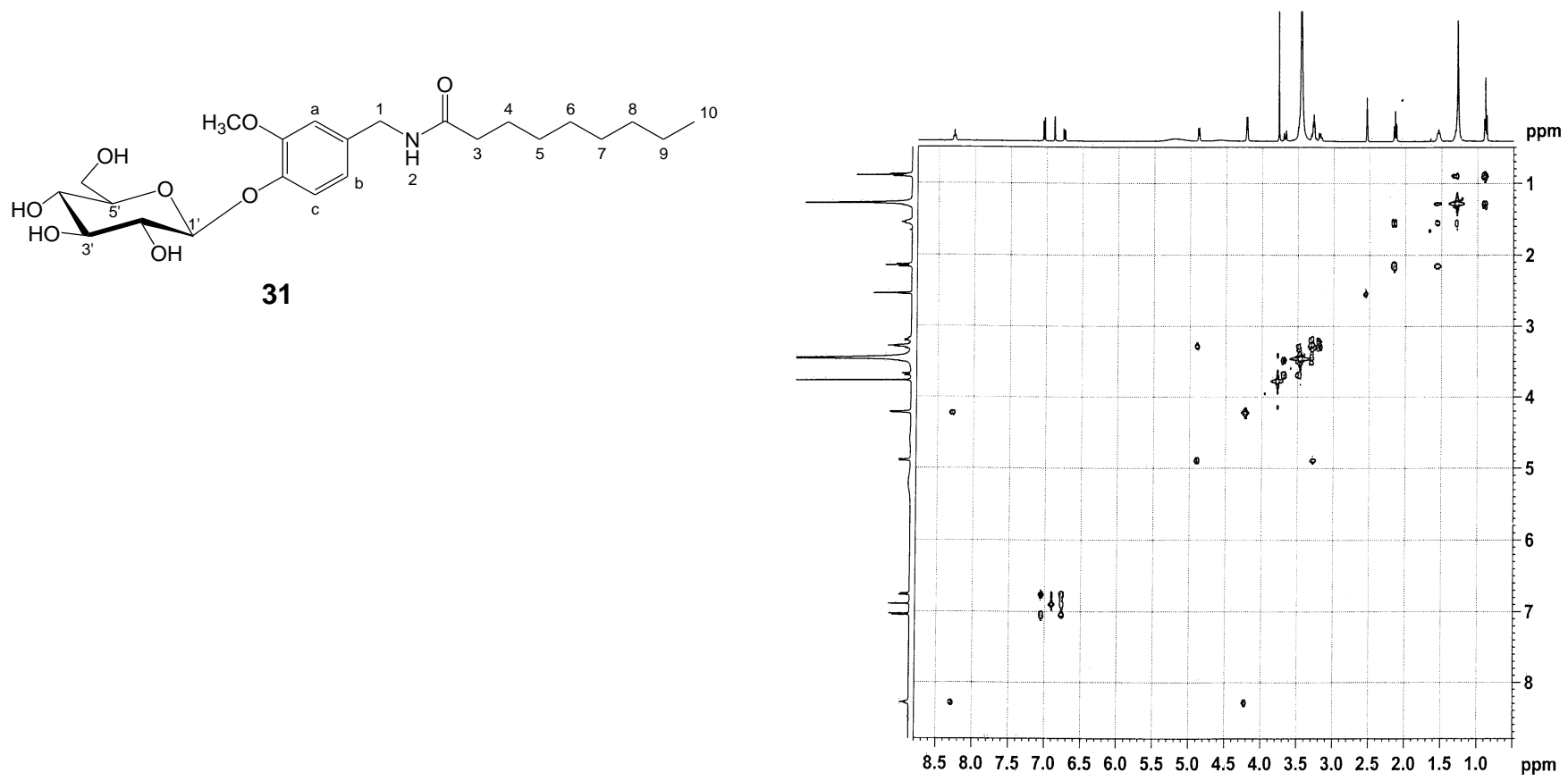
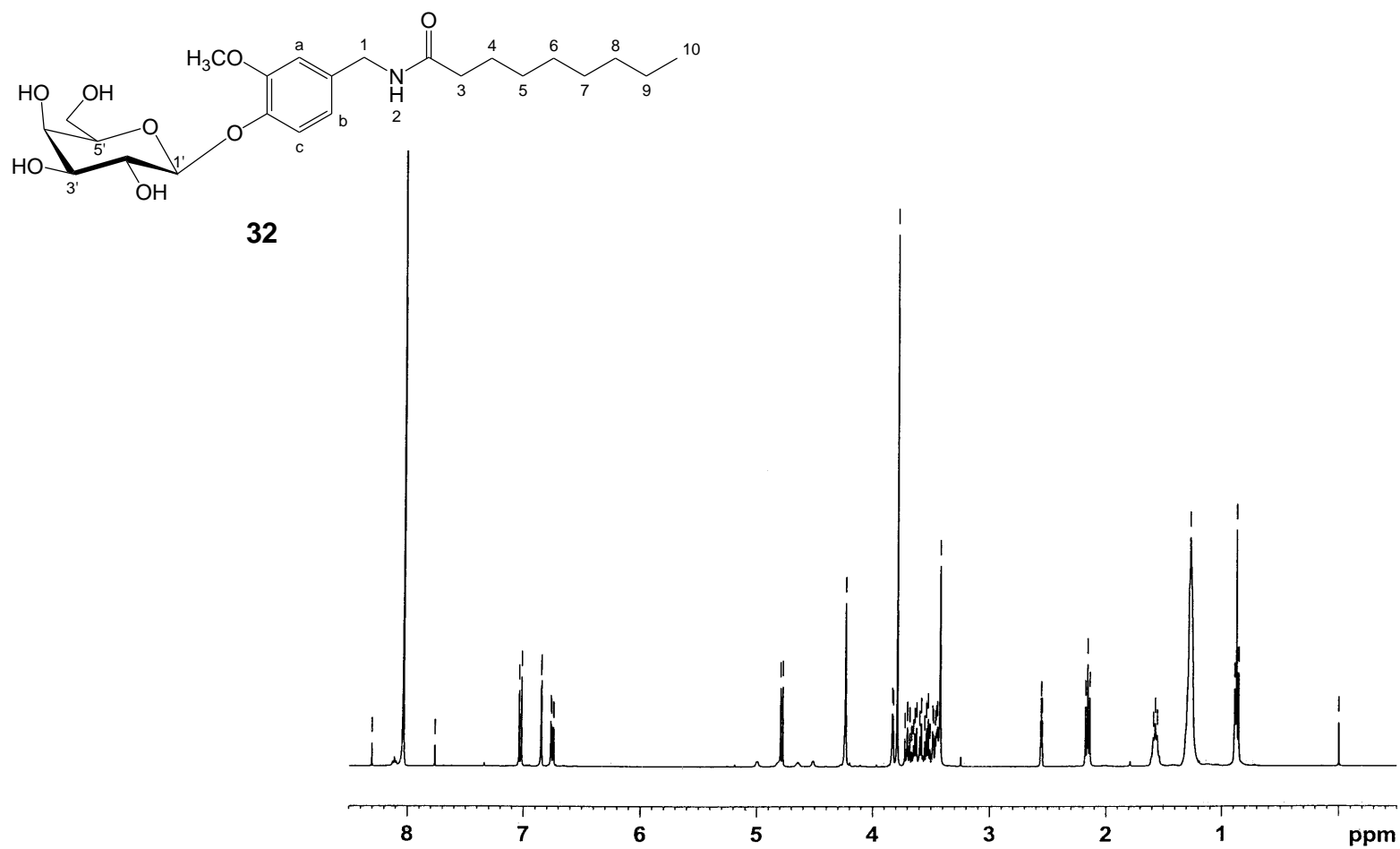


