

R. 2768

T. 198

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
CATEDRA DE FISICOQUIMICA APLICADA

ESTUDIO CINETICO DE LAS REACCIONES DE
OXIDACION DE ALCALOIDES DE LA RAUWOLFIA
SERPENTINA POR NITRITO.

Tesina de licenciatura

presentada por:

M^a del Pilar Aznar Ferrero

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

MIGUEL SANCHEZ GONZALEZ, Catedrático Numerario de Fisicoquímica Aplicada de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

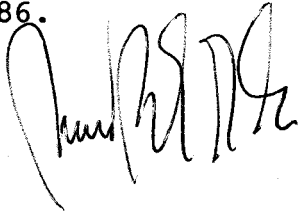
CERTIFICO: Que el presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de esta Cátedra, y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Y para que conste, expido y firmo el presente Certificado, en Sevilla, Junio de mil novecientos ochenta y seis.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Miguel Sánchez', is written over a horizontal line. The signature is enclosed within a simple rectangular box.

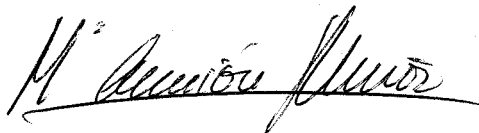
Fdo. Miguel Sánchez González.

Como Director de esta Tesina
declaro que ha sido leída y
revisada por mí en Junio de
1.986.



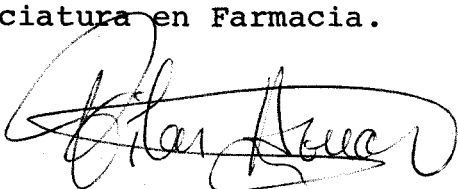
Fdo. Manuel Balón Almeida

Como Co-director de esta Tesina
declaro que ha sido leída y re-
visada por mí en Junio de 1.986.



Fdo. M^a Asunción Muñoz Pérez

Trabajo presentado como Tesina
para aspirar al grado de Licen-
ciatura en Farmacia.



Fdo. M^a del Pilar Aznar Ferrero

Sevilla, Junio 1.986.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Profesor Dr. D.Manuel Balón Almeida, Director de esta Tesina y a cuya orientación y estímulo se debe la realización de la misma.

A la Dra. Dña. Ma Asunción Muñoz Pérez por su co-dirección en esta Tesina, así como por su colaboración y continua ayuda.

Asimismo, deseo hacer patente mi gratitud a todos los restantes miembros del Departamento por su inestimable colaboración y ayuda en todo momento.

A mis padres.

INDICE

	Página
1.- Introducción.....	1
2.- Experimental.....	14
2.1.- Reactivos.....	15
2.2.- Procedimiento y aparatos.....	17
3.- Resultados.....	20
3.1.- Análisis de productos.....	21
3.2.- Resultados cinéticos.....	26
3.2.1.- Método de obtención de las constantes de velo_ cidad.....	27
3.2.2.- Ecuaciones de veloci- dad.....	28
3.2.3.- Influencia de factores ambientales.....	32
4.- Discusión.....	52
5.- Conclusiones.....	66
6.- Referencias bibliográficas.....	69

1.- INTRODUCCION

Las Rauwolfias constituyen un extenso género de plantas de la familia de las Apocináceas que se encuentran ampliamente distribuidas sobre las regiones tropicales de nuestro planeta. Desde un punto de vista farmacológico, la especie más importante de éste género es la Rauwolfia Serpentina Benth cuyas raíces eran utilizadas por los antiguos indios como febrífugo, en el tratamiento de disentería y como remedio para las mordeduras de serpientes.

Aunque ya en 1890 Greshoff⁽¹⁾ había señalado la presencia de principios alcaloideos en las preparaciones

de ésta planta, los primeros en aislar en forma cristalina una serie de alcaloides de la Rauwolfia Serpentina fueron Siddiquí y Siddiquí⁽²⁾ en el año 1931. El posterior descubrimiento de la reserpina, un alcaloide con pronunciada actividad hipotensora y sedativa, por Müller, Schlitter y Bein⁽³⁾ potenció notablemente la investigación de las propiedades farmacológicas y químicas de estos alcaloides. Actualmente se conocen más de treinta alcaloides de la Rauwolfia Serpentina⁽⁴⁻⁵⁾ entre los que cabe destacar por su mayor interés farmacológico la ajmalicina, ajmalina, deserpidina, reserpina, serpentina, yohimbina y rescinamina.

Desde que en 1933, Chopra, Gupta y Mukherjee⁽⁶⁾ registraron la actividad hipotensora de las sustancias extraídas de la Rauwolfia Serpentina, han sido numerosísimos los estudios farmacológicos⁽⁷⁻¹⁰⁾ llevados a cabo con estos alcaloides. Actualmente se cree que la acción hipotensora y sedativa de ésta planta se debe principalmente a los alcaloides deserpidina, reserpina y rescinamina y que su mecanismo de acción está relacionado con su actuación sobre el sistema nervioso central.

Aunque la acción hipotensora y sedativa de las preparaciones de Rauwolfia es, sin lugar a dudas, la propiedad farmacológica que ha atraído mayor atención, existe también referencias en las que se recogen la potencialidad de estos alcaloides en el campo de la geriatría⁽¹¹⁾, en el tratamiento de algunos desórdenes mentales⁽¹²⁾, de la psoriasis⁽¹³⁾, de la angina de pecho⁽¹⁴⁾, de las alteraciones cardiovascula -

res⁽¹⁵⁾ y desórdenes ginecológicos⁽¹⁶⁾.

Las preparaciones de Rauwolfia Serpentina - poseen dos propiedades que aumentan de forma importante su utilidad terapéutica; su baja toxicidad y la no creación de drogodependencia⁽¹⁷⁾. En algunos casos los tratamientos con estas drogas producen letargia, relajación muscular, rino- rrea, diarrea, disminución de la libido y tendencia a la ganancia de peso⁽¹⁸⁾. No obstante, estos efectos colaterales son poco acusados y desaparecen rápidamente al suprimir o reducir la dosis.

En los últimos años, el interés farmacológico de los alcaloides de la Rauwolfia Serpentina se ha visto notablemente acrecentado al haberse comprobado su capacidad para inhibir selectivamente la replicación del ADN en las células cancerosas sin afectar al de las células normales⁽¹⁹⁾.

Desde un punto de vista químico, la mayor parte de los alcaloides de la Rauwolfia Serpentina son bases indólicas que pueden clasificarse según sus características estructurales en los siguientes grupos⁽²⁰⁾;

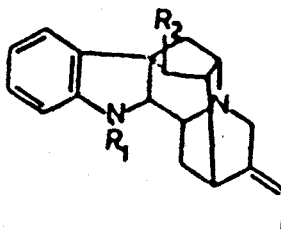
- I. Indolinas terciarias.
- II. Bases cuaternarias de anhidronio.
- III. Bases indólicas terciarias. Este grupo puede a su vez subdividirse en;
 - a) Alcaloides de la yohimbina y
 - b) Alcaloides de la heteroyohimbina

ESQUEMA 1.-

Estructuras químicas más comunes de los alcaloides de la Rauwolfia Serpentina.

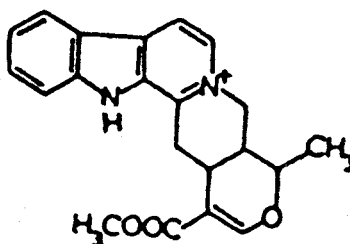
GRUPO I:

Indolinas terciarias



GRUPO II:

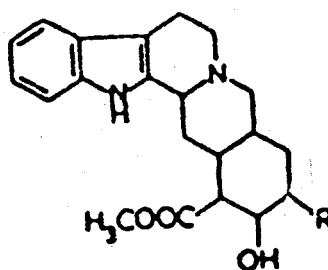
Bases cuaternarias de anhidronio.



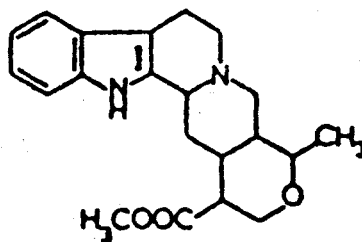
GRUPO III:

Bases indólicas terciarias:

a) Alcaloides de la yohimbina.



b) Alcaloides de la heteroyohimbina.



Como puede apreciarse en el Esquema 1, gran parte de los alcaloides de la Rauwolfia Serpentina y especialmente los de mayor significación farmacológica poseen en su estructura un anillo de β carbolina (9H-pirido|3,4-b|indol) (Esquema 2), en alguno de sus diferentes grados de oxidación.

La presencia de este grupo de β -carbolina confiere a los alcaloides de la Rauwolfia que lo poseen sus propiedades fisicoquímicas más significativas y sus reacciones más características ⁽²¹⁾. En particular, entre estos últimos queremos destacar por su relación con el tema de nuestro trabajo las reacciones de oxidación.

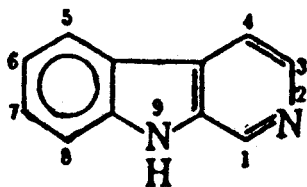
Las tetrahidro- β -carbolinas reaccionan con una variedad de agentes oxidantes dando lugar a diferentes productos dependiendo de las características de los oxidantes y de la naturaleza del medio de reacción.

Estas reacciones presentan gran interés tanto desde un punto de vista sintético como analítico.

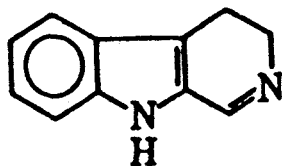
Posiblemente, las reacciones de oxidación de las tetrahidro- β -carbolinas más características son las que conducen a la formación de dehidro- β -carbolinas y en algunos casos a β -carbolinas completamente aromáticas. Este es el caso de las reacciones con oxidantes tales como tert-butil hipoclorito ⁽²²⁾, acetato de mercurio ⁽²³⁾, tetraacetato de plomo ⁽²⁴⁾ o persulfato ⁽²⁵⁾. A este grupo pertenecen también las reacciones de degradación oxidativa de los alcaloides derivados de la tetrahidro- β -carbolina ⁽²⁶⁾.

ESQUEMA 2.-

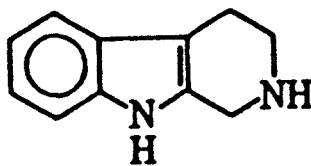
Estructuras de las β -carbolinas.



Tetradehidro- β -carbolina



Dehidro- β -carbolina



Tetrahidro- β -carbolina

El mecanismo de estas reacciones puede racionalizarse sobre la base del mecanismo general propuesto por Taylor⁽²⁷⁾ para las reacciones de oxidación de los derivados 2,3- disustituidos del indol (Esquema 3). Este mecanismo supone un ataque a la posición 4 del anillo de tetrahidro- β -carbolina (I) por un electrófilo para dar lugar a la indolenina correspondiente (II), estableciéndose posteriormente el equilibrio imino-enamina(IIa,IIb), el cual en medio ácido conduce a la formación de la dehidro- β -carbolina(III) y con oxidantes fuertes a β -carbolinas completamente aromáticas (V).

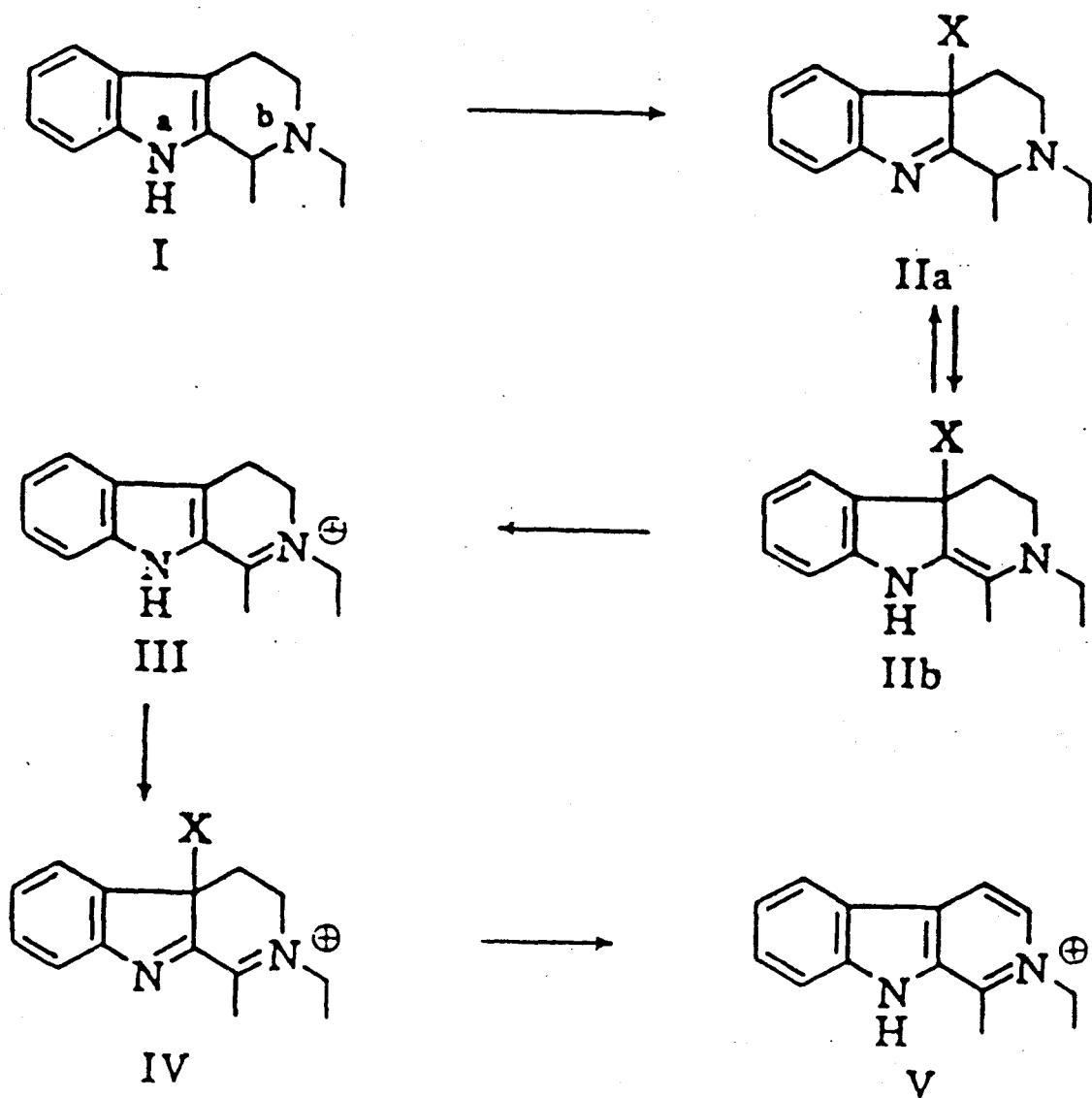
Las reacciones de la reserpina con nitrito en medio ácido conducen a la formación de 3,4-dehidroreserpina por lo que puede considerarse englobada dentro del mecanismo indicado anteriormente. Esta reacción ha presentado un interés analítico considerable ya que en ella se basan una gran cantidad de métodos de determinación analítica de reserpina.

