

Tesis de Posgrado

Estudio sobre la biosíntesis de Skimmianina en Fagara Coco (Gill.) Engl.

Colonna, Agustín Ovidio

1970

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Colonna, Agustín Ovidio. (1970). Estudio sobre la biosíntesis de Skimmianina en Fagara Coco (Gill.) Engl.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1376_Colonna.pdf

Cita tipo Chicago:

Colonna, Agustín Ovidio. "Estudio sobre la biosíntesis de Skimmianina en Fagara Coco (Gill.) Engl.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1970. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1376_Colonna.pdf

Tesis
1376

1376

ESTUDIO SOBRE LA BIOSINTESIS

DE SKIMMIANINA EN

FAGARA COCO

(GILL.) ENGL.

1376

AGUSTIN OVIDIO COLONNA

1970

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO SOBRE LA BIOSINTESIS
DE SKIMMIANINA
EN FAGARA COCO (GILL.) ENGL.

ESTE LIBRO
PRESTA A DOMICILIO

AGUSTIN OVIDIO COLONNA

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Química
(Orientación Química Orgánica)

1970

F-137⁶
el único
C

A Silvia

A mis padres

Agradezco al Dr. Eduardo G. Gros,
Director de esta Tesis, por su
enseñanza y consejo, gracias a los
cuales pude llevar a cabo este
trabajo.

Agradezco también:

Al Dr. R. Juliani, de la Universidad de Córdoba, por su inapreciable colaboración durante las inoculaciones de los ejemplares de Fagara coco, con las sustancias radiactivas.

Al Sr. J. J. Ferrer por la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Al Sr. G. Moreno, por haber facilitado los medios para la impresión de esta Tesis.

Al Dr. A. Mitta, de la Comisión Nacional de Energía Atómica, por haber proporcionado algunas de las sustancias radiactivas que fueron utilizadas en el presente trabajo.

A mis compañeros del Departamento de Química Orgánica, por su apoyo y cordialidad permanente.

CAPITULO 1

ALCALOIDES DE FAGARA COCCO (GILL.) ENGL.

ALCALOIDES PRESENTES EN FAGARA COCO (GILL.) ENGL.

1) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS ALCALOIDES DE F. COCO

Fagara coco es un árbol de la familia de las Rutáceas que crece en la zona central y norte de la República Argentina. Los primeros estudios químicos de F. coco fueron realizados por Stuckert en 1933, quien informó la presencia de cuatro alcaloides cristalinos, a los que denominó α , β , γ y δ -fagarina. La compañía Merck-Darmstadt llevó a cabo una extracción en gran escala de F. coco, reportando la presencia de sólo dos alcaloides: fagarina I, que resultó ser igual a la α -fagarina descrita por Stuckert y fagarina II, que no era conocido. En 1942, Deulofeu et al aislaron α , β y γ -fagarina, demostrando que β -fagarina era igual a skimmianina (Honda et al, 1904; Asahina et al, 1930-A), y que γ -fagarina era un derivado monometoxilado de la dictamnina (4-metoxi-2,3-b-furoquinolina). Berinzaghi et al (1945) determinaron que γ -fagarina era δ -metoxidictamnina.

En estudios realizados posteriormente (Redeman et al, 1949) se llegó a la conclusión de que fagarina I era idéntica a la α -allocriptopina. En este mismo trabajo se informaba la presencia de fagarina III, una base no identificada, pero que presentaba un espectro U.V. muy similar al de fagarina I.

El alcaloide principal de la corteza de Fagara coco es la base aporfínica cuaternaria N-metil isocoridina (Comin et al, 1954)

Recientemente se informó la presencia de candicina, mag-

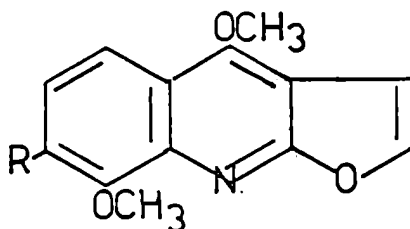
noflorina, palmatina, berberina, queleritrina y nitidina en la corteza de Fagara coco . (Kuck et al, 1967).

Fagara coco se diferencia de otras especies de Fagara argentinas, tanto en su morfología y ecología, como en el tipo de alcaloides presentes, y en la distribución de los mismos en la planta. F. coco contiene alcaloides furoquinolínicos , proto-pínicos y berberínicos, ausentes en las otras especies de Fagara argentinas.(Kuck et al, 1967).

También es notable el hecho de que se encuentren alcaloides en apreciable cantidad en hojas y tallos jóvenes de F. coco, como skimmianina, γ -fagarina y las bases protopínicas α -allocriptopina y fagarina II y el alcaloide desconocido fagarina III. Tanto skimmianina como γ -fagarina se encuentran sólo en pequeñas cantidades en la corteza. En las demás Fagaras argentinas la cantidad de bases nitrogenadas en hojas es muy pequeña, a tal punto que no ha sido posible aislar e identificar ninguna de ellas. (Kuck et al , 1967).

II) DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DE LOS DISTINTOS ALCALOIDES DE FAGARA COCO

a) ALCALOIDES FUROQUINOLINICOS



1) Skimmianina (R = OCH₃)

Este alcaloide fué aislado por primera vez de la planta Skimmia japonica (Honda, 1904).

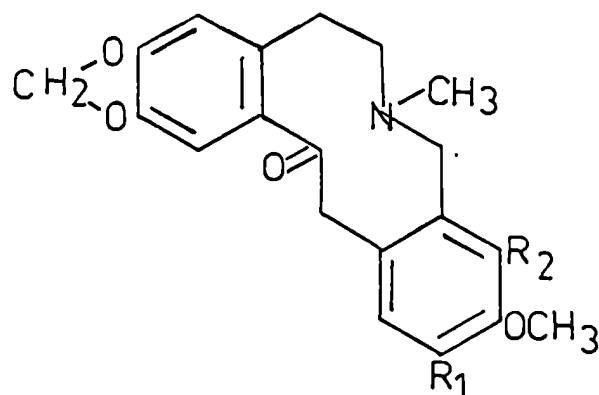
La estructura de skimmianina fué determinada mediante degradación de la misma a ácido skimmianico y descarboxilación del mismo a 7,8-dimetoxi-2,4-dihidroxi quinolina (Y. Asahina et al, 1930). Por síntesis de este último compuesto se determinó la posición de los metoxilos, con lo que se completó la determinación de estructura .(Asahina et al, 1930).

2) γ-fagarina (R = H).

La determinación de estructura de este alcaloide fué realizada mediante una degradación similar a la utilizada para skimmianina. El producto de degradación obtenido, la 2,4-dihidroxi-8-metoxi-quinolina fué identificado por comparación con sustancia auténtica obtenida a partir del ácido o-nitrobenzoico metoxilado correspondiente. (Berinzaghi et al, 1945)

En un trabajo realizado sobre las fracciones que contienen bases terciarias presentes en la corteza de Fagara coco, si bien fué detectada skimmianina , no fué posible evidenciar la presencia de γ-fagarina. (Barilari et al, 1955)

En el mismo trabajo se describe un método para separar skimmianina y γ-fagarina , presentes ambas en hojas de la planta mencionada, mediante cromatografía en alúmina.

b) ALCALOIDES PROTOPINICOS1) Fagarina I ($R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$)

Fué descripta por primera vez en la planta Chelidonium majus (F. Selle, 1890).

Se conocen dos modificaciones alotrópicas de la allocriptopina: α y β . Fagarina I corresponde a α -allocriptopina.

Se demostró su estructura mediante su conversión en el clorometilato de dihidro-berberina por tratamiento con Cl_5P . Además por reducción de α -allocriptopina y tratamiento posterior del dihidro derivado obtenido con Cl_5P se obtuvo el clorometilato de la tetrahidro-anhidroberberina (Gadamer, 1919).

La síntesis de α -allocriptopina fué realizada por Haworth et al (1926) partiendo de un isómero de la tetrahidro berberina.

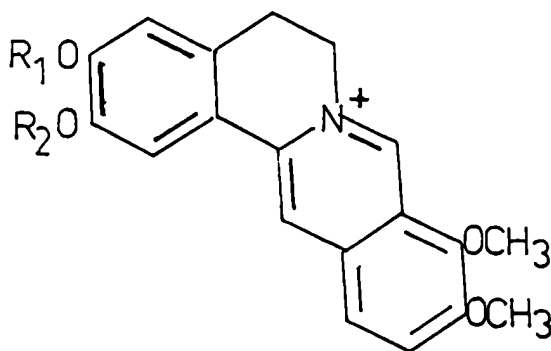
2) Fagarina II ($R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$)

Redeman et al, (1949) demostraron que fagarina II era

isomérica con fagarina I.

La determinación de estructura fué completada mediante transformación de fagarina II en tetrahidro-pseudo-berberina (Comin et al, 1959). La estructura así determinada fué confirmada mediante la síntesis de fagarina II a partir de tetrahidro-pseudo berberina (Giacopello et al, 1964).

c) ALCALOIDES BERBERINICOS



1) Berberina ($R_1 + R_2 = CH_2$)

La berberina es conocida con tal nombre desde 1837 (Büchner et al) cuando fué aislada de Berberis vulgaris. Previamente había sido descrita con el nombre de "xanthopicrit" en Xanthoxillum caribaeum (Chevallier et al, 1826). La fórmula molecular fué establecida por Perrins en 1862, quien además demostró que ambos productos eran idénticos.

La estructura de la berberina fué deducida debido principalmente a los estudios de Perkin sobre la constitución de los productos obtenidos al oxidar la berberina con MnO_4K en distintas

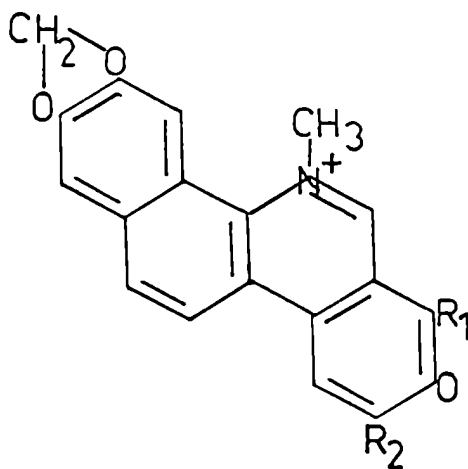
condiciones (1889,1910).

Gadamer postuló que berberina existe en solución como una mezcla de tres formas tautoméricas en equilibrio : hidróxido cuaternario, pseudo base (carbinólica) y aldehídica (1905). Actualmente está bien establecida la existencia de las dos primeras formas , mientras que las pruebas de la existencia de la tercera no son definitivas. (D. Beke et al, 1963)

2) Palmatina ($R_1 = R_2 = CH_3$)

Fué aislada por primera vez de Jatheoriza palmata por Gadamer (1902). Su estructura fué determinada por Feist et al (1918) , mediante la oxidación con MnO_4K , obteniéndose ácido hemipínico y coridaldina.

d) ALCALOIDES α -NAFTAFENANTRIDINICOS



1) Queleritrina ($R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$)

Fué encontrada por primera vez en la planta Chelidonium majus (Probst, 1839).

Späth y Kuffner (1931) obtuvieron por oxidación suave

de queleritrina la N-metilamida del ácido hemipínico. Por oxidación energética se obtenía el ácido hidrástico. De esta manera se conoció la posición de los O-metilos de la queleritrina. Por destilación de una mezcla de sanguinarina y queleritrina con polvo de Zn se obtuvo α -naftafenantridina. El mismo producto se obtenía al someter a ese tratamiento quelidonina y sanguinarina puras. De esta manera quedó determinada la secuencia de unión de los núcleos.

Queleritrina fué sintetizada partiendo de ácido opiánico y 3,4-metilendioxi-acetofenona con lo cual se completó la determinación de estructura (Bayley et al, 1956).

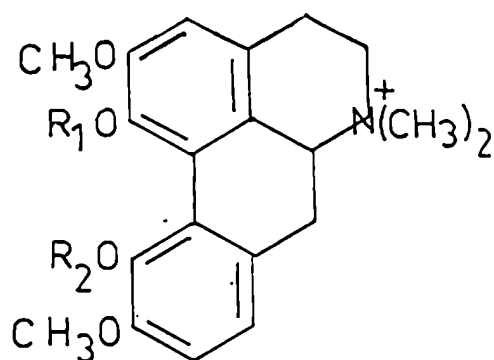
2) Nitidina ($R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$)

Fué detectada por primera vez en Zanthoxillum nitidum (Gopinath et al, 1963).

Al ser liberada de sus sales se dismuta en oxinitidina y dihidronitidina. La oxinitidina fué convertida en el derivado de fenantridina tetrametoxilado correspondiente cuya estructura era conocida por haber sido sintetizado previamente. (Arthur etal, 1959).

Al oxidar la nitidina se obtenía la N-metil amida del ácido meta hemipínico, lo cual permitió establecer las posiciones de los O-metilos (Arthur et al, 1958, 1959).

Se han descrito dos síntesis de dihidro nitidina (Arthur et al, 1959), (Gopinath et al, 1963)

e) ALCALOIDES APORFENICOS1) Magnoflorina ($R_1 = R_2 = H$)

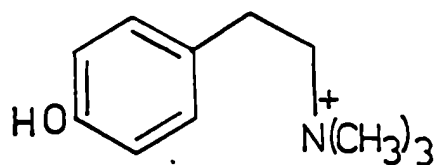
Fué aislada por primera vez de Magnolia Grandiflora, (T. Nakano, 1954-A).

Su estructura fue demostrada por comparación de las propiedades de su yoduro con las del yodometilato de corituberina, demostrándose que eran idénticos. (Nakano et al., 1954-B).

2) N-metil-isocoridina ($R = CH_3$, $R_2 = H$).

La estructura de este alcaloide fué determinada mediante su transformación en isocoridina y en el dimetil-éter de la corituberina.

Se aplicaron además otras reacciones de degradación basadas en la acetilación en distintas condiciones y en la oxidación enérgica (Comin et al., 1954,1955).

f) ALCALOIDES DEL GRUPO DE LA β -FENIL-ETILAMINACandicina

Fué encontrada por primera vez en el cactus Trichocereus candicans (L. Reti, 1933).

Se determinó su estructura mediante el análisis de la constitución de los productos que se obtenían al aplicar la reacción de eliminación de Hoffmann y la oxidación con permanganato de potasio sobre el O-metil derivado.

CAPITULO 2

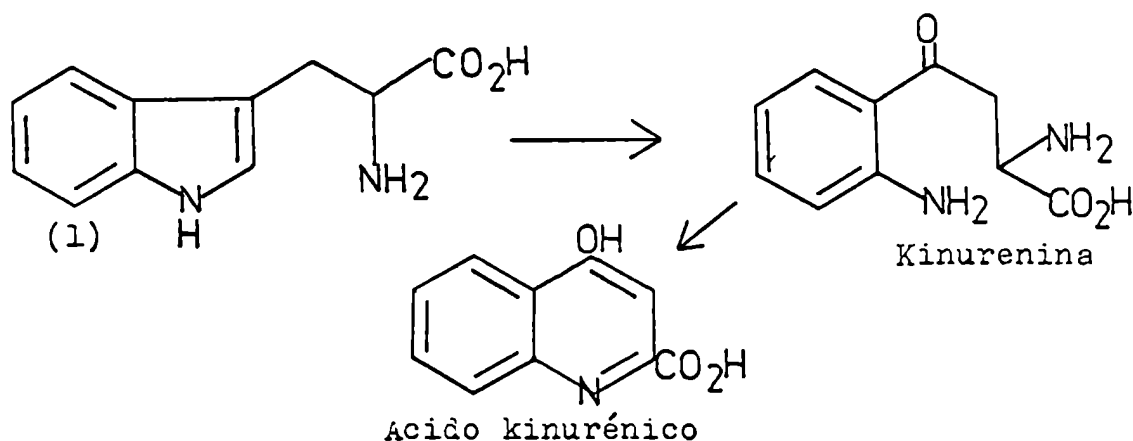
BIOSINTESIS DE ALCALOIDES PUROQUINOLINICOS

BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES FUROQUINOLÍNICOS

Los primeros estudios acerca de la biosíntesis de los alcaloides furoquinolínicos permitieron establecer la naturaleza de los precursores de la porción quinolínica de los mismos.

El anillo quinolínico está presente en un gran número de productos naturales y puede formarse a través de distintas vías metabólicas.

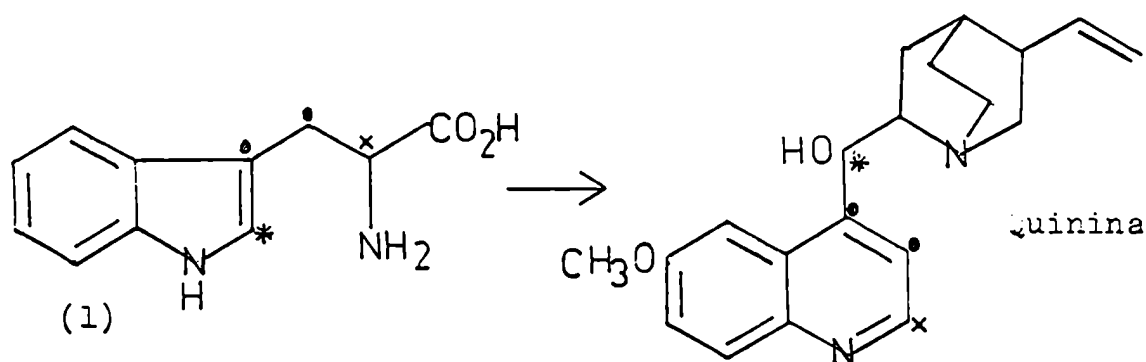
El ácido kinurénico por ejemplo, y compuestos relacionados, que se encuentran en mamíferos, insectos, y algunas especies de Pseudomonas, resulta de la degradación de triptofano (1), siendo kinurenina un intermediario (D. Gröger, 1969).



Los pigmentos de insectos denominados ommocromos derivan a su vez de 3-hidroxiquinurenina (D. Gröger, 1969).

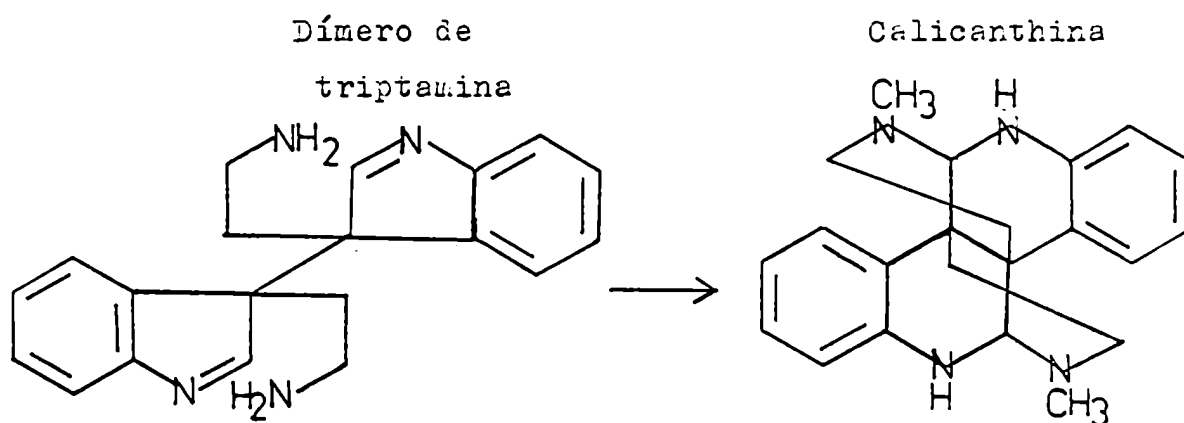
Triptofano (1) es el precursor del anillo quinolínico del alcaloide quinina en la planta Cinchona succirubra. Este resultado fué obtenido utilizando triptofano-2-¹⁴C, el que resultó precursor de la quinina. Mediante métodos degradativos se logró determinar que el alcaloide se hallaba marcado en el C-2 del

anillo quinolinico

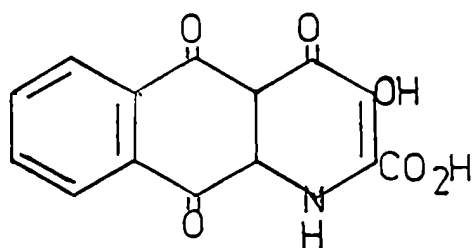


En este proceso metabólico el C-2 del núcleo indólico del triptofano se conserva, mientras que en el caso del ácido kinurénico dicho carbono se pierde como ácido fórmico (N. Kowan-ko et al, 1962).

Triptofano (1) es también precursor del alcaloide calicanthina, que contiene dos núcleos indólicos fusionados . Es probable que dicho alcaloide provenga de un reordenamiento de un dímero de triptamina, según se demuestra en el siguiente esquema (Monkôvić et al, 1967) :

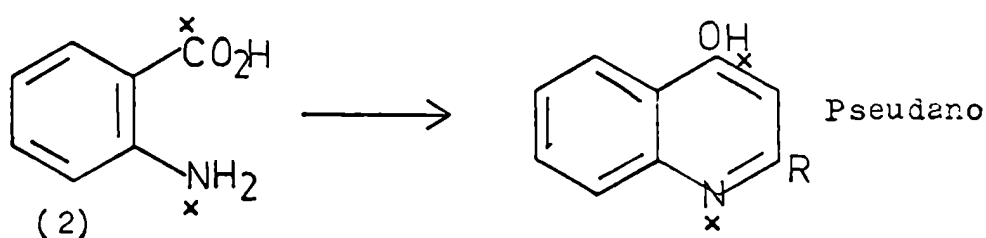


El anillo quinolinico puede provenir también de acetato, como en phomazarina, un metabolito del hongo Phoma terrestris. Se supone que en este caso el átomo de N proviene de un aminoácido, que podría ser glicina. (Birch et al, 1961)



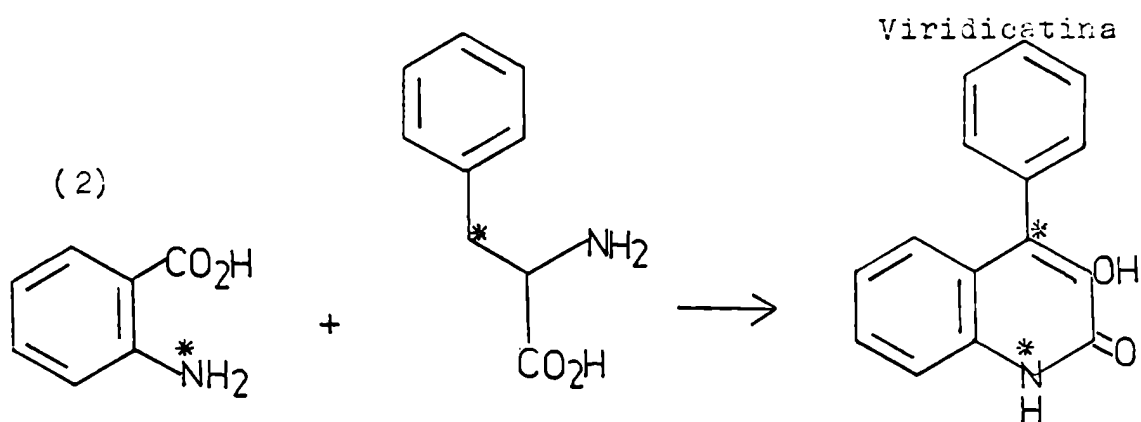
Phomazarina

Algunas cepas de Pseudomonas producen 2-alkil-4-hidroxi-quinolinas, denominadas pseudanos, que también pueden estar presentes como N-óxidos. Los distintos miembros de este grupo de compuestos difieren en la naturaleza del grupo alquilo.

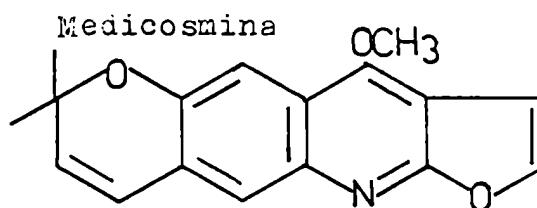
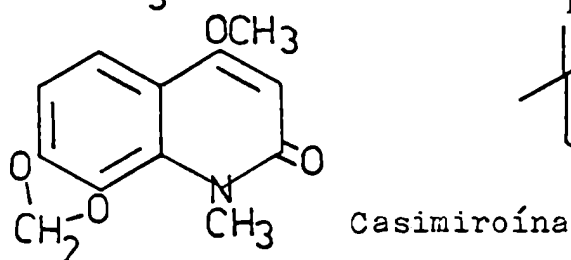
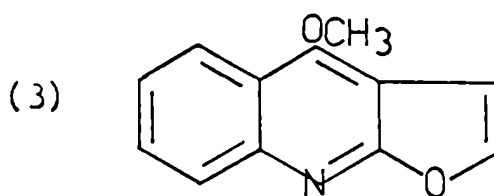
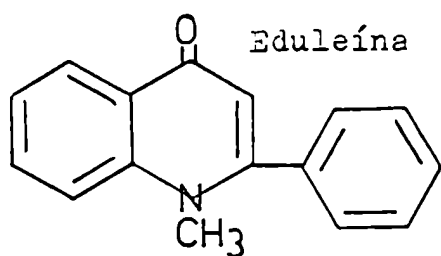


Se pudo establecer, mediante estudios con compuestos marcados con ^{14}C que el anillo bencénico, el C-4 y el N provienen de ácido antranílico (2), y que la cadena lateral R deriva de acetato. No se pudo establecer sin embargo el origen de los carbonos 2 y 3 (Gröger, 1969).

Algunas especies de Penicillium, producen un derivado de la quinolina, viridicatina; estudios biosintéticos han establecido que el ácido antranílico (2) es su precursor, pero con pérdida del carboxilo, siendo provisto el resto de la molécula por fenil alanina (Monković et al, 1967).



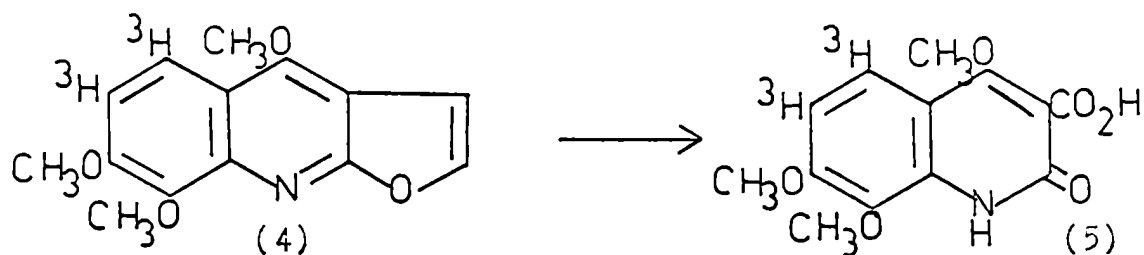
Las Rutáceas son particularmente ricas en alcaloides quinolínicos, hallándose bases de distintos tipos estructurales, como casimiroína, eduleína, dictamnina (3), medicosmina, etc .



Es característico de este grupo de quinolinas la sustitución en posición 4 , por un grupo hidroxilo o alcoxilo. Späth postuló que estas quinolinas provendrían de ácido antranílico , (Späth et al , 1929).

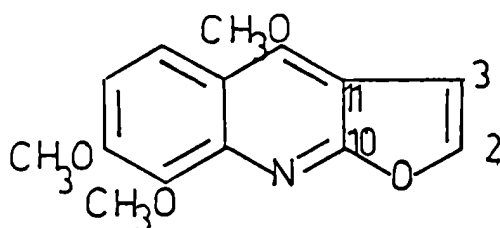
Ha sido estudiada la biosíntesis de skimmianina (4) en Skimmia japónica , a partir de ácido antranílico (2) marcado con ^3H en el anillo bencénico (Matsuo et al, 1966). Se observó en este caso que la radiactividad de skimmianina y la de su

producto de degradación, ácido skimmianico (5) eran prácticamente iguales.

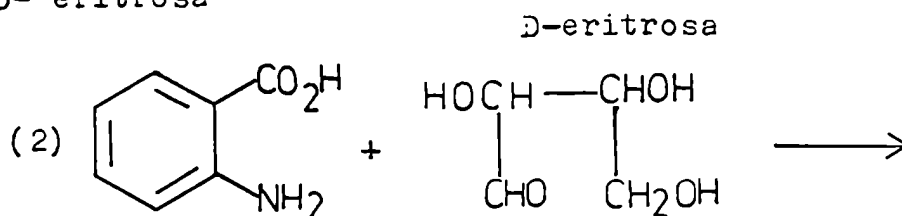


También se investigó la incorporación de ácido antranílico-carboxilo- ^{14}C , en el caso de dictamnina (3) en la planta Dictamnus albus, obteniéndose una incorporación específica del mismo orden que en la experiencia anterior. Mediante degradación del alcaloide obtenido quedó establecido que el carboxilo del ácido antranílico (2) es precursor del C-4 de dictamnina (3) (Monković et al, 1967). Los mismos autores llevaron a cabo una inoculación con ácido antranílico- ^{15}N -carboxilo- ^{14}C comprobando que la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{C}$ era igual en el precursor y en el alcaloide aislado. Esta experiencia demostraba que el ácido antranílico se incorporaba en dictamnina sin degradaciones ni reordenamientos previos.

Han sido enunciadas varias hipótesis para explicar el origen biogénico de los cuatro carbonos furánicos (C-2, C-3, C-10, y C-11), de los alcaloides furoquinolínicos.