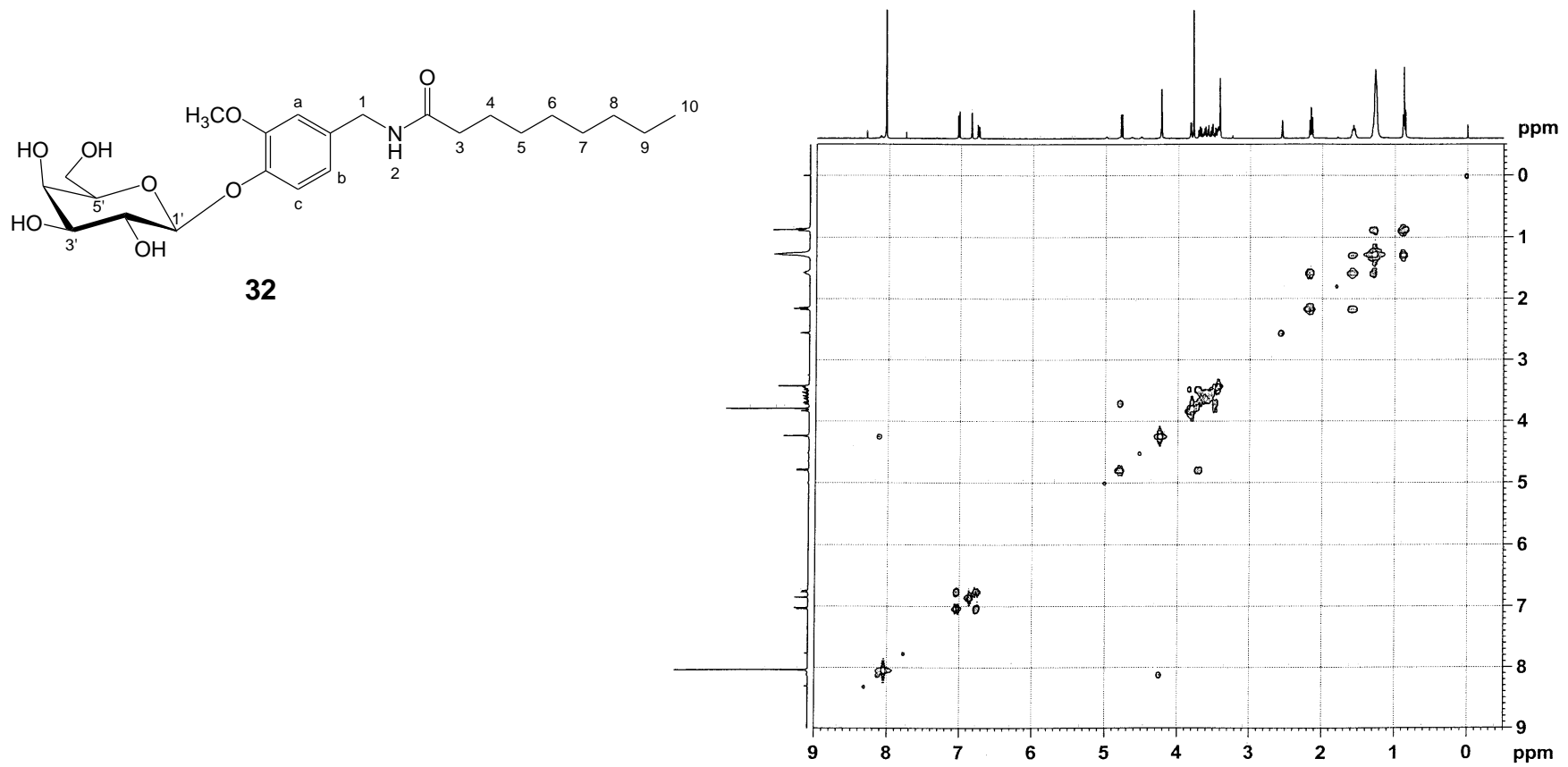
Figura 26. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[3-metoxi-4-(β-D-glupiranosiloxi)encil]nonanamida