La reacción reserpina-nitrito fué registrada por primera vez por Szalkowski y Mader⁽²⁸⁾ que utilizaron las características cromogénicas del producto de reacción: 3,4-dehidroreserpina, para la determinación analítica de este alcaloide. Este procedimiento modificado inicialmente por Banes y col⁽²⁹⁾ y posteriormente por otros autores⁽³⁰⁾ ha sido adoptado como método oficial para la determinación de reserpina en la farmacopea U.S.A.⁽³¹⁾

Haycock y Mader⁽³²⁾ realizaron un análisis detallado de las características de esta reacción, llegando a la conclusión de que para la formación de productos cromogé-

ESQUEMA 3.-

Mecanismo general de Taylor de tetrahi-
dro- β -carbolinas.

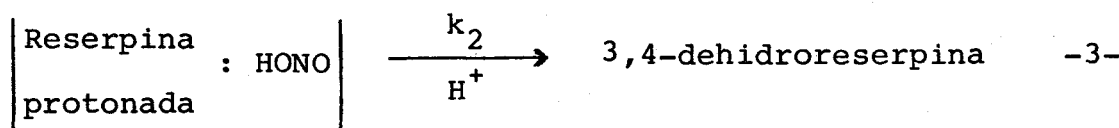
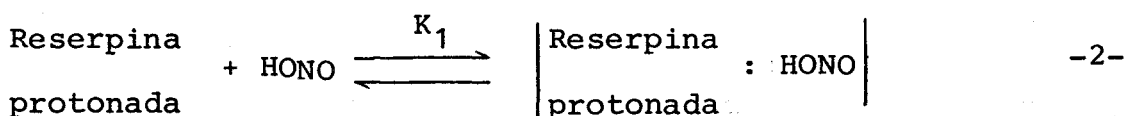


nicos de características similares a la 3,4-dehidroreserpina resulta imprescindible la presencia de un grupo metoxi en la posición 11 del anillo de tetrahidro- β -carbolina por lo que aquellos alcaloides que como la alstonina, deserpina, ajmalicina y yohimbina no poseen esta estructura, no dan la reacción.

En un estudio cinético posterior de esta reacción⁽³³⁾, éstos autores encontraron la siguiente ecuación de velocidad:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_2 \cdot K_1 \cdot |H^+| \cdot |HONO|}{1 + K_1 \cdot |HONO|} \quad -1-$$

consistente con el mecanismo de reacción que se indica a continuación;



No obstante, sus autores no pudieron establecer la naturaleza del producto de adición reserpina-nitrito, ni el origen de la dependencia de la concentración de ácido en la velocidad de reacción. Un estudio posterior de la reacción entre la rescinamina y nitrito⁽³⁴⁾ condujo a resultados similares, aunque tampoco en este caso sus autores aclararon

las cuestiones anteriormente indicadas.

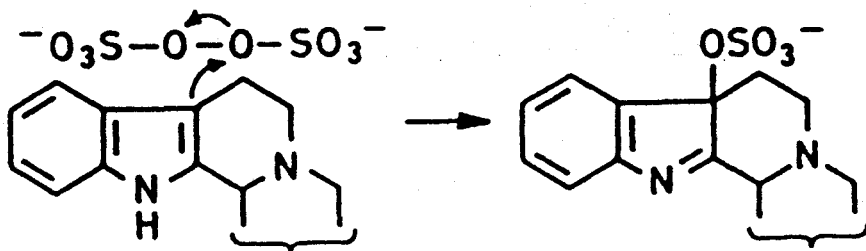
Recientemente, se ha llevado a cabo en nuestro Departamento un estudio cinético de las reacciones de oxidación de varios alcaloides indólicos con peroxodisulfato potásico ^(25,a). Las reacciones de este oxidante con yohimbina, reserpina y reserpidina conducen a la formación de los correspondientes 3,4-dehidroderivados, aunque en el caso de la reserpina la oxidación prosigue hasta la formación de tetra-dehidroreserpina ^(25,b).

Aunque las diferentes características estructurales de estos alcaloides afectan notablemente las velocidades de sus reacciones, éstos siguen una misma ecuación de velocidad;

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_2 \cdot K_1 \cdot |S_2O_8^=|}{1 + K_1 \cdot |S_2O_8^=|} \quad -4-$$

formalmente similar a la indicada previamente para la reacción reserpina-nitrito.

El mecanismo de éstas reacciones se recoge en el Esquema 4 y puede considerarse un caso particular del mecanismo general de Taylor anteriormente expuesto.



ESQUEMA 4

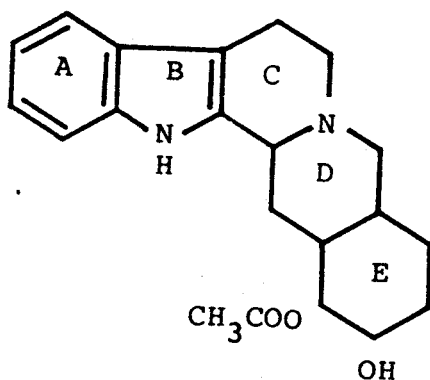
Una comparación de los datos existentes sobre las reacciones de los alcaloides de la Rauwolfia Serpentina con nitrito y con peroxodisulfato, pone en evidencia que ambos tipos de reacciones presentan características muy similares; dan lugar a la formación de los mismos tipos de productos y obedecen las mismas ecuaciones de velocidad. Estas similitudes permiten suponer razonablemente que sus mecanismos de reacción deben ser análogos.

Por ésta razón, hemos creído interesante llevar a cabo un estudio sistemático de las cinéticas de las reacciones de diversos alcaloides de la Rauwolfia Serpentina con nitrito que permita esclarecer con detalle el mecanismo y las características generales de estas reacciones.

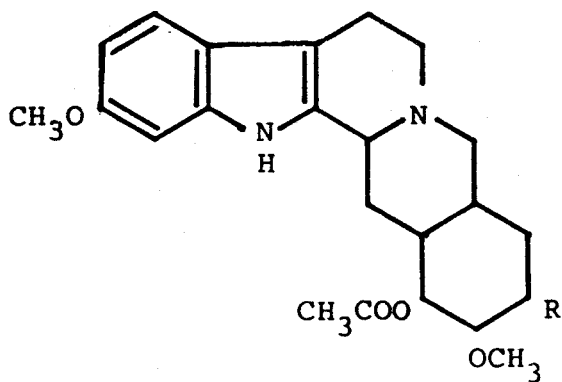
Los alcaloides seleccionados han sido yohimbina(I), reserpina(II) y reserpilina(III) (Esquema 5) ya que estos alcaloides poseen distintos grados de sustitución por grupos metoxi en el anillo de benceno del núcleo de tetrahidro- β -carbolina y pueden proporcionar una información adicional de este sustituyente en la cinética y mecanismos de estas reacciones.

ESQUEMA 5.-

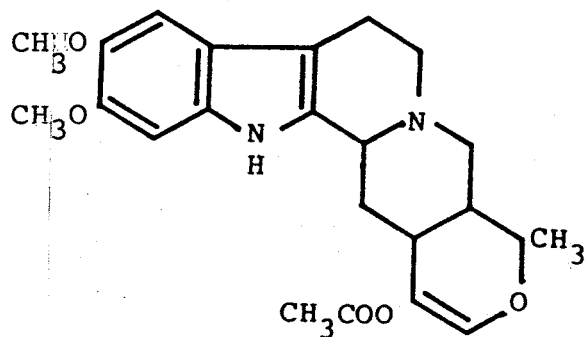
Estructura de la YOHIMBINA, RESERPINA, Y
RESERPILINA.



I: YOHIMBINA



II: RESERPINA



III: RESERPILINA

$\text{R} = 3,4,5(\text{OCH}_3)\text{C}_6\text{H}_2-\text{COO}$

2.- EXPERIMENTAL.

2-1 REACTIVOS.

Los alcaloides utilizados; clorhidrato de yohimbina, clorhidrato de reserpilina y reserpina fueron donados por C.H. Boehringer Sohn Ingelheim⁽³⁵⁾. Se comprobó que estos productos eran cromatográficamente puros por lo que se utilizaron sin someterlos a ninguna purificación posterior.

Las disoluciones de yohimbina y de reserpina se prepararon disolviendo sus clorhidratos en 5 cm³ de metanol y diluyendo posteriormente con agua destilada hasta

completar un volumen total de 100 cm^3 . Las disoluciones de reserpina, a causa de la baja solubilidad en agua de este alcaloide, se prepararon en metanol-agua al 50% en volumen.

Todas las disoluciones de los alcaloides se prepararon en matraces de color topacio y se conservaron en la oscuridad para evitar procesos de fotooxidación⁽³⁶⁾ preparándose diariamente antes de cada experiencia.

Las disoluciones de nitrito se prepararon a partir de NaNO_2 Merck R.A. y las de ácido perclórico por dilución de una disolución comercial de este reactivo del 70% (Merck). Estas últimas disoluciones se valoraron frente a otras de NaOH.

2-2 PROCEDIMIENTO Y APARATOS

Las reacciones estudiadas se han seguido espectrofotométricamente, midiendo las absorbancias de las mezclas reaccionantes a intervalos regulares de tiempo. Los reactivos con la excepción del nitrito, se mezclaron previamente y se mantuvieron termostatizados en un baño durante unos veinte minutos a la temperatura a la que se iba a seguir la reacción. Una vez transcurrido este tiempo se añadió la cantidad de nitrito conveniente, también previamente termostatizado, se tomó una alícuota de la mezcla y se llevó a la cubeta del espectrofotómetro.

La temperatura en la cámara de cubetas se mantuvo constante a la temperatura deseada en $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, haciendo circular agua procedente de un baño exterior.

Las medidas de absorbancias y los espectros UV-VIS de reactivos y productos se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 5. Este aparato es de doble haz, con rango de longitud de onda de 190 a 900 nm. La precisión en la selección de longitud de onda es de ± 0.3 nm, la reproducibilidad de ± 0.1 nm y la precisión fotométrica de ± 0.003 unidades de absorbancia para 1A. Además, dicho aparato posee un Printer/Plotter para la recogida de datos y representación de espectros y es programable.

Los espectros de fluorescencia de los alcaloides y de sus productos de reacción se han realizado en un espectrofluorímetro Perkin Elmer modelo 650-40. Este aparato utiliza una lámpara de xenon de 150w. Los monocromadores tanto de excitación como de emisión poseen un paso de banda regulable desde 1.5 a 20 nm y seleccionan la radiación en un intervalo de 200 a 830 nm. Como registrador se ha utilizado un Hitachi Modelo 057 XY.

El procesamiento de los datos cinéticos se ha efectuado en un microordenador Apple II Europlus.

Los productos de reacción se han identificado por cromatografía de capa fina. Estos experimentos se han llevado a cabo con dos fines; por un lado caracterizar los alcaloides y sus productos mediante las medidas de sus R_f y por otro lado, utilizando placas preparativas individuales para

cada alcaloide, realizar espectros de absorción separando en las placas las bandas correspondientes al alcaloide y su producto respectivamente.

Hemos utilizado placas de 20x20cm y como soporte Kieselgel 60 PF₂₅₄, el cual contiene aditamentos fluorescentes. El subíndice indica la longitud de onda de excitación a la que fluoresce dicho indicador. De esta forma se pueden localizar las manchas o bandas observando simplemente la placa con una lámpara de UV (Uv atom), sin necesidad de hacer un revelado posterior.

La fase móvil más conveniente para éstas separaciones resultó ser cloroformo-metanol en la proporción 4:1.

3.- RESULTADOS

3-1 ANALISIS DE PRODUCTOS.

Cuando se mezclan disoluciones de los alcaloides con una de nitrito sódico en medio ácido se forman productos amarillos (yohimbina y reserpilina) o amarillo-verdoso (reserpina), que en condiciones de alta concentración de nitrito o de ácido, toman posteriormente una coloración parda-rojiza que puede ser debida a la descomposición de los productos iniciales o a la formación de óxidos de nitrógeno. Todas nuestras experiencias se han llevado a cabo en condi-

ciones experimentales adecuadas para que los últimos procesos no tengan lugar.

Las cromatografías de las mezclas de reacción mostraron dos manchas correspondientes al alcaloide y al producto de reacción. Estos análisis cromatográficos se realizaron con muestras tomadas en los primeros tiempos de reacción para evitar los efectos de posibles reacciones secundarias y sus resultados se recogen en la tabla 1.

Cabe señalar que los productos obtenidos en las reacciones de estos alcaloides son cromatográficamente idénticos a los de las reacciones de los mismos alcaloides con peroxodisulfato potásico. (25)

Los espectros UV-VIS (figs. 1-3) de estos productos de reacción, una vez separados cromatográficamente, muestran máximos de absorción a 350 nm (yohimbina), 382 nm (reserpina) y 388 nm (reserpilina). Estos espectros se corresponden de forma plenamente satisfactoria con los de los 3,4-dehidroderivados de cada alcaloide (37).

Con objeto de confirmar la naturaleza de los productos de reacción, se realizaron varios análisis espectrofluorimétricos. Los espectros de emisión de los productos de reacción obtenidos excitando a las longitudes de onda de los máximos de absorción anteriormente indicados, muestran bandas cuyos máximos a 504 nm (yohimbina), 495 nm (reserpina) y 530 nm (reserpilina) están también en pleno acuerdo con los que se recogen en la bibliografía. (38)

TABLA 1.- ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS PRODUCTOS
DE REACCION.

<u>Muestra</u>	<u>R_f (1)</u>	<u>R_f (2)</u>
Yohimbina	0.57	-----
Yohimbina+nitrito	-----	0.34
Reserpina	0.82	-----
Reserpina+nitrito	0.82	0.43
Reserpilina	0.82	-----
Reserpilina+nitrito	0.82	0.34

=====

FIGURA 1

Espectros UV-VIS de la YOHIMBINA (——) y
3,4-DEHIDROYOHIMBINA (-----).