Wenkert sugirió en 1959 , que dictamnina podría formarse biogénicamente por condensación de ácido antranílico (2) con D- eritrosa

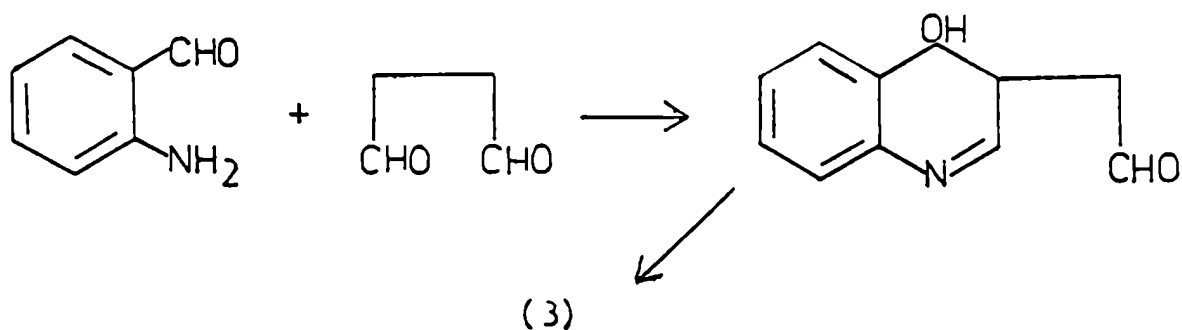


D-eritrosa puede formarse, a su vez , a partir de D-ribosa por dos vías metabólicas, siendo una de ellas la fijación fotosintética del CO_2 . Mediante este camino D-ribosa-5-fosfato-1- ^{14}C daría lugar a eritrosa-4-fosfato-4- ^{14}C , cuya incorporación en dictamnina produciría marcación en la posición 2. El otro camino de transformación de D-ribosa en eritrosa sería a través del ciclo de las pentosas, por el cual D-ribosa-1- ^{14}C , marcaría a eritrosa en C-1. La incorporación de ésta marcaría el G10 de dictamnina (Monković et al, 1967).

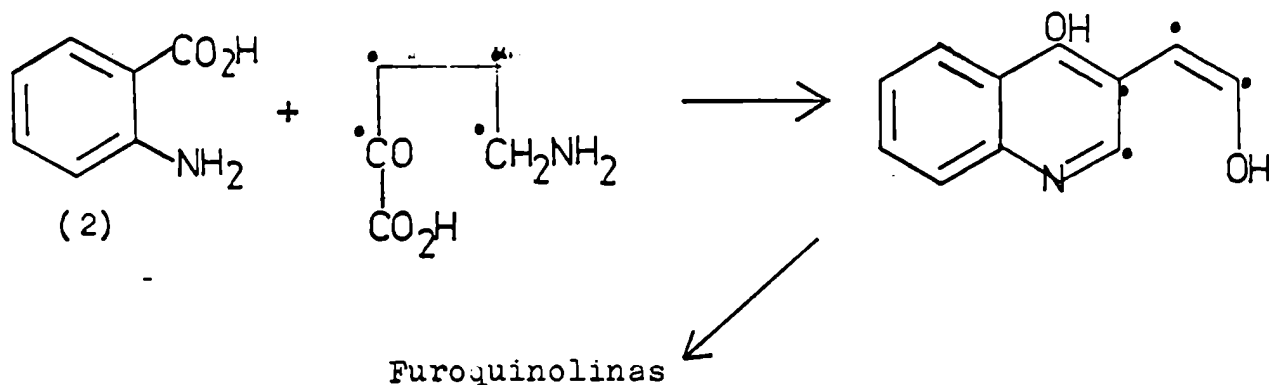
Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores , Monković et al (1967) inocularon a un ejemplar de Dictamnus albus D-ribosa-1- ^{14}C , observando que la distribución de radiactividad en la dictamnina aislada no correspondía al camino biogénico propuesto por Wenkert.

El dialdehído succínico también fué propuesto como precursor del anillo furánico de los alcaloides furoquinolínicos (Böit, 1961).

Por ejemplo, para el caso de la dictamnina (3) la biosíntesis se realizaría por un camino semejante al siguiente:



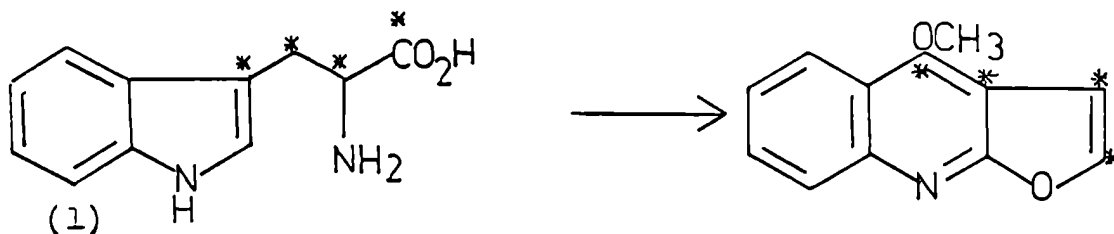
Por otra parte, Ghosal (1964) sugirió que los alcaloides furoquinolínicos se formarían por condensación de ácido antranílico (2) con un derivado de la ornitina según se indica a continuación:



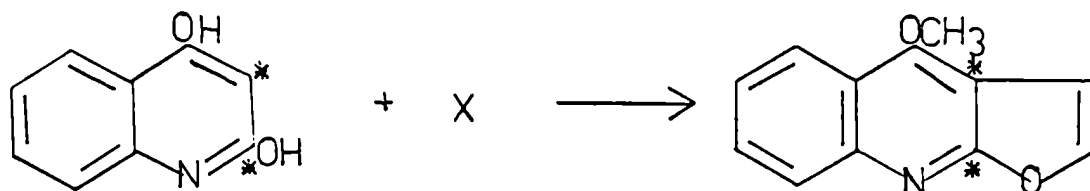
Conociendo que el ácido α -ceto glutárico puede ser precursor de ornitina via ácido glutámico, y que también puede dar lugar a ácido succínico a través del ciclo de Krebs, Monkôvić et al (1967) inocularon a un ejemplar de D albus ácido α -ceto glutárico-5- ^{14}C . La incorporación específica en dictamnina (3) correspondiente a esta experiencia fué de $0,1 \times 10^{-4} \%$, resultado que permitió descartar las hipótesis de Boit y Ghosal simultáneamente.

Robinson (1955) sugirió tres probables caminos a través de los cuales se formaría el anillo furánico de las furoquinolinas:

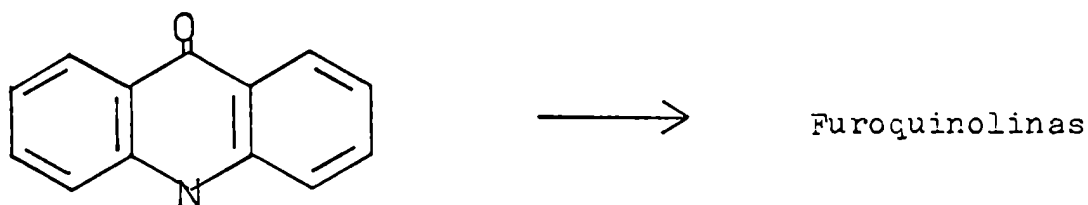
a) a partir de la cadena lateral de triptofano (1)



b) por condensación de 2,4-dihidroxiquinolina con un intermediario apropiado



c) por degradación del anillo aromático de las acridonas



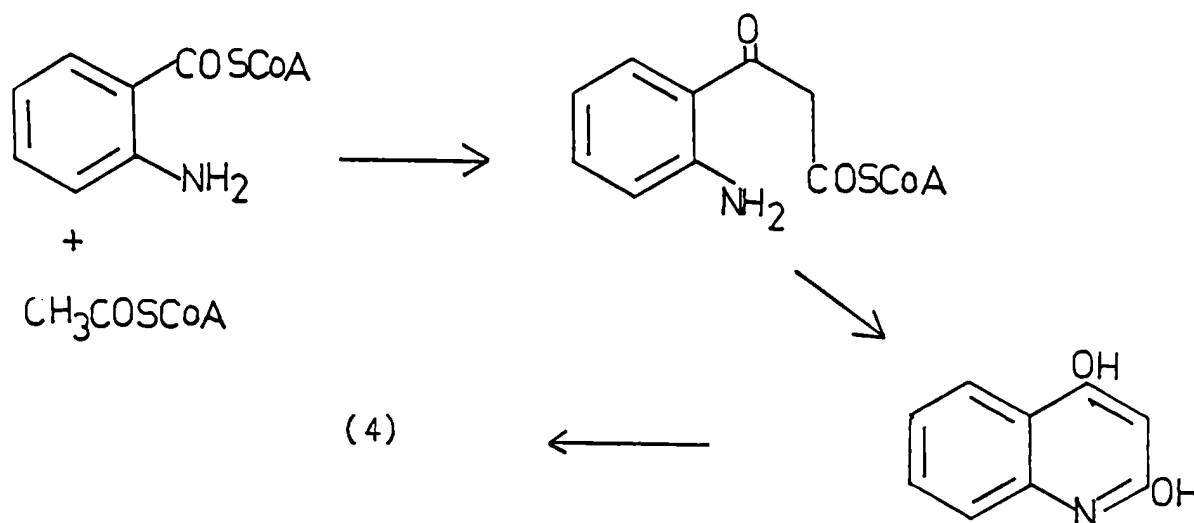
La posibilidad de que triptofano (1) actúe como precursor de los alcaloides furoquinolínicos ha sido estudiada para el caso de skimmianina (4) y de dictamnina (3) por Matsuo et al (1966) y Mõnkovič et al (1967) respectivamente.

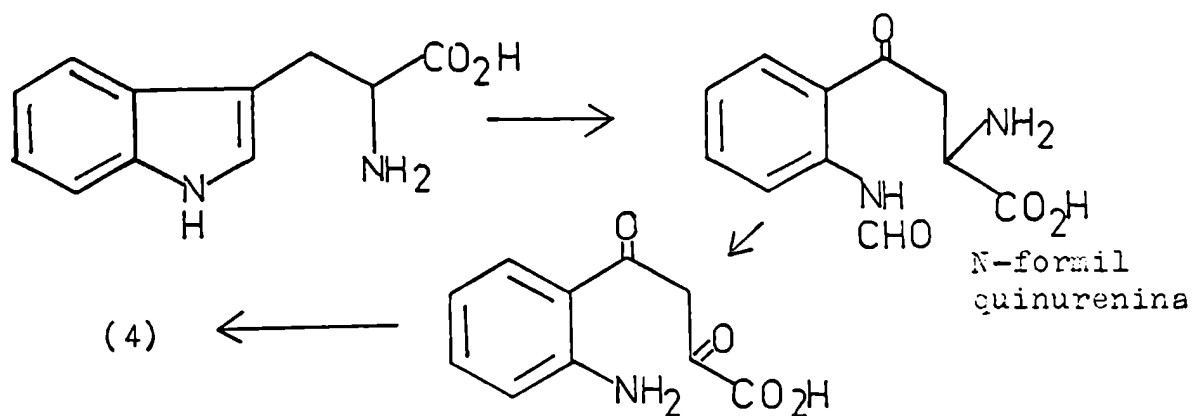
La skimmianina (4) aislada de Skimmia japónica, a la

que se había inyectado triptofano-3-¹⁴C era relativamente poco radiactiva. Sin embargo, por degradación del alcaloide se pudo determinar que toda la actividad estaba en el C-11 del mismo, pero dada la baja incorporación obtenida, dicho resultado no permitía decidir sobre la validez de la primera hipótesis de Robinson.

Los autores mencionados realizaron posteriormente otras experiencias que permitieron descartarla; así sendos ejemplares de la mencionada planta fueron inoculados con acetato de sodio-1-¹⁴C y 2-¹⁴C. En el primer caso la skimmianina aislada estaba marcada solamente en el C-10 mientras que en el segundo lo estaba sólo en el C-11. La incorporación específica correspondiente a cada una de dichas experiencias con acetato de sodio radiactivo resultó mucho mayor que la previamente obtenida utilizando triptofano marcado.

En base a los resultados obtenidos, Matsuo et al (1966) propusieron el siguiente esquema biogénico:





En este esquema el triptofano (1) participa en una vía metabólica secundaria de formación del anillo quinolínico del alcaloide, que además es distinta de la propuesta por Robinson (ver pag 17).

Los resultados de Matsuo et al (1966) fueron confirmados en estudios realizados respecto de la biosíntesis de dictamnina (3) en D. albus a partir de acetato- $1-^{14}\text{C}$ y $2-^{14}\text{C}$ (Monkôvić et al, 1967).

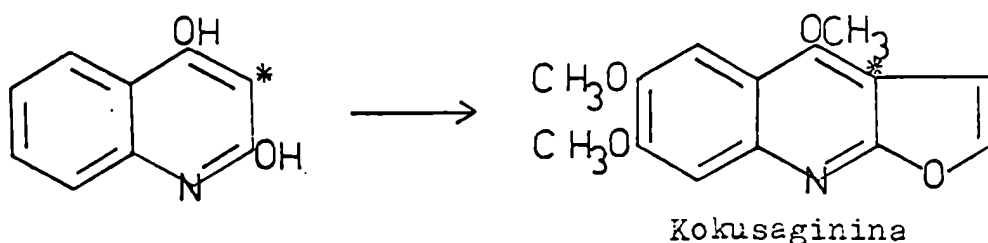
Los investigadores canadienses realizaron una experiencia con triptofano- $3-^{14}\text{C}$, siendo la dictamnina (3) aislada en este caso prácticamente inactiva.

Esta diferencia con los resultados obtenidos para skimmianina en S. japonica, fué explicada por Monkôvić et al (1967), con el argumento de que el proceso limitante de la velocidad de biosíntesis de skimmianina (4) sería la metoxilación, siendo ésta relativamente lenta respecto de la velocidad de degradación de triptofano a N-formil-quinurenina.

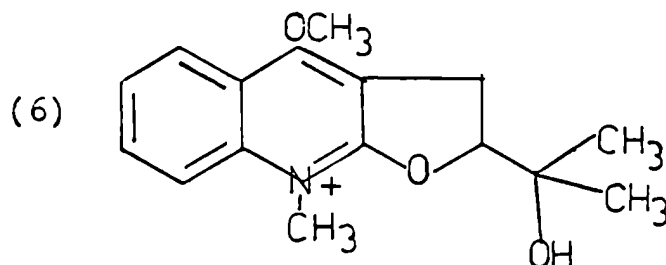
La segunda hipótesis de Robinson (ver pag 17) según la cual los alcaloides furoquinolínicos derivarían de la condensación de 2,4-dihidroxiquinolina con el intermediario apropiado (X)

fué comprobada correcta mediante experiencias realizadas recientemente.

En una de ellas se verificó la eficiente incorporación de 2,4-dihidroxiquinolina-3- ^{14}C en kokusaginina en la planta Ruta graveolens (Cobet et al , 1968).



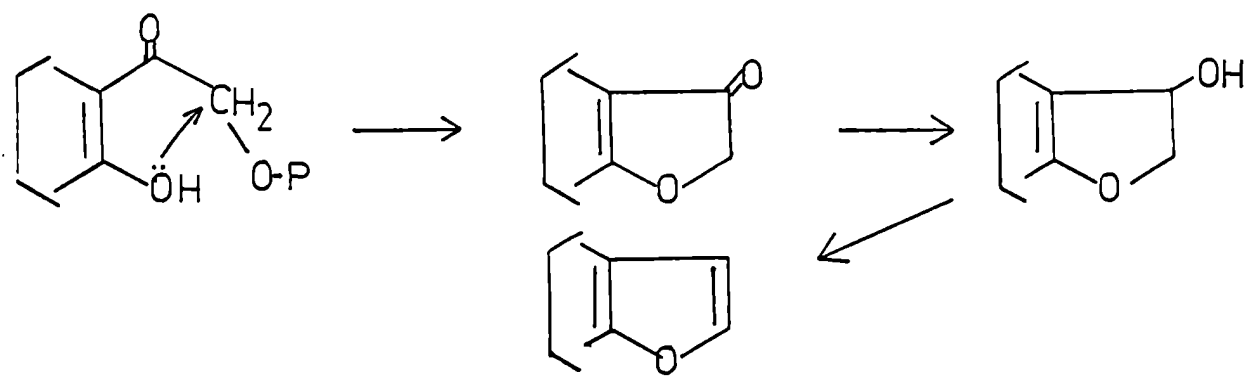
Por otra parte , Collins et al (1969) inocularon 2,4-dihidroxiquinolina-3- ^{14}C a Skimmia japonica, encontrando alta incorporación en la sal de platidesminio (6) en dictamnina y en skimmianina (4)



El conjunto de las experiencias anteriormente mencionadas permitieron establecer que 2,4-dihidroxiquinolina, formada a partir de ácido antranílico y ácido acético, era precursor directo de los alcaloides furoquinolínicos. Sin embargo , dichas experiencias no permitieron establecer el origen biogénico de C-2 y C-3 (ver pag 14) de las furoquinolinas.

Además de las teorías de Robinson , Wenkert , Ghosal y Böit , ya mencionadas , habían sido enunciadas algunas hipótesis acerca de la biogénesis de esa porción del anillo furánico.

Una de ellas es la de Geissmann et al, (1952), quienes postularon que el anillo furánico se formaría a partir de un cetoalcohol fosforilado, que se condensaría intramolecularmente con un hidroxilo adyacente para dar un ceto furano, que por reducción y deshidratación daría el furano. La secuencia de reacciones se puede representar mediante el siguiente esquema:

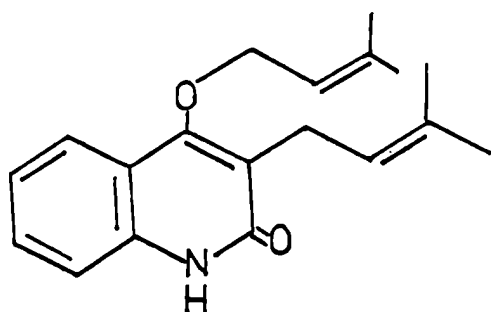


Algunas de la restantes hipótesis propuestas tienen en común la idea de que en la biogénesis del furano existiría un intermediario isoprenoide.

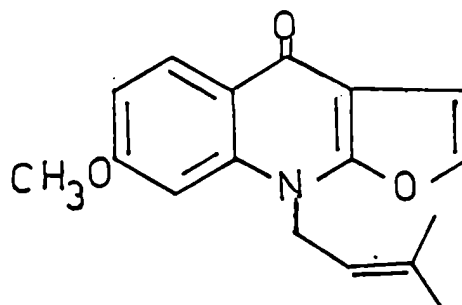
Un cierto grupo de productos naturales que son esencialmente no terpenoides contienen unidades isoprenicas en su estructura. Estas sustancias pertenecen a diversos tipos moleculares, pudiendo ser derivados de benceno, naftaleno , cumarina, quinolina, etc , y son por lo general componentes de plantas superiores o, menos frecuentemente, metabolitos de hongos.

Ciertos miembros de ese grupo de sustancias pueden poseer más de una unidad isoprenoide de C-5, que pueden estar unidas a un oxígeno, o a un nitrógeno o a un carbono del esque-

leto principal, como por ejemplo 3-dimetilalil-4-dimetilaliloxi-2-quinolona (Lavié et al, 1968), y acrophilidina (Laney et al, 1968)



Acrophilidina

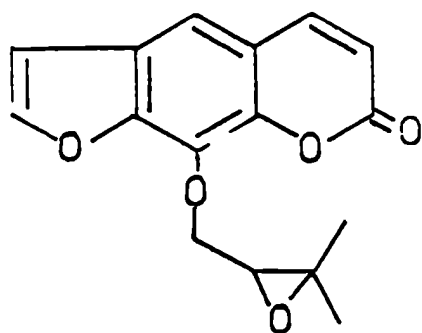


Es frecuente la asociación, en una misma planta de los compuestos del tipo mencionado y compuestos furánicos, y también lo es el hecho de que el anillo furánico no sustituido y la unidad isoprenica están unidos al mismo esqueleto carbonado central (Aneja et al, 1958).

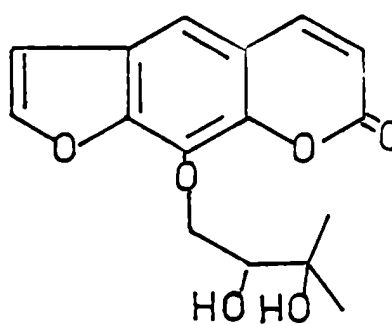
Las hipótesis que postulaban un intermediario isoprenoide se han basado en las coincidencias mencionadas.

Además del grupo dimetilalilo, el epóxido o el glicol correspondiente pueden encontrarse como sustituyentes isoprenoides, como por ejemplo en byakangelicol y byakangelicina (Aneja et al, 1958)

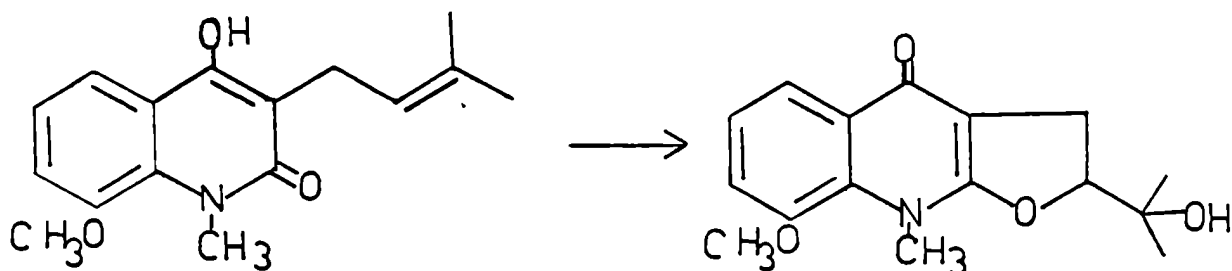
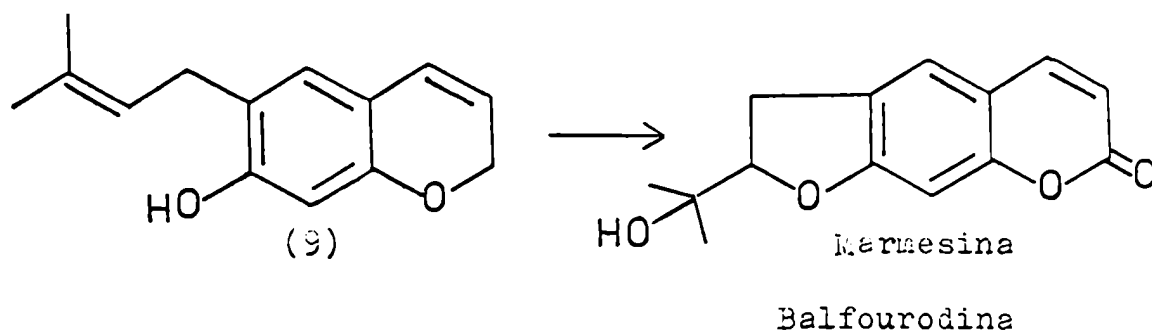
Byakangelicol



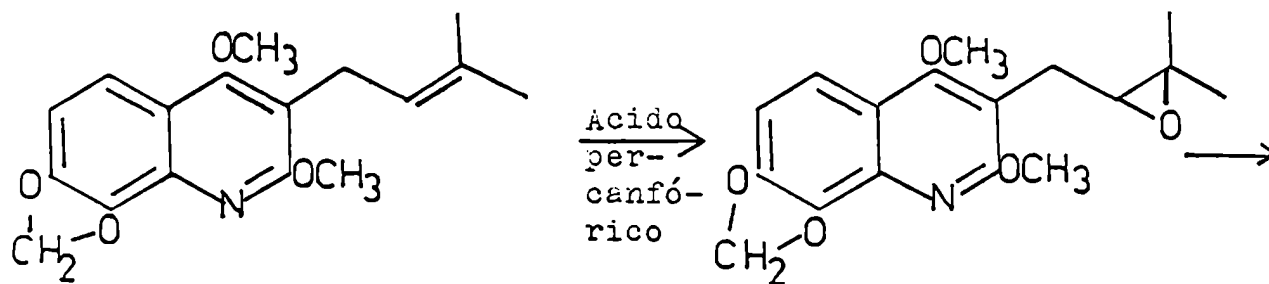
Byakangelicina

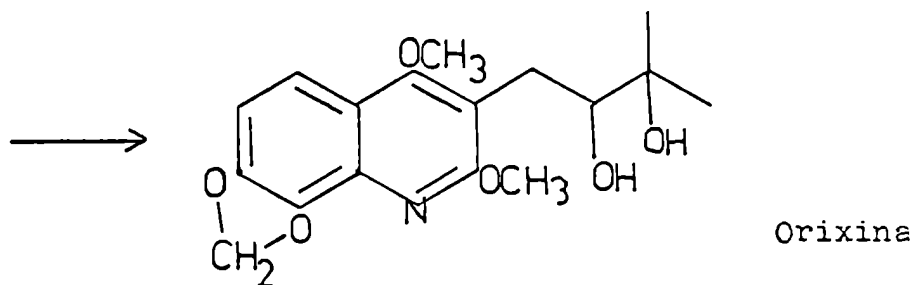


Según Aneja et al (1958), por ciclación de este tipo de compuestos, podrían formarse estructuras como la de marmesina (Chatterjee et al, 1949) o balfourodina (Rapoport et al, 1959,1960). La ciclación oxidativa ha sido realizada in vitro para ambos casos, utilizando los precursores apropiados (King et al, 1954,; Bowman et al, 1967, A)

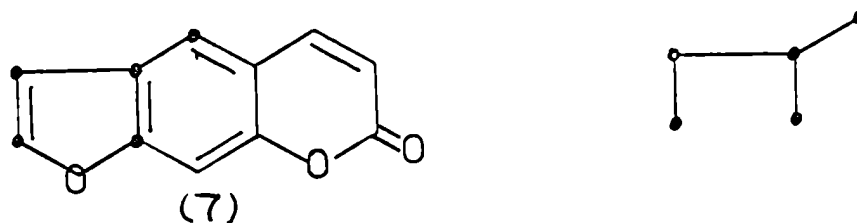


Es también significativo el hecho de que se haya sintetizado y aislado el epóxido correspondiente a la 3-dimetilalil 2,4-dimetoxi-7,8-metilendioxi-quinolina, por tratamiento de ésta con ácido peroxicanfórico, y que dicho epóxido haya sido, a su vez, transformado en el producto natural orixina (Bowman et al, 1967, B)



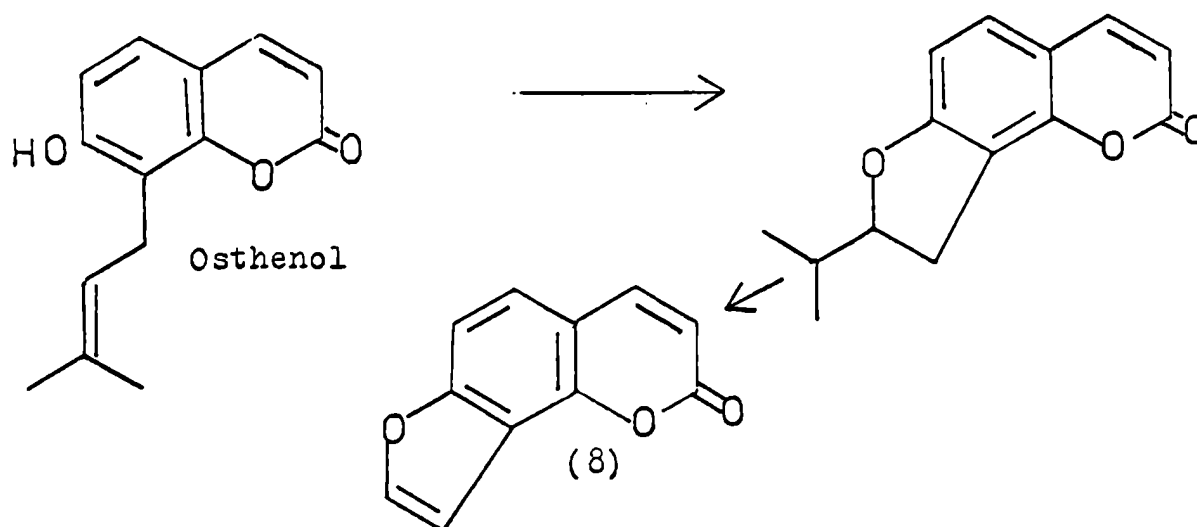


Späth postuló en 1937 un origen isoprenoide para el anillo de 4 C del furano; estos átomos de carbono junto con un carbono del anillo bencénico central, constituirían una unidad isoprélica, por ejemplo en el caso de psoraleno (7) :

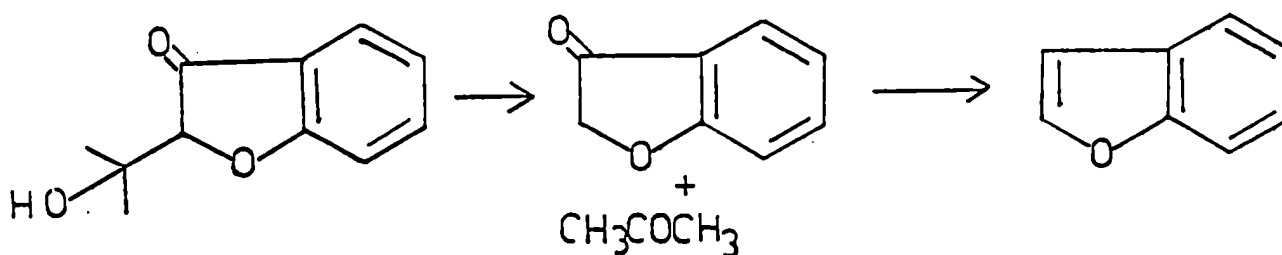


Sin embargo, esa suposición no era consistente con su idea acerca del origen del anillo bencénico en cumarinas simples y en las que tenían una unidad isoprélica sustituyente, ya que en aquellos casos le asignaba un origen a partir de hidratos de carbono.