**Figura 27.** Espectro de HOMO-COSY N-[3-metoxi-4-( $\beta$ -D-glupiranosiloxi)bencil]nonanamida **31**



**Figura 28.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[3-metoxi-4-(β-D-galactopiranosiloxi)encil]nonanamida **32**



**Figura 29.** Espectro de HOMOCOSY de N-[3-metoxi-4-( $\beta$ -D-galactopiranosiloxi)encil]nonanamida **32**

## 8. CONCLUSIONES

Aunque no se lograron caracterizar los O-glicósidos propuestos, derivados de la capsaicina, si se obtuvieron los derivados O-glucósidos y O-galactósidos derivados de la Vainillilnonanamida, los cuales son presentados y discutidos en este trabajo e identificados mediante un análisis espectroscópico.

La catálisis por transferencia de fase es una metodología adecuada para la reacción de O-glicosidación, ya que mediante esta se obtienen buenos rendimientos en condiciones suaves y tiempos menores evitándose la formación del producto de eliminación **26**.

Los productos O-glicósidos análogos a la capsaicina sintetizados a partir de la vainillilnonanamida **8**, mostraron un mejor comportamiento frente a la solubilidad, ya que fueron más solubles en metanol y etanol, que la vainillilnonanamida de partida.

Se determinó que esta metodología es eficiente para la síntesis de O-glicósidos con capsaicina, bajo las condiciones optimizadas, porque los resultados demostraron la formación del compuesto O-glicosídico esperado.

Teniendo en cuenta que las modificaciones realizadas aún no han sido reportadas,



se concluye que esta investigación es un aporte importante en la síntesis de prodrogas derivadas de capsaicina, probablemente con características citotóxicas diferentes.