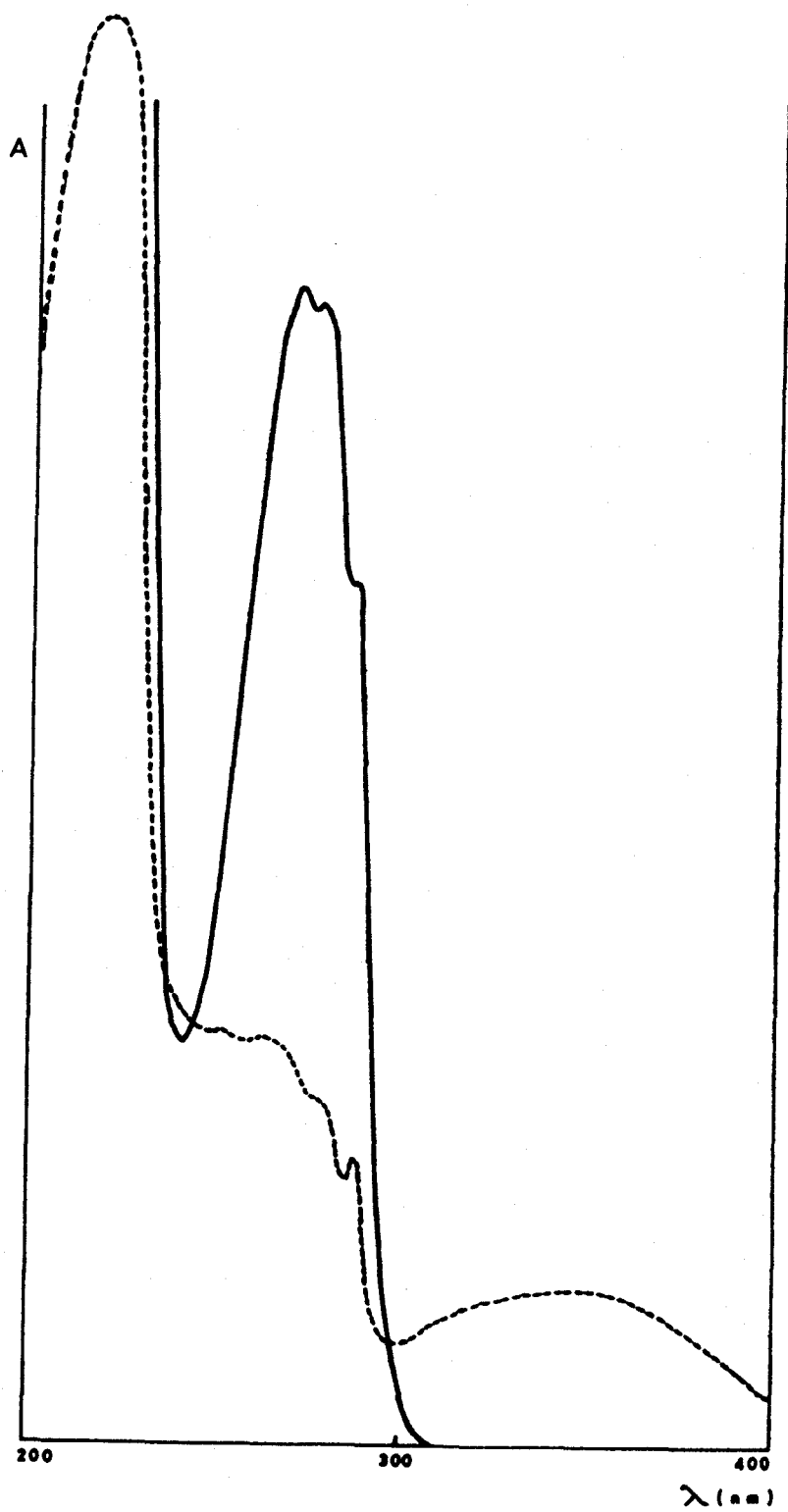


FIGURA 2

Espectros UV-VIS de la RESERPINA (—————)
Y 3,4-DEHIDRORESERPINA (-----).

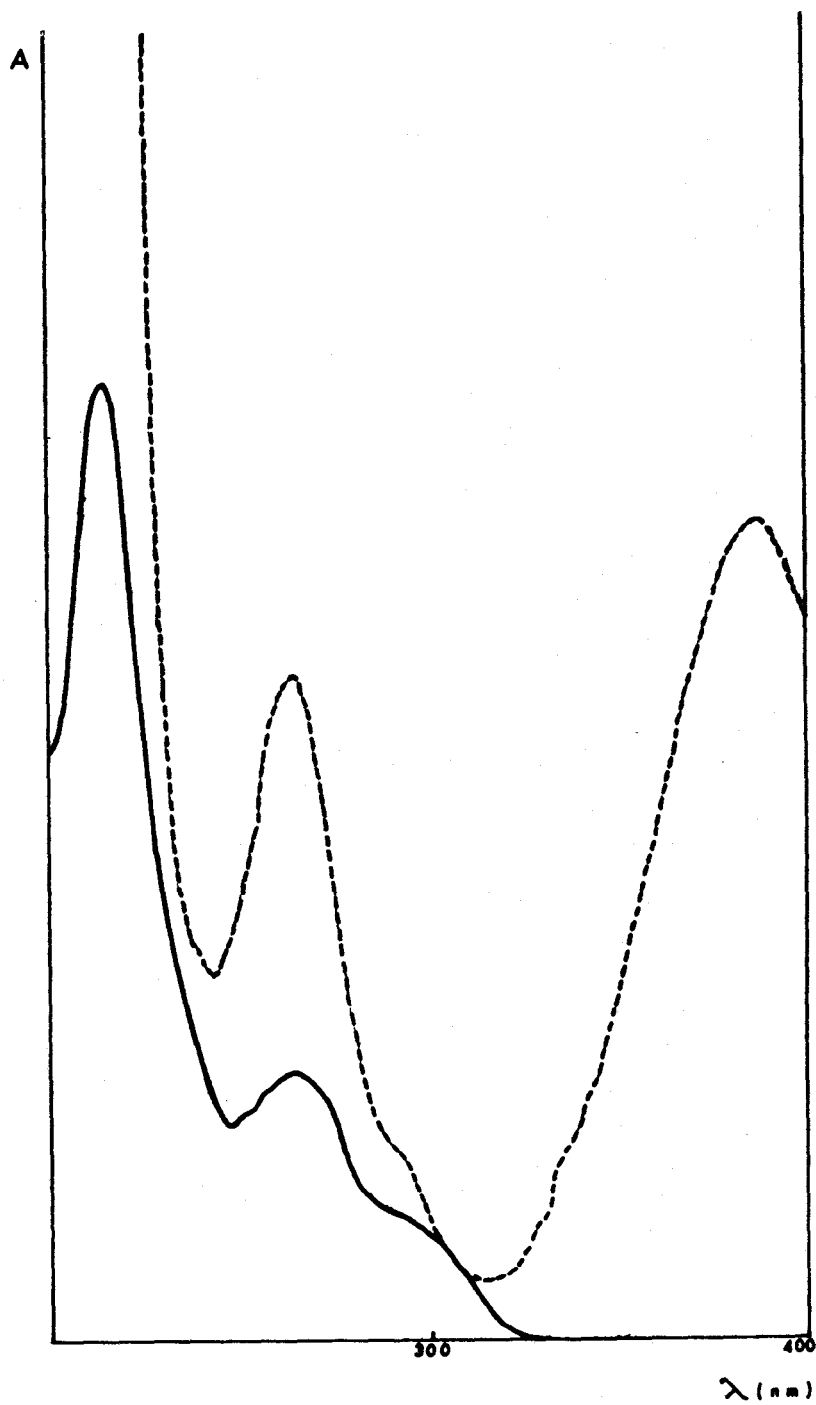
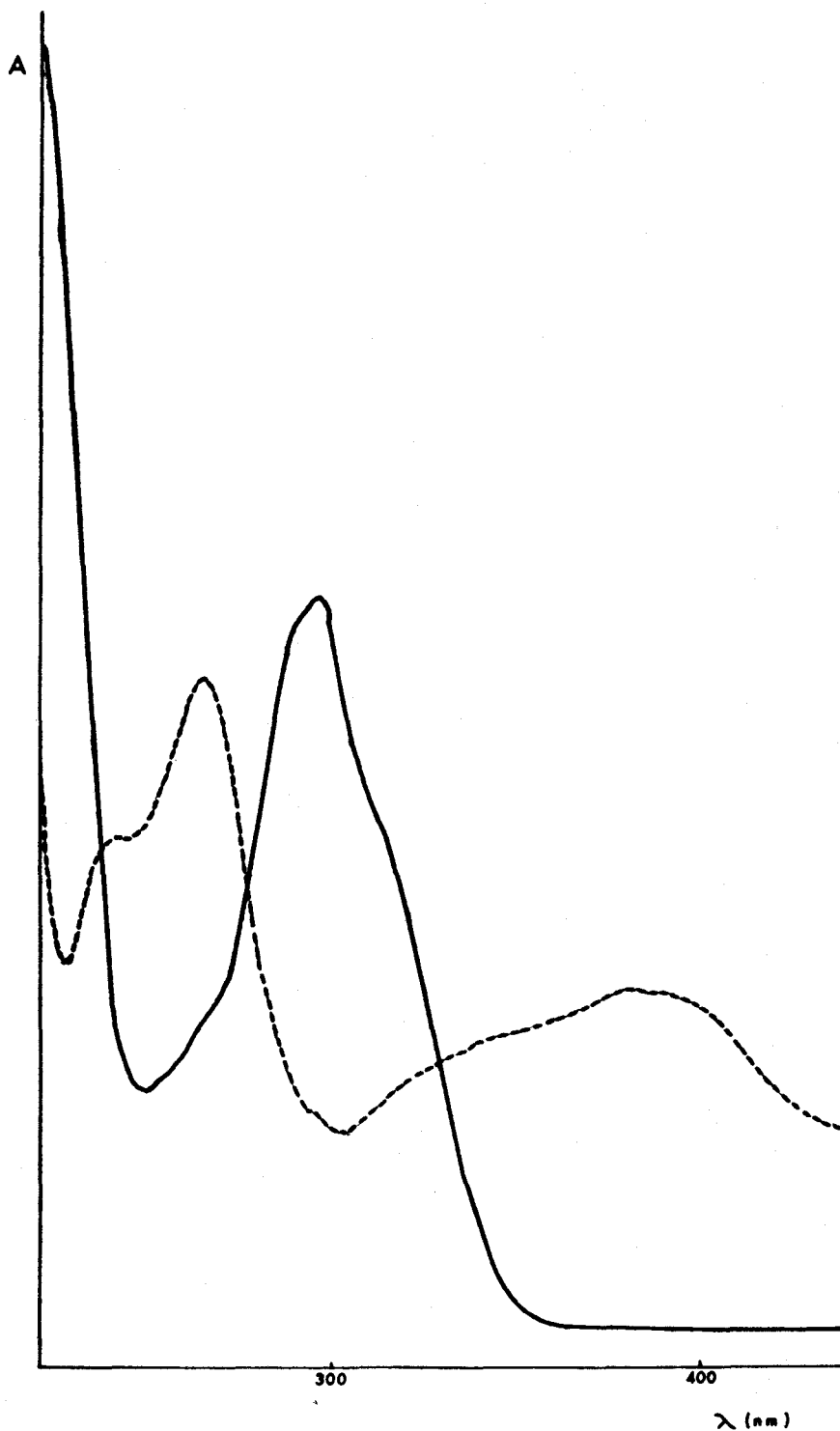


FIGURA 3

Espectros UV-VIS de la RESERPILINA (—————)
Y 3,4-DEHIDRORESERPILINA (-----).



3-2 RESULTADOS CINETICOS.

3-2-1 METODO DE OBTENCION DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD.

Las medidas cinéticas se realizaron siguiendo la variación de las absorbancias de las mezclas de reacción con el tiempo a las longitudes de onda de los máximos de absorción de los productos de reacción, según el procedimiento indicado previamente.

Estas medidas cinéticas se realizaron siempre en condiciones de pseudo-primer orden, empleando para ello con-

centraciones de nitrito y de ácido en exceso con respecto a la de alcaloide.

Previamente se comprobó que la presencia de ácido era indispensable para que las reacciones transcurriesen con velocidad apreciable.

Las constantes de velocidad de pseudo-primer orden, k_{obs} , se determinaron mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de los datos de absorbancia-tiempo a la ecuación;

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty) \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) \quad -5-$$

En este ajuste A_0 , A_∞ y k_{obs} se consideraron parámetros ajustables.

El acuerdo entre los valores de A_t obtenidos mediante la ecuación (5) y los experimentales fué siempre plenamente satisfactorio (fig. 5) (desviación estandar del ajuste $< \pm 2,0 \cdot 10^{-5}$).

Este método de cálculo de k_{obs} dió siempre resultados reproducibles, de forma que el error en k_{obs} para varias medidas cinéticas duplicadas no fué nunca superior al 8%.

3-2-2 ECUACION DE VELOCIDAD.

Con objeto de determinar las ecuaciones de velocidad de las reacciones estudiadas se llevaron a cabo medidas cinéticas con diferentes concentraciones de ácido perclórico y de nitrito. Los resultados de estas medidas se recogen en las Tablas (2-7).

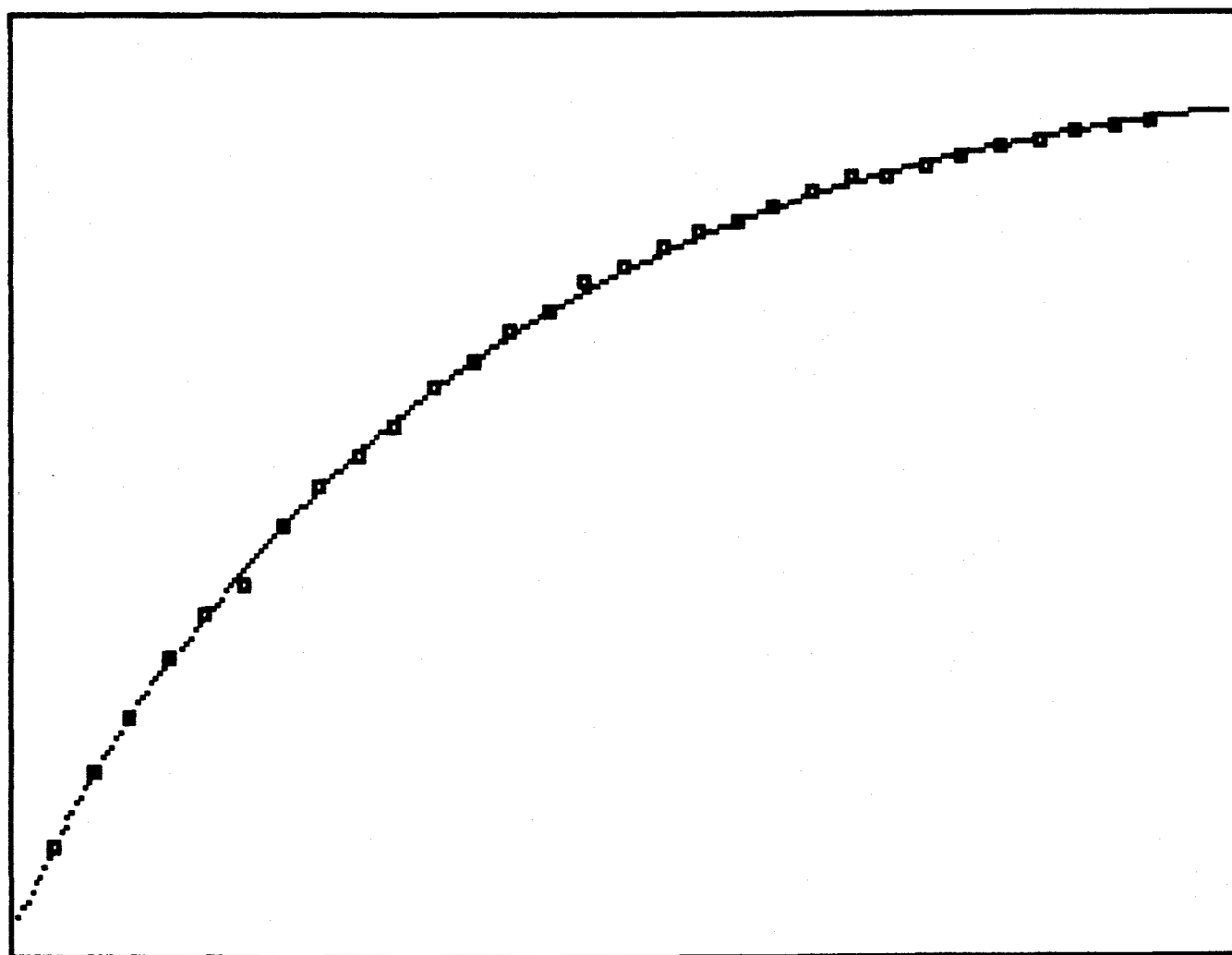
Los valores de k_{obs} recogidos en estas tablas corresponden al

FIGURA 5

Representación ABSORBANCIA-TIEMPO.