Haworth propuso en 1937 que el anillo furánico no sustituido de las furocumarinas como angelicina (8) y psoraleno (7) provendría de la ciclación de estructuras como la de osthenol o 7-demetil suberosina (9) (ver pag 28) respectivamente, con posterior pérdida del resto isopropilo. Dicho proceso puede representarse por el siguiente esquema:



Continuando con las hipótesis isoprénicas de formación de anillos furánicos, Birch, en 1958 sugirió que los benzofuranos se formarían por una reacción retroaldólica, seguida de reducción y deshidratación; (B)

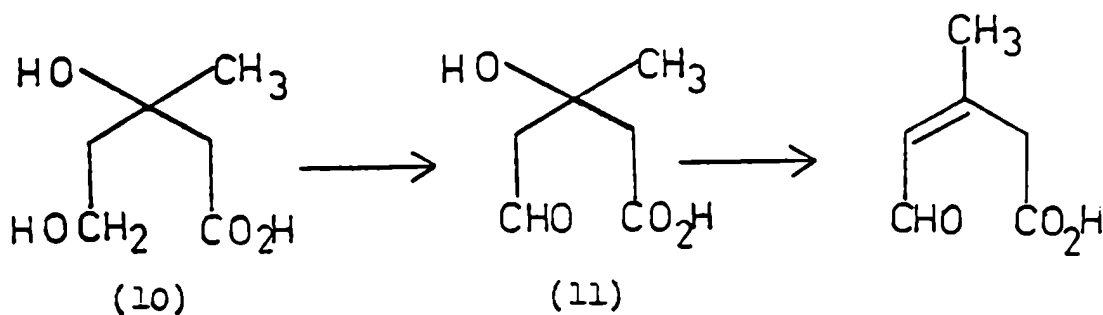


El autor mencionado, y simultáneamente Aneja et al, (1958) hicieron extensiva la hipótesis del intermediario isoprenoide a las furoquinolinas.

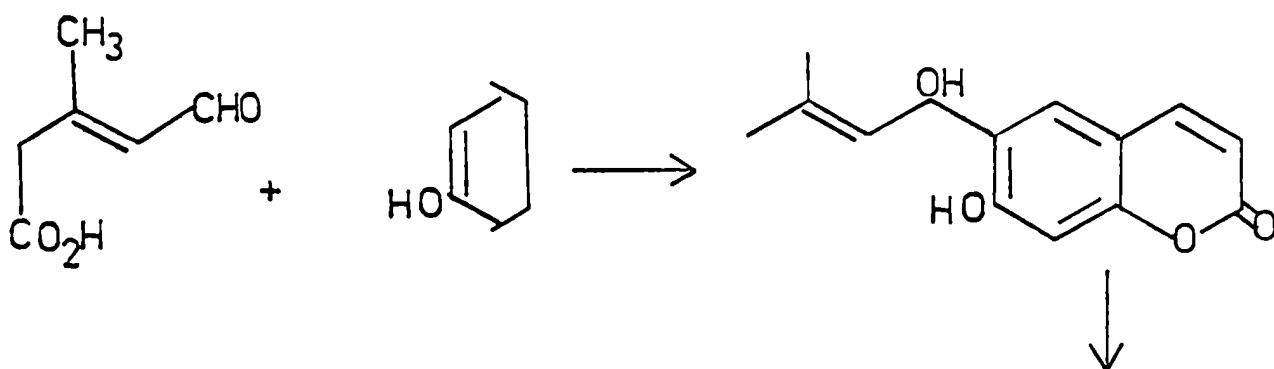
Las primeras experiencias que revelaron que el ácido mevalónico era un precursor cercano de estructuras terpénicas fueron dadas a conocer en 1956 (Wolff et al, y Tavorimina et al,) .

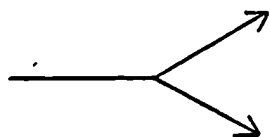
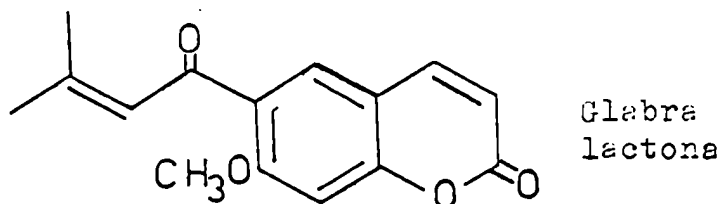
Aneja et al, (1958), enunciaron la hipótesis que invo-

lucraba al ácido mevalónico (10) como precursor del anillo furánico de furocumarinas y eventualmente de furoquinolinas. Según esta hipótesis la pérdida de la unidad de 3 C sería previa a la ciclación. El primer paso de este camino biogenético sería la oxidación a aldehído del grupo alcohólico primario del ácido mevalónico (10). El intermediario así formado (11) sufriría deshidratación formándose una doble ligadura α, β respecto del carbonilo aldehídico. Este sería a su vez el que atacaría la posición activada del compuesto fenólico:



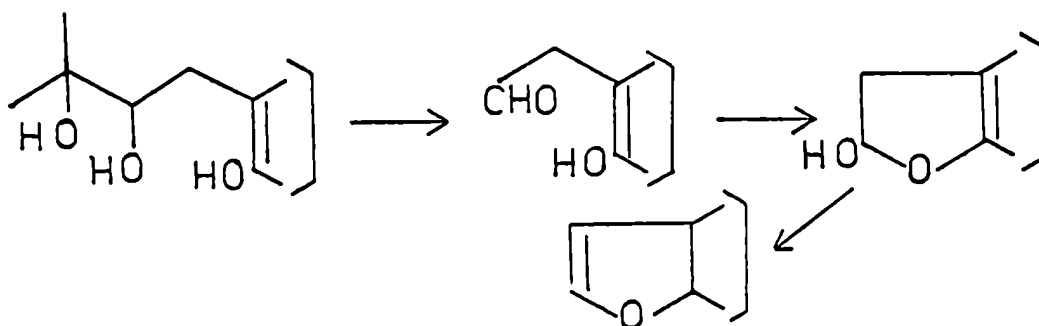
Por sustitución en la posición activada del producto fenólico y descarboxilación, se llegaría a un compuesto que podría considerarse como una etapa primaria, a partir de la cual podrían derivarse compuestos dimetilalílicos, y sus correspondientes epóxidos y glicoles, ya mencionados. También podría dar origen a derivados del ácido seneciico, como la glabra lactona:



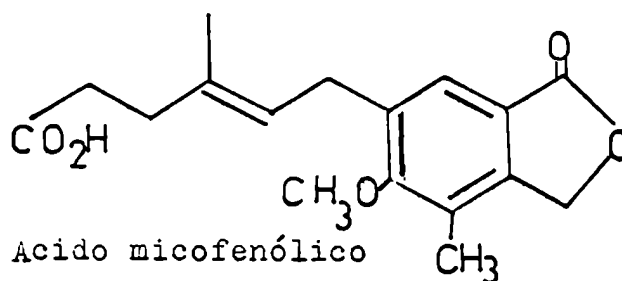
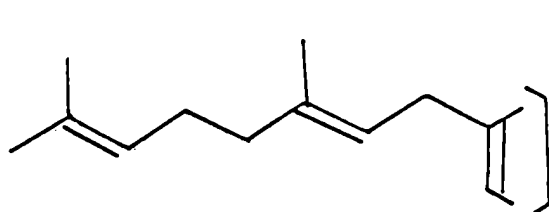


Dimetil alil derivados, epóxidos y glicoles.

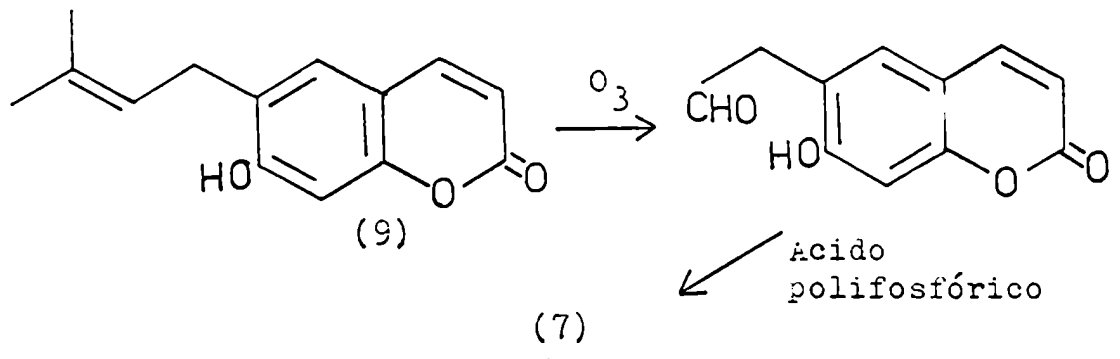
El glicol formado a partir de la mencionada estructura primaria, podría sufrir una ruptura oxidativa, dando un aldehído, que se ciclaría y deshidrataría al anillo furánico:



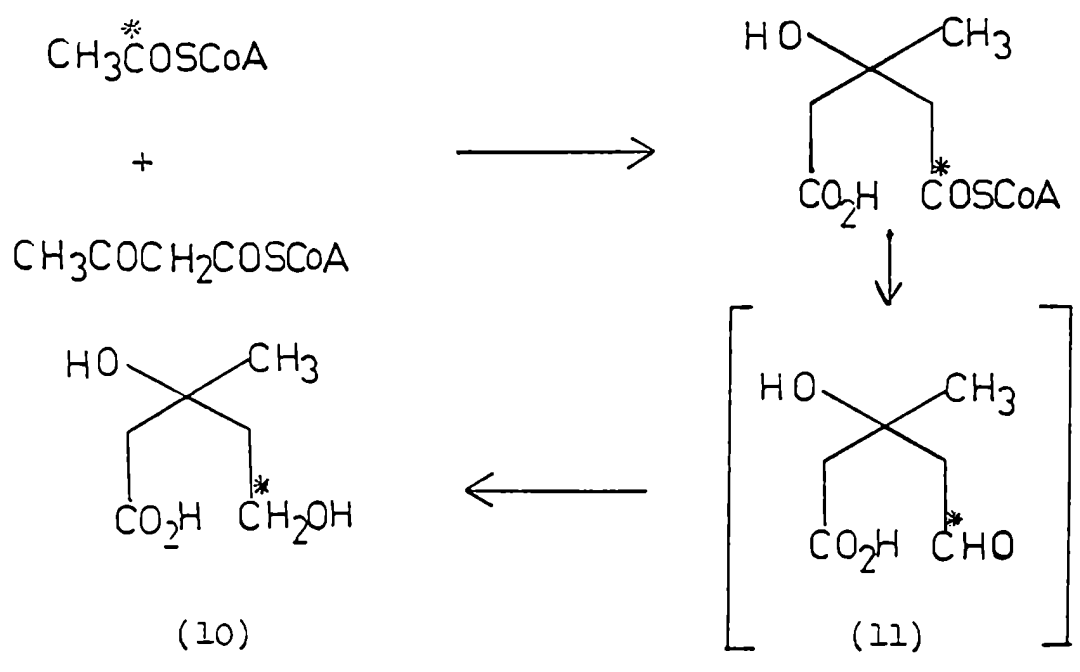
Para formular este esquema biogenético, los autores se basaban en la existencia de compuestos como el ácido micofenólico, que podrían derivarse de una secuencia de reacciones similar a la propuesta, seguida de la oxidación del grupo aldehído formado:



Aneja et al (1958), consiguieron preparar psoraleno (7) in vitro, siguiendo la ruta biosintética por ellos propuesta:

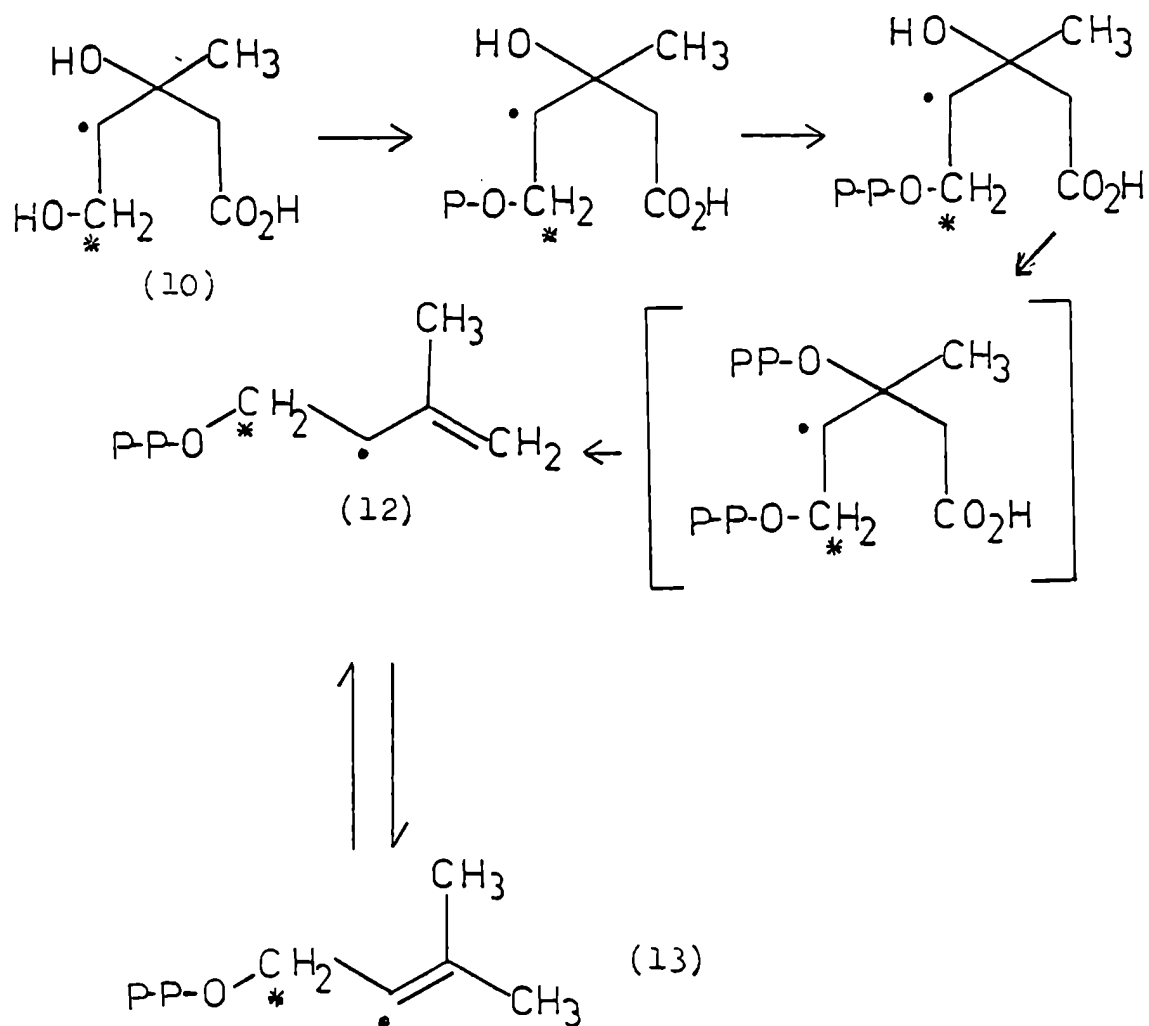


Actualmente es bien conocida la biosíntesis de ácido mevalónico (10) (Bernfeld, 1967) (Ferguson et al, 1959), que puede ser representada por el siguiente esquema:



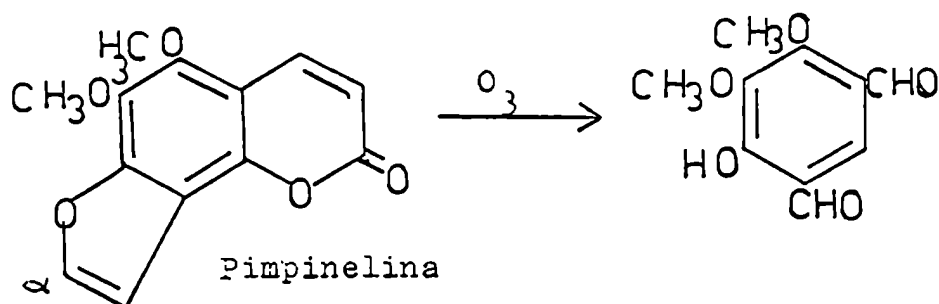
Es evidente, entonces, que el ácido meváldico (11) es un precursor de ácido mevalónico y no su derivado, como postularon Aneja *et al* (1958) (ver pag 26).

Asimismo está bien establecido que previamente a su incorporación en terpenos y esteroides el ácido mevalónico se transforma en pirofosfato de isopentenilo (12) el cual está en equilibrio con su isómero, el pirofosfato de dimetilalilo (13) (Bernfeld, 1967).



Es por lo tanto más razonable suponer que los derivados isoprenoides de quinolina, cumarina, etc, ya mencionados, no se biosintetizan a través del intermediario propuesto por Aneja et al (1958) , sino de pirofosfato de dimetilalilo (13).

Floss et al (1966), estudiaron la biosíntesis de la furocumarina pimpinellina en Pimpinella magna. La pimpinellina radiactiva aislada de un ejemplar de dicha planta, al que se había inoculado ácido mevalónico-4- ^{14}C , fué degradada por ozonólisis:



El aldehído obtenido contenía el 11% de la radiactividad del producto de partida, lo cual indica, que la mayor parte de la radiactividad estaba localizada en el C- α del furano. Esto era de esperarse, si se suponía que la incorporación de mevalónico en la furocumarina tenía lugar a través de pirofosfato de dimetil alilo.

A pesar de como ya ha sido mencionado acetato es precursor de ácido mevalónico, Monkovic et al (1967) no obtuvieron incorporación de radiactividad en los C-2 y C-3 de dictamnina (3) , ni tampoco lo observaron Matsuo et al , (1966) en skimmianina (4) al efectuar inoculaciones con acetato- ^{14}C y 2- ^{14}C .

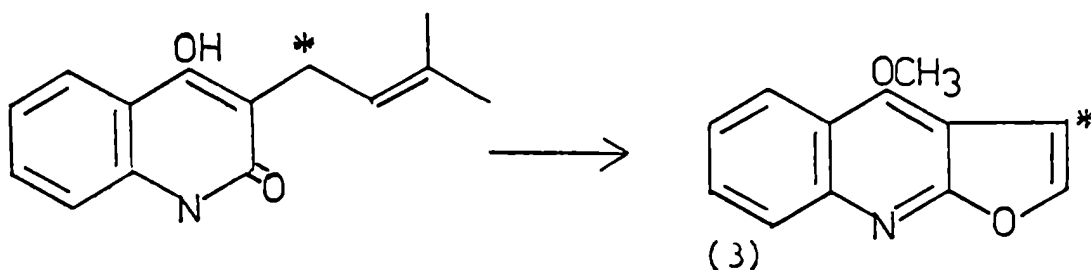
Según los primeros autores mencionados esto se debería

a que el acetato es consumido mucho más rápidamente para la biosíntesis de quinolina que para la de ácido mevalónico (10).

También fueron negativos los resultados de la experiencia realizada con mevalónico-4- ^{14}C por Monković et al (1967).

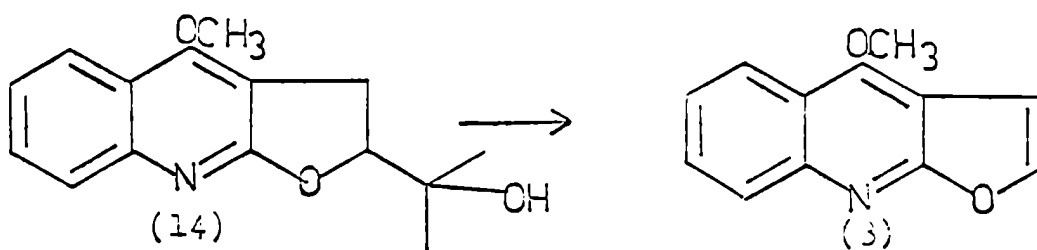
Otro resultado fallido de incorporación de ácido mevalónico en furoquinolinas, ha sido comunicado por Atkinson et al (ver Collins et al, 1969).

Collins et al, (1969), demostraron que 3-(3,3-dimetilalil-1- ^{14}C)-4-hidroxi-2-quinolona es un precursor eficiente de dictamnina (3) y de la sal de platidesminio (6). La distribución de radiactividad encontrada mediante la degradación de la dictamnina, puede representarse por medio del siguiente esquema:

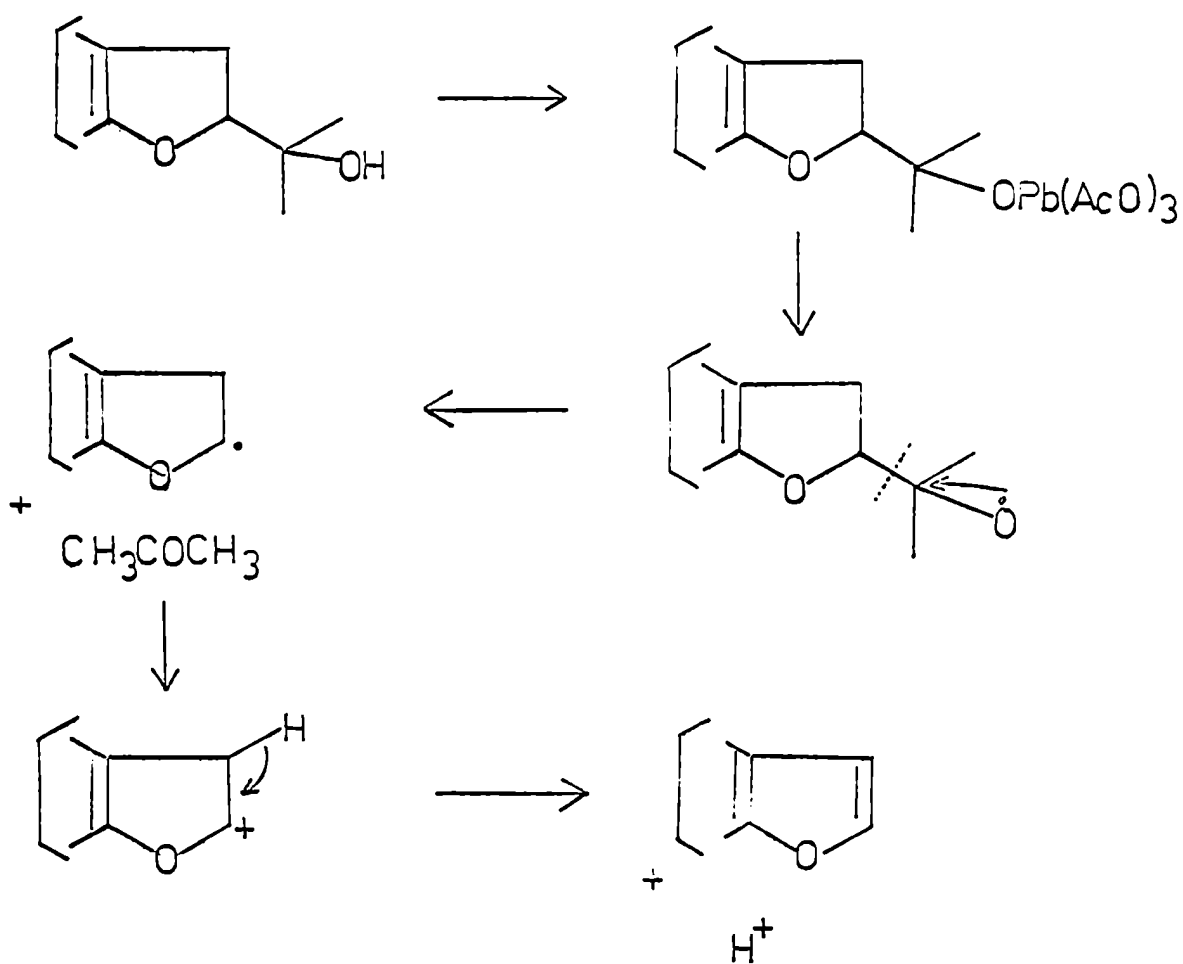


Es evidente por lo tanto, la existencia de un intermedio isoprenoide. Queda por ver de qué manera se forma dicho intermediario, y cual es el mecanismo de ruptura que conduce al anillo furánico no sustituido. (ver pag 73).

Diment et al, (1969), han conseguido preparar dictamnina (3) a partir de platidesmina (14) por tratamiento de este compuesto con tetraacetato de plomo en presencia de iodo.

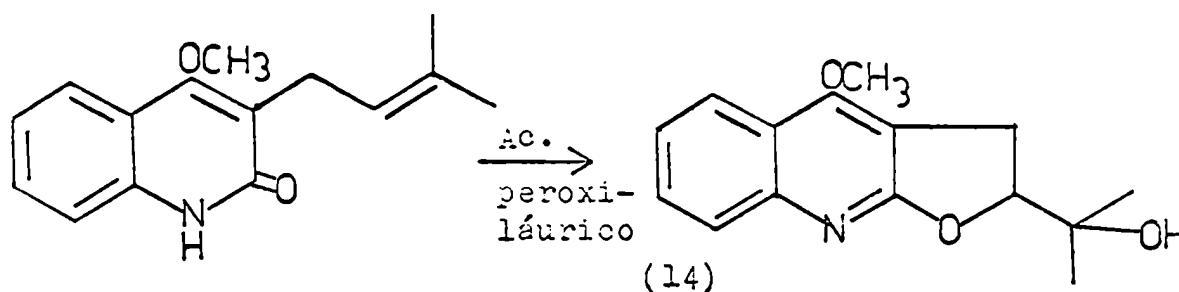


El mecanismo propuesto por los autores del mencionado trabajo es el siguiente:



Para formular este mecanismo los autores se han basado en que la descomposición de los hipohalitos de alquilo sigue un curso similar. Sin embargo, la descomposición fotoquímica del hipoclorito correspondiente a platidesmina (14) rindió solamente trazas de dictamnina (3).

Es interesante al respecto el hecho de que platidesmina pudo ser sintetizada in vitro por ciclación oxidativa de 3-(3,3-dimetilalil-4-metoxi-2-quinolona) (Bowman et al, 1966)



Como ya ha sido mencionado anteriormente, éste parece ser el mecanismo por el cual se forman biogenéticamente los derivados de isopropil dihidrofurano. (ver pag 23).

La conversión de platidesmina (14) en dictamnina (3) realizada por Diment et al, (1969), no tiene necesariamente significado biogenético, dado que las condiciones en que fué realizada ~~neran~~ similares a las fisiológicas. Sin embargo es significativo el hecho que platidesmina se encuentre junto a dictamnina en algunas plantas como por ejemplo S. japonica o Zanthoxillum parviflorum (Diment et al, 1967). En estos casos platidesmina" podría ser un precursor de dictamnina a través de un mecanismo similar al mencionado. (ver pags 22 y 23)

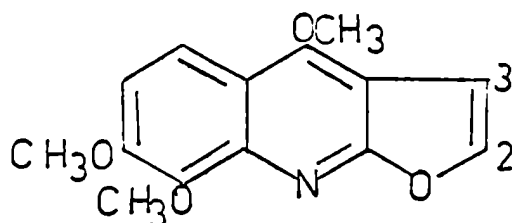
CAPITULO 3

ESTUDIO SOBRE LA BIOSINTESIS
DE SILEMIANINA
EN FAGARA COCO (GILL.) ENGL.

DESCRIPCION DEL TRABAJO REALIZADO

1) OBJETO DEL TRABAJO REALIZADO

El objeto principal del presente trabajo consistió en tratar de establecer el origen biogénico de los C-2 y C-3 del alcaloide skimmianina (4) y al mismo tiempo tratar de confirmar los resultados obtenidos para éste y otros alcaloides similares, que ya han sido mencionados en capítulos precedentes.



Las evidencias experimentales conocidas en el momento en que fué comenzado este trabajo, pueden resumirse de la siguiente manera: se conocía el origen biológico de la porción quinolínic del alcaloide, dado que se había comprobado que dicha fracción provenía de los ácidos antranílico y acético; se desconocía el origen de los carbonos furánicos, aún cuando se sospechaba la existencia de algún intermediario isoprenico.

La existencia simultánea en una misma planta de compuestos con anillos furánicos y de otros con restos dimetil alílicos, unidos al mismo tipo de esqueleto carbonado central, favorecían la hipótesis del intermediario isoprenoide (ver pag 21). Apoyaba esta idea el estudio de la biosíntesis de la furocumarina pimpineline a partir de ácido mevalónico, en el cual se comprobó que el C- α del anillo furánico derivaba de ácido mevalónico (10) (ver pag 30). Sin embargo se había encontrado que, a pesar

de que acetato es precursor del ácido mevalónico (10), no era incorporado en el anillo furánico de la skimmianina (4) y la dictamnina (3). Otro dato contradictorio consistía en la no incorporación de ácido mevalónico-4- ^{14}C en dictamnina (3) (ver pag 30).