La extracción de capsaicina por soxhlet con metanol produjo buenos resultados al compararse con acetona y acetonitrilo y la técnica de precolación por ultrasonido.

La utilización de ENVICARB permitió una mayor limpieza de la muestra con una decoloración casi completa y buenos resultados en la recuperación. Es importante seguir investigando para determinar mejores condiciones.

## 9. BIBLIOGRAFIA

---

1. BOSLAND, P. Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. En: J. Janick. 1996. p. 479 – 487.
2. Enciclopedia terranova: Producción agrícola. Bogota: Terranova. 1995; vol 2., p 406 –407
3. Federación nacional de cafeteros. El cultivo del pimentón. 7 ed. Bogota. Linotipia Bolivar. 1994. p 3-6
4. CONTRERAS, M. and YAHIA, E. Changes in capsaicinoids during development, maturation and senescence of chili pepper and relation with peroxidasa activity. En: J. Agric. Food. Chem. 1998; Vol 46. p. 2075-2079
5. <http://easyweb.easynet.co.uk/goaselton/chile/scovile.html>
6. KARNKA, R., et al. Optimization of HPLC parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. En: Analytical Sciences. 2002; Vol 18. p. 661 – 665
7. THOMAS, B., et al. Simple method for Quantitation of Capsaicinoids in Peppers Using Capillary Gas Chromatography. En: Journal Agric. Food Chem. 1998; Vol 46. p 2076 -2076
8. BETTS, T., Pungency Quantitation of Hot pepper sauces using HPLC. En: Journal of Chemical Education. Vol. 76, No. 2 (feb. – 1999); p. 240 – 244
9. BATCHELOR, J.; JONES, B. Determination of the Scoville Heat Value for Sauces and Chilies: An HPLC Experiment. En: Journal of Chemical Education. 2000; Vol. 77. No. 2. p. 266 – 267

- 
- 10 HUANG, Jiping.; MABURY, Scott. Hot Chili Peppers: Extraction, Cleanup, and Measurement of Capsaicin. . En: Journal of Chemical Education. 2000; Vol. 77. No.12. p. 1630 – 1631
- 11 The hottest chilli variety in India. En: Scientific Correspondence. 2000; vol 79. No. 3. p. 287-288
- 12 Capsaicinoids. En: Application note ESA. 5600A
- 13 PINTO, J., et al. Cuantificación de capsaicinoides y Determinación de la Pungencia del ají por HPLC. Universidad Industrial de Santander. Departamento de Química
- 14 OCHOA-ALEJO, N. In Vitro Chilli Peper Biotechnology. Biologi Plant. Vol 37 2001; p.701-729
- 15 THRESH, M. Pharm. J. Trans. 1876, p 7 – 15. Citado por: WALPOLE, C. et al. Analogues of Capsaicin with Agonist Activity as Novel Analgesic Agents; Structure – Activity Studies. 1. The Aromatic “A – Region”. En: Journal of Medical Chemistry. Vol.36, No. 16. 1993; p. 2352 – 2372
- 16 NELSON, E. K. The Constitution of Capsaicin: the pungent principle of capsicum. En: Journal of the American Chemical Society. Vol. 41. 1919; p 1115 – 1472
- 17 CROMBIE, L.; DANDEGAONKER. S. SIMPSON, K. B. Amides of Vegetables Origin. Part VI. Synthesis of Capsaicin. J. Chem. Soc. 1955. pp. 1025 – 1027
- 18 [www.people.cornel.edu/chem/senese/101/features/capsaicin.Shtml](http://www.people.cornel.edu/chem/senese/101/features/capsaicin.Shtml)
- 19 WALPOLE, C. et al . Similarities and differences in the structure – activity relationships of capsaicin y resiniferatoxin analogues. En: J. Med. Chem. 1996. vol 39. pp. 2939 - 2952
- 20 CATERINA, M. et al. The Capsaicin Receptor: a heat – activated ion channel in the pain pathway. En: Nature. Vol. 389 (oct. – 1997); p. 816 – 817