■ = Puntos experimentales.

.... = Ajuste según ecuación 5.



t

valor medio de, al menos, dos determinaciones.

Así, en una primera serie de experiencias se varió la concentración de HClO_4 manteniendo fija las de nitrito y alcaloide así como la temperatura (25°C).

En las figuras (4-6) se recogen las representaciones gráficas de k_{obs} frente a la concentración de HClO_4 para cada una de las reacciones estudiadas. Como puede apreciarse, en todos los casos existe una relación lineal entre k_{obs} y la concentración de ácido perclórico.

En una segunda serie de experiencias se mantuvieron constantes las concentraciones de ácido y de alcaloide (a 25°C) y se modificaron las de nitrito. En estas condiciones, las representaciones de k_{obs} frente a la concentración de oxidante se recogen en las figuras (7-9).

Como puede apreciarse, las representaciones de k_{obs} frente a $|\text{NO}_2^-|$ son lineales en el caso de las reacciones yohimbina-nitrito y reserpilina-nitrito pero muestran una curvatura para la reacción reserpina-nitrito, tendiendo los valores de k_{obs} hacia un valor constante a medida que aumenta la concentración de oxidante. Los resultados de ésta última reacción coinciden cualitativamente con los obtenidos previamente por Haycock y Col⁽³³⁾ por lo que puede establecerse para ella una ecuación de velocidad similar;

$$k_{\text{obs}} = \frac{k \cdot |\text{NO}_2^-| \cdot |\text{HClO}_4|}{1 + k' \cdot |\text{NO}_2^-|} \quad -6-$$

Tomando los inversos en ambos miembros de la

ecuación -6- y reordenando, puede obtenerse la ecuación -7-;

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{1}{k \cdot |\text{NO}_2^-| \cdot |\text{HClO}_4|} + \frac{k'}{k \cdot |\text{HClO}_4|} \quad -7-$$

según la cual, para una concentración fija de $|\text{HClO}_4|$ la representación de $1/k_{\text{obs}}$ frente a $1/|\text{NO}_2^-|$ deberá dar una línea recta.

En la figura 10 se ha efectuado dicha representación y como puede apreciarse confirma plenamente la expectativa anterior. Los valores de k y k' a 25°C obtenidos de la pendiente y ordenada en el origen de la recta obtenida son $0.69 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 156 M^{-1} , respectivamente.

En el caso de las reacciones yohimbina-nitrito y reserpilina-nitrito los resultados experimentales conducen a la siguiente ecuación de velocidad;

$$k_{\text{obs}} = k \cdot |\text{NO}_2^-| \cdot |\text{HClO}_4| \quad -8-$$

siendo los valores de k a 25°C , $0.173 \pm 0.005 \text{ M}^{-2}\text{seg}^{-1}$ (yohimbina) y $5.74 \pm 0.17 \text{ M}^{-2} \text{seg}^{-1}$ (reserpilina).

Puesto que la ecuación -8- podría ser un caso particular de la -7- con $k' \cdot |\text{NO}_2^-| \ll 1$, se ha intentado observar si en éstas últimas reacciones se producen también curvaturas en las representaciones de k_{obs} frente a $|\text{NO}_2^-|$. No obstante al aumentar fuertemente la concentración del oxidante

se forman los compuestos pardo-rojizos ya mencionados anteriormente, por lo que los resultados obtenidos carecen de confianza.

3-2-3 INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES.

Con objeto de obtener una mayor información de las características cinéticas de estas reacciones, se ha estudiado también la influencia que ejercen factores tales como temperatura, composición del disolvente y adición de sales en las velocidades de estas reacciones.

En la Tabla 8 se recogen los valores de k_{obs} para las reacciones estudiadas a 20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C. y en las figuras (11-13) las correspondientes representaciones de Arrhenius. A partir de estas gráficas se han obtenido de la forma habitual ⁽³⁹⁾ las energías de activación de estas reacciones, que también se indican en dicha tabla.

Las reacciones objeto de nuestro estudio están sujetas a efectos del medio, modificándose sus velocidades tanto por la adición de sales como por las variaciones en la composición del disolvente. En el primer caso, adición de sales, los efectos son poco pronunciados, aumentando la velocidad de reacción al aumentar la fuerza iónica. Así por ejemplo, para la reacción reserpilina-nitrito ($[Reserpilina] = 2 \cdot 10^{-4}$ M; $[HClO_4] = 0.275$ M), los valores de k_{obs} cuando las concentraciones de LiCl presentes en el medio de reacción son 0; 0.05 y 0.10 M toman los valores de 0.039, 0.046 y 0.057 min^{-1} , respectivamente. En el caso de las otras reacciones los resultados

obtenidos son muy similares.

Por el contrario, la influencia de la composición del disolvente en la velocidad de reacción es mucho más destacada. Así, al aumentar la proporción de metanol se observa una disminución de las velocidades para todas las reacciones estudiadas.

Es suficiente considerar, por ejemplo en el caso de la yohimbina, como al aumentar la proporción de MeOH desde un 1% hasta un 10%, la k_{obs} disminuye drásticamente, desde 0.146 a 0.0302 min^{-1} .

TABLA 2 .- REACCION YOHIMBINA - NITRITO.

Influencia en k_{obs} de la concentración de $HClO_4$.

Condiciones generales.

| Yohimbina | = $2 \cdot 10^{-4} M$; | NO_2^- | = $4 \cdot 10^{-3} M$; $t = 25^\circ C$.

=====

<u> $HClO_4$ M</u>	<u>k_{obs} (min^{-1})</u>
0.55	0.022
0.825	0.032
1.10	0.042
1.375	0.057
1.65	0.068
1.925	0.079
2.20	0.092

=====

TABLA 3.- REACCION RESERPINA - NITRITO .

Influencia en k_{obs} de la concentración de $HClO_4$.

Condiciones generales.

$|Reserpina| = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}; |NO_2^-| = 4 \cdot 10^{-3} \text{ M}; t = 25^\circ C$

$\% (V/V) \text{ MeOH:H}_2\text{O} = 25\%$.

$ HClO_4 \text{ M}$	$k_{obs} (\text{min}^{-1})$
0.13	0.016
0.275	0.025
0.41	0.035
0.55	0.052
0.68	0.062
0.80	0.072

TABLA 4 .- REACCION RESERPILINA - NITRITO.

Influencia en k_{obs} de la concentración de $HClO_4$.

Condiciones generales.

$|Reserpilina| = 2 \cdot 10^{-4} M$; $|NO_2^-| = 4 \cdot 10^{-4} M$; $t = 25^\circ C$.

=====

<u>$HClO_4$ M</u>	<u>k_{obs} (min^{-1})</u>
0.825	0.112
0.68	0.089
0.55	0.073
0.41	0.055
0.275	0.039
0.165	0.020

=====

TABLA 5 .- REACCION YOHIMBINA - NITRITO.

Influencia en k_{obs} de la concentración de nitrito.

Condiciones generales.

$|Yohimbina| = 2 \cdot 10^{-4} M$; $|HClO_4| = 1.65 M$; $t=25^{\circ}C$.

=====

$ NO_2^- \cdot 10^3 M$	$k_{obs} (min^{-1})$
2	0.038
4	0.064
5	0.087
6	0.099
7	0.127
8	0.146
10	0.182

=====

TABLA 6 .- REACCION RESERPINA - NITRITO.

Influencia en k_{obs} de la concentración de nitrito.

Condiciones generales

$|Reserpina| = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M} ; |HClO_4| = 0.55 \text{ M} ; t = 25^\circ C.$

$\% (v/v) \text{ MEOH} - H_2O = 25 \%$.

=====

$ NO_2^- \cdot 10^3 \text{ M}$	$k_{obs} \text{ (min}^{-1}\text{)}$
1	0.020
2	0.033
4	0.057
6	0.074
8	0.082

=====

TABLA 7.- REACCION RESERPILINA - NITRITO.

Influencia en k_{obs} de la concentración de nitrito.

Condiciones generales.

$|Reserpilina| = 2 \cdot 10^{-4} M$; $|HClO_4| = 0.275 M$; $t = 25^{\circ}C$.

=====

<u>$NO_2^- \cdot 10^4 M$</u>	<u>$k_{obs} (min^{-1})$</u>
4	0.040
5	0.049
6	0.063
7	0.071
8	0.081
10	0.100

=====

TABLA 8.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN k_{OBS} .

ENERGIAS DE ACTIVACION;

Condiciones generales.

- Reacción yohimbina-nitrito

$$|Yohimbina| = 2 \cdot 10^{-4} M; |NO_2^-| = 4 \cdot 10^{-3} M; |HClO_4| = 2.2 M.$$

- Reacción reserpina-nitrito

$$|Reserpina| = 1 \cdot 10^{-4} M; |NO_2^-| = 4 \cdot 10^{-3} M; |HClO_4| = 0.275 M.$$

$$\% v/v MeCH:H_2O = 25\%$$

- Reacción reserpilina- nitrito.

$$|Reserpilina| = 2 \cdot 10^{-4} M; |NO_2^-| = 4 \cdot 10^{-4} M; |HClO_4| = 0.380 M.$$

=====

<u>t(°C)</u>	<u>Yohimbina</u>	<u>Reserpina</u>	<u>Reserpilina</u>
20	0.072	0.018	0.038
25	0.092	0.025	0.055
30	0.152	0.029	0.070
35	0.195	0.033	0.083
40	0.243	0.044	0.113
E_A (kJ / mol)	48.5	31.4	39.3

=====

FIGURA 4

Representación de k_{obs} frente a $[\text{HClO}_4]$.

Reacción YOHIMBINA-NITRITO.

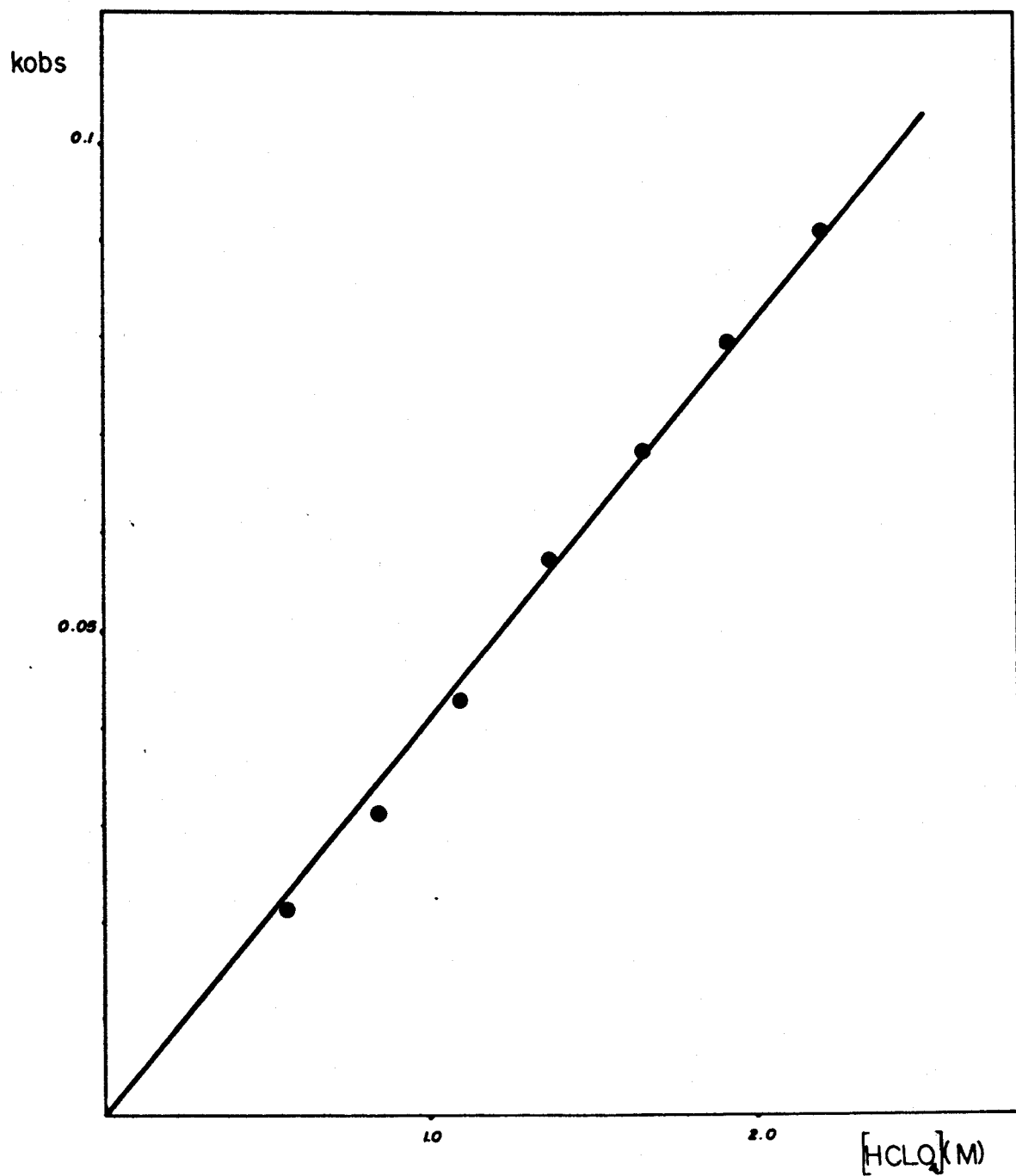


FIGURA 5

Representación de k_{obs} frente a $|\text{HClO}_4|$.

Reacción RESERPINA-NITRITO.

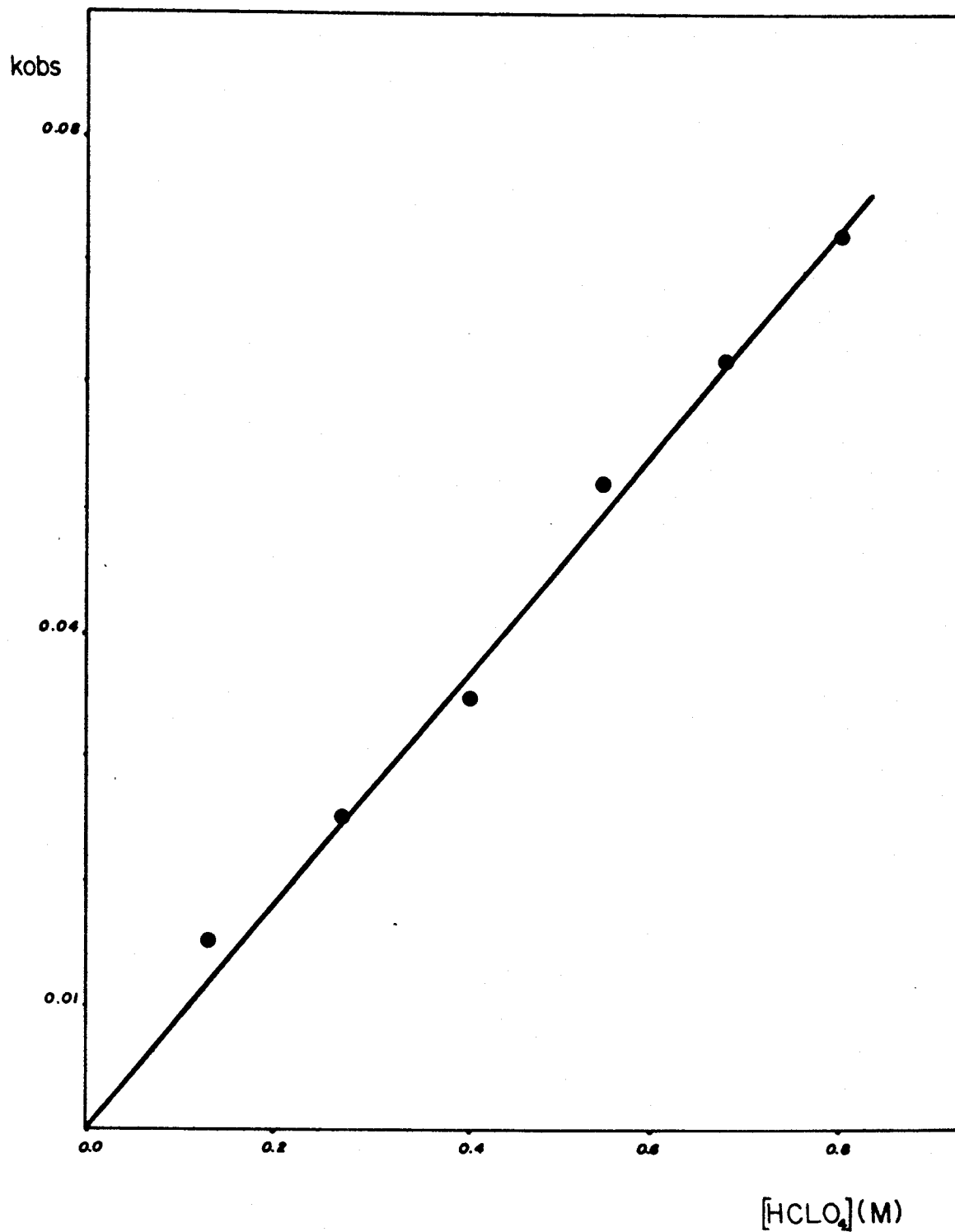


FIGURA 6

Representación de k_{obs} frente a $[\text{HClO}_4]$.
Reacción RESERPILINA-NITRITO.

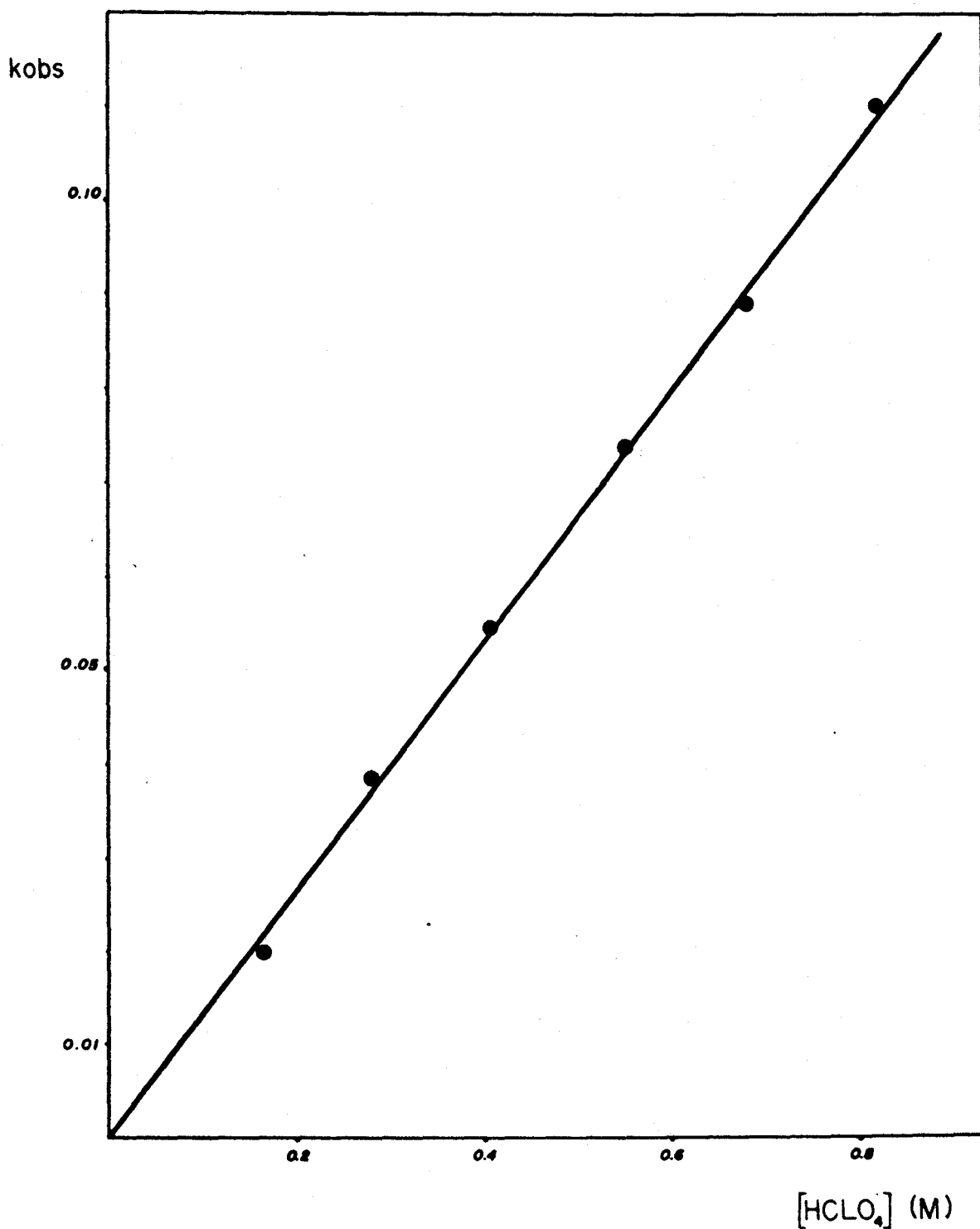


FIGURA 7

Representación de k_{obs} frente a $|\text{NO}_2^-|$.
Reacción YOHIMBINA-NITRITO.

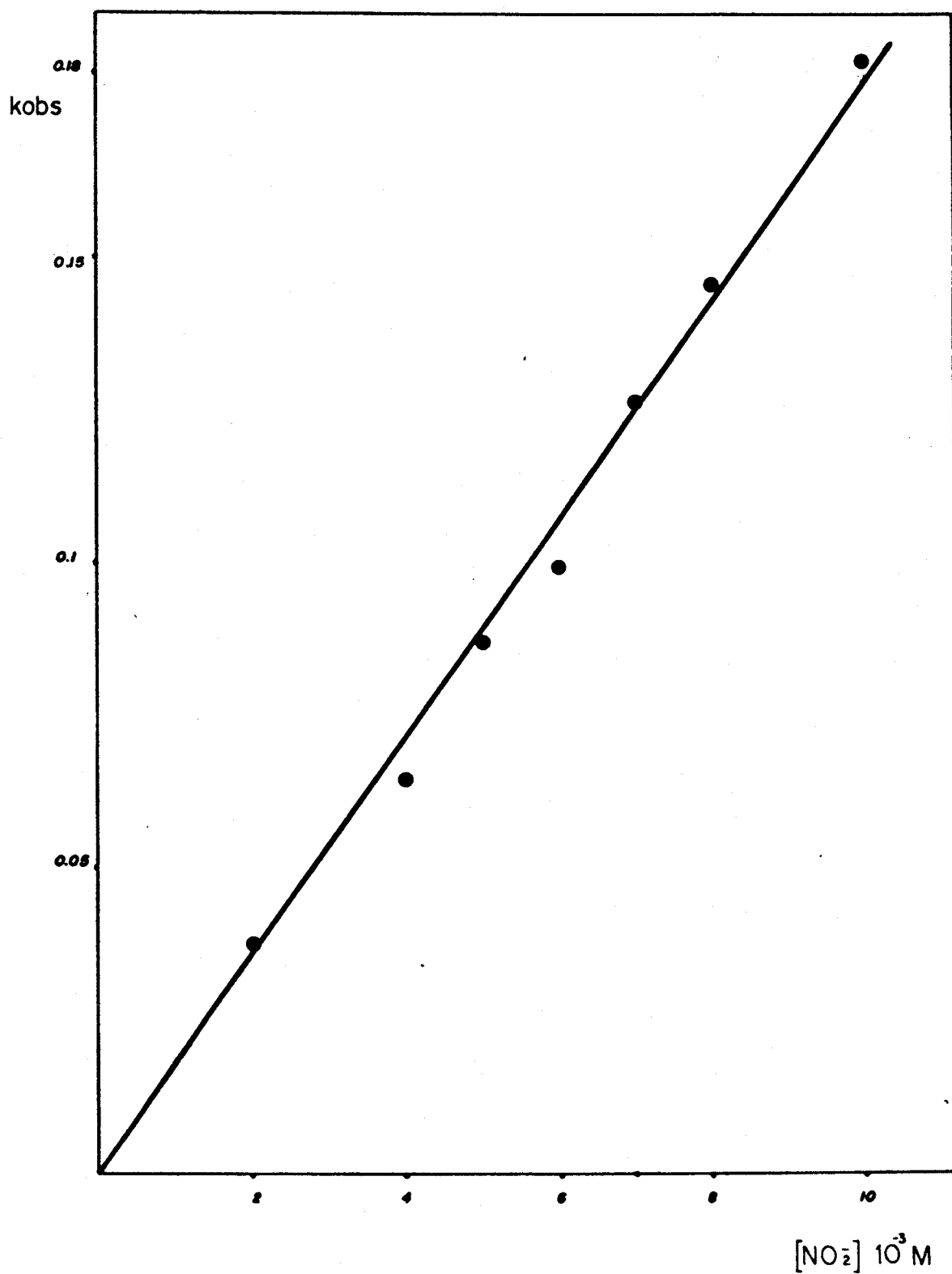


FIGURA 8

Representación de k_{obs} frente a $|\text{NO}_2^-|$.
Reacción RESERPINA-NITRITO.

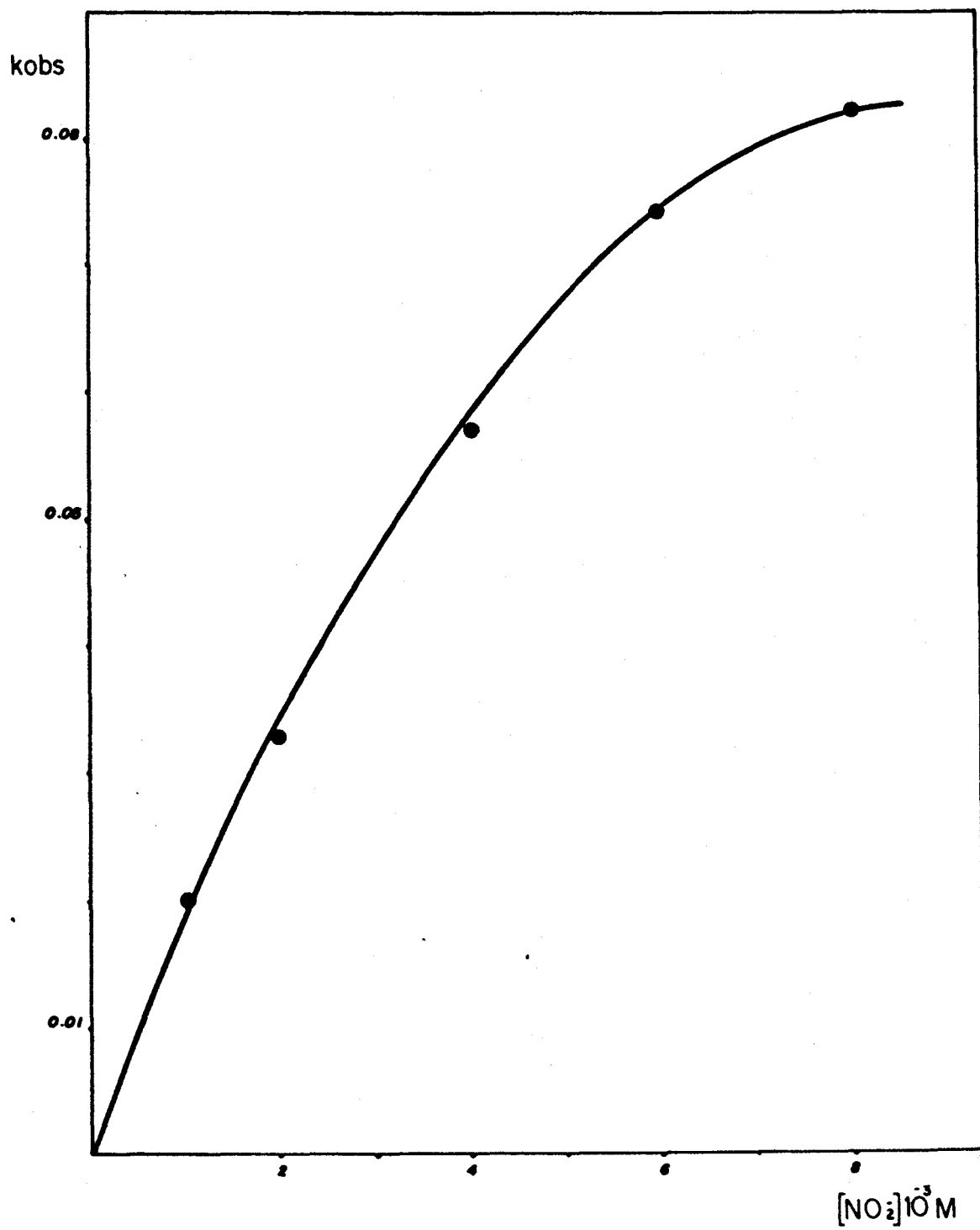


FIGURA 9

Representación de k_{obs} frente a $|\text{NO}_2^-|$.
Reacción RESERPILINA-NITRITO.

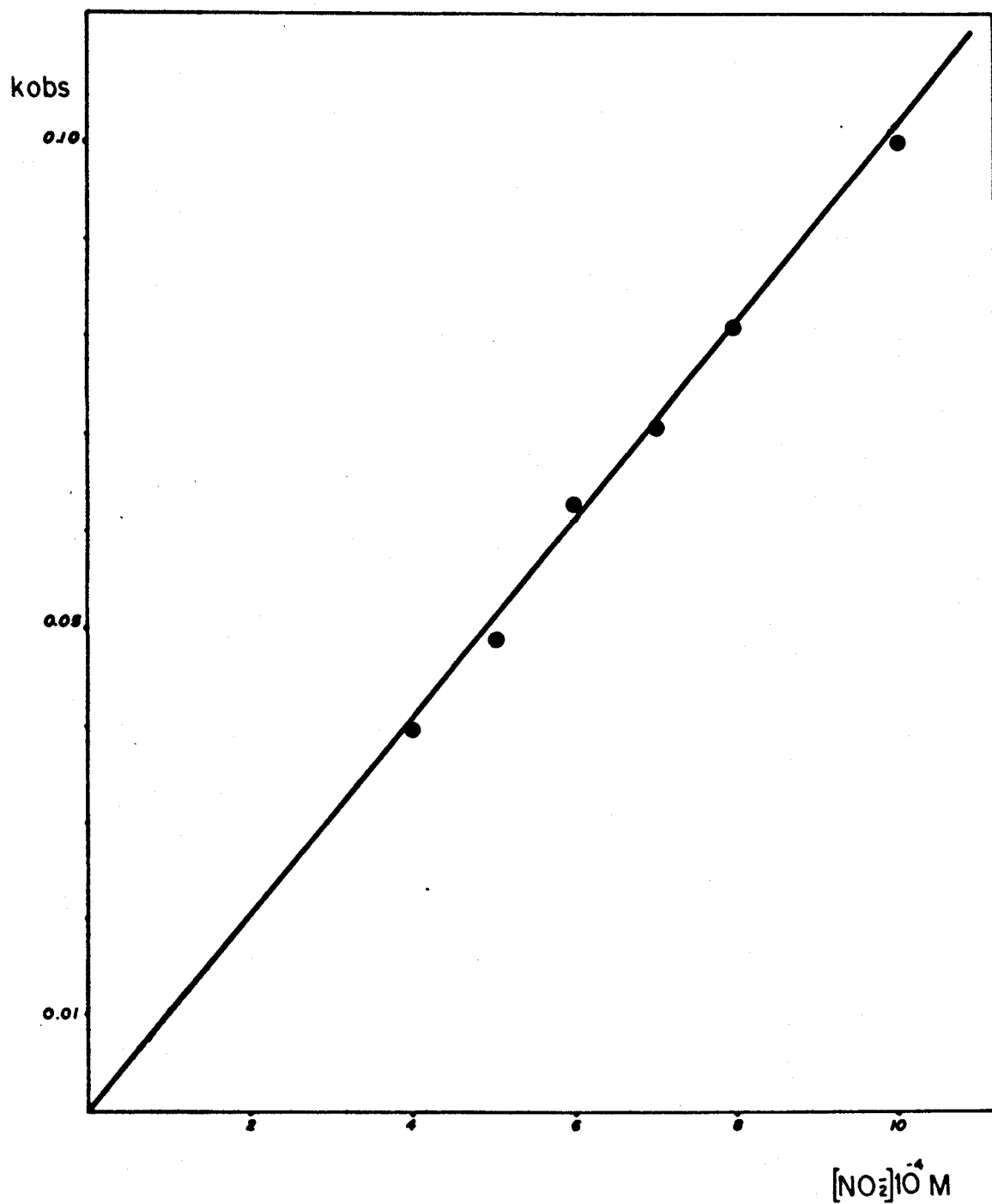


FIGURA 10

Representación $1/k_{\text{obs}}$ frente a $1/|\text{NO}_2^-|$.

Reacción RESERPINA-NITRITO.

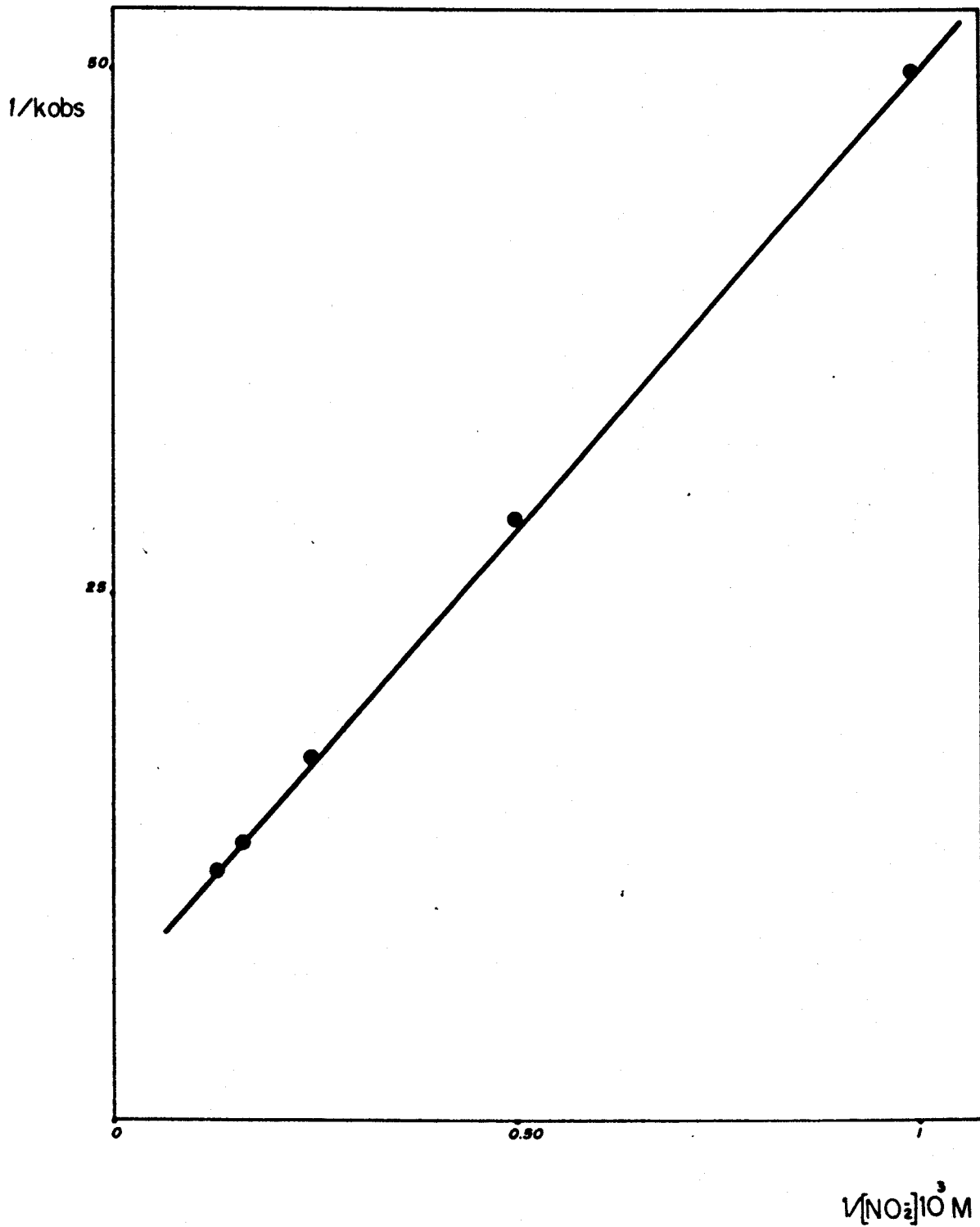


FIGURA 11

Representación de $\ln k_{\text{obs}}$ frente a $1/T$.
Reacción YOHIMBINA-NITRITO.

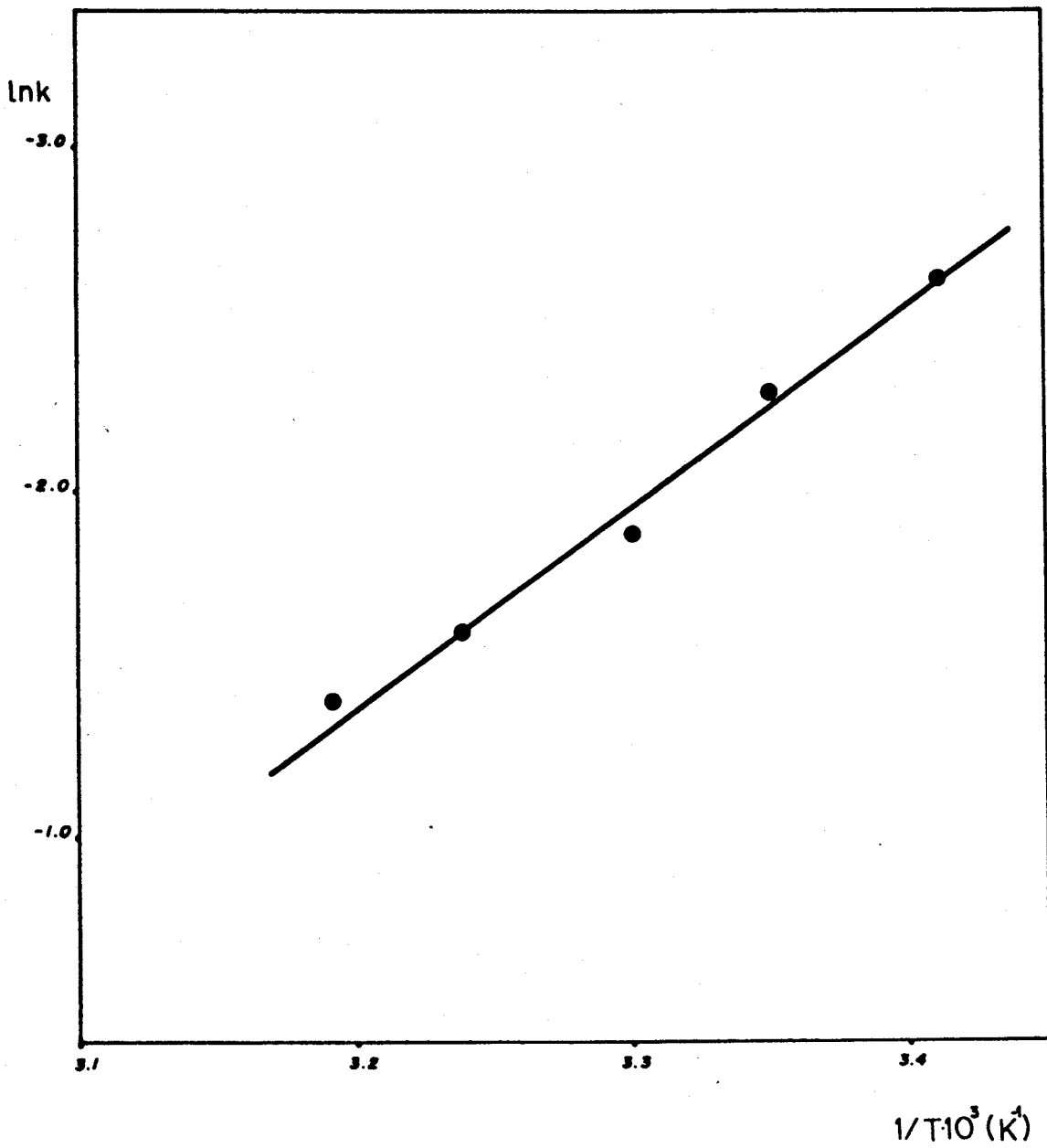


FIGURA 12

Representación de $\ln k_{\text{obs}}$ frente a $1/T$.

Reacción RESERPINA-NITRITO.

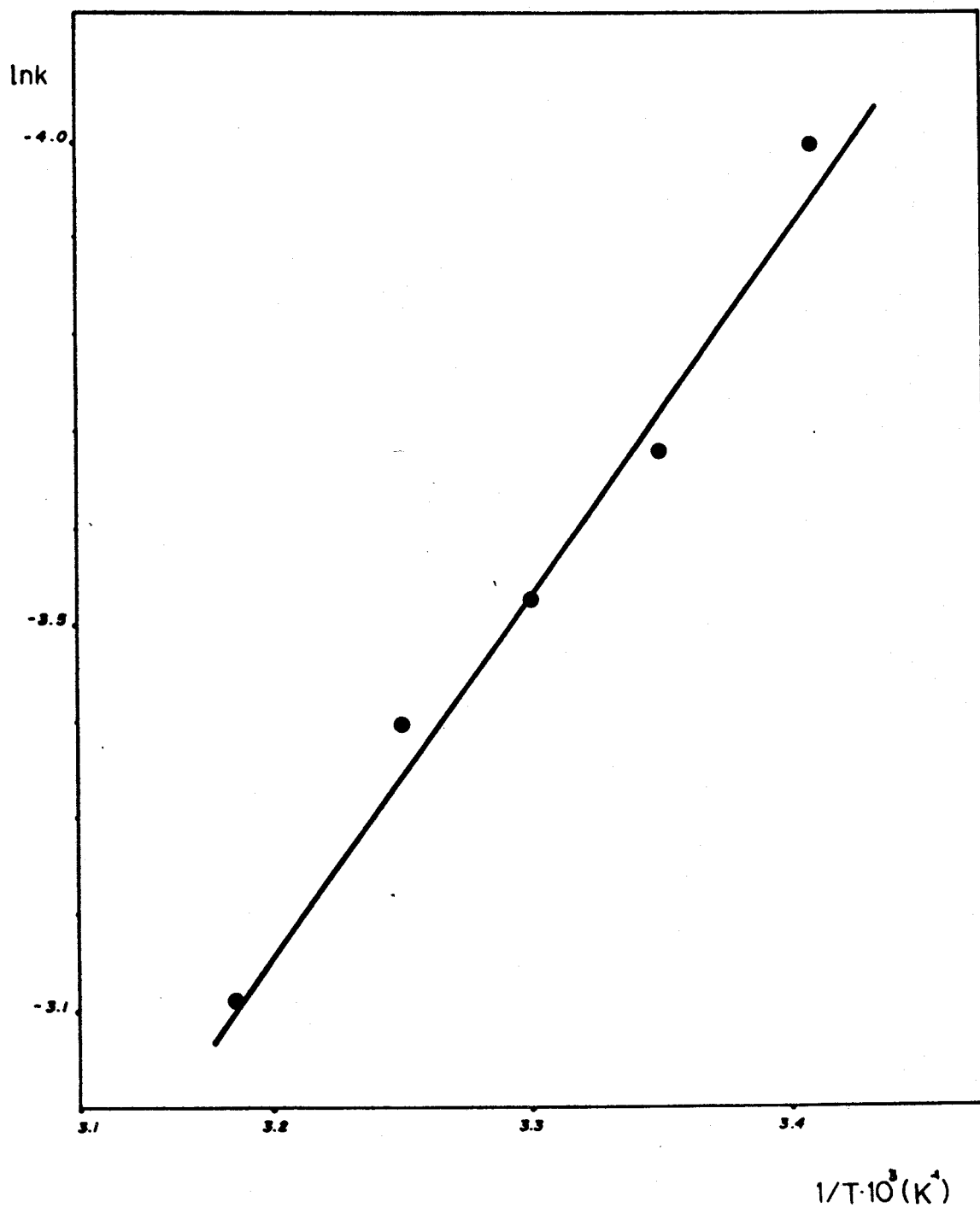
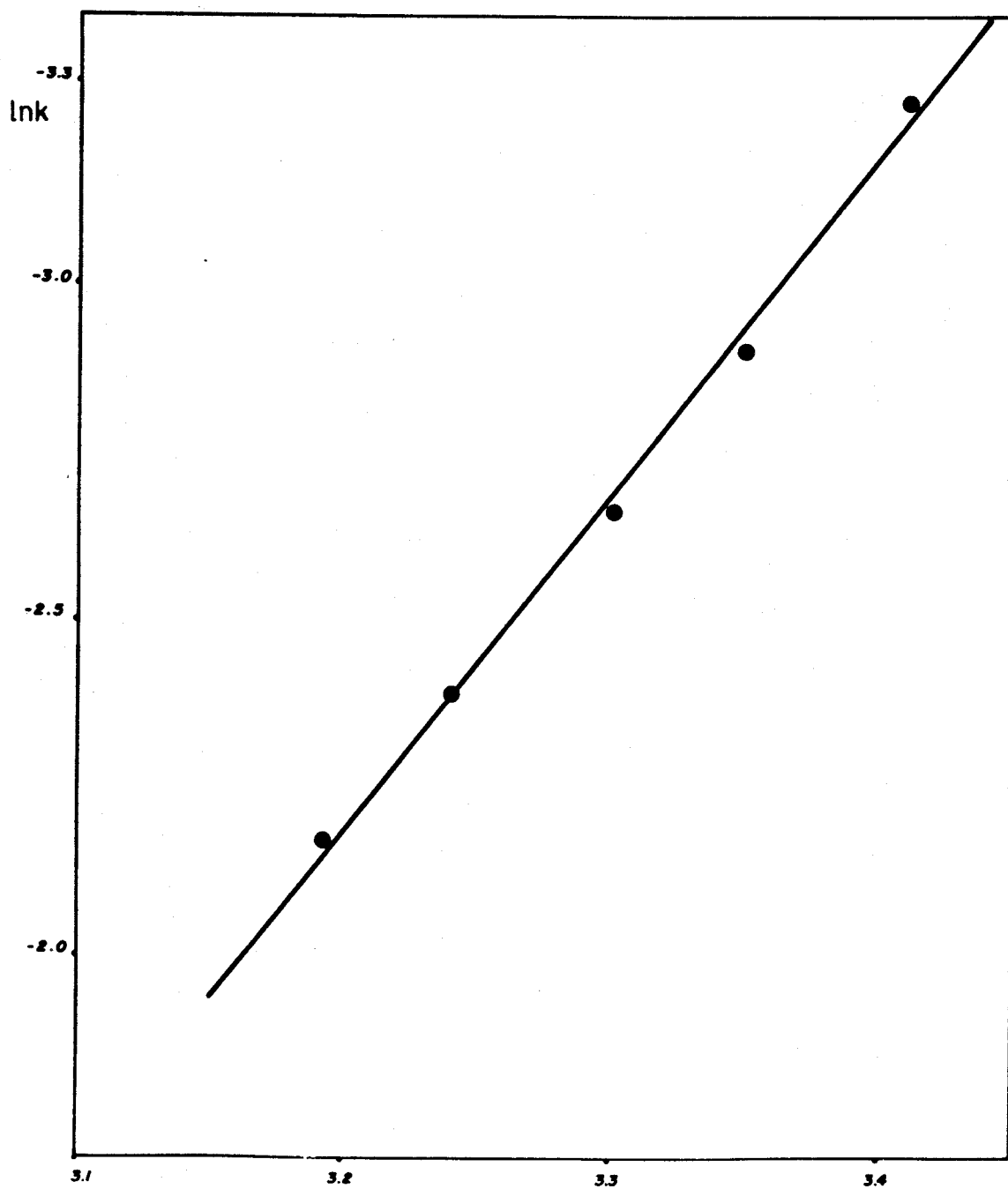


FIGURA 13

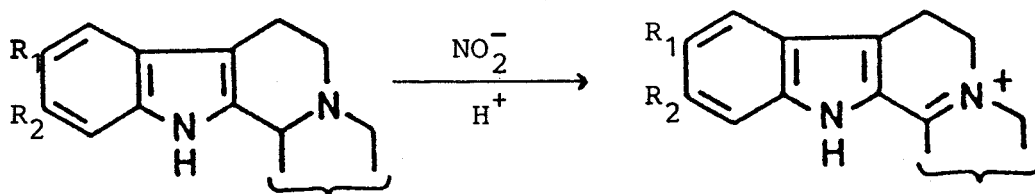
Representación de $\ln k_{\text{obs}}$ frente a $1/T$.

Reacción RESERPILINA-NITRITO.



4.- DISCUSION.

Los resultados obtenidos indican que en medio ácido el ión nitrito oxida a aquellos alcaloides de la Rauwolfia Serpentina que contienen en sus estructuras un núcleo de tetrahydro- β -carbolina, dando como productos principales los 3,4-dehidroderivados correspondientes;



ESQUEMA 6

Esta reacción es general para este tipo de alcaloides, independientemente del número y posición de sustituyentes metoxi que existan en el anillo de tetrahydro- β -carbolina.

Nuestros resultados contrastan, por tanto con la conclusión previamente apuntada por Haycock y Mader⁽³²⁾ de que es requerimiento indispensable para que se den estas reacciones la existencia en el alcaloide de un núcleo de 7-metoxi-tetrahydro- β -carbolina.

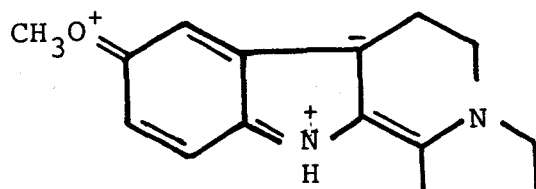
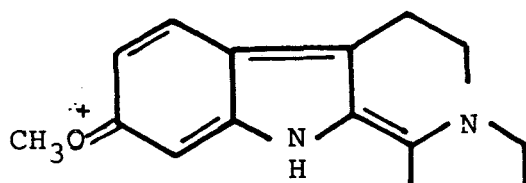
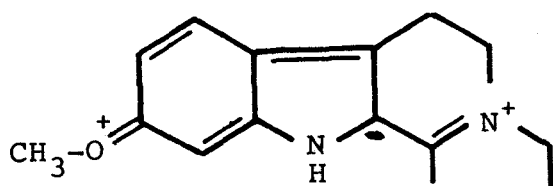
No obstante, hay que señalar que las características espectrales de los productos de oxidación son muy diferentes, dependiendo de la posición de este sustituyente. Así, la 3,4-dehidroyohimbina, que no tiene metoxi sustituyentes, presenta un máximo en su espectro de absorción a longitud de onda mas corta (350 nm) que la de los 3,4-dehidroderivados de la reserpina (382 nm) y reserpilina (389 nm), que presentan sustituyentes metoxi en las posiciones 6 ó 7 del anillo.

El desplazamiento batocrómico que experimentan estas bandas en los derivados metoxi sustituidos reflejan la contribución de formas resonantes de estructura quinonoide en estos últimos compuestos, tales como los que se indican en el esquema 7:

Por otra parte, también se observan diferencias en los espectros de emisión con la sustitución, modificándose tanto los máximos de estas bandas como sus intensidades relativas. Es interesante destacar el gran aumento en la

intensidad de fluorescencia con respecto al alcaloide original que se produce en los 3,4 -dehidroderivados cuando la sustitución tiene lugar en la posición 7 como es el caso de la reserpina, mientras que para los otros alcaloides la intensidad de fluorescencia de sus 3,4-dehidroderivados es mucho menor.

ESQUEMA 7



Como ya se ha indicado, las propiedades fluorescentes de la 3,4-dehidroreserpina sirven de base para una gran cantidad de métodos analíticos de determinación cuantitativa de este alcaloide. En estos métodos se utilizan una gran variedad

de agentes oxidantes tales como nitrito⁽⁴⁰⁾ ó ácido sulfovanádico⁽⁴¹⁾ siendo, no obstante, el nitrito el de uso mas estudiado.

En vista del carácter general de las reacciones de oxidación de los alcaloides de la Rauwolfia Serpentina por el ión nitrito, es razonable la existencia de un mecanismo de reacción común para todas ellas, siendo sus diferentes ecuaciones de velocidad casos particulares de la ecuación general correspondiente a este mecanismo.

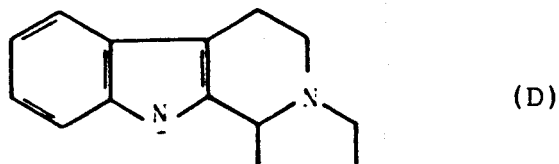
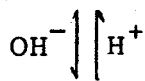
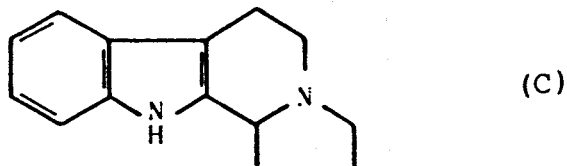
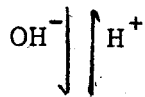
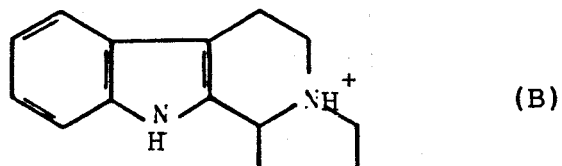
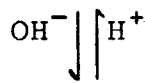
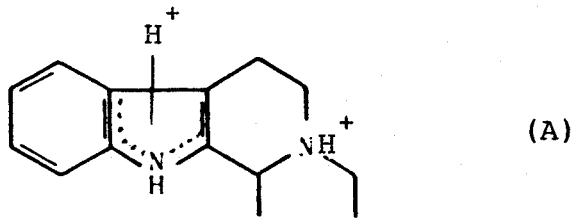
Teniendo en cuenta, por otra parte, la gran similitud existente entre las ecuaciones de velocidad de las reacciones reserpina-nitrito y reserpina-peroxodisulfato^(25,b) este mecanismo general parece derivarse del propuesto por Taylor para las reacciones de oxidación de los derivados del 2,3-dimetilindol, al que hicimos referencia en la introducción y como allí indicamos es la base del mecanismo de las reacciones con peroxodisulfato.

Cabe destacar, no obstante, una importante diferencia entre las ecuaciones cinéticas de estas reacciones. Esta diferencia consiste en la dependencia de ácido perclórico observada en la reacción reserpina-nitrito y que no se da en la reacción reserpina-peroxodisulfato.

Aunque los alcaloides de la Rauwolfia Serpentina con estructura de tetrahidro- β -carbolina pueden participar en los equilibrios ácido-base que se indican en el esquema 8⁽⁴²⁻⁴⁵⁾, en las condiciones en que se han llevado a cabo las reacciones en el presente estudio, estas especies se en-

ESQUEMA 8.-

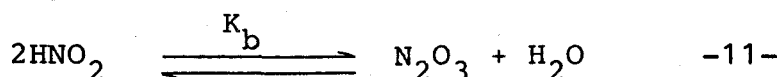
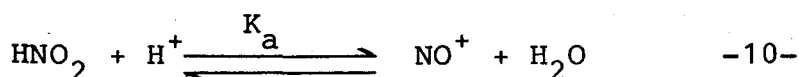
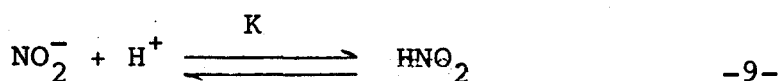
Equilibrios ácido-base de tetrahidro- β -carbo-
linas.



cuentran fundamentalmente en la forma B, esto es, protonadas en el nitrógeno no indólico, por lo que no cabrá esperar una dependencia con la concentración de ácido tal como la encontrada .

Además, el hecho de que esta diferente influencia de la acidez sólo se manifieste al cambiar el oxidante, sugiere que la dependencia de primer orden con la concentración de ácido observada en las reacciones con nitrito debe asociarse al comportamiento ácido-base de este oxidante y no al alcaloide.

En medio ácido, el ión nitrito puede participar en los siguientes equilibrios;



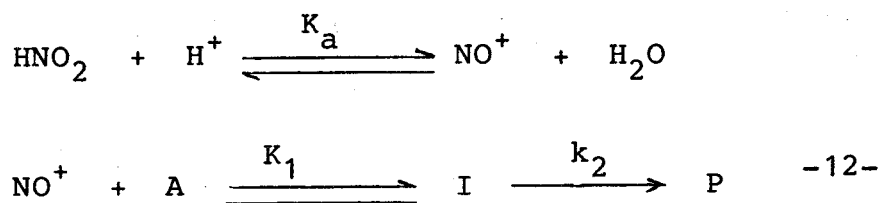
siendo los valores de K , K_a y K_b , a 25°C , $8 \cdot 10^{-4} \text{M}^{-1}$, $3 \cdot 10^{-7} \text{M}^{-1}$ y $3 \cdot 10^{-5} \text{M}^{-1}$, respectivamente.

Si se adopta como base de estas reacciones el mecanismo de Taylor, se requiere la presencia de un electrófilo en la primera etapa de la reacción. De las diferentes especies involucradas en los equilibrios anteriores resulta evidente que la especie que por su estructura presenta las mejores características electrofílicas es el catión NO^+ .

Por otra parte, esta sería la única especie que con su participación en el mecanismo de reacción daría lugar a una dependencia con la acidez y con la concentración de nitrito de primer orden, tal como la observada. La participa--ción de especies tales como HNO_2 o N_2O_3 conduciría a ecuaciones de velocidad con una dependencia más compleja de la concentración de ácido con la primera especie o de segundo orden en nitrito con la segunda.

Por tanto, tomando como base el mecanismo de Taylor y considerando al ión NO^+ como el agente electrofilico, puede establecerse el mecanismo indicado en el Esquema 9 para las reacciones de oxidación de los alcaloides de la Rauwolfia Serpentina por el ión nitrito.

Este mecanismo puede expresarse esquemáticamente de forma resumida como sigue;



donde A, I y P representan respectivamente al alcaloide, el intermedio y el 3,4-dehidroderivado producto de reacción. En este esquema se ha suprimido el equilibrio-9- de protonación del ión nitrito ya que, en las condiciones de acidez en que se han llevado a cabo las reacciones, éste se encuentra totalmente desplazado hacia la formación de HNO_2 .

A partir de este esquema pueden derivarse distintas ecuaciones de velocidad, dependiendo de las magnitudes relativas de k_1 , k_{-1} y k_2 , o lo que es equivalente, de la acumulación o no de intermediato durante la reacción.

Consideramos en primer lugar el caso en que se produce acumulación de intermediato debido a que la reacción de descomposición es suficientemente lenta y por tanto el equilibrio no se ve apreciablemente modificado por aquella. En este caso ;

$$v = \frac{d \cdot |P|}{dt} = k_2 \cdot |I| \quad -13-$$

La concentración del intermediato, I, puede expresarse a partir de la condición de equilibrio como;

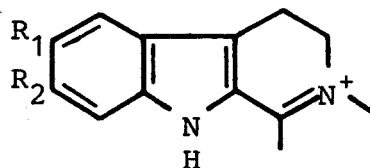
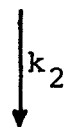
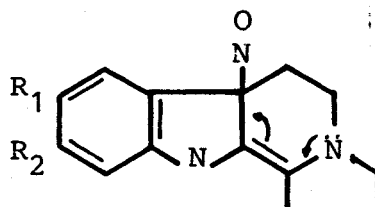
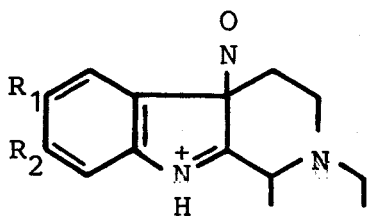
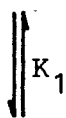
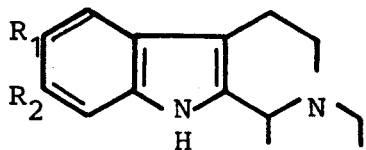
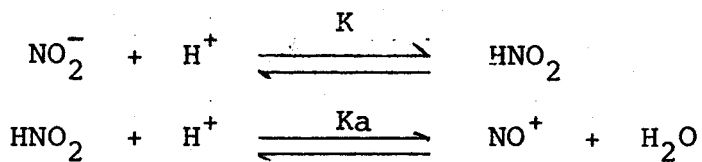
$$|I| = K_1 \cdot |A| \cdot |NO^+| \quad -14-$$

en esta expresión, la concentración de alcaloide libre, |A|, puede ponerse en función de la concentración total de alcaloide en cada instante |At| a partir del siguiente balance de materia

$$|A| = |At| - |I| \quad -15-$$

Sustituyendo -15- en -14- se obtiene :

ESQUEMA 9.-



$$|I| = K_1 |At| |NO^+| - K_1 |I| |NO^+| \quad -16-$$

de donde despejando

$$|I| = \frac{K_1 \cdot |At| \cdot |NO^+|}{1 + K_1 \cdot |NO^+|} \quad -17-$$

Aplicando también la condición de equilibrio para la especie NO^+ se obtendría

$$|NO^+| = K_a \cdot |H^+| \cdot |HNO_2| \quad -18-$$

Sustituyendo los valores de $|I|$ y $|NO^+|$ de las expresiones -17- y -18- en la ecuación -13- se obtiene la siguiente expresión para la ecuación de velocidad;

$$v = \frac{d \cdot |P|}{dt} = \frac{k_2 \cdot K_a \cdot K_1 \cdot |At| \cdot |H^+| \cdot |HNO_2|}{1 + K_a \cdot K_1 \cdot |H^+| \cdot |HNO_2|} \quad -19-$$

cuya constante, k_{obs} , para condiciones de pseudo primer orden con respecto al alcaloide viene dada por;

$$k_{obs} = \frac{k_2 \cdot K_a \cdot K_1 \cdot |H^+| \cdot |HNO_2|}{1 + K_a \cdot K_1 \cdot |H^+| \cdot |HNO_2|} \quad -20-$$

que puede identificarse con la ecuación -6- obtenida para k_{obs} en la reacción reserpina-nitrito si se hace $k = k_2 \cdot K_a \cdot K_1$ y $k' = K_a \cdot K_1 \cdot |H^+|$.

Las ecuaciones de velocidad de las reacciones yohimbina-nitrito y reserpilina-nitrito pueden considerarse un caso particular de la ecuación -19- si $K_a \cdot K_1 \cdot |H^+| \cdot |HNO_2| \ll 1$, con lo que quedaría la siguiente expresión para k_{obs} :

$$k_{obs} = k_2 \cdot K_a \cdot K_1 \cdot |H^+| \cdot |HNO_2| \quad -21-$$

que es formalmente similar a las obtenidas experimentalmente para estas reacciones. Igualando ambas ecuaciones, experimental y teórica, se obtendría que $k = k_2 \cdot K_a \cdot K_1$.

Otra posibilidad diferente que conduce también a una ecuación de velocidad teórica coincidente formalmente con las experimentales, consiste en considerar una situación estacionaria para los intermediatos y que $k_2 \gg k_1$, siendo por tanto la formación de estos la etapa determinante de la velocidad. En este caso;

$$k_{obs} = k_1 \cdot K_a \cdot |H^+| \cdot |HNO_2| \quad -22-$$

con lo que la constante experimental k vendría dada por $k = k_1 \cdot K_a$ y teniendo en cuenta el valor de K_a resultarían los siguientes valores para k_1 ; $5,8 \cdot 10^5$ (yohimbina) y $1,9 \cdot 10^7 \text{MS}^{-1}$

(reserpilina).

Aunque ambos tratamientos son cinéticamente -- indistinguibles, pueden indicarse algunos argumentos indirectos en favor del segundo . Así, si se considera que básicamente las reacciones de estos alcaloides con nitrito y con peroxodisulfato transcurren por el mismo mecanismo, es razonable suponer que la secuencia de valores de K_1 deben ser muy parecidas.

En el caso de las últimas reacciones los valores de K_1 son mayores para la yohimbina y la reserpilina que para la reserpina. Esta secuencia es, por otra parte, plenamente justificable si se considera la diferente influencia que ejercen los sustituyentes metoxi en la reactividad electrofílica de estos compuestos, ya que aunque este tipo de sustituciones tiene lugar en los derivados indólicos preferentemente en la posición 3 del anillo (posición 4 en los tetrahidros- β -carbolinas), existen evidencias de que la presencia de un grupo metoxi en la posición 6 activa este centro mientras que en la posición 7 lo desactiva⁽⁴⁷⁾.

De acuerdo con esto, habría que esperar que esta sustitución esté más favorecida en la reserpilina y yohimbina que en la reserpina. En este sentido la secuencia de k_1 obtenida con la ecuación -22- que se deriva del segundo tratamiento coincide satisfactoriamente con estas previsiones-- (k_1 yohimbina $<$ k_1 reserpilina).

Por el contrario, la suposición efectuada en el

primer tratamiento de que $K_a \cdot K_1 \cdot [H^+] \cdot [HNO_2] \ll 1$ implica que los valores de las constantes K_1 de formación de los intermedios sería menor para la yohimbina y para la reserpilina -- que para la reserpina lo cual está en contra de los razonamientos anteriores.

Por otra parte, el mecanismo propuesto permite dar cuenta satisfactoriamente de los efectos del medio observados. Así, el aumento de la velocidad de la reacción con el aumento de la fuerza iónica y su disminución al aumentar la proporción de metanol son los que cualitativamente corresponderían a una reacción entre especies cargadas del mismo signo⁽³⁹⁾, como es la reacción entre el ión NO^+ y el alcaloide protonado.

Por último, es interesante reseñar que en ninguna de las reacciones estudiadas se ha observado la posterior oxidación del 3,4-dehidroderivado, como sucede en el caso de algunas de las reacciones de estos alcaloides con peroxodisulfato potásico⁽²⁵⁾ o con agua oxigenada⁽⁴⁸⁾. Esta diferencia -- está posiblemente relacionada con el mayor poder oxidante de estos últimos ($E_{S_2O_8}^{\circ} = 2.0$ volt y $E_{H_2O_2}^{\circ} = 1.776$ volt)⁽⁴⁹⁾. En el caso del nitrito de menor poder oxidante ($E^{\circ} = 0.99$ volt)⁽⁴⁹⁾ este segundo proceso de oxidación podría no estar favorecido termodinámicamente.

5.- CONCLUSIONES

1^a.- En medio ácido, el ión nitrito oxida a aquellos alcaloides de la Rauwolfia Serpentina que contienen en sus estructuras un núcleo de tetrahidro- β -carbolina para formar los 3,4-dehidroderivados correspondientes.

2^a.- Esta reacción es general e independiente del número y posición de sustituyentes metoxi en este núcleo aunque estos modifican las características de los productos de reacción.

3^a.- Las ecuaciones de velocidad de estas reac-

ciones muestran todas ellas una dependencia de primer orden con respecto al alcaloide y concentración de ácido perclórico, pero existen diferencias con respecto a la concentración de nitrito, ya que mientras las reacciones de yohimbina y reserpilina muestran primer orden con respecto a nitrito, en el caso de la reserpina este tiende a cero a medida que aumenta la concentración del oxidante.

4^a.- Aunque las ecuaciones de velocidad son diferentes, todas ellas pueden derivarse de un mecanismo de reacción común consistente en un ataque electrofílico del ión NO^+ sobre el anillo de tetrahidro- β -carbolina para dar un intermediato de estructura indolenínica cuya descomposición posterior da lugar a los productos.

6.- REFERENCIAS

- 1.- M. Greshoff, Chem. Ber.; 23,3537 (1890)
- 2.- S. Siddiqui y R.H. Siddiqui, J.Indian Chem. Soc.; 8,667 (1931); 9,539(1932) y 12,37(1935).
- 3.- J.M. Müller, E. Schlitter y A.J. Bein, Experientia.; 8,338 (1952).
- 4.- D.D. Phillips y M. S. Chadha, J.Am.Pharm. Assoc. Sci. Ed.; 44,553 (1955).
- 5.- " Encyclopedia of the alkaloids" Ed. J.S Glasby Plenum Press, Nueva York y Londres 1975.
- 6.- R.N Chopra, J. C. Gupta y B. Mukherjee, Indian J. Med.

- Research,; 21,261 (1933).
- 7.- E.G. M_c Queen, A.E Doyle y F.H Smirk; Nature ,; 174,1015 (1954).
 - 8.- J. Tripod, H.J. Bein y R. Meier, Arch. Intern. Pharmacodynamie,; 96,406 (1954).
 - 9.- J. Tripod y R. Meier; Arch. Intern. Pharmacodynamie,; 97,251 (1954) y 99,104(1954).
 - 10.- J. Cronheim, W. Brown, J. Cawthorne., M.J. Tockes y J. Ungari,; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med,; 86,120 (1954).
 - 11.- a) R.J. Vakil, Lancet, 267,726 (1954).
b) P.V. Ledbetter y E.J.Morrow, J.Am. Geriat. Soc.; 3,172 (1955).
 - 12.- R.H. Noce, D.B. Williams and w. Rapaport, J. Am. Med. Assoc.; 156,821 (1954) y 158,11 (1955).
 - 13.- J. Ganest, L. Adam. Kiewicz, R. Rabillard y G. Trembley, Can.Med. Assoc. J,; 72,483,490 (1955).
 - 14.- W.R. Livesay, J.H. Moyer y S.I.Miller, V. Am. Med. Assoc,; 155,1027 (1954).
 - 15.- A.Petter y K. Engelmann, Arzneim-forsch,; 24,876 (1974).
 - 16.- R.B. Greenblatt, Ann. N.Y. Acad: Sci,; 59,133 (1954).
 - 17.- E.G.C. Clarke , Pharmaceutical Press, Vol1 London(1969).
 - 18.- R.B. Moore, W.J. Pierce y A.D. Dennison, J. Indiana State Med. Assoc,; 47,853 (1954).
 - 19.- M. Beljanski y M.S. Beljanski, Expl. Cell. Biol. ;50,79- (1982).
 - 20.- M. Beljanski y M.J. Beljanski, IRCS. Med. Sci. ; 12,587- (1984).

- 21.- R.A. Abramovitch y A.D. Spencer , Adv. Heterocycl. Chem.;
3,79 (1964).
- 22.- a) N. Finch y W.I. Taylor, J. Am. Chem. Soc.; 84,1318
(1962).
b) J.Shavel y H. Zinnes, J. Am. Chem. Soc.; 84,1320
(1962).
- 23.- a) F.L. Weisenborn y P.A. Diassi, J.Am.Chem.Soc.;--
78,2022 (1956).
b) E.Wenkert y D.K.Roychaudhuri, J. Org.Chem.; 21,1315
(1956).
- 24.- a) F. Finch y W.I. Taylor, J. Am. Chem. Soc.; 48,3871
(1962).
b) N. Finch , C.N. Gemedén, I.Hsiu-Chu y W.I. Taylor,
J.Am. Chem. Soc.; 85,1520 (1963).
- 25.- a) M. Balón, M.A. Muñoz, M.C. Carmona y M. Sánchez,
J.Chem. Soc. Perkin Trans.II.; 1683 (1985).
b) M.C. Carmona, M. Balón, D. González, J. Maraver y
M. Sánchez, J.Chem. Soc. Perkin Trans. II.;409 (1986).
- 26.- Th. J. Hakkesteeft, Pharm. Weekblad,;105,829 (1970).
- 27.- W.I. Taylor, Proc. Chem. Soc.; 247 (1962).
- 28.- C.R. Szalkowski y W. J. Mader, J.Am.Pharm. Assoc. Sci.
Ed.; 46,744 (1957).
- 29.- D. Banes, J. Wolff, H.O. Fallscheer y J.Carol, J. Am.
Pharm. Assoc. Sci. Ed.; 45,708 (1956).
- 30.- a) B.N.Kabadi, A.T. Warren y C.H. Newman, J. Pharm Sci.;
58,1127 (1969).

- b) W.H. Smith, C.C. Clark, J. Assoc. Off. Anal. Chem.;
59, 811 (1976).
- 31.- U.S. Pharmacopeia (1980), 20th Rev. U.S. Pharmacopeial
Convention, Rockville, M.D. pag. 702-704.
- 32.- R.P. Haycock y W.J. Mader, J. Am. Pharm. Assoc.; 46, 744
(1957).
- 33.- R.P. Haycock, P.B. Sheeth, T.Hiqucchi, W.J. Mader y -
G.J. Papariello, J. Pharm. Sci.; 55, 826 (1966).
- 34.- Los autores expresan su agradecimiento a la C.H. Boehrin-
ger Sohn Ingelheim por la donación de los alcaloides.
- 35.- G.E. Wright y T.Y.Tang, J. Pharm. Sci.; 61, 299 (1972).
- 36.- J.Hidalgo, P.P.Tejada, M.A. Muñoz, A. Maestre, M. Balón
y M. Sánchez, Pharm. Acta Helvetiae, 2 (1986).
- 37.- R.P. Haycock, P.B. Sheth y W.J. Mader, J. Am. Pharm.
Assoc. Sci. Ed.; 48, 479 (1959).
- 38.- "Chemical Kinetics and Reaction Mechanims". J.H. Es-
penson, Mc-Gran Hill, New York 1981.
- 39.- T. Urbanyi y H. Stober, J. Pharm. Sci.; 59, 1824 (1970)
- 40.- R. Stainer, J. Pharm. Belg,; 28, 115 (1973).
- 41.- A. Maestre, M. Balón, M.A. Muñoz, P.P. Tejada, J. Hidal-
go y M. Sánchez, An. Real Acad. Farm.; 50, 105 (1984).
- 42.- M. Balón , C. Carmona Guzman y D. González, Tetrahedron,;
41, 4703 (1985).
- 43.- J.Hidalgo, M. Balón, M.A. Muñoz y M.C.Carmona, Tetrahe-
dron,; 42, 1497 (1986).
- 44.- M. Shamma y J.Moss, J.Am. Chem. Soc.; 85, 2507 (1963).

- 45.- a) H.Schmid, Chem. Ztg/Chem. Apparatur; 86, 809 (1962)
b) G. Y. Markovits, S.E. Schwartz y L. Newman, Inorg.
Chem.; 20, 445 (1981).
- 46.- J.S.L. Ibaceta-Lizana, R. Iyes, A.H. Jackson y P.V.R.
Shannon, J. Chem. Soc. Perkin II,; 733 (1978).
- 47.- M. Sánchez, T. Díaz, M.C. Carmona, M. Balón y J. Hidalgo,
Oxid. Com.; en prensa.
- 48.- "Handbook of Chemistry and Physics" 63 Ed.; C.R.C.
Press.