Teniendo presente estos conocimientos se proyectó el estudio de la biosíntesis del alcaloide skimmianina en la planta Fagara coco, tratando fundamentalmente de determinar el origen biológico de los C-2 y C-3 del compuesto mencionado.

Para llevar a cabo nuestras investigaciones se optó por el método de inyectar en un vegetal vivo una sustancia radiactiva sospechada de jugar un rol precursor en la formación biológica del producto natural en estudio. La planta es luego mantenida viva y sin variar sus condiciones durante un lapso prudencial como para considerar que la sustancia inoculada ha entrado a formar parte de los procesos biológicos del organismo vivo. Posteriormente la planta es cosechada, secada y molida procediéndose a la extracción y purificación del compuesto en estudio, el cual , en el caso de poseer radiactividad, es sometido a reacciones de degradación con el objeto de determinar en qué posiciones se localiza la radiactividad.

En la primera serie de inyecciones, realizada en diciembre de 1968, se inocularon a sendos ejemplares de F. coco , acetato de sodio-1- ^{14}C , formiato de sodio- ^{14}C y ácido mevalónico-5- ^{14}C .

Ya fué mencionada la posible causa por la cual acetato no se incorporaba en el anillo furánico de dictamnina (3) en D. Albus (ver pag 30)

A pesar de ello, se decidió efectuar una inoculación de acetato-1- ^{14}C , confiando en que el metabolismo de dicha sustancia en F. coco podría ser distinto al encontrado en la planta D. albus de manera tal que se produjese ácido mevalónico a partir de acetato radiactivo a una velocidad suficientemente grande como para que fuera incorporado en skimmianina.

La necesidad de una inoculación con ácido mevalónico (10) marcado con ^{14}C en algunas de las posiciones adecuadas era bien evidente. El ~~compuesto~~ marcado en la posición 5 fué sintetizado por nosotros, según la técnica de Conforth (1959). La actividad total disponible era muy pequeña por lo que el éxito de la experiencia se consideró poco probable desde el comienzo. Los resultados obtenidos confirmaron esta presunción ya que la skimmianina correspondiente a esta experiencia resultó prácticamente inactiva.

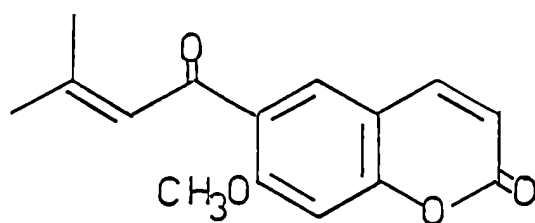
Es conocido el hecho de que la cadena lateral de 2 \cdot C en la posición 24 de esteroides vegetales como β -sitosterol o stigmasterol, deriva de formiato o metionina (Bernfeld, 1967). La inoculación de formiato de sodio- ^{14}C , se realizó contemplando la posibilidad de que dicha unidad de 1 C fuese precursora de los C-2 y C-3 de skimmianina (4), sibien se había encontrado que en el caso de la dictamnina toda la actividad incorporada a partir de metionina S-metil - ^{14}C , estaba localizada en el grupo metoxilo.

En la segunda serie de inyecciones, llevada a cabo en diciembre de 1969, se administraron a ejemplares de la planta mencionada, ácido mevalónico-5- ^{14}C (adquirido a una firma comercial); (ácido mevalónico-4- ^{14}C (proporcionado por la División Mo-

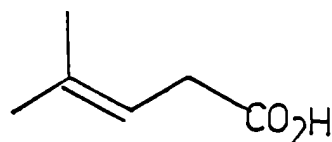
léculas arcadas de la C.N.E.A.) ; alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C y ácido 3,3-dimetil acrílico-1-¹⁴C, habiéndolo sido estos dos últimos compuestos sintetizados por nosotros.

Dado que existían ciertas dudas sobre la facilidad con que el ácido mevalónico podía metabolizarse en el sitio de biosíntesis del alcaloide ya que no se había encontrado incorporación del mismo en nuestra experiencia previa con ácido mevalónico marcado, y lo mismo había sucedido en otros casos ya mencionados (ver pag 30), y como se pensaba que la no incorporación del ácido mevalónico podía deberse a la lenta formación de pirofosfato de dimetil alilo a partir de dicho compuesto en el sitio de biosíntesis del alcaloide, se decidió por ello inocular, además de ácido mevalónico-4-¹⁴C y 5-¹⁴C, alcohol 3,3-dimetil alílico-1-¹⁴C.

Debido a la existencia de productos naturales derivados del ácido 3,3-dimetil acrílico, similares a los ya mencionados de dimetil alilo (ver pag 21), como por ejemplo la glabra lactona (Aneja et al 1958) :



Glabra lactona



Acido 3,3-dimetil acrílico

y a la existencia de hipótesis biogenéticas según las cuales el resto isoprenico actuante sería carboxílico (Birch et al, 1958), (Aneja et al, 1958), se realizó la inoculación del ácido 3,3-

dimetilacrilico-1-¹⁴C, con el objeto de lograr información acerca del comportamiento de éste ácido en el proceso biológico de formación del alcaloide en estudio.

Es bien conocido el hecho que el ácido mevalónico es precursor de esteroides (Clayton, 1965), y dado que en F. coco se ha descrito la presencia de β-sitosterol, se consideró interesante, en el caso que el anillo furánico tuviera un origen isoprenoide , comparar las incorporaciones específicas de las sustancias marcadas utilizadas, en el esteroi y el alcaloide, para tener una idea de las velocidades relativas de biosíntesis de ambos compuestos. Por otra parte el hecho de que β-sitosterol resultara radiactivo indicaría que los productos inoculados habían entrado al metabolismo general de la planta.

Por las razones mencionadas, se procedió en cada caso al aislamiento y purificación y medición de la radiactividad del β-sitosterol .

2) INOCULACION DE LAS SUSTANCIAS RADIATIVAS

Para realizar las inoculaciones se debió trasladar los productos radiactivos a la localidad de La Calera (proia de Córdoba) donde abunda la planta Fagara coco en estado salvaje.

Fueron elegidos para ser inyectados ejemplares jóvenes de Fagara coco de aproximadamente 2 mts de altura , que tuvieran abundante follaje, dado que la skimmianina se encuentra en mayor concentración en las hojas.

Según ya fué mencionado se realizaron dos series de experiencias con productos radiactivos y en cada una de ellas

se empleó un método distinto de inoculación.

En la primera serie, el método consistía en realizar con una aguja de coser común un estrecho orificio que atravesara el tallo de la planta, a través del cual se hizo pasar un hilo de algodón cuyos extremos eran luego sumergidos en la solución de la sustancia radiactiva. Este método presentaba el inconveniente que parte de la sustancia radiactiva podía no ser absorbida por la planta al quedar depositada sobre el hilo por evaporación del líquido que circulaba a través del mismo. Para disminuir este riesgo se efectuaron varios lavados con agua destilada, después que la totalidad de la solución había sido absorbida. (ver pag.42 y 100)

En la segunda serie de inoculaciones se utilizó un dispositivo que permitía introducir la sustancia en la planta directamente desde el reservorio, a través de un tubo de vidrio (ver pag 42).

Este método presentaba la ventaja adicional que la entrada del líquido en la planta era algo más rápida que en el método anterior, lo que disminuía la probabilidad que parte de la solución se derramase debido a los movimientos que por acción del viento llegara a realizar la planta.

3) AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE SKIMMIANINA (4). METODO GENERAL

Después de transcurridos doce días a partir del momento de la inoculación, las plantas fueron cosechadas y trasladadas a nuestros laboratorios, donde se procedió a su secado y molienda. El polvo así obtenido fué humedecido con carbonato de

sodio acuoso y luego extraído con éter de petróleo en un aparato de extracción continua. La solución fué luego concentrada a presión reducida y extraída con ácido clorhídrico 6 N.

Los extractos ácidos unidos fueron lavados con cloroformo y luego alcalinizados y extraídos con ese mismo solvente hasta reacción negativa de alcaloide en el último extracto clorofórmico. La solución clorofórmica fué evaporada al vacío, quedando un residuo aceitoso oscuro. Este residuo se trató con metanol, formándose cristales amarillentos, que fueron separados por filtración luego de una noche a 0°. El precipitado obtenido fué recristalizado del mismo solvente hasta constancia de radiactividad. El producto fué identificado como skimmianina por comparación de su pf y espectro IR con los de muestra inactiva auténtica previamente identificada mediante RMN. Espectro RMN de skimmianina en Cl_3CD (ver pag 52) : 4,01 (3 protones, singulete, OCH_3 en C-7 ó C-8); 4,12 (3 protones, singulete, OCH_3 , en C-7 ó C-8); 4,37 (3 protones, singulete, OCH_3 en C-4); 6,98 (1 protón , doblete, J 2,5 c/s, H-3); 7,21 (1 protón, doblete, J 9,0 c/s, H-6); 7,54 (1 protón doblete, J 2,5 c/s , H-2), 7,97 (1 protón, doblete, J 9,0 c/s, H-5) (Robertson, 1963).

4) AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL β -SITOSTEROL. METODO GENERAL

La solución etérea remanente de la extracción con ácido clorhídrico fué lavada con bicarbonato de sodio acuoso, secada con sulfato de magnesio y luego evaporada al vacío hasta sequedad. El residuo correspondiente fué sometido al proceso de extracción de sustancias insaponificables (ver pag103). El material así obtenido fué purificado por cromatografía en columna

de alúmina, eluyendo sucesivamente con éter de petróleo y benceno. Las fracciones bencénicas que contenían β -sitosterol fueron unidas y evaporadas. El producto resultante fué tratado con metanol formándose un precipitado amarillento pastoso, que fué separado por filtración.

En los primeros ensayos, realizados con material inactivo, se observó que dicho precipitado no era purificable por recristalizaciones sucesivas, obteniéndose después de cada una de ellas un producto blanco, pero de bajo pf, con valores que oscilaban entre 60 y 100°.

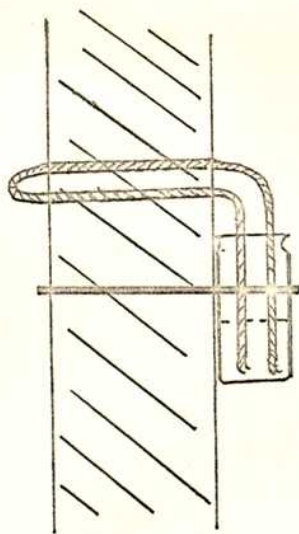
Se procedió por lo tanto a tratar el producto impuro con anhídrido acético y piridina, suponiendo que el acetato de β -sitosterol sería más fácilmente separable de las sustancias que lo impurificaban.

El producto resultante de la acetilación fué sometido a recristalizaciones de etanol, con un resultado análogo al anterior, es decir el pf del producto permaneció en el intervalo 70-100°. Por cromatografía en capa delgada de alúmina se observó la presencia de dos manchas principales, de las cuales sólo la de menor Rf daba reacción de esteroides.

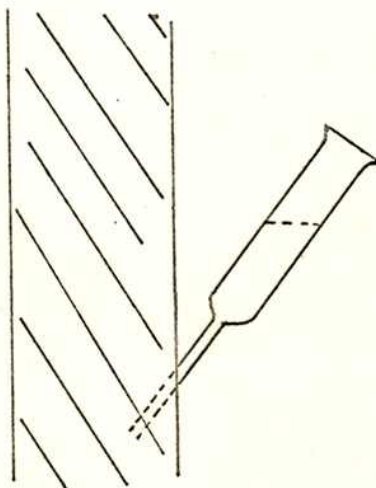
La separación del acetato de β -sitosterol de las sustancias que lo impurificaban se llevó acabo mediante cromatografía preparativa en placa de alúmina (ver pag 104).

Por elución de la franja de menor Rf y evaporación del solvente se obtuvo un producto que luego de recristalizado en etanol, fué identificado como acetato de β -sitosterol, por comparación de su pf y espectro IR con el de una muestra auténtica .

DISPOSITIVO UTILIZADO EN LA PRIMERA SERIE DE INOCULACIONES



DISPOSITIVO UTILIZADO EN LA SEGUNDA SERIE DE INOCULACIONES



5) REACCIONES DE DEGRADACION DEL ALCALÓIDE RADIOACTIVOa) OXIDACION A ACIDO SKIMMIANICO (5). METODO GENERAL

Una solución de skimmianina (4) en acetona a ebullición fué tratada con permanganato de potasio sólido en pequeñas porciones. El residuo de dióxido de manganeso formado se separó por filtración y se lo extrajo con carbonato de sodio acuoso, solubilizándose de esta manera la sal sódica del ácido skimmianico (5) (ver esquema en pag 49); el mismo fué precipitado al acidificarse la solución. El producto se filtró y secó al vacío y luego se recristalizó de ácido acético glacial hasta actividad constante. La identificación del producto obtenido se hizo mediante comparación del p.f. y espectro IR (banda fuerte 1700 cm^{-1}) con el de muestra inactiva, que a su vez se había identificado por RMN. Espectro RMN del ácido skimmianico (solvente: ácido trifluoroacético): 4,25 (6 protones, singulete, OCH_3 en C-7 y C-8); 4,60 (3 protones, singulete, OCH_3 en C-4); 7,58 (1 protón, doblete J 10 c/s, H-6), 8,3 (1 protón, doblete, J 10c/s, H-5). (Ver pag. 52).

La diferencia entre la actividad específica milimolar de la skimmianina y la del ácido skimmianico (5) sirve para calcular la radiactividad localizada en el C-2 de skimmianina (ver esquema en pag 49).

b) DESCARBOXILACION DEL ACIDO SKIMMIANICO A 7,8-DIMETOXI-2,4-QUINOLINDIONA (15)

Para realizar la descarboxilación del ácido skimmianico (5), se calentó a reflujo una suspensión del mismo en ácido clorhídrico 6 N, durante 3 h. (ver esquema en pag 50). El anhídrido carbónico formado fué arrastrado mediante corriente de nitrógeno

que burbujeaba a través de la mezcla reaccionante. Previamente a su entrada en el balón de reacción el N_2 se purificó mediante pasaje por distintos frascos lavadores. Primeramente se lo hizo pasar por un tubo en U conteniendo cal sodada con el objeto de retener cualquier impureza gaseosa acídica que pudiera contener en particular anhídrido carbónico, que diluiría el CO_2 radiactivo formado en la reacción, lo que introduciría un error en los correspondientes cálculos de la actividad específica del mismo. Luego se lo hacía pasar a través de ácido sulfúrico concentrado y posteriormente por una solución saturada de hidróxido de bario con el objeto de controlar la ausencia de anhídrido carbónico en el gas que a continuación pasaría a través de la mezcla reaccionante.

El balón donde se realizó esta reacción estaba acoplado a un sistema que permitía capturar como CO_3Ba el anhídrido carbónico formado, a medida que se iba produciendo, por burbujeo en una solución saturada de hidróxido de bario (ver pag 50).

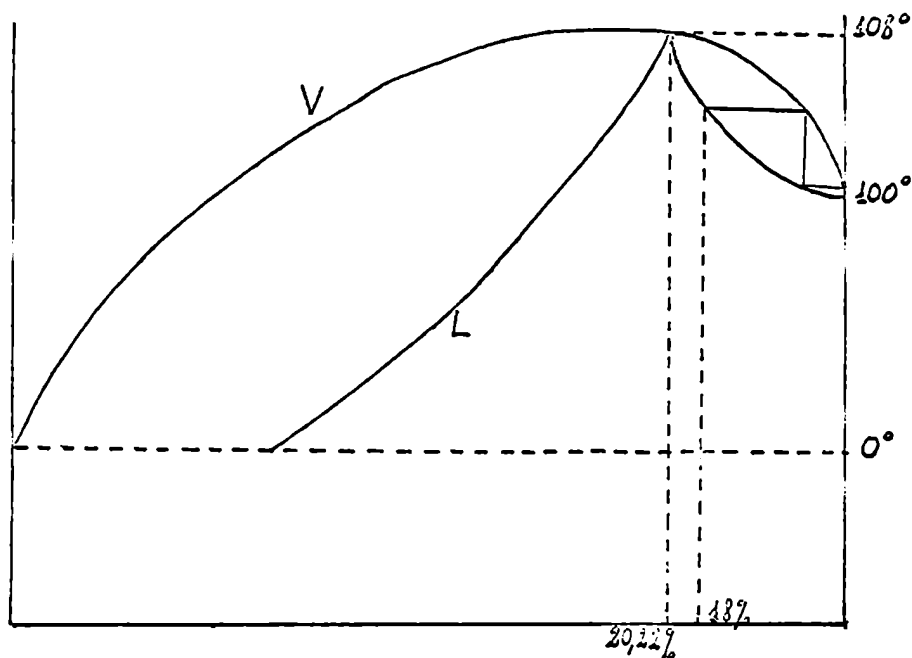
Una vez finalizada la reacción, el carbonato de bario formado se filtró, se secó y midió su radiactividad mediante su transformación en carbonato de Hyamina (ver pag 96). La radiactividad del carbonato de bario corresponde a la del C-3 de skimmianina (ver pag 49).

Las condiciones que estaban descriptas en el trabajo original para la descarboxilación del ácido skimmianico (Asahina et al, 1930), indicaban que debía realizarse por reflujo en ácido clorhídrico concentrado. Es de hacer notar que en el trabajo mencionado no se requería coleccionar el anhídrido carbónico que se desprendía, sino que sólo se procuraba obtener el deriva -

de la quinolina resultante de la reacción.

Ya ha sido mencionado que es necesario hacer pasar una corriente de N_2 para arrastrar el anhídrido carbónico formado. Si se utilizara ácido clorhídrico concentrado, la corriente gaseosa arrastraría también cloruro de hidrógeno, cuya presión de vapor correspondiente a ácido clorhídrico concentrado en su temperatura de ebullición es suficientemente grande como para que la cantidad arrastrada neutralice el hidróxido de bario, anulando su capacidad de retener anhídrido carbónico con la consiguiente pérdida del mismo.

La mezcla $ClH-H_2O$, presenta un azeótropo de p.eb. máximo ($108,6^\circ$, 760 mm) cuya concentración de ClH es de 20,22% (Lange, 1943). Se pensó por lo tanto, en utilizar para la reacción de descarboxilación, ácido clorhídrico acuoso de una concentración ligeramente inferior a la del azeótropo, de manera tal que se rectificación no produjese cloruro de hidrógeno gaseoso.



La solución de ácido clorhídrico 6 N (c = 10%) además de cumplir las condiciones antes mencionadas, produjo una fácil descarboxilación del ácido skimmianico, lográndose el resultado buscado.

Una vez finalizada la reacción de descarboxilación, la solución ácida remanente en el balón fue concentrada y enfriada, precipitando entonces un producto blanco, cuyo μ f coincidía con el descrito por Ashina et al (1930) para el producto de descarboxilación del ácido skimmianico, que según dichos autores era la 7,8-dimetoxi-2,4-dihidroxiquinolina. Sin embargo el espectro IR del producto obtenido no presentaba la absorción característica del grupo hidroxilo, apareciendo, en cambio, la correspondiente al carbonilo ($1650, 1635 \text{ cm}^{-1}$ (f)) y al NH de amida (3200 cm^{-1} (m)) (ver fig en pag 54). Estos datos indican que dicha sustancia sería más correctamente descripta como 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona (15) (ver esquema en pag 49). El espectro RMN obtenido para dicho producto en ácido trifluoroacético es el siguiente: 4,20 (3 protones, singulete, OCH_3 en C-7 ó C-8); 4,28 (3 protones, singulete, OCH_3 en C-7 ó C-8); 6,75 (1 protón, doblete, J 2' c/s, H-3); 7,51 (1 protón, doblete, J 10 c/s H-6); 8,25 (1 protón, doblete, J 10 c/s, H-5). (Price et al., 1959).

La actividad de este producto representa la correspondiente a la skimmianina menos los dos carbonos del anillo furánico y por lo tanto serviría para confirmar los resultados obtenidos individualmente para éstos.

c) REDUCCION DE SKIMMIANINA A 4,7,8-TRIMETOXI-3-ETIL-2-QUINOLONA (16)

El alcaloide (4) disuelto en ácido acético glacial fué hidrogenado en presencia de PtO_2 , a temperatura ambiente, a la presión de 1 atmósfera. El producto obtenido (16) fué identificado mediante la comparación de su pf y espectro IR (3100 cm^{-1} (m) correspondiente al grupo NH amídico, 1650 cm^{-1} (f) correspondiente al grupo carbonilo) (ver fig. en pag 53), con los de muestra auténtica inactiva, que había sido identificada previamente por RMN. Espectro RMN del producto reducido (CCl_3): 1,24 (3 protones, triplete, J 8 c/s, CH_3); 2,72 (2 protones, cuádruplete, J 8 c/s, CH_2); 3,98 (9 protones, singulete, OCH_3 , 4, 7 y 8); 6,90 (1 protón, doblete, J 9 c/s, H-6); 7,52 (1 protón, doblete, J 9 c/s, H-5); 9,30 (1 protón, singulete, H-1).

Tanto la obtención de 4,7,8-trimetoxi-3-etil-2-quinolona como su posterior oxidación por el método de Kühn-Roth, fueron realizados únicamente en el caso del alcaloide proveniente de la experiencia con formiato de sodio- ^{14}C .

d) OXIDACION DE 4,7,8-TRIMETOXI-3-ETIL-2-QUINOLONA MEDIANTE EL METODO DE KUHN ROTH

El producto anterior fué tratado con una solución de trióxido de cromo en ácido sulfúrico diluido, a la temperatura de ebullición (ver pag 119). En esas condiciones se produjeron ácido acético y ácido propiónico, que fueron arrastrados por destilación con vapor de agua. La mezcla de los ácidos acético y propiónico fué separada mediante cromatografía en columna de ácido silícico. Una vez separados, los ácidos fueron convertidos en sus correspondientes 1-naftilamidas, que fueron purificadas por sublimación y recristalización y utilizadas para las medi-

ciones de radiactividad.

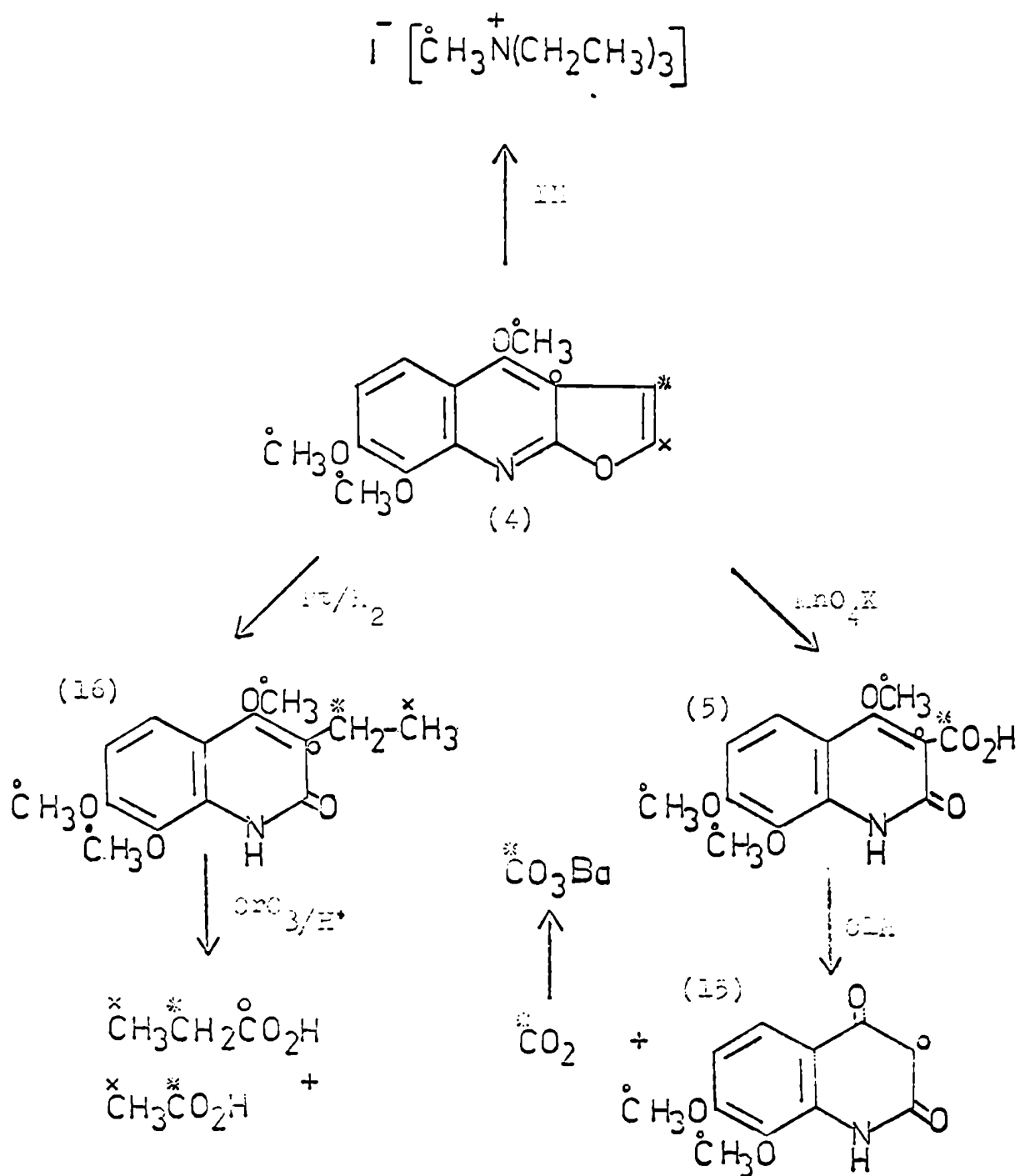
La radiactividad del ácido acético corresponde a la de los C-2 y C-3 del alcaloide y la del propiónico a la de los C-11, C-2 y C-3. (ver esquema en pag 49)

e) DEMETILACION DE SKIMMIANINA CON ACIDO YODHIDRICO

Esta degradación fué aplicada únicamente en el caso del alcaloide proveniente de la experiencia con formiato de sodio $-^{14}\text{C}$.

El alcaloide fué demetilado por tratamiento con ácido yodhídrico a reflujo. El yoduro de metilo formado fué arrastrado con una corriente de N_2 purificado que burbujeaba en la mezcla de reacción. La corriente gaseosa emergente del balón de reacción, se hizo pasar por una solución de sulfato de cadmio, cuyo objeto era captar el yoduro de hidrógeno que pudiera ser arrastrado por dicha corriente, y luego por una solución de tiosulfato de sodio, cuya misión era eliminar el yodo que pudiera haber sido arrastrado. Luego la corriente gaseosa burbujeaba por una solución de trietilamina en etanol absoluto donde el yoduro de metilo se combinaba con aquélla para dar yoduro de metil trietilamonio. Después de aislar y purificar este último producto se midió su radiactividad, que representaba el promedio de la radiactividad de los tres metoxilos presentes en la molécula de skimmianina. (Ver fig. en pag. 51).

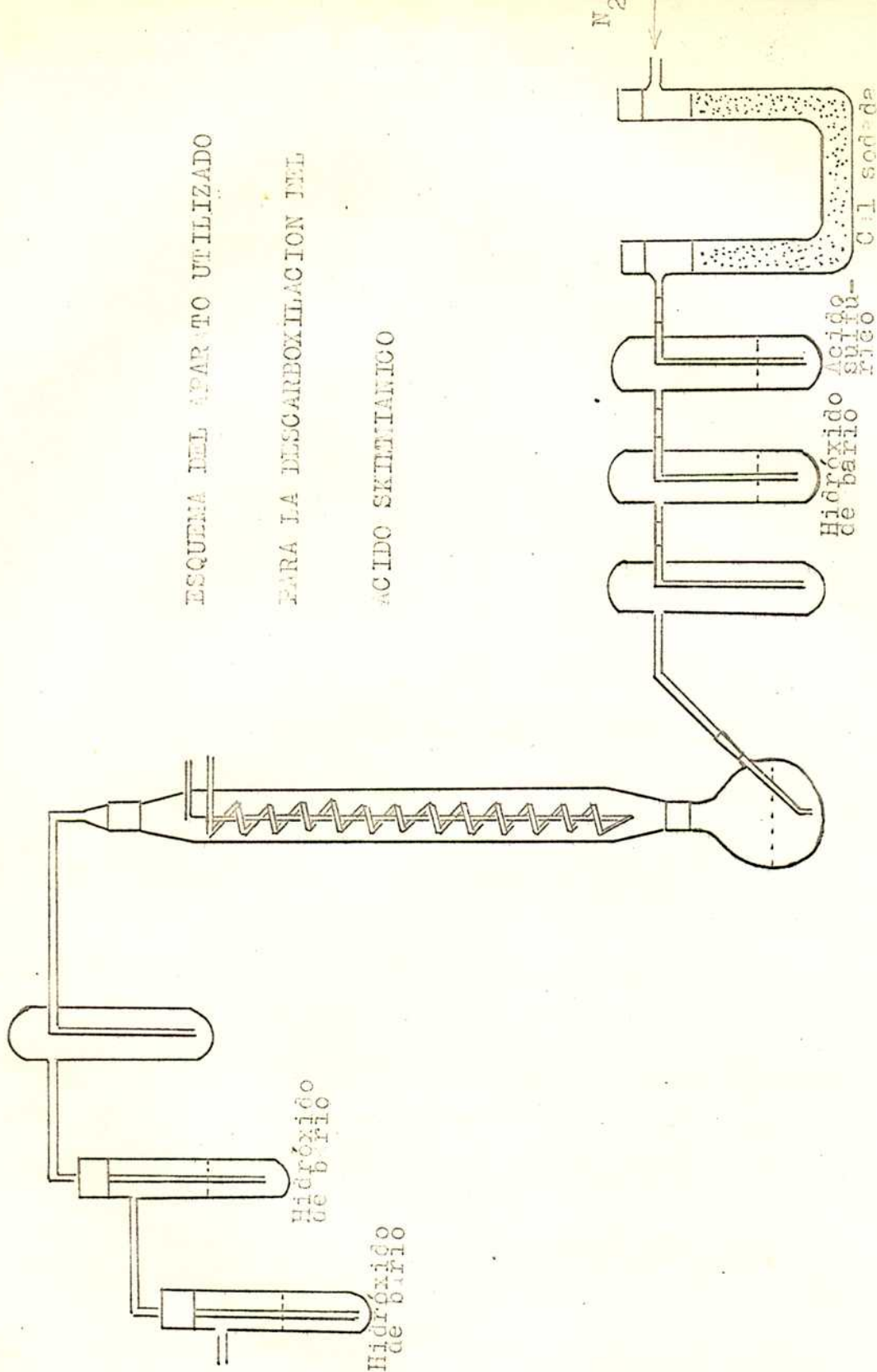
ESQUEMA DE LAS REACCIONES DE DEGRADACION
EFECTUADAS SOBRE EL ALCALOCIDE SKIMMIANINA



ESQUEMA DEL APARATO UTILIZADO

PARA LA DESCARBOXILACION DEL

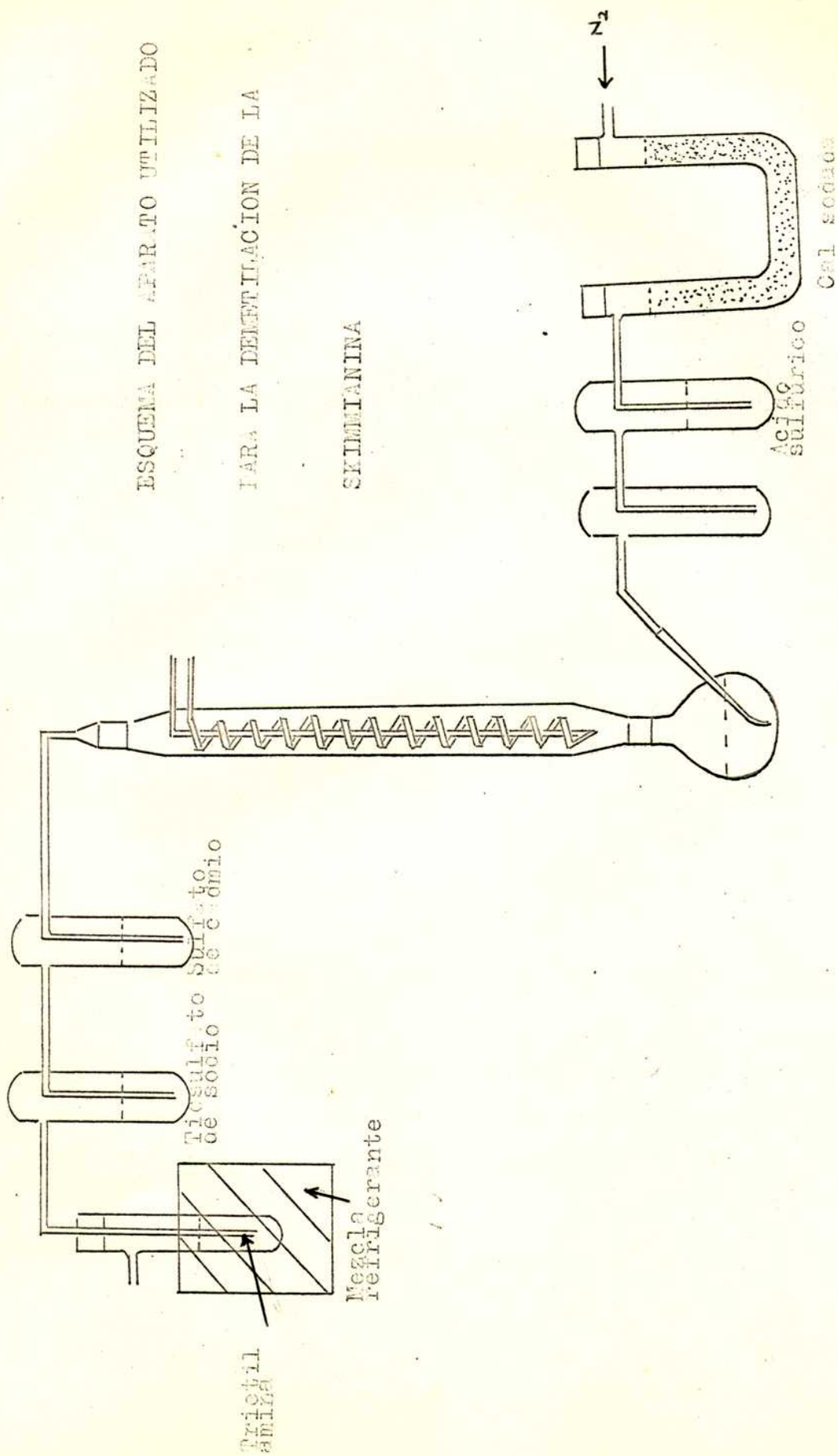
ACIDO SKETIANICO



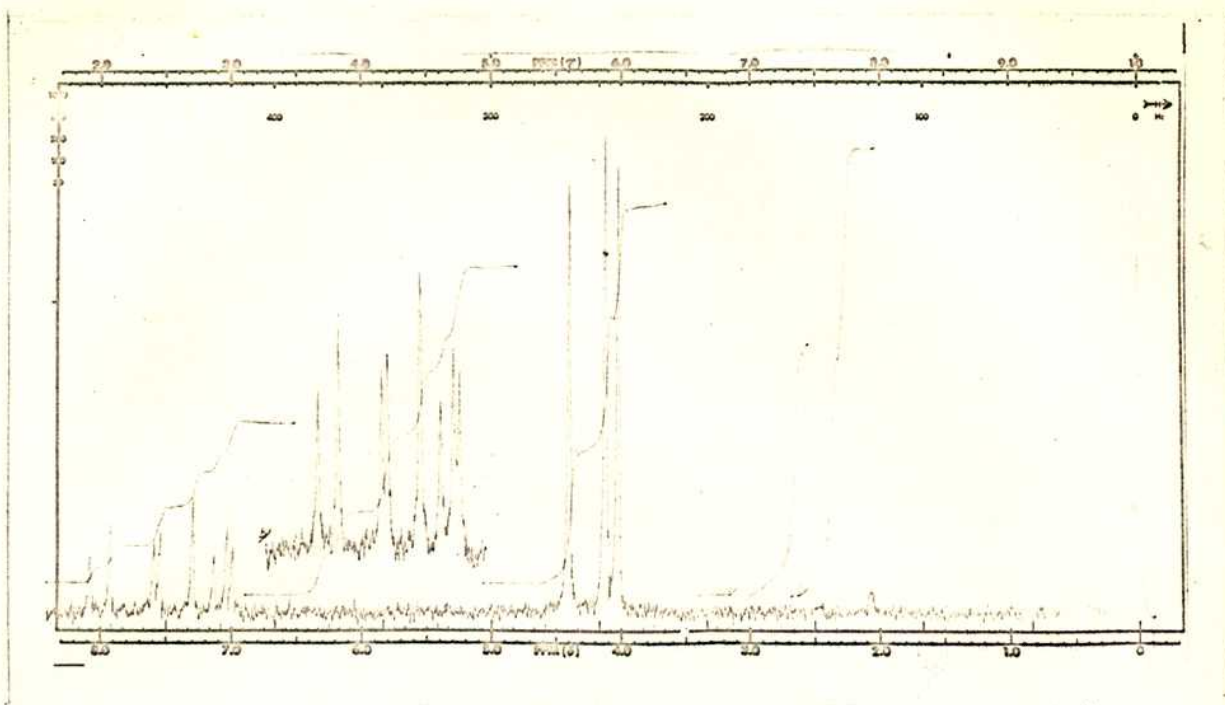
ESQUEMA DEL APARATO UTILIZADO

PARA LA DECONTAMINACION DE LA

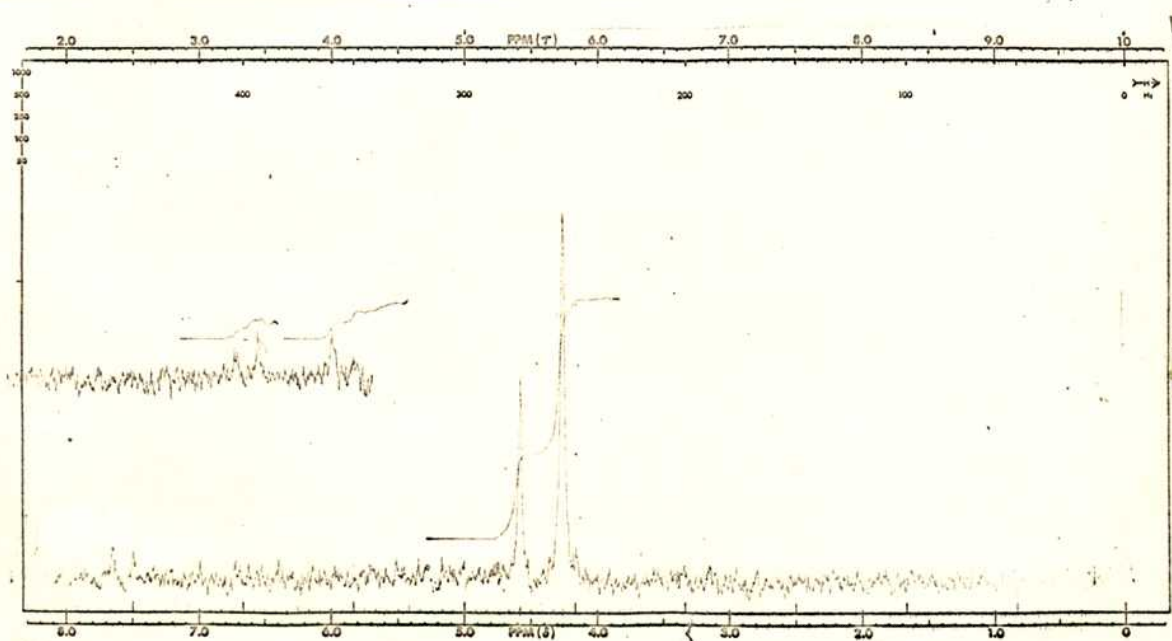
SKIMMIANINA



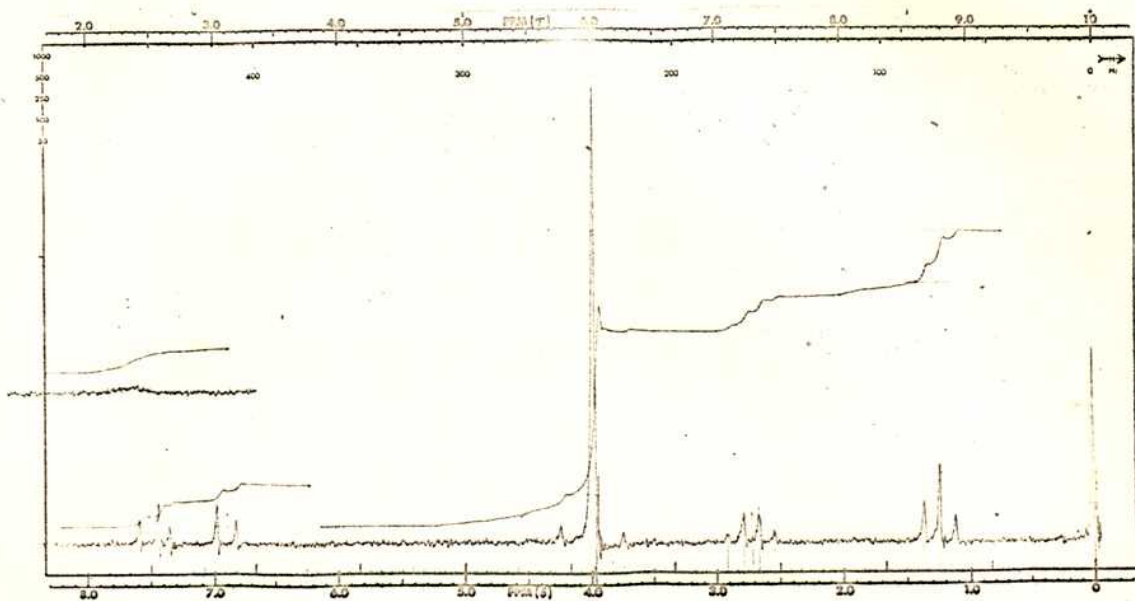
Espectro RMN de la skimmianina



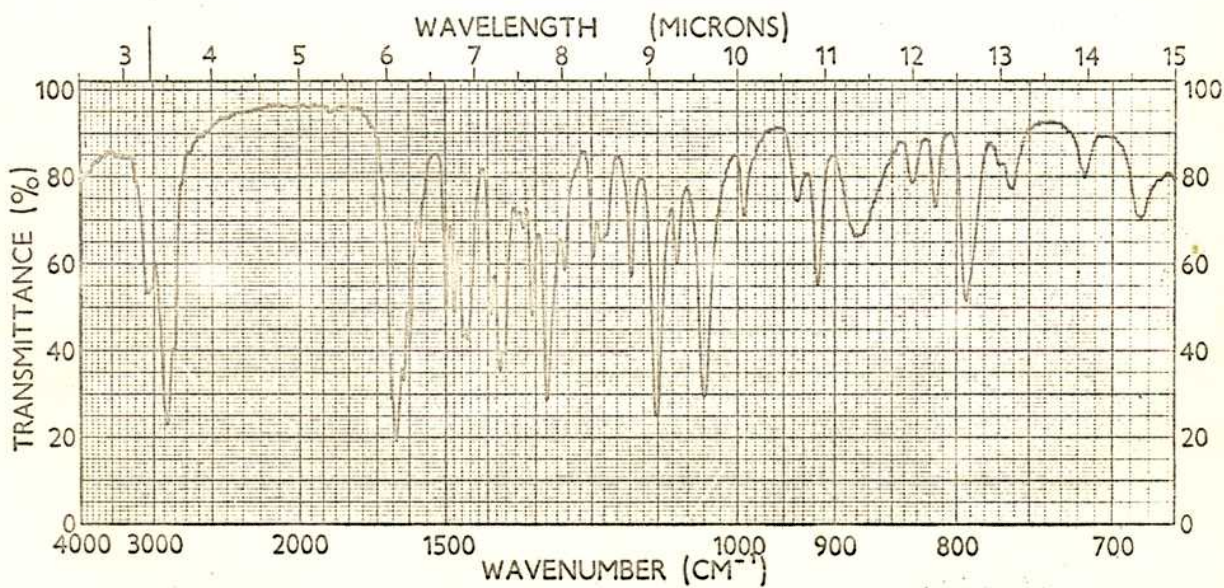
Espectro RMN del ácido skimmianico

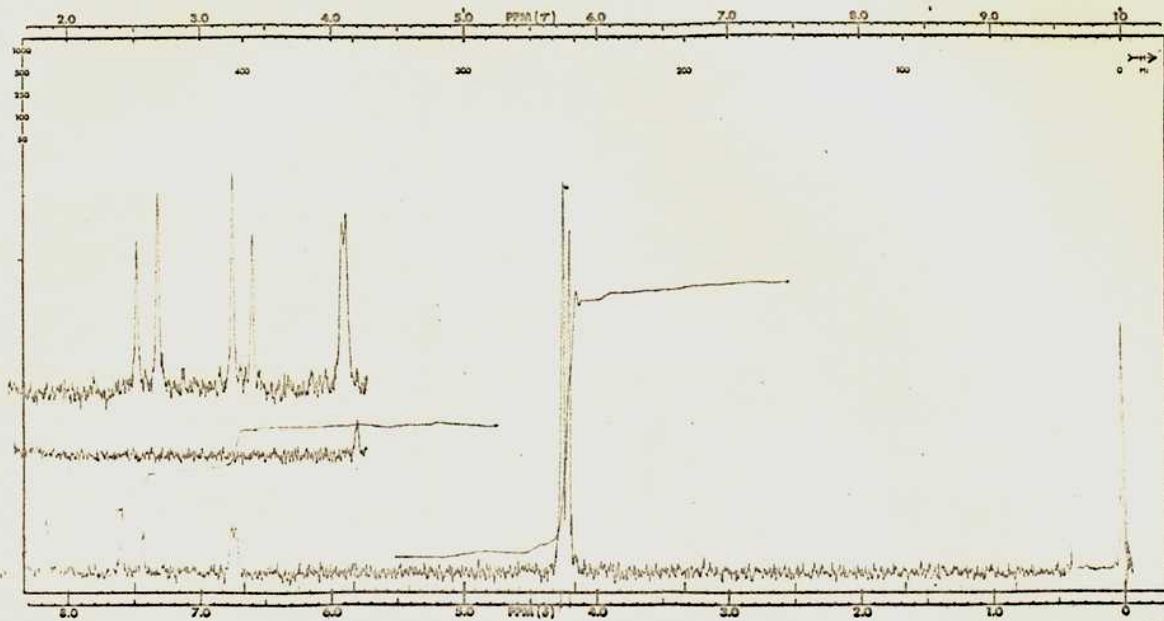
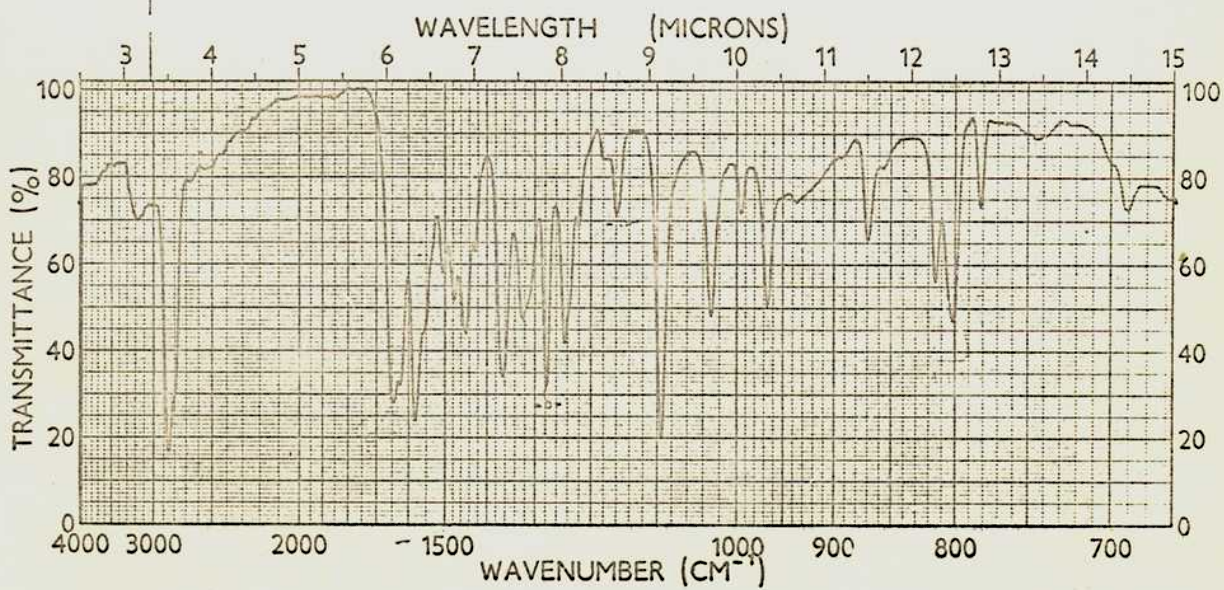


Espectro RMN de la 4,7,8-trimetoxi-3-etil-2-quinolona



Espectro IR de la 4,7,8-trimetoxi-3-etil-2-quinolona



Espectro RMN de la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindionaEspectro IR de la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona

6) SÍNTESIS DEL ALCOHOL 3,3-DIMETIL ACRÍLICO-1-¹⁴C (17) Y DEL ÁCIDO 3,3-DIMETIL ACRÍLICO-1-¹⁴C (18)

Para preparar estos productos por el camino que se tenía proyectado (ver esquema en pag 58) o sea utilizando la reacción de Wittig fué necesario disponer de bromoacetato de etilo-1-¹⁴C. Este producto fué preparado partiendo de acetato de sodio-1-¹⁴C (adquirido en la C.N.E.A.).

Por tratamiento con ácido fosfórico anhidro se liberó el ácido acético-1-¹⁴C, que fué destilado al vacío mediante un sistema que permitió recogerlo en el balón donde iban a tener lugar las sucesivas reacciones que lo transformarían en bromoacetato de etilo-1-¹⁴C. Dichas reacciones consistieron, en primer lugar, en el tratamiento con tribromuro de fósforo y bromo, para obtener el bromuro del ácido bromoacético-1-¹⁴C. Una vez formado éste se lo hizo reaccionar con etanol absoluto. El bromoacetato de etilo así obtenido fué aislado de la mezcla de reacción y purificado por destilación.

El bromoéster fué disuelto en benceno y agregado sobre una solución de trifenil fosfina en ese mismo solvente.

El bromuro de carboximetil-trifenil-fosfonio radiactivo formado precipitó y fué separado por filtración e identificado por comparación de su ρ y τ con el de una muestra auténtica inactiva. (19)

El producto anterior se disolvió en agua y esta solución enriquecida a 0° se alcalinizó por lento agregado de hidróxido de sodio acuoso, separándose un aceite, que luego de una noche a 5° cristalizó. El precipitado se filtró e identificó como

carbetoxi-metilen trifenil fosforano (20) por comparación de su μ ν con el de una muestra inactiva auténtica.

Este producto fué dividido en dos porciones iguales y cada una de ellas fué sometida a reacción con acetona en tubo cerrado , a 100°, para dar 3,3-dimetilacrilato de etilo-1-¹⁴C (21), identificado en cada caso por comparación de su espectro IR con el de muestra auténtica . El producto inactivo previamente preparado fué además identificado por su espectro RMN. Espectro RMN del 3,3-dimetilacrilato de etilo : 1,24 (2 protones, triplete, J 8 c/s, CH₃); 1,85 (3 protones, doblete, J 2 c/s, CH₃ trans); 2,11 (3 protones, doblete, J 2 c/s, CH₃ cis) ; 4,10 (2 protones, cuadruplete, J 8 c/s , CH₂) ; 5,62 (1 protón, multiplete, H-2). (Ver pag. 59).

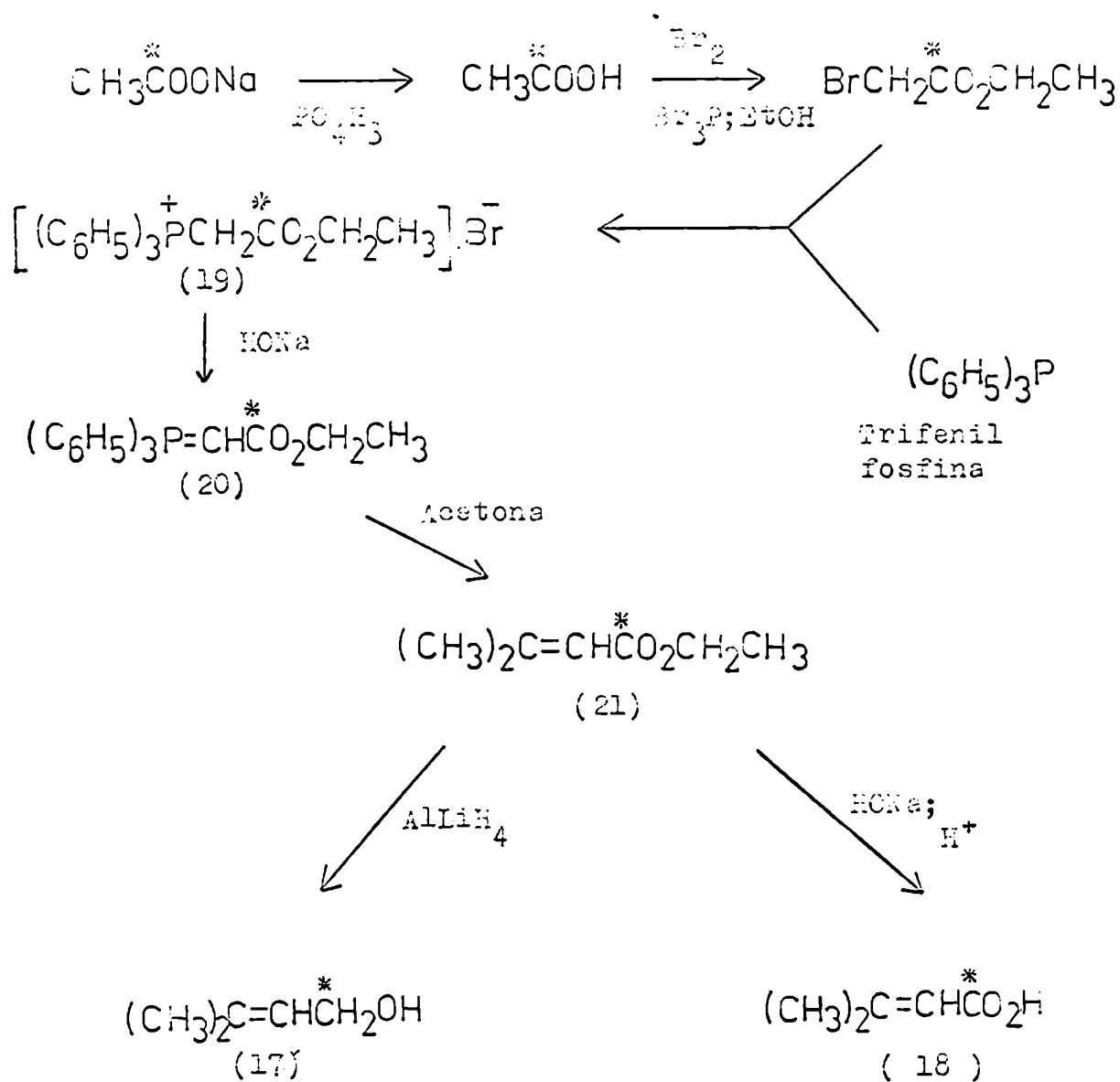
La reacción de ambas porciones del fosforano con acetona no fué realizada simultáneamente, sino inmediatamente antes de utilizar el 3,3-dimetilacrilato de etilo.

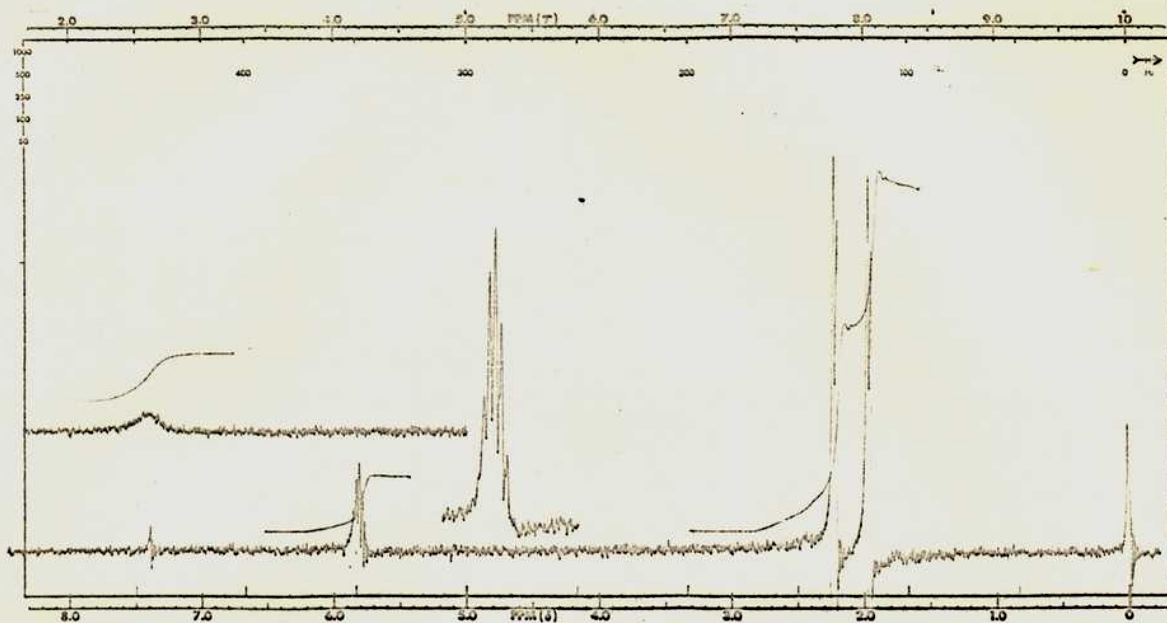
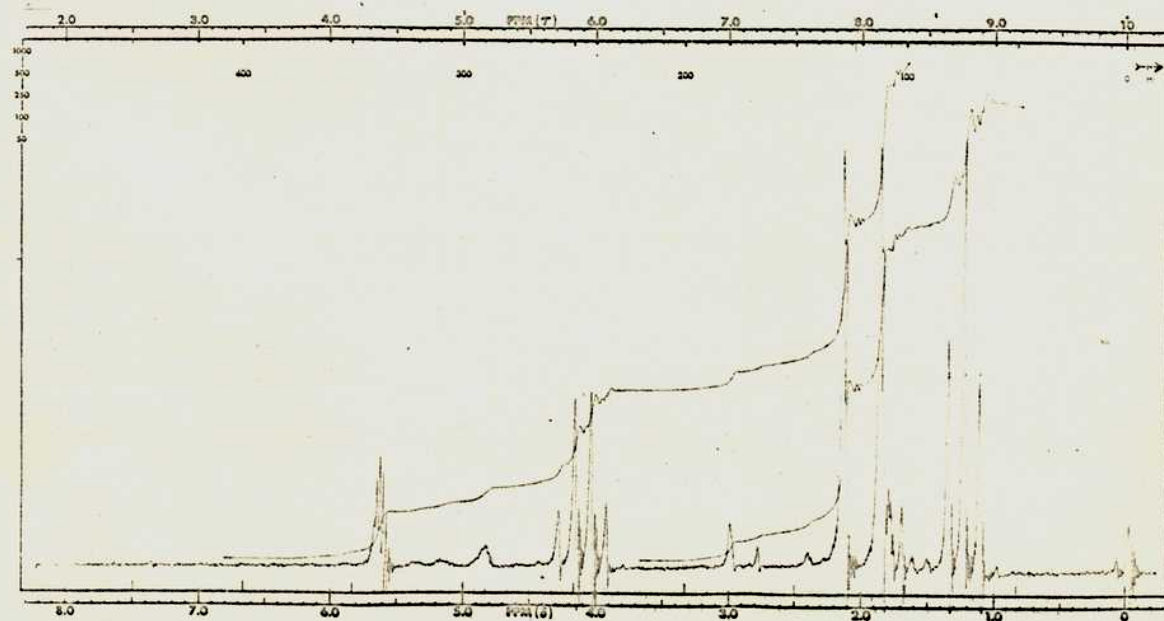
El producto de una de las reacciones fué tratado con hidruro de aluminio y litio obteniéndose alcohol 3,3-dimetil alílico-1-¹⁴C (17), identificado por comparación de su espectro IR con el de muestra auténtica inactiva a la que se había identificado por su espectro RMN. Espectro RMN del alcohol 3,3-dimetil alílico: 1,28 (3 protones, doblete, J 1 c/s, CH₃ trans) ; 1,70 (3 protones, doblete, J 1c/s , CH₃ cis); 3,00 (1 protón, singulete, OH) ; 4,20 (2 protones, doblete, J 7,5 c/s, CH₂) ; 5,5 (1 proton., multiplete, H-2). Como solvente fué utilizado Cl₃CD. (Ver pág. 60).

La otra porción del éster fué tratada con hidróxido de sodio acuoso, rindiendo la sal sódica del ácido seneciólico-1-¹⁴C

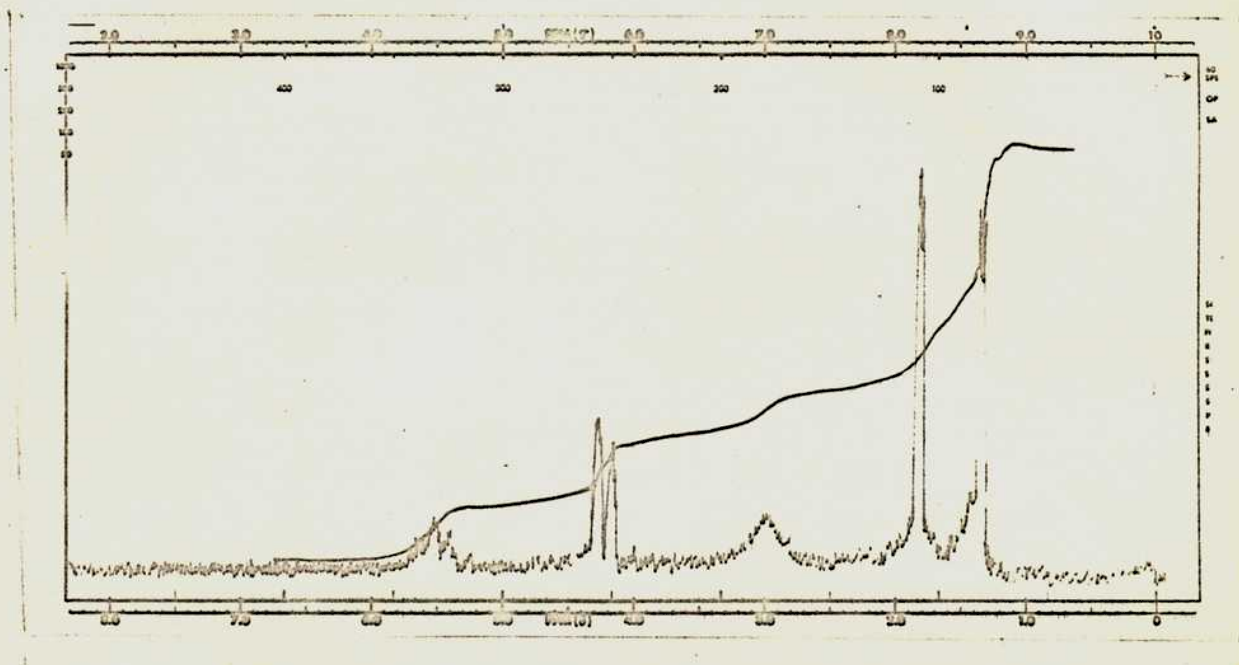
(18), en cual precipita al ser adicionada la solución. El producto fué separado por filtración, e identificado por comparación de su μ y IR con el de muestra inactiva previamente identificada por RMN. Espectro RMN de ácido 3,3-dimetilacrílico en D_2O/DCM 1,97 (tres protones, doblete, J 2 c/s, CH_2 trans); 2,26 (3 protones, doblete, J 2 c/s, CH_2 cis); 5,82 (1 protón, multiplete, H-2). (Ver pag. 59).

ESQUEMA DE LA SINTESIS DE ALCOHOL 3,3-DIMETILACRILICO-1-¹⁴C (17)
Y DE ACIDO 3,3-DIMETILACRILICO-1-¹⁴C (18)



Espectro RMN del ácido 3,3-dimetilacrílicoEspectro RMN del 3,3-dimetilacrilato de etilo

Espectro RMN del alcohol 3,3-dimetilalílico



DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

1) EXPERIENCIA CON ACETATO DE SODIO-1-¹⁴C

La skimmianina obtenida en este caso (ver pag 39) tenía una actividad específica de $9,1 \times 10^5$ dpm/μM siendo la incorporación específica correspondiente de 0,0041 %.

El ácido skimmianico obtenido por degradación de la misma (ver pag 43) tenía una actividad específica de $9,1 \times 10^5$ dpm/μM, lo que representa el 100 % de la actividad del alcaloide de partida.

La actividad del carbonato de bario proveniente de la descarboxilación del ácido skimmianico (ver pag 43) era de $4,83 \times 10^3$ dpm/μM, mientras que la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona tenía una act esp de $9,03 \times 10^5$ dpm/μM (99 % de la act esp de skimmianina).

La actividad del acetato de β-sitosterol obtenido en esta experiencia era de $7,00 \times 10^5$ dpm/μM lo que representa una incorporación específica de 0,04 %.

2) EXPERIENCIA CON FORMIATO DE SODIO-1-¹⁴C

La skimmianina aislada en este caso tenía una actividad específica de $5,93 \times 10^5$ dpm/μM siendo la incorporación específica correspondiente de $0,64 \times 10^{-3}$ %.

El ácido skimmianico obtenido por degradación de la misma (ver pag 43) tenía una actividad específica de $5,72 \times 10^5$ dpm/μM, lo que corresponde al 96 % de la actividad de skim-

mianina.

La actividad del carbonato de bario proveniente de la descarboxilación del ácido skimmianico (ver pag 43) era de $3,2 \times 10^3$ dpm/mm (0,5 % de la act esp de skimmianina), mientras que la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona tenía una act esp de $4,00 \times 10^5$ dpm/mm (67 % de la act esp de skimmianina).

Por otra parte la reducción del alcaloide dió 4,7,8-trimetoxi-3-etil-2-quinolona (ver pag 46) cuya act esp era de $5,04 \times 10^5$ dpm/mm (100 % de la correspondiente a skimmianina). La degradación de dicho compuesto por el método de Kuhn-Roth (ver pag 47) dió ácido acético ($3,9 \times 10^3$ dpm/mm, 1 % de la actividad de skimmianina) y ácido propiónico , ($6,97 \times 10^3$ dpm/mm, 1 %).

Por demetilación de skimmianina (ver pag 48) se obtuvo yoduro de trietil metil amonio, cuya actividad específica era de $1,8 \times 10^5$ dpm/mm (31 % de skimmianina).

3) EXPERIENCIA CON ACIDO MEVALONICO-4-¹⁴C

La skimmianina aislada en este caso (ver pag 39) tenía una act esp de $1,48 \times 10^3$ dpm/mm, siendo la inc esp correspondiente 0,0012 %.

El ácido skimmianico obtenido por degradación del alcaloide tenía una act esp de 20 dpm/mm , lo que representa el 2 % de la actividad de skimmianina.

La actividad del acetato de β -sitosterol obtenido en esta experiencia (ver pag 40) era de $1,11 \times 10^5$ dpm/mm lo que representa una incorporación específica de 0,09 %.

4) EXPERIENCIA CON ACIDO LEVALONICO-5-¹⁴C

La skimmianina obtenida en este caso (ver pag 39) tenía una actividad específica de $1,01 \times 10^5$ dpm/mM siendo la inc esp correspondiente de $0,38 \times 10^{-3}$ %.

El ácido skimmianico obtenido por degradación de la misma (ver pag 43) tenía una actividad específica de $0,95 \times 10^5$ dpm/mM lo que representa el 94 % de la actividad de skimmianina.

La actividad del CO_2 proveniente de la descarboxilación del ácido skimmianico (ver pag 43) era de $0,83 \times 10^5$ dpm/mM (82 % de la act esp de skimmianina) mientras que la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona (ver pag 46) tenía una act esp de $2,4 \times 10^3$ dpm/mM (2 % de la act esp de skimmianina.)

La actividad del acetato de β -sitosterol obtenido en esta experiencia era de $4,42 \times 10^6$ dpm/mM, lo que corresponde a una inc esp de 0,02 %.

5) EXPERIENCIA CON ALCOHOL 3,3-DIMETIL ALILICO-1-¹⁴C

La skimmianina obtenida en este caso (ver pag 39) tenía una act esp de $5,2 \times 10^4$ dpm/mM siendo la inc esp correspondiente de 0,017 % .

El ácido skimmianico obtenido por degradación del alcaloide tenía una act esp de $4,80 \times 10^4$ dpm/mM, lo que representa el 94 % de la act esp de skimmianina.

La actividad del carbonato de bario proveniente de la descarboxilación del ácido skimmianico (ver pag 43) era de $0,83 \times 10^5$ dpm/mM (85 % de act esp de skimmianina) , mientras que la

7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona (ver pag 46) tenía una act esp de $3,9 \times 10^3$ dpm/mM (7 % de act esp de skimmianina).

La act esp del acetato de β -sitosterol obtenido en esta experiencia era de $5,5 \times 10^5$ dpm/mM lo que corresponde a una incorporación específica de 0,18 %.

6) EXPERIENCIA CON ACIDO 3,3-DIMETIL ACRILICO-1-¹⁴C

La skimmianina obtenida en este caso (ver pag 39) tenía una act esp de $1,17 \times 10^5$ dpm/mM siendo la inc esp correspondiente de 0,039 %.

El ácido skimmianico obtenido por degradación de este alcaloide tenía una act esp de $1,16 \times 10^5$ dpm/mM representando el 99 % de la actividad de la skimmianina.

La actividad del carbonato de bario proveniente de la descarboxilación del ácido skimmianico (ver pag 43) era de $1,4 \times 10^2$ dpm/mM (0,1 % de la act esp de skimmianina) , mientras que la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona (ver pag 46) tenía una act esp de $1,12 \times 10^5$ dpm/mM (95 % de actividad de la skimmianina).

La act esp del acetato de β -sitosterol obtenido en esta experiencia era de $2,4 \times 10^5$ dpm/mM lo que corresponde a una incorporación específica de 0,06 %.

Los datos de actividades e incorporaciones específicas para el alcaloide skimmianina obtenido en las diferentes experiencias llevadas a cabo, así como los correspondientes a los

productos de degradación obtenidos en cada caso se hallan resumidos en la Tabla 1 (pag 66)

La Tabla 2 (pag 67) contiene los valores de actividad e incorporación específica del acetato de β -sitosterol obtenido en cada una de las experiencias llevadas a cabo.

Table 1

Table 2

INCUBADO	Acetato de sodio-1- ¹⁴ C		ácido mevalónico-4- ¹⁴ C		ácido mevalónico-5- ¹⁴ C		Alcohol 3,3-dimetilheptano-1- ¹⁴ C		ácido 3,3-dimetilheptano-1- ¹⁴ C	
	Actividad específica	Inc. esp. %	Actividad específica	Inc. esp. %	Actividad específica	Inc. esp. %	Actividad específica	Inc. esp. %	Actividad específica	Inc. esp. %
Acetato de β-esteroles	7,66 x 10 ⁵ dpm/mM	0,04	1,11 x 10 ⁵ dpm/mM	0,09	4,42 x 10 ⁶ dpm/mM	0,02	5,50 x 10 ⁵ ipm/mM	0,18	2,40 x 10 ⁵ ipm/mM	0,06
Incorporación específica por átomo de ¹⁴ C	-----	0,0033	-----	0,015	-----	0,0033	-----	0,03	-----	0,005

DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

EXPERIENCIA CON FORMIATO DE SODIO-¹⁴C

Ya ha sido mencionado que la skimmianina correspondiente a la experiencia realizada con formiato de sodio-¹⁴C fué sometida a una serie de reacciones degradativas que condujeron a la obtención de los ácidos acético y propiónico (ver pag 47).

La actividad presente en los carbonos 1 y 2 del ácido acético corresponde, según el esquema de degradación, a la actividad de los C-3 y C-2 de la skimmianina respectivamente (ver pag 49). El valor experimental de la actividad obtenido para el ácido acético representaba un 0,65 % de la actividad total presente en la skimmianina. (ver Tabla en pag. 66).

Por otra parte, la actividad de los carbonos 1, 2 y 3 del ácido propiónico corresponde a la presente en C-11 , C-3 y C-2 de la skimmianina (ver esquema en pag 49) respectivamente. En este caso el ácido propiónico tenía un valor de actividad que representaba el 1 % de la que poseía la skimmianina original (ver Tabla en pag 66).

También ha sido descripta la serie de degradaciones de skimmianina que conducen al aislamiento del C-3 del alcaloide como CO₃Ba (ver pag 43). En este ensayo, la actividad de dicho producto representaba el 0,5% de la actividad de la skimmianina (ver Tabla en pag 66).

Los datos obtenidos en esta experiencia permiten calcular la actividad individual de los C-11 , C-2 , y C-3 del alcaloi-

de con respecto a la actividad original del mismo:

$$C-11 \quad C-2 \quad C-3 = 1 \%$$

$$C-2 \quad C-3 = 0,65 \%$$

$$C-3 = 0,5 \%$$

Por lo tanto $C-2 = 0,15 \%$, $C-11 = 0,35 \%$. Estos valores son extremadamente bajos , y permiten establecer que el formiato no es importante como precursor de dichos carbonos. La semejanza entre ellos indica que la actividad presente en los C-2 , C-3 y C-11 de skimmianina fué incorporada a través de caminos metabólicos no específicos, que condujeron a una dispersión aleatoria de la actividad.

El valor de actividad específica del yoduro de metil-trietilamonio, proveniente de la demetilación del alcaloide (ver pag 48) representaba el 31 % de la actividad de la skimmianina. (ver Tabla en pag 66). Dado que este dato corresponde a la actividad promedio de cada uno de los tres grupos metoxilos presentes en el alcaloide, el porcentaje de la actividad original de la skimmianina que corresponde a los tres grupos metoxilos es de 93 %. quedó por lo tanto establecido mediante este dato que formiato es un excelente precursor de los O-metilos de la skimmianina.

El valor de la actividad de la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona resultante de la descarboxilación del ácido skimmianico (ver pags 43 y 66), representaba el 67 % de la actividad de la skimmianina. Si se compara la estructura de esta sustancia con la de skimmianina, se observa que en aquélla no están presentes los C-2 y C-3 y tampoco el O-metilo de la posición 4 de la skimmianina. Dado que la adición de las actividades porcentuales de C-2 y C-3 es de sólo 0,65 % el valor de actividad perdida a-

sociada con la eliminación del metilo del grupo metoxilo del C-4 será de aproximadamente 32 % de la actividad del alcaloide, o sea prácticamente igual al promedio de la actividad por centual de los metoxilos (31 %) encontrado por el método de demetilación. Este hecho permite suponer que la velocidad de metilación del hidroxilo en la posición 4 es muy similar a la velocidad correspondiente a los metoxilos en 7 y 8.

Por otra parte, si se tiene en cuenta que la actividad promedio de los grupos metoxilos es de 31 %, la actividad presente en la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona estaría distribuída de la siguiente forma: 62 % para los dos grupos metoxilos y 5 % para los restantes átomos de carbono. De éstos se sabe que a C-11 le corresponde un 0,35 % de la actividad original del alcaloide por lo que podría suponerse que cada uno de los restantes 8 átomos de carbono debe poseer un valor de actividad del mismo orden que C-11 para completar el 5 % encontrado para el núcleo de la quinolina.

Como conclusión de esta experiencia puede expresarse que formiato de sodio es un excelente precursor de los grupos metoxilos presentes en el alcaloide, que la velocidad de metilación biológica debe ser semejante para los tres metoxilos, y que en los restantes carbonos del alcaloide el formiato es incorporado probablemente en forma aleatoria.

EXPERIENCIAS CON LOS ACIDOS MEVALONICO-4-¹⁴C, MEVALONICO-5-¹⁴C, CON EL ALCOHOL 3,3-DIMETILALILICO-1-¹⁴C Y ACETATO DE SODIO-1-¹⁴C.

La degradación del alcaloide proveniente de la experiencia realizada con ácido mevalónico-5-¹⁴C permitió determinar que el 94 % de la radiactividad del alcaloide estaba localizada en el C-3 del mismo (ver Tabla en pag 66 y esquema en pag 49).

En el caso de ácido mevalónico-4-¹⁴C se verificó que el 98 % de la radiactividad estaba en el C-2 de la skimmianina (ver pag 66).

El alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C produjo marcación prácticamente exclusiva en el C-3 (94 % de la actividad del alcaloide), y su incorporación específica (0,017 %) fué considerablemente mayor que la obtenida con ácido mevalónico-4-¹⁴C (0,0012 %), como con ácido mevalónico-5-¹⁴C (0,00038 %).

Estos resultados permiten establecer sin lugar a dudas que los C-2 y C-3 de la skimmianina provienen respectivamente de los C-4 y C-5 del ácido mevalónico (10) (Colonna et al, 1970).

Dada la mayor incorporación obtenida con alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C, es también posible afirmar que éste es un precursor de skimmianina más cercano que el ácido mevalónico. En el caso de la biosíntesis de los esteroides, éste era un hecho conocido, pero respecto del alcaloide skimmianina, se trataba de una suposición basada en experiencias conocidas realizadas en el campo de los compuestos isoprenoides.

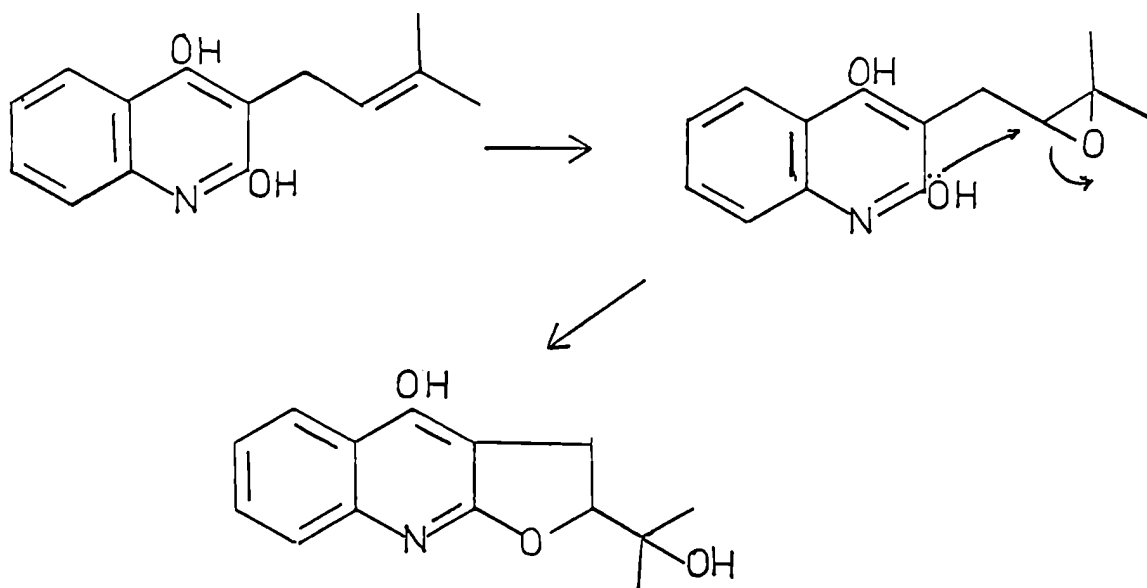
La sustitución nucleofílica sobre la posición 3 de la 2,4-dihidroxi-quinolina, por parte del dimetilalilo activado, probablemente como pirofosfato, originaría un derivado similar al que Collins et al (1969) demostraron era precursor de la sal

La presencia simultánea de derivados de isopropil dihidro furoquinolinas y furoquinolinas en la misma planta (ver pag 21) no significa necesariamente que éstas deriven de las primeras, ya que ambas pueden corresponder a dos caminos metabólicos distintos a partir de un precursor común, que podría ser el ya mencionado epóxido.

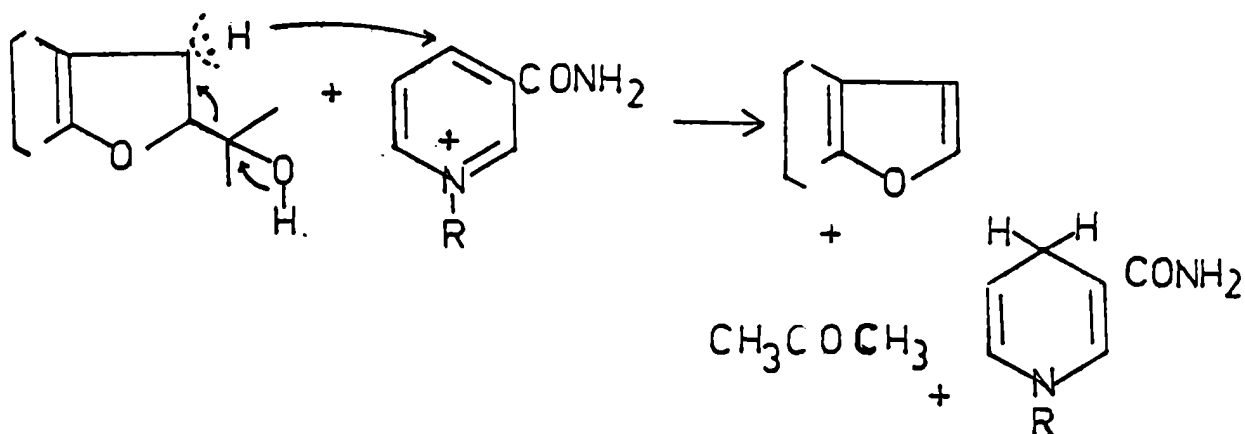
Sin embargo, si bien el ácido micofenólico podría haberse formado mediante un proceso similar al postulado por Anreja et al. (1958), (ver pag 27), es significativo el hecho de que no se hayan aislado compuestos carbonílicos del tipo del intermedio propuesto por esos autores como precursores de las furoquinolinas.

A continuación se representan esquemáticamente los distintos caminos biogénéticos mencionados que podrían conducir a la formación de las furoquinolinas:

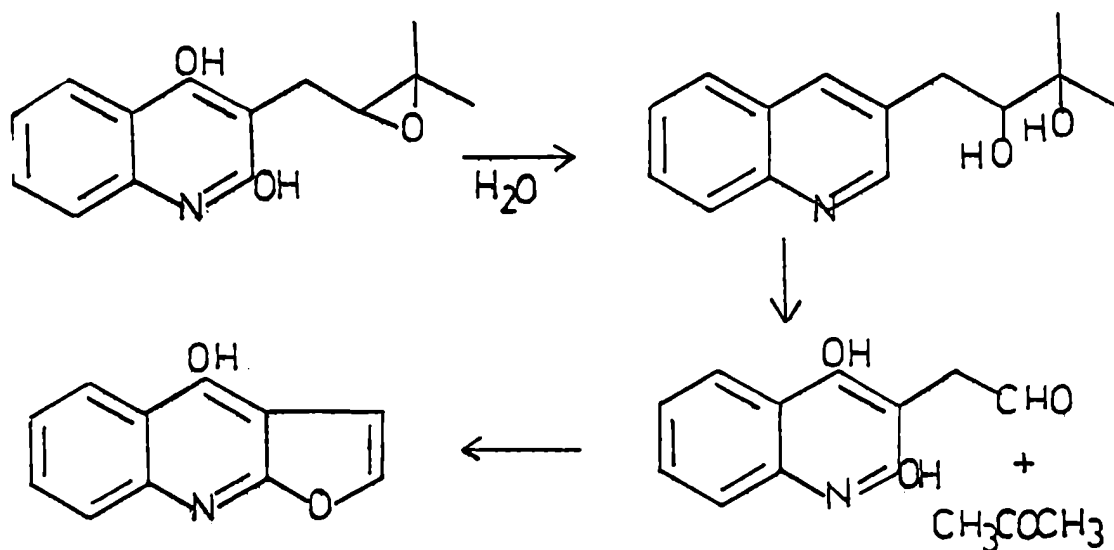
1) RUPTURA POSTERIOR A LA CICLACION



Respecto del mecanismo de ruptura, ya ha sido mencionado el propuesto por Diment, *et al.* (ver page 32). Otra posibilidad respecto del mecanismo, es propuesta ahora, y sería la cesión de un hidruro desde el C-3 que es de tipo bencílico, a un aceptor como el nicotinamin-adenin-dinucleótido (NAD) o su análogo fosforilado (NADP). Esta cesión estaría concertada con la ruptura de la unión C-C, con pérdida de acetona.

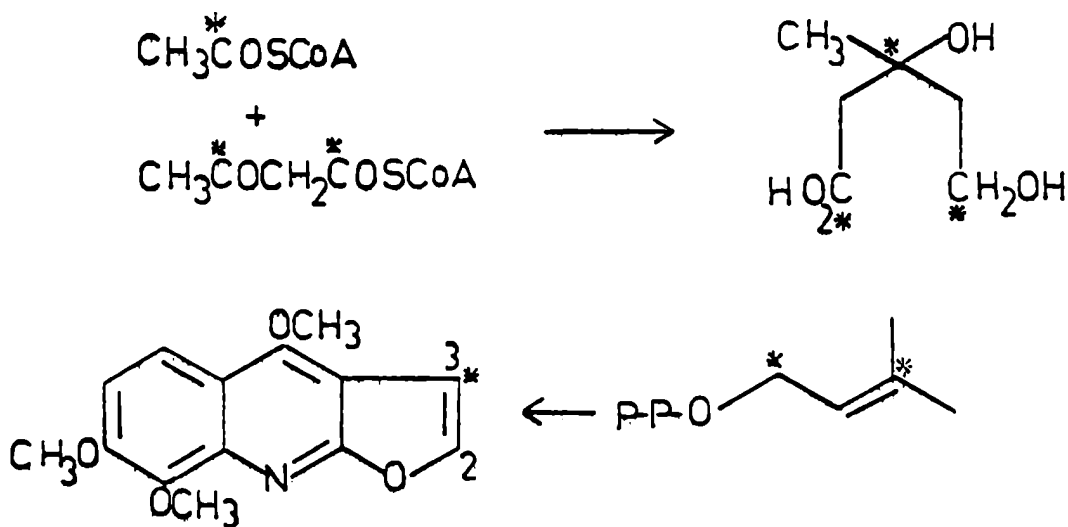


2) RUPTURA PREVIA A LA CICLACION



Los estudios realizados con trazadores radiactivos no permiten establecer si alguno de los caminos propuestos es el correcto.

De haber seguido el camino biológico establecido para el caso de isoprenoides, acetato-1- ^{14}C debería haber producido mevalonato marcado en el C-5 (además del C-1 y C-3) y éste, por lo demostrado en este trabajo, debería haber producido marcación en el C-3 de skimmianina; esquemáticamente se puede representar: (ver además pag 28)



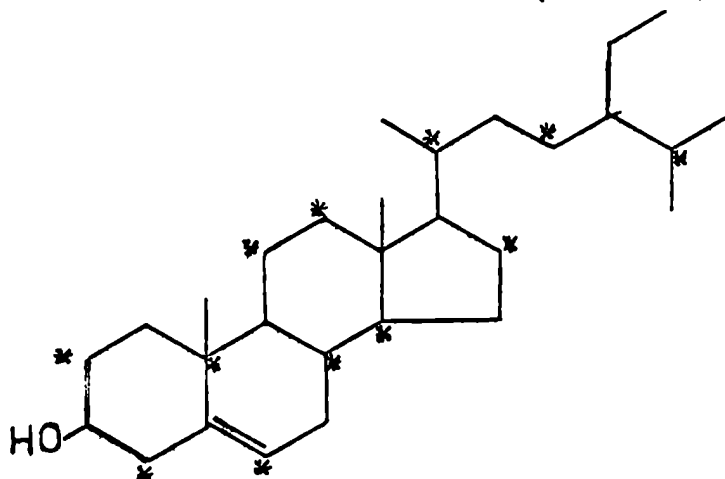
Sin embargo en el ensayo con acetato-1- ^{14}C , la marcación en el C-3 fué prácticamente nula, ya que el 99 % de la radiactividad del alcaloide estaba en el anillo quinolínico (ver Tabla en pag 66)

Monkovic' et al. (1967), han tratado de explicar la no incorporación de acetato-1- ^{14}C y-2- ^{14}C en los C-2 y C-3 de dictamnina respectivamente, argumentando que la velocidad de

biosíntesis de ácido mevalónico a partir de acetato sería relativamente menor que la velocidad de biosíntesis del anillo quinolínico a partir de acetato y ácido antranílico.

Sería por lo tanto interesante obtener información acerca de la velocidad de biosíntesis de ácido mevalónico a partir de acetato. Dicha velocidad puede estimarse en forma aproximada a partir del dato de incorporación específica de acetato en β -sitosterol.

Es un hecho conocido el que la molécula de β -sitosterol se biosintetiza a partir de seis unidades de ácido mevalónico, el cual a su vez se biosintetiza a partir de tres unidades de acetato, según está indicado en el esquema anterior. La marcación que se obtendría en el β -sitosterol formado a partir de acetato-1- ^{14}C sería la siguiente: (Clayton, 1965)



Por lo tanto para poder efectuar comparaciones entre valores de incorporaciones específicas sería necesario transformar el dato de incorporación específica total en otro valor que represente la incorporación de un solo carbono marcado, es decir que en el caso de β -sitosterol proveniente de acetato el dato

de incorporación específica deberá ser dividido por 12 para obtener el valor buscado.

Para los casos de β -sitosterol obtenido en los ensayos con ácido mevalónico o con alcohol dimetilalílico la incorporación específica deberá dividirse por 6. Estos nuevos valores aparecen en la Tabla de la pag 67 como incorporaciones específicas para un ^{14}C .

Dado que la incorporación específica corregida de acetato en β -sitosterol es 0,0033 % (ver Tabla en pag 67) y conociendo que ácido mevalónico es un intermediario obligado de dicha transformación biológica podemos suponer que la incorporación de acetato en ácido mevalónico deberá ser por lo menos de ese orden. Por otra parte, la incorporación de acetato en la porción quinolínica de skimmianina es de 0,04 % , o sea aproximadamente 12 veces mayor. De los datos tabulados, (ver pag 66) y comparando la incorporación de acetato en la porción quinolínica del alcaloide (0,04 %) con la hallada para el C-3 del mismo, (aproximadamente 0,0002 %), que tiene su origen en ácido mevalónico , resulta que en este último átomo de carbono la actividad es 200 veces menor que la hallada para la porción quinolínica y no 12 veces como sería de esperar si el ácido mevalónico se incorporara en el alcaloide a la misma velocidad con que lo hace en el esteroide.

Monković et al. habían interpretado el resultado de la experiencia con acetato radiactivo asumiendo que dicha sustancia se consumía casi totalmente para formar el anillo quinolínico (suponían que éste se biosintetizaba a mucha mayor velocidad que el ácido mevalónico), por lo que quedaba poca disponibilidad de aquél para sintetizar mevalonato.

Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que la explicación no sería la mencionada, dado que por los datos anteriores se ha podido demostrar que el ácido mevalónico se forma a partir de acetato a una velocidad tal que hace difícil justificar la no incorporación de éste en el C-3 del alcaloide según la hipótesis de Monković et al. .

En la siguiente discusión se tratará de explicar el resultado hallado con acetato. Para ello, y basándose en lo anteriormente explicado, puede asegurarse que el ácido mevalónico se biosintetiza en cantidades tales que sería factible su incorporación en la porción isoprenoide del alcaloide, pero que ésta no se produce pues el mevalonato sigue preferentemente el camino hacia los esteroides.

Si se define la relación R como el cociente entre la incorporación específica corregida para β -sitosterol y la incorporación específica para la skimmianina, o sea :

$$R = \frac{\text{Inc. esp. corregida en } \beta\text{-sitosterol}}{\text{Inc. esp. en skimmianina}}$$

puede observarse que R es igual a 10 para mevalónico-5-¹⁴C y mevalónico-4-¹⁴C y R es aproximadamente igual a 2 para el caso del alcohol dimetilalílico-1-¹⁴C.

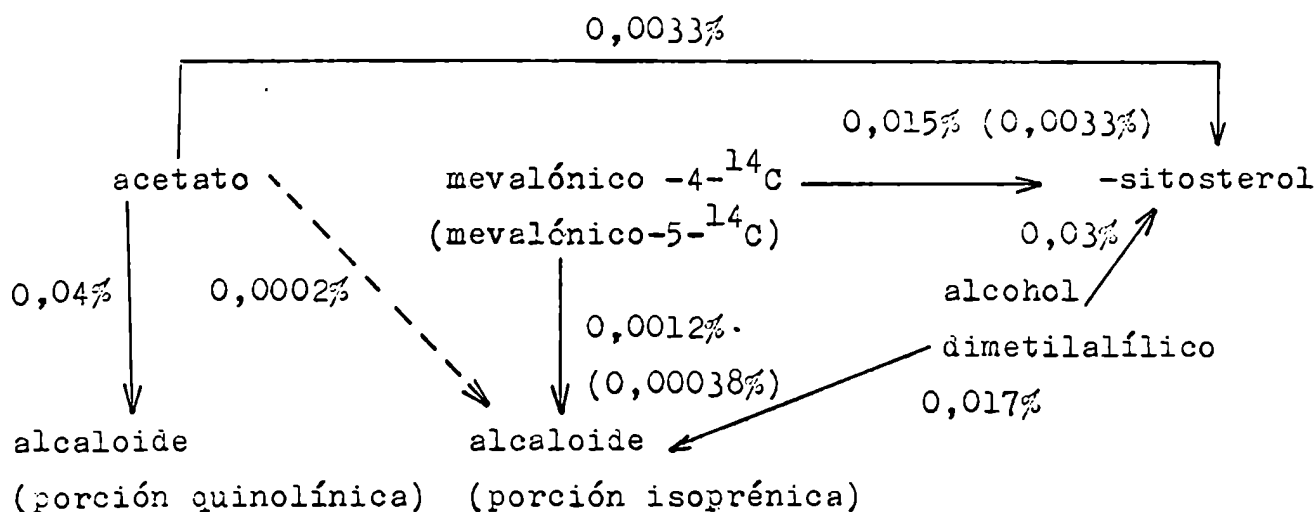
De los valores de R se deduce que todos los precursores utilizados son mejor incorporados en los esteroides que en la porción isoprenoide del alcaloide.

Es posible entonces que el ácido mevalónico radiactivo biosintetizado por la planta a partir de acetato-1-¹⁴C se consumiera tan rápidamente en la biosíntesis de esteroides, que la can-

tividad del producto disponible para la biosíntesis de la skimmianina fuera muy pequeña, haciendo que la incorporación del ácido mevalónico biosintético en el alcaloide resultara prácticamente nula. Sin embargo, cuando a la planta se le proporciona ácido mevalónico, deberá producirse una acumulación del intermediario de tal magnitud que aunque la mayor parte del producto radiactivo siga el camino hacia los esteroides, una determinada cantidad pueda incorporarse al alcaloide.

Por lo anterior, resulta claro el hecho que los valores de incorporación específica de ácido mevalónico-4-¹⁴C en β -sitosterol y skimmianina, sean mayores que los correspondientes a mevalónico-5-¹⁴C, dado que la cantidad de producto inoculado en el caso de ácido mevalónico-4-¹⁴C fué bastante mayor que la cantidad de producto marcado en 5. Puede argumentarse además que la mayor cantidad de producto presente en la planta puede haber ocasionado en el caso de mevalónico-4-¹⁴C una mayor velocidad de biosíntesis de skimmianina y β -sitosterol. Existen ejemplos en los cuales se demuestra que la cantidad inyectada de una sustancia que se supone precursora influye notablemente en la velocidad de biosíntesis de un dado producto (Monković et al, 1967). El mevalónico radiactivo sería consumido más rápidamente, con lo que la dilución del mismo con el mevalónico biosintetizado por la planta sería menor que en el caso de mevalónico-5-¹⁴C.

Los datos de incorporaciones específicas encontrados experimentalmente en los casos de ácido mevalónico-4-¹⁴C y 5-¹⁴ y alcohol dimetilalílico-1-¹⁴C pueden resumirse en el siguiente esquema: (ver además Tabla en pag 67)



El valor de R correspondiente a la experiencia de alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C no es coherente con el calculado para los ácidos mevalónico-4-¹⁴C y 5-¹⁴C. Dado que el alcohol dimetilalílico-1-¹⁴C debe transformarse en su pirofosfato para su incorporación en el esteroide y probablemente también en el alcaloide, es probable que la razón de esta aparente anomalía reside en la diferente velocidad de fosforilación en los distintos sitios de biosíntesis de ambas sustancias.

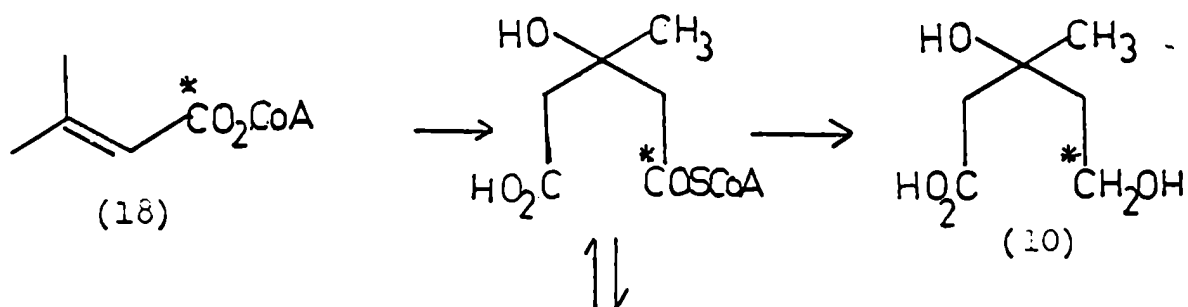
EXPERIENCIA CON ACIDO 3,3-DIMETILACRILICO-1-¹⁴C (18)

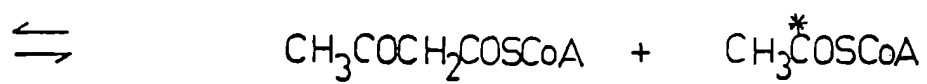
La incorporación de ácido 3,3-dimetilacrílico-1-¹⁴C en el C-3 de la skimmianina fué prácticamente nula. Sin embargo se incorporó en el anillo quinolínico del alcaloide y en el β -sitosterol con una eficiencia prácticamente igual a la de acetato-1-¹⁴C (ver Tablas en pags 66 y 67).

Birch et al (1958-A) encontraron que el ácido 3,3-dimetilacrílico-1-¹⁴C se incorporaba en micelianamida y ácido micofenólico a través de su degradación a acetato-1-¹⁴C, en experiencias realizadas con Penicillium griseofulvum y P. brevicompactum, respectivamente.

Según dichos autores, el ácido 3,3-dimetilacrílico se transformaría en ácido β -hidroxi- β -metil glutárico. Este producto se forma también a través de la condensación de acetyl CoA con acetoacetyl CoA y es un precursor de ácido mevalónico. (10)

Según Birch et al, la condensación mediante la cual se forma el ácido β -hidroxi- β -metil glutárico sería reversible y el equilibrio se alcanzaría más rápidamente que la formación de ácido mevalónico, por lo cual el ácido β -hidroxi- β -metil glutárico, produciría acetyl CoA y ácido acetyl acético, según se indica a continuación:





y el acetato seguiría el camino metabólico ya discutido.

CAPITULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión fueron determinados sobre placa calefactora con un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros infrarrojos (IR) fueron determinados con un espectrofotómetro Perkin-Elmer 137-B Infracord en emulsiones de Nujol, en el caso de sólidos o en película cuando se trataba de líquidos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se determinaron con un espectrofotómetro Varian A-60; los solventes utilizados fueron deuterocloroformo (Cl_3CD) o ácido trifluoroacético (TFA). Los resultados se expresan en δ (ppm) referidos a la señal del tetrametilsilano (TMS), que se utilizó como patrón interno. Todos los solventes utilizados en este trabajo fueron previamente purificados (Fieser, 1957).

La evaporación de los solventes se llevó a cabo a presión reducida a temperatura inferior a 50° , salvo en los casos expresamente indicados. Los extractos de solventes orgánicos fueron previamente secados sobre sulfato de magnesio anhidro.

Las cromatografías en capa delgada se llevaron a cabo con óxido de aluminio G, Merck. Las cromatografías en placas preparativas se realizaron con óxido de aluminio PF_{254} , tipo E, Merck.

El reactivo de Dragendorff se preparó de la siguiente manera: solución madre: se disolvieron 20g de yoduro de potasio en 20 ml de agua, se agregaron 40 ml de ácido acético glacial y luego 6,8 g de subnitrito de bismuto en pequeñas porciones, se filtró y diluyó con agua a 120 ml. Solución reveladora: a 40 ml de la solución madre se agregaron 360 ml de ácido acético 30 % y se llevó a 500 ml con agua.

El ácido mevalónico-5-¹⁴C fué adquirido a Swarz BioReserch Inc. N.Y.; el ácido mevalónico-4-¹⁴C y el acetato de sodio-1-¹⁴C fueron suministrados por la División Moléculas Marcadas de la Comisión Nacional de Energía Atómica; el formiato de sodio-¹⁴C fué adquirido a The Radiochemical Center, Amersham, Inglaterra.

Las mediciones de radiactividad se realizaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard, Tri-Carb, modelo 3305 semiautomático de 3 canales.

MEDICIONES DE RADIOACTIVIDAD
EL CONTADOR DE CENTELLEO LIQUIDO . SU FUNCIONAMIENTO

Es un hecho conocido el que una molécula orgánica excitada electrónicamente vuelva a su estado fundamental mediante fluorescencia , perdiendo parte de su energía de excitación en forma de luz, y el resto como energía vibracional.

Esta propiedad es aplicada a la medición de radiactividad utilizando el método del contador de centelleo líquido. La energía necesaria para la excitación de la molécula fluorescente o centelladora es provista en este caso por la radiación producida durante la degradación de un núcleo radioactivo, tal como el carbono-14 : ${}^{14}_{6}\text{C} \rightarrow {}^{14}_{7}\text{N} + \beta^{-}$

Se ha comprobado, sin embargo, que la excitación directa de la molécula de soluto centellador por la radiación β , es sólo una parte de la excitación total.

La mayor parte de la energía es transferida a la molécula de soluto centellador por moléculas de solvente, que han sido previamente excitadas por la radiación.

La energía liberada en forma de radiación durante una degradación radiactiva puede producir radicales libres, moléculas ionizadas, electrones libres y moléculas excitadas electrónicamente y por vibraciones atómicas; cualquiera de estos procesos puede conducir a la excitación del soluto o del solvente, habiéndose comprobado que la excitación electrónica es la principal responsable de la transferencia de energía.

Un mecanismo probable de transferencia de energía desde una molécula de solvente a la molécula de soluto centellador

cuando ambas se encuentran alejadas entre sí, parece ser la migración de la energía a través de las moléculas de solvente hasta llegar a una de ellas lo suficientemente cerca de la molécula de soluto centellador como para poder transferirle su energía.

Los destellos producidos por la molécula excitada de soluto centellador en su retorno al estado fundamental son captados por un sistema de dos fotomultiplicadores, que los convierten en impulsos eléctricos.

Los impulsos que salen del fotomultiplicador son amplificados electrónicamente, de manera que resulten suficientemente intensos como para ser registrados.

Las radiaciones β producidas en la degradación del carbono-14 son de baja energía, por lo que los impulsos eléctricos que producen son de muy pequeña amplitud, de manera que resulta muy difícil distinguirlos de los impulsos del ruido térmico propios de los fotomultiplicadores.

Para reducir esta interferencia se dispone en general de dos recursos. Uno de ellos consiste en refrigerar todo el equipo detector de manera que la cámara con los fototubos esté a una temperatura intermedia entre 0 y 5°. El segundo recurso consiste en conectar los dos fotomultiplicadores al sistema registrador a través de un circuito de coincidencia, que acepta únicamente los impulsos provenientes de ambos fototubos simultáneamente, y dado que los impulsos de ruido térmico son fortuitos es muy difícil que se produzcan simultáneamente en ambos fotomultiplicadores, por lo que no son registrados. (C. Bell et al, 1958). Los modernos equipos para medir radiactividad por el método del centelleo líquido están equipados con circuitos en coincidencia

y la cámara de detección se halla refrigerada.

CARACTERISTICAS DE SOLUTOS CENTELLADORES Y SOLVENTES

La misión del soluto centellador es emitir una cierta cantidad de fotones por cada degradación radiactiva que descarga energía sobre la solución. El solvente debe absorber dicha energía y transferirla al soluto fluorescente.

Un soluto centellador debe cumplir los siguientes requisitos: 1) ser accesible en el comercio y no muy costoso; 2) debe ser un eficiente emisor de luz; 3) debe producir un espectro de fotones que en un detector convencional sea eficientemente transformado en energía eléctrica por el fotomultiplicador, y transmitido y reflejado por el sistema óptico; 4) debe ser compatible con las restricciones de solubilidad impuestas por la composición de la solución centelladora y las condiciones de temperatura.

Los mejores emisores de luz tienen longitud de onda demasiado corta para satisfacer el criterio 3, por lo que es usual la utilización de una combinación de dos solutos, uno primario para asegurar un número apreciable de fotones emitidos y uno secundario que absorbe dicha radiación y emite a su vez luz de longitud de onda más adecuada a la sensibilidad del fotomultiplicador.

En el presente trabajo se utilizó como soluto primario 2,5-difeniloxazol (PPO) y como soluto secundario 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno (dimetil POPOP).

En cuanto al solvente de centelleo líquido, no sólo debe tener buenas características de transferencia de energía, sino que debe tener un bajo coeficiente de absorción respecto de la

luz que emite el soluto centellador.

Los solventes que mejor cumplen estos requisitos son los del tipo alquilbenceno, como el tolueno (Newton Hayes, 1963).

Hay solventes que no transfieren eficientemente su energía de excitación, como el dioxano. Esto se debe a que las moléculas de solvente excitadas tienen, en este caso, una vida media muy corta, por lo que la probabilidad de transferencia de energía es pequeña para las concentraciones usuales de soluto centellador.

Es posible adicionar a soluciones de dichos solventes una sustancia en tales concentraciones que pueda extraer energía de excitación de las moléculas de solvente activadas. Esto requiere que dicha sustancia tenga una alta solubilidad en el solvente empleado, y que su estado excitado tenga una vida media suficientemente larga como para transferir su energía de excitación al soluto fluorescente.

El naftaleno, que no puede ser utilizado como solvente en las condiciones de trabajo, es una sustancia que reúne las mencionadas cualidades, por lo que se lo adiciona a las soluciones de soluto centellador en dioxano (C. Bell, 1958).

CARACTERISTICAS DEL RECIPIENTE

El vidrio del recipiente que se utiliza para introducir la muestra en la cámara de contaje debe contener una baja proporción de ^{40}K , ya que este isótopo radioactivo, abundante en el vidrio común, contribuye apreciablemente a la radiación de fondo.

Se ha intentado utilizar viales de polietileno que además de no poseer radiactividad natural tienen la ventaja adicional de ser más transparentes que el vidrio a las radiaciones a las cuales el fotomultiplicador es más sensible.

Sin embargo, no pueden ser utilizados cuando la muestra radiactiva debe ser conservada después de la medición, ya que el polietileno es permeable a los solventes orgánicos, en particular al tolueno, de gran uso en este tipo de mediciones de radiactividad, en cuyo caso el recipiente puede perder hasta 100 mg de solvente diarios (Rapkin et al, 1965)

EFICIENCIA DE LAS MEDICIONES DE RADIATIVIDAD

Se define como eficiencia de una determinación de radioactividad a el porcentaje de descomposiciones nucleares producidas que son detectadas y registradas.

Algunas de las radiaciones producidas no llegan a ser detectadas, debido a fenómenos de autoextinción o "quenching".

Existen fundamentalmente dos mecanismos de autoextinción. Uno de ellos, denominado autoextinción química, consiste en la transferencia de la energía de una molécula excitada a la molécula interferente, que la elimina mediante procesos sin emisión luminosa (Bell, 1958).

El segundo mecanismo, llamado autoextinción de color , consiste en la absorción por el solvente de la luz emitida por el centellador, siendo posible también la absorción por el mismo centellador, o por la sustancia radiactiva.

CORRECCION DE LA AUTOABSORCION

Existen varios métodos para conocer el número real de desintegraciones de la muestra radiactiva a pesar de que , debido

al proceso de autoextinción, el número de desintegraciones registradas sea menor que el realmente producido.

Los métodos más importantes son: el del standard interno, el del standard externo y el de la relación de canales. Este último es el más práctico y accesible y es el que fue usado en el presente trabajo.

Para poder aplicarlo es necesario disponer de un equipo que posea, por lo menos, dos canales de registro; uno de ellos (llamado canal de contaje) se acondiciona de tal manera que cubra casi totalmente el espectro de impulsos mientras que el segundo, (llamado canal de monitoreo), tiene el mismo límite inferior que el primer canal, pero su límite superior puede ser cambiado según convenga.

El efecto de la autoextinción es desplazar y comprimir el espectro hacia alturas de pulso más bajas, de manera que la relación de cuentas entre los dos canales, para una muestra dada, puede variar conforme a diferentes grados de interferencia.

El método se aplica de la siguiente manera: Se construye una curva graficando la eficiencia de contaje en función de la relación de cuentas entre los dos canales. Esto se hace contando varias muestras conteniendo la misma cantidad conocida de radioactividad, habiéndose agregado en cada una de ellas cantidades diferentes de una sustancia productora de autoextinción.

Cuando se efectúa una medición con una sustancia desconocida, se cuenta en los dos canales elegidos, y calculando su relación puede conocerse la eficiencia por referencia a la curva previamente confeccionada. (Herberg, 1965).

Curvas de eficiencia como la descripta deben prepararse para cada mezcla centelladora utilizada.

CALIBRACION DEL CONTADOR DE CENTELLEO LIQUIDO

Debido a las diferentes características de solubilidad de las sustancias con las que se trabajó, se hicieron mediciones de radiactividad utilizando como solventes tolueno o dioxano, por lo que fué necesario preparar curvas de calibración para ambos sistemas.

En los dos casos los voltajes utilizados fueron:

Canal 1: 50-1000 voltios

Canal 2: 50-100 voltios

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES CENTELLADORAS

a) Solución centelladora de dioxano

Se disolvieron 7 g. de PPO , 0,3 g. de dimetil POPOP y 100g de naftaleno en 1 lt de dioxano. La solución se almacena en lugar fresco a resguardo de la luz. No puede guardarse en heladera porque el solvente solidifica.

b) Solución centelladora de tolueno

Se disolvieron 5 g de PPO y 0,3 g de dimetil POPOP en 1 lt de tolueno. La solución se guardó en heladera a resguardo de la luz.

CURVAS DE EFICIENCIA

a) Correspondiente a la solución centelladora de dioxano

Se realizó siguiendo el procedimiento general ya des-

cripto (ver pag 89). Como sustancia radiactiva patrón se utilizó tolueno- ^{14}C (actividad específica: $4,37 \times 10^5$ dpm/ml) y como sustancia interferente se usó acetona. El tiempo de conteo fué de cinco minutos. El volumen total en cada vial fué de 10 ml , resultante del agregado de 0,5 ml de agua, 0,1 ml de tolueno- ^{14}C más cantidades variables de solución de dioxano y acetona según se detalla a continuación:

Frasco N°	Solución centelladora ml.	Acetona ml.
1	9,5	-
2	9,3	0,2
3	9,0	0,5
4	8,6	0,9
5	8,0	1,5
6	7,6	1,9

Las medidas de actividad obtenida fueron las siguientes:

Frasco N°	Actividad teórica dpm	Canal 1 cpm	Canal 2 cpm	E %	R
1	43.700	34.668	6.833	79,3	0,197
2	43.700	32.332	8.497	73,9	0,263
3	43.700	28.531	10.572	65,2	0,370
4	43.700	25.252	11.934	57,7	0,472
5	43.700	21.116	12.420	48,3	0,588
6	43.700	18.722	12.172	42,8	0,650

Se define R de la siguiente manera:

$$R = \frac{\text{N}^\circ \text{ de cpm en el Canal 2}}{\text{N}^\circ \text{ de cpm en el Canal 1}}$$

De acuerdo con la definición de eficiencia dada, ésta se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$E = \frac{\text{N}^\circ \text{ de cpm en el Canal 1} \times 100}{\text{Actividad teórica}}$$

La curva standard se obtiene graficando E versus R.

b) Correspondiente a la solución centelladora de tolueno

Frasco Nº	Solución centelladora ml	Acetona ml
1	10	-
2	9,8	0,2
3	9,5	0,5
4	9,1	0,9
5	8,5	1,5
6	8,1	1,9

Los valores obtenidos fueron los siguientes: (T = 5 min)

Frasco Nº	Actividad teórica dpm	Canal 1 cpm	Canal 2 cpm	E %	R
1	43.700	37.245	4.140	85,2	0,11
2	43.700	32.281	8.162	73,8	0,25

3	43.700	29.704	9.880	67,2	0,33
4	43.700	27.265	10.810	62,3	0,39
5	43.700	25.536	11.696	58,4	0,46
6	43.700	23.011	11.887	52,6	0,52

CALCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA MILIMOLAR DE UNA SUSTANCIA

Se define como actividad específica milimolar de una sustancia al número de descomposiciones por minuto que tienen lugar en un milimol de la misma, y se representa en este caso por A_m .

Si se define como actividad específica A_e al número de descomposiciones por minuto, por miligramo de sustancia, se puede calcular A_m en función de A_e , mediante la fórmula:

$$A_m \text{ (dpm/mM)} = A_e \text{ (dpm/mg)} \times M \text{ (mg/mM)}$$

donde M es el peso molecular de la sustancia expresado en miligramos.

Para calcular A_e se procede de la siguiente manera: Se determina la actividad de la muestra en los canales 1 y 2 durante un tiempo T . El tiempo T debe ser suficientemente grande como para que el número de cuentas en el canal 1 (C), sea superior a 10.000. Esto es debido a que cuando C es de ese orden el error estadístico es inferior a 1 %.

Después de medir la radioactividad de la muestra es necesario medir la radiación de fondo F , en el canal 1. Para ello se introduce en la cámara de contaje un recipiente con solución centelladora pero sin sustancia radiactiva. El tiempo de contaje es en este caso igual a T .

radiactivo aislado no es suficiente para efectuar sobre él las reacciones necesarias para estudiar la distribución de la radioactividad.

En ese caso puede usarse el método de dilución, que consiste en agregar al producto radiactivo cierta cantidad del mismo producto inactivo, cuidando que la actividad de la mezcla resultante sea lo suficientemente alta como para efectuar mediciones dentro del error aceptado.

Siendo M_a el peso de producto activo, A_a su actividad específica molar, y M_i el peso de producto inactivo adicionado, se puede calcular la actividad específica molar A_d del producto diluido mediante la siguiente fórmula:

$$A_d = \frac{A_a \times M_a}{M_a + M_i}$$

METODO UTILIZADO PARA LA MEDICION DE RADIOACTIVIDAD DEL CARBONATO DE BARIO

Dado que el CO_3Ba es insoluble en los solventes utilizados para las determinaciones de radioactividad por el método del centelleo líquido, es necesario transformarlo en un producto soluble en las soluciones centelladoras habituales.

Para realizar esta medición se utiliza la propiedad del hidróxido de p-di-isobutil-cresoxietil-dimetilbencilamonio, de reaccionar con el CO_2 para dar un carbonato soluble en tolueno. (Ver pag. 96) (Rapkin, 1962).

Es posible obtener en el comercio una solución 1 molar de este compuesto en metanol, con el nombre de hidróxido de Hyamina 10-X (Rohm and Haas, Filadelfia, U.S.A.).

La transformación del carbonato de bario en carbonato de Hyamina se realizó de la siguiente manera:

El carbonato de bario (pueden ser 5-10 mg) se pesó en un pequeño recipiente que se coloca en la rama mayor del tubo A (ver esquema, en pag. 99)

En la rama menor del tubo A se colocan 1 ml de ácido sulfúrico concentrado mediante una pipeta con la punta curvada.

Seguidamente se adapta el tubo A al resto del aparato con las uniones perfectamente siliconadas.

En el balón B se coloca 0,1 ml de hidróxido de Hyamina 10-X y se agregan 0,5 ml de tolueno. Con las llaves C, D y E abiertas se coloca el aparato a la línea de alto vacío (10^{-2} Torr).

Cuando el tolueno comienza aburbujear, la llave E se cierra, y el balón B se sumerge en nitrógeno líquido, contenido en un termo.

Cuando el contenido de B está congelado se abre la llave E y se continúa la evacuación por aproximadamente 20 minutos, al cabo de los cuales todas las llaves se cierran y se desconecta el sistema de la línea de vacío.

El tubo A es rotado lentamente, de manera que el ácido sulfúrico pase a la rama mayor y reaccione con el CO_3Ba ; se agita cuidadosamente para que toda la sustancia entre en contacto con el ácido.

Manteniendo el recipiente B sumergido en el N_2 líquido, se abren las llaves C y E y el CO_2 liberado en el tubo A se condensa en B.

Después de 1 h , la llave E se cierra y se retira el

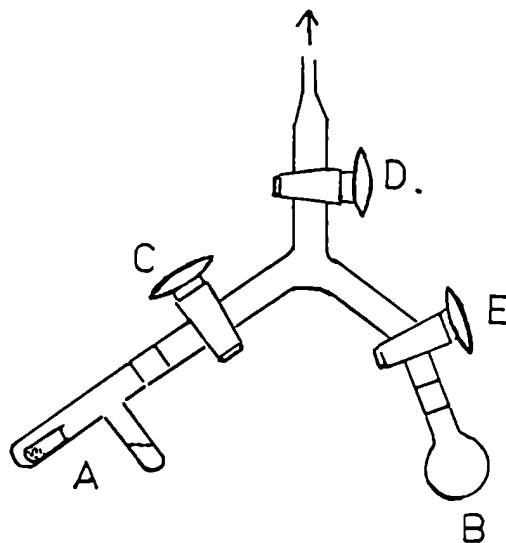
recipiente del N_2 líquido. El balón B se agita suavemente durante 30 min para asegurar la total absorción del CO_2 por el hidróxido de Hyamina.

Luego, todas las llaves se abren y el contenido del recipiente B se transvasa a un vial de medición, lavando con 2 ó 3 porciones de solución centelladora de tolueno, usándose en total 10 ml.

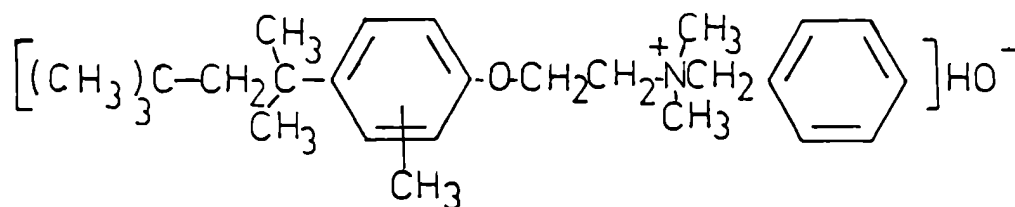
De esta manera el CO_3Ba se ha transformado en un carbonato soluble en tolueno.

Si se realizan mediciones con cantidades mayores de CO_3Ba deben utilizarse 0,1 ml de hidróxido de Hyamina por cada 10 mg de CO_3Ba adicionales.

ESQUEMA DEL APARATO UTILIZADO PARA LA CONVERSION
DEL CARBONATO DE BARIO EN CARBONATO DE HYAMINA



HIDROXIDO DE HYAMINA



METODO DE ADMINISTRACION DE LOS PRODUCTOS RADIATIVOS

La administración de las sustancias radiactivas se realizó sobre ejemplares jóvenes e intactos de Fagara coco, que crecían en la localidad de La Calera (pcia de Córdoba). Las plantas fueron inoculadas "in situ". Se inyectaron a sendos ejemplares, acetato de sodio- $1-^{14}\text{C}$, formiato de sodio- ^{14}C , ácido mevalónico- $4-^{14}\text{C}$, ácido mevalónico- $5-^{14}\text{C}$, alcohol 3,3-dimetil alílico- $1-^{14}\text{C}$, y ácido 3,3-dimetil acrílico- $1-^{14}\text{C}$. Las dos primeras sustancias mencionadas fueron inoculadas en diciembre de 1968 y las tres últimas en diciembre de 1969.

En la primera experiencia, se utilizó el siguiente método (Comar, 1955): Mediante una aguja fina se pasó un hilo de algodón, de regular grosor, a través del tallo de la planta y luego ambos extremos del hilo se introdujeron en un frasco de 5 ml de capacidad, de cuello ancho (ver figura en pag 42), donde se añadió la solución acuosa de la sustancia radiactiva. Esta solución pasó a la planta por acción capilar, empleando unas 20 h en absorberse totalmente. Cuando el recipiente estuvo seco se agregaron 2 ó 3 ml de agua destilada, repitiéndose esta operación otras dos veces para asegurar que todo el compuesto radiactivo fuese absorbido por la planta.

En la segunda experiencia se introdujeron algunas modificaciones. Se utilizó en esa oportunidad un dispositivo resultante de soldar un tubo de vidrio de 2 mm de diámetro x 70 mm de largo al fondo de un tubo de ensayos de 10 mm de diámetro x 70 mm de largo (ver esquema en la pag 42).

Para realizar la administración se perforó en el tallo, con un taladro, un orificio de aproximadamente 10 mm de profun-

didad y se introdujo en el mismo el vástago del dispositivo descrito. Para evitar pérdidas se selló con vaselina la zona externa de contacto entre el vidrio y la corteza del tallo. Se agregó la solución por la parte superior del tubo, tapándose luego la boca del mismo con papel de aluminio. La absorción se completó en unas 12 h , efectuándose luego 3 lavados con agua destilada.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE SKIMMIANINA . METODO GENERAL

Una vez cosechadas, las plantas inoculadas fueron transportadas a nuestros laboratorios, donde se procedió a su secado en estufa a 45°, con circulación de aire, durante 72 h, y posteriormente a su molienda.

El material así obtenido (500 g) fue humedecido con aproximadamente 100 ml de CO_3Na_2 10 % y extraído en un extractor tipo Schxlet con éter de petróleo durante 96 h (Asahina et al, 1930 , A).

La solución etérea se concentró hasta 200 ml y se extrajo con ClH 6 N (3 x 100 ml). Los extractos clorofórmicos unidos fueron evaporados a presión reducida, obteniéndose un aceite oscuro, que cristalizó por agregado de la mínima cantidad necesaria de metanol. Después de una noche a 0° el producto cristalino se separó por filtración obteniéndose 120 mg de una sustancia de pf 145-160°; luego de una recrystalización en el mismo solvente, se obtuvieron 100 mg de producto, de pf 176-178°.

Este producto fué identificado como skimmianina mediante co-cromatografía en placa delgada y por comparación de su espectro IR con el de una muestra auténtica. En los primeros ensayos realizados se completó la identificación mediante comparación de su espectro RMN, con el obtenido con una muestra auténtica.

En las experiencias en que se inoculó la planta con sustancias radiactivas, el producto aislado fué recrystalizado hasta actividad constante. En la mayoría de los casos esta purificación implicó una recrystalización adicional respecto de las ya descriptas.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL β -SITOSTEROL . METODO GENERAL

La solución de éter de petróleo remanente de la extracción del alcaloide con $\text{ClH } 6 \text{ N}$ (ver pag 102) se lavó con solución saturada de CO_3HNa (2 x 50 ml), con agua (100 ml) y se llevó a sequedad.

El residuo fué disuelto en 50 ml de etanol y mezclado con una solución de 40 g de HOK en 300 ml de etanol.

La solución resultante fué calentada a reflujo durante 3 h al cabo de las cuales se dejó enfriar y se diluyó con 2 veces su volumen de agua. La solución acuoso-alcohólica fué extraída con éter etílico (5 x 200 ml).

Los extractos etéreos se lavaron con agua hasta neutralidad y luego se secaron sobre SO_4Mg . Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo aceitoso oscuro. En la experiencia realizada con 500g de planta seca se obtuvieron 2,5g de este producto.

El residuo se disolvió en cloroformo (5 ml) y se empastó con alúmina (10 g) secando luego la mezcla completamente. La mezcla seca se colocó sobre una columna de alúmina (Woelm, Neutra, Grado 1) (50 g) y se comenzó a eluir con éter de petróleo recogién dose cuatro fracciones de 75 ml ; se cambió luego de solvente de elución por benceno recogién dose hasta fracción 25 (Comin, 1953).

Las fracciones recogidas fueron controladas mediante cromatografía en capa delgada (Alúmina Merck G, solvente: cloroformo, revelador Cl_3Sb) observándose presencia de β -sitosterol en las fracciones 5-22.

Las fracciones que contenían β -sitosterol se unieron y llevaron a sequedad, obteniéndose un residuo aceitoso rojizo . Por tratamiento con metanol este residuo se transformó en un precipitado amarillento pastoso que fué separado por filtración. Este precipitado fué tratado con anhídrido acético y piridina y el producto así obtenido fué recrystalizado de etanol absoluto rindiendo una sustancia de pf 65-90° (120 mg).

El producto anterior, disuelto en cloroformo se sembró sobre una placa preparativa de alúmina (Merck PF 254, Tipo E) de 1mm de espesor . La placa se desarrolló con éter de petróleo-benceno (9:1). La posición de las bandas fué detectada revelando con iodo en tres líneas transversales: dos laterales y una central.

Mediante elución de la banda de menor Rf con cloroformo y posterior evaporación del solvente se obtuvo un producto que , recrystalizado de etanol absoluto rindió 30 mg de sustancia de pf 134-135° que no mostraba depresión de su pf al ser mezclada con acetato de β -sitosterol auténtico.

El espectro IR de la sustancia obtenida era idéntico al de acetato de β -sitosterol auténtico.

REACCIONES DE DEGRADACION DEL ALCALOIDE SKIMMIANINA

a) Oxidación a ácido skimmianico

Una solución de skimmianina (60 mg) en acetona (15 ml) agitada mediante agitador magnético y calentada a ebullición, fué tratada con 150 mg de MnO_4K sólido, agregado en pequeñas porciones durante aproximadamente 30 min .

Una vez terminado el agregado, se filtró el precipitado de MnO_2 por Filtercel y el mismo se extrajo con CO_3Na_2 10 % (3 x 1 ml) mediante agitación y posterior centrifugación en cada oportunidad.

La solución alcalina se enfrió a 0° y se neutralizó con ClH (conc) apareciendo un precipitado que fué separado por filtración. El producto seco (25 mg) fué recristalizado de ácido acético, obteniéndose 15 mg de sustancia de pf $235-240^\circ$. Mediante una nueva recristalización del mismo solvente se obtuvieron 10 mg de ácido skimmiánico pf $247-248^\circ$ (Asahina et al, 1930, B)

El producto fué identificado por su pf y por comparación de sus espectros IR y de RMN con los de ácido skimmiánico auténtico.

En los ensayos radiactivos se recristalizó hasta actividad constante (por lo general fué suficiente con una recristalización adicional respecto de las ya mencionadas).

b) Descarboxilación del ácido skimmiánico a 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona

Para realizar la descarboxilación del ácido skimmiánico se utilizó un aparato como el descrito en la figura de la p. 50

Acido skimmiánico (37 mg) fué suspendido en 22 ml de ClH 6 N, calentándose luego a ebullición la mezcla heterogénea durante 3 h .

Se observó que el ácido skimmiánico insoluble iba desapareciendo durante el transcurso de la reacción, quedando al final de ésta una solución límpida.

El CO_2 producido en la reacción se arrastró mediante

una corriente de N_2 (previamente purificado por pasaje a través de cal sodada, SO_4H_2 conc, y $(OH)_2Ba$ (solución saturada)) y se colectó como CO_3Ba mediante burbujeo en una solución saturada de $(OH)_2Ba$. Al cabo de las 3 h el CO_3Ba formado se filtró rápidamente lavándose el precipitado sobre el filtro con metanol y éter etílico. Una vez seco, el producto obtenido pesaba 21 mg . La radiactividad del CO_3Ba se midió mediante su transformación en carbonato de Hyamina, por el método ya descrito (ver pag 96)

La solución ácida remanente en el balón de reacción se concentró hasta 2 ml . Al enfriar precipitó un producto blanco, que se recristalizó de metanol-agua, obteniéndose 12 mg de sustancia de pf 249-250°.

El producto obtenido se identificó como 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona, mediante la realización de espectros RMN e IR.

EXPERIENCIA CON ACETATO DE SODIO-1-¹⁴C

1) Inoculación de la sustancia radiactiva y extracción de skimmianina y β -sitosterol

Un ejemplar de Fagara coco fué inoculado con acetato de sodio-1-¹⁴C (246 mg, act esp: $2,22 \times 10^9$ dpm/mM) según el método ya descripto (ver pag 100).

Se cosechó la planta 12 días después de la inyección y se la sometió a los procesos ya indicados para la extracción y purificación del alcaloide (ver pag 102) y del β -sitosterol

El peso del material vegetal secado y molido era de 750 g. Se obtuvieron a partir de él 180 mg de skimmianina (pf 177-178°, act esp : $9,10 \times 10^5$ dpm/mM).

El β -sitosterol fué aislado como acetato, obteniéndose 4 mg (pf 130-131°, act esp : $7,66 \times 10^5$ dpm/mM)

2) Reacciones de degradación de la skimmianina

a) Oxidación a ácido skimmianico

Una solución de 39 mg de alcaloide en 7 ml de acetona se trató con 75 mg de MnO_4K , según el método ya mencionado (ver pag 104) para obtener 13 mg de ácido skimmianico (pf 248-249°, act esp: $9,10 \times 10^5$ dpm/mM).

b) Descarboxilación del ácido skimmianico a 7,8-dimetoxi-2,4 quinolindiona

El ácido skimmianico obtenido (12 mg) fué descarboxilado por reflujo en $\text{ClH } 6 \text{ N}$, captándose el CO_2 desprendido como CO_3Ba (6,8 mg) (ver pag. 105).

La actividad de CO_3Ba obtenido se midió mediante su transformación en carbonato de Hyamina según el método ya indicado (ver pag 96) obteniéndose un valor de $4,83 \times 10^3$ dpm/mM .

La solución ácida remanente fué concentrada a 1/10 de su volumen y enfriada , precipitando entonces la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona (9 mg) que fué recristalizada de metanol-agua obteniéndose 6 mg de pf 247-248° y act esp $9,03 \times 10^5$ dpm/mM .

Se completó la identificación de esta sustancia por comparación de su espectro IR con el de muestra auténtica.

EXPERIENCIA CON ACIDO MEVALONICO-5-¹⁴C

1) Inoculación del producto radiactivo y extracción de la skimmianina y el β -sitosterol

Un ejemplar de Fagara coco fué inoculado con ácido mevalónico-5-¹⁴C (5,2 mg, act esp: $2,62 \times 10^{10}$ dpm/mM) , según el método ya descripto (ver pag 100).

Se cosechó la planta 12 días después de la inyección y se la sometió a los procesos ya indicados para la extracción y purificación de skimmianina y del β -sitosterol.

El peso del material vegetal secado y molido era de 500 g y se obtuvieron a partir de él , 110 mg de skimmianina (pf: 177-178°, act esp: $1,01 \times 10^5$ dpm/mM). El β -sitosterol fué aislado como acetato, obteniéndose 4,5 mg (pf: 129-132°, act esp: $4,42 \times 10^6$ dpm/mM).

2) Reacciones de degradación de la skimmianina

a) Oxidación a ácido skimmianico

Una solución de 75 mg del alcaloide en 15 ml de acetona se trató con 150 mg de MnO_4K , según el método ya mencionado (ver pag 104) para obtener 14 mg de ácido skimmianico (pf 249-250°, act esp: $0,95 \times 10^5$ dpm/mM).

b) Descarboxilación del ácido skimmianico a 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona

El ácido skimmianico obtenido (13 mg) fué descarboxilado por reflujo en ClH 6 N, capturándose el CO_2 desprendido como CO_3Ba (9,35 mg). La actividad del CO_3Ba obtenido fué de $0,83 \times 10^5$ dpm/mM (ver pag 96).

La solución ácida remanente fué concentrada, precipitando la 7.8-dimetoxi-2,4-quinolindiona (9 mg) que fué recristalizada de metanol-agua obteniéndose 6 mg (pf 248-250°, act esp: $2,40 \times 10^3$ dpm/mM).

EXPERIENCIA CON ACIDO MEVALONICO-4- ^{14}C

1) Inoculación del producto radiactivo y extracción de la skimmianina y del β -sitosterol

Un ejemplar de Fagara coco fué inoculado con ácido mevalónico-4- ^{14}C (50 mg, act esp: $1,20 \times 10^8$ dpm/mM) según el método ya descripto (ver pag 100).

Se cosechó la planta 12 días después de la inyección y se la sometió a los procesos ya indicados para la extracción y purificación de la skimmianina y del β -sitosterol.

El peso del material secado y molido fue de 600 g y se obtuvieron a partir de él 125 mg de skimmianina (pf 177-178°, act esp: $1,48 \times 10^3$ dpm/mM) y 25 mg de acetato de β -sitosterol, (pf 128-133°, act esp: $1,11 \times 10^5$ dpm/mM).

2) Reacciones de degradación de la skimmianina

Oxidación a ácido skimmianico

Una solución de 80 mg de alcaloide en 15 ml de acetona se trató con 160 mg de MnO_4K según el método ya mencionado, para obtener 15 mg de ácido skimmianico (pf 248-249°, act esp: $0,28 \times 10^2$ dpm/mM).

EXPERIENCIA CON ALCOHOL 3,3-DIMETILALILICO-1-¹⁴C

1) Síntesis de alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C

a) Bromoacetato de etilo-1-¹⁴C

Acetato de sodio-1-¹⁴C (350 mg , act esp: $5,3 \times 10^9$ dpm/mM) fue tratado con 3 ml de ácido fosfórico saturado con P_2O_5 , destilando al vacío el ácido acético liberado y recogiéndolo en el mismo recipiente en que iba a tener lugar la reacción de bromación (enfriado con N_2 líquido) (F.Kölgel, 1954). Se obtuvieron 240 mg de ácido acético-1-¹⁴C el cual fue diluido con 750 mg de ácido acético glacial inactivo.

En el recipiente de reacción fueron agregados 2 ml de Br_3P , y luego con agitación 2 ml de Br_2 (previamente secado sobre P_2O_5). La adición se llevó a cabo lentamente, hasta que la mezcla tomó color de Br_2 , y luego el remanente en un solo agregado. Se calentó la mezcla a $85-90^\circ$ durante 1,5 h agregándose luego 0,5 ml adicionales de Br_2 . Las condiciones mencionadas se mantuvieron durante 18 h (Freeman et al, 1963).

Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 6 ml de etanol absoluto y se reflujo durante 2 h (B. Scheppartz et al, 1949; W. Sakami et al, 1947).

El producto de reacción se volcó sobre 2 veces su volumen de agua fría. La capa inferior se decantó, lavó con SO_3HNa acuoso, y luego con agua.

Se secó con SO_4Mg , filtró y destiló (p.e: 57° , 15 Torr), obteniéndose 1,77g de bromoacetato de etilo- $1-^{14}\text{C}$.

b) Bromuro de carbetoximetil-trifenil-fosfonio radiactivo

El bromoacetato de etilo- $1-^{14}\text{C}$ obtenido previamente se disolvió en 3 ml de benceno y se agregó lentamente sobre una solución de 5 g de trifenil fosfina en 10 ml de benceno, formándose un precipitado. (Isler et al., 1957).

Luego de una noche a 0° se filtró el producto sólido, se lavó con una mezcla de benceno-éter de petróleo (1:1) y se secó al vacío. Se obtuvieron 3,9 g de pf $152-153^\circ$ (act esp: $3,0 \times 10^8$ dpm/mM)

c) Trifenil-carbetoximetilen-fosforano radiactivo

La sal de fosfonio anteriormente obtenida se disolvió en 80 ml de agua y esta solución, enfriada con hielo fué alcalinizada mediante el lento agregado de HONa 0,5 N~~9~~ dejó una noche a 0°, se filtró el precipitado formado y secó durante 24 h. Se obtuvieron 2,52 g del fosforano correspondiente, pf: 125-127° (Isler et al, 1957) (act esp: $2,9 \times 10^8$ dpm/mM)

d) 3,3-dimetilacrilato de etilo-1-¹⁴C

El producto anterior (1,25 g) se disolvió en 15 ml de acetona (previamente secada sobre CO₃K₂) y la solución se colocó en un tubo de vidrio de 2,5 cm de diámetro x 20 cm de largo. se sumergió el tubo en N₂ líquido, se purgó con una corriente de N₂ durante 5 min y se cerró a la llama.

El tubo cerrado se calentó en horno a 100° durante 24 h. Cuando fría, la mezcla de reacción se transvasó a un balón y se eliminó el exceso de acetona. El residuo formado por óxido de trifenil fosfina y el éster buscado se lavó repetidas veces con éter de petróleo separando en cada oportunidad el líquido de lavado por decantación.

El extracto de éter de petróleo fué llevado a sequedad y el residuo obtenido destilado a presión reducida (75°, 40 Torr) (Horner et al, 1958).

Se obtuvieron 98 mg de 3,3-dimetilacrilato de etilo-1-¹⁴C identificado por comparación de su espectro IR con el de una muestra inactiva, que a su vez había sido identificada por RMN.

Dicha muestra inactiva había sido sintetizada por el

camino ya descripto para la sustancia radiactiva.

e) Alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C

El producto anterior (75 mg) se disolvió en 25 ml de éter etílico anhidro, se enfrió la solución a 0° y se agregaron luego con agitación, en pequeñas porciones 30 mg de AlLiH_4 .

Una vez terminado el agregado, se destruyó el exceso de AlLiH_4 con acetato de etilo, y se añadieron 3,5 ml de solución saturada de CO_3HNa . Se transvasó la mezcla a una ampolla y se extrajo varias veces con éter.

La solución etérea se secó sobre SO_4Na_2 y se evaporó. Se obtuvieron 50 mg de alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C (act esp: $3,1 \times 10^8$ dpm/mM) (Pleninger et al, 1965), que fué identificado por comparación de su espectro IR con el de sustancia inactiva, que a su vez fué identificada por RMN.

2) Inoculación del producto radiactivo y extracción de la skimmianina y del β -sitosterol

Un ejemplar de Fagara coco fué inoculado con alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C (50 mg, act esp: $3,1 \times 10^8$ dpm/mM), suspendiendo la sustancia en agua destilada mediante el agregado de "Tween 20", y luego inyectando la suspensión mediante el método ya descripto (ver pag 100).

Se cosechó la planta 12 días después de la inyección y se la sometió a los procesos ya indicados para la extracción y purificación de la skimmianina y del β -sitosterol (ver pag 102).

El peso del material vegetal secado y molido era de 620 g. Se obtuvieron a partir de él 60 mg de skimmianina (pf 177-178°, act esp: $5,2 \times 10^4$ dpm/mM) y 15 g de acetato de

sitosterol (pf :128-133°, act esp: $5,5 \times 10^5$ dpm/mM).

3) Reacciones de degradación de la skimmianina

a) Oxidación a ácido skimmianico

El alcaloide obtenido (60 mg) fué diluído con 60 mg de producto inactivo, obteniéndose un producto de act esp : $2,65 \times 10^4$ dpm/mM.

Una solución de 80 mg de la skimmianina así obtenida en 15 ml de acetona , se trató con 175 mg de MnO_4K , según el método ya indicado (ver pag 104), para obtener 19 mg de ácido skimmianico (pf:248-249°, act esp: $2,55 \times 10^4$ dpm/mM), (corrección por dilución: $4,88 \times 10^4$ dpm/mM).

b) Descarboxilación del ácido skimmianico a 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona

El ácido skimmianico obtenido (18 mg) fué descarboxilado por reflujo en ClH 6N, captándose el CO_2 desprendido como CO_3Ba (10,35 mg) (ver pag 105). La actividad del CO_3Ba obtenido era de $2,26 \times 10^4$ dpm/mM (corrección por dilución $4,41 \times 10^4$ dpm/mM).

La solución ácida remanente fué concentrada , precipitando la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona (9 mg), que fué recristalizada de metanol-agua, obteniéndose 6 mg de pf:247-248° (act esp: $2,4 \times 10^3$ dpm/mM) (corrección por dilución: $3,90 \times 10^3$ dpm/mM)

EXPERIENCIA CON ACIDO 3,3-DIMETILACRILICO-1-¹⁴C

1) Síntesis de ácido 3,3-dimetilacrílico-1-¹⁴C

3,3-dimetilacrilato de etilo (98 mg), obtenido en forma similar a la ya indicada (ver pag 112) fué tratado con 0,5 ml de HONa 5 N, en baño de agua a 80° con continua agitación .

Después de observarse la desaparición de la fase inmiscible en agua, se continuó la agitación durante 30 min adicionales. Se enfrió con hielo y acidificó con ClH 6 N, se filtró el precipitado formado, dejándose una noche en desecador de vacío.

Se obtuvieron 47 mg de ácido 3,3-dimetilacrílico-1-¹⁴C de pf :68-70° (act esp:3,10 x 10⁸ dpm/mM).

La sustancia fué identificada por comparación de su espectro IR con el de una muestra inactiva, que había sido identificada mediante su espectro de RMN. Dicha muestra inactiva había sido sintetizada por el camino ya descrito para la sustancia radiactiva.

2) Inoculación de la sustancia radiactiva y extracción de la skimmianina y del β-sitosterol

Un ejemplar de Fagara coco fué inoculado con ácido 3,3-dimetilacrílico-1-¹⁴C (47 mg, act esp: 3,10 x 10⁸ dpm/mM) disuelto en bicarbonato de potasio acuoso, según el método ya descrito (ver pag 100).

Se cosechó la planta 12 días después de la inyección y se la sometió a los procesos ya indicados para la extracción y purificación de la skimmianina y del β-sitosterol (ver pag 102

El peso del material vegetal secado y molido era de 600 g . Apartir de él se obtuvieron 190 mg de skimmianina (pf 177-178°, act esp: $1,17 \times 10^5$ dpm/mM) y 18 mg de acetato de β - sitosterol (pf:133-135°, act esp: $2,40 \times 10^5$ dpm/mM).

3) Reacciones de degradación de la skimmianina

a) Oxidación de skimmianina a ácido skimmianico

Una solución de 84 mg de skimmianina en 15 ml de acetona se trató con 150 mg de MnO_4K según el método ya mencionado (ver pag 104) para obtener 25 mg de ácido skimmianico (pf :247-248°, act esp: $1,16 \times 10^5$ dpm/mM)

b) Descarboxilación del ácido skimmianico a 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona

El ácido skimmianico obtenido (18 mg) fué descarboxilado por reflujo en ClH 6 N, capturándose el CO_2 formado como CO_3Ba (13,7 mg). La actividad del CO_3Ba fué de $1,40 \times 10^2$ dpm/mM

La solución ácida remanente fué concentrada , precipitando la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona (12 mg), que fué recristalizada de metanol-agua obteniéndose 9 mg de pf :248-249° (act esp: $1,12 \times 10^5$ dpm/mM.)

EXPERIENCIA CON FORMIATO DE SODIO- ^{14}C

1) Inoculación de la sustancia radiactiva y extracción de skimmianina

Un ejemplar de Fagara coco fué inoculado con formiato

de sodio-1- ^{14}C (1,3 mg, act esp: $9,25 \times 10^{10}$ dpm/mM) según el método ya descrito. (ver pag 100). Se cosechó la planta 12 días después de la inyección, y se la sometió a los procesos ya indicados para la extracción y purificación de skimmianina (ver pag 102). El peso del material vegetal seco y molido era de 600 g se obtuvieron a partir de él 190 mg de skimmianina (pf: 177-178°, act esp: $5,93 \times 10^5$ dpm/mM).

2) Reacciones de degradación

a) Oxidación a ácido skimmianico

Una solución de 63 mg de alcaloide en 13 ml de acetona se trató con 150 mg de MnO_4K , según el método ya indicado (ver pag 104) para obtener 24 mg de ácido skimmianico (pf :247-248°, act esp : $5,72 \times 10^5$ dpm/mM).

b) Descarboxilación del ácido skimmianico a 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona

El ácido skimmianico obtenido (20 mg) fué descarboxilado por reflujo en ClH 6 N, captándose el CO_2 desprendido como CO_3Ba (12 mg) (ver pag 105). La actividad del CO_3Ba obtenido se midió mediante su transformación en carbonato de Hyamina, según el método ya indicado (ver pag 96) obteniéndose el valor de $3,2 \times 10^3$ dpm/mM.

La solución ácida remanente fué concentrada a 1/10 de su volumen y enfriada, precipitando entonces la 7,8-dimetoxi-2,4-quinolindiona (12 mg) que fué recristalizada de metanol-agua ob-

teniéndose 9 mg de pf 247-248° (act esp: $4,00 \times 10^5$ dpm/mM).

Se completó la identificación de esta sustancia por comparación de su espectro IR con el de la muestra auténtica.

c) Reducción de skimmianina a 4,7,8-trimetoxi-3-etil-2-quinolona

63,5 mg de alcaloide disueltos en 10 ml de ácido acético glacial, fueron hidrogenados a presión atmosférica y temperatura ambiente, en presencia de 30 mg de PtO_2 .

Una vez terminada la absorción de hidrógeno (12 cm^3 , 2 h), se filtró el catalizador lavándose con ácido acético, y el filtrado fué evaporado.

El residuo (69 mg) fué recristalizado de etanol obteniéndose 46 mg de sustancia de pf 