- 
- 21 HENDERSON D, SLICKMAN M. Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and Melatonin. J. Agric. Food Chem. 1999. Vol 47. p. 2563 – 2570
- 22 [www.oncolink.upenn.edu/pdg.html/3/span/392904.html](http://www.oncolink.upenn.edu/pdg.html/3/span/392904.html)
- 23 BHABADEB C, et al. Capsaicin, a unique anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic compound with antifungal activity against dermatophytes. Medical Science Research. 1995. Vol. 24. No. 10.
- 24 ABDEL – SALAM O, SZOLCSÁNYI J, MÓZSIK G. Capsaicin and the stomach. A review of experimental and clinical data. Journal Physiol Paris. (1997). Vol. 91. p. 151 – 171
- 25 IORRIZZI, M. New glycosides from capsicum annum L. var acuminatum. Isolation. Structure. Determination and biology activity. Journal Agric. Food. Chem. 2001, vol 49. p 2022-2029
- 26 AUSTIN P. Capsaicin Toxicity. Science / Health Abstrac. (1986). Vol. 5. No. 3.
- 27 KO F, et al. Toxic effects of capsaicin on keratinocytes and fibroblasts. Journal Burn Care Rehabil. 1998. Vol. 19. pp. 409 – 413.
- 28 CONSTANT, H. Nonivamide a constituent of capsicum oleoresin. Journal Natural Product. 1996. Vol 50. p 425-426
- 29 SHARMA, P. Prodrug approach in improving drug delivery. Journal of Scientific and Industrial Research. 1986). Vol 45. p 534-543
- 30 WALPOLE, C., et al. Analogues of Capsaicin with Agonist Activity as Novel Analgesic Agents; Structure – Activity Studies. 1. The Aromatic “A – Region”. En: Journal of Medical Chemistry. Vol.36, No. 16. 1993; p. 2352 – 2372

- 
- 31 WALPOLE, C, et al. Analogues of Capsaicin with Agonist Activity as Novel Analgesic Agents; Structure – Activity Studies. 2. The Amide Bond “B – Region”. En: Journal of Medical Chemistry. 1993. Vol.36. p. 2373 – 2380.
- 32 WALPOLE, C, et al. Analogues of Capsaicin with Agonist Activity as Novel Analgesic Agents; Structure – Activity Studies. 3. The Hydrophobic Side – Chain “C – Region”. En: Journal of Medical Chemistry. 1993. Vol.36. p. 2381 – 2389.
- 33 WALPOLE, C, et al. Analogues of Capsaicin with Agonist Activity as Novel Analgesic Agents; Structure – Activity Studies. 4. Potent, Orally Active Analgesics. En: Journal of Medical Chemistry. 1996. Vol.39. p. 4942 – 4951
- 34 KATRITZKY, A. Model Compunds of Caged capsaicin: Desing, Synthesis, and Photorreactivity. En: Journal Organic Chemistry. 2003. Vol 68. p. 9100-9104.
- 35 WANG, P. et al. A Carbohydrate-Linked Cisplatin Analog Having Antitumor Activity. En: Angrew. Chem. Int. Rd. Vol 38, No 12 . 1999; p. 1768-1769
- 36 MIHARA, S., et al. Synthesis of N-[4-( $\alpha$ -D-Glucopyranosyloxy)-3-metoxybenzyl] nonanamide and Its  $\beta$ -Anomer. En: J. Agric. Food Chem. 1992. Vol. 40. p. 2057 – 2059
- 37 KOMETANI, T. Glucosylation of Capsaicin by Cell Suspension cultures of Coffe arabica. En: Note Biosci. Biotech. Biochem. 1993. Vol 57. No 12. p. 2192-2193
- 38 MAKOSZA, M. Phase-transfer catalysis. A general green methodology in organic synthesis. En: Pure Appl. Chem. 2000. Vol 72. No 7. p. 1403-2000.
- 39 MORRISON .R , BOY. R. Química Orgánica. Addison-Weslwy Iberoamericana. 1996.
- 40 KREWSTER, K. Synthesis of aryl  $\beta$ -D-Glucopyranosides and aryl  $\beta$ -D-Glucopyranosiduronic acids. En: Tetrahedron Letters. 1979. Vol 52. p. 5051-5054

- 
- 41 LOGANATHAN D y GIRISH, T. Phase-Transfer-catalyzed d-Glucosylation: síntesis of benzoylated aryl  $\beta$ -D-glucopyranosides and  $\beta$ -D-glucopyranosyl-substituted cinnamates. En: Carbohydrate Research. 1987. p. 117-125
- 42 ROY, R y TROPPER, F. Stereospecific Synthesis of Aryl  $\beta$ -D-acetylglucopyranosides by phase transfer catalysis. Department of Chemistry. University of Ottawa. 1990
- 43 BINKLEY, R. Modern Carbohydrate Chemistry. Department of Chemistry. United States of America. 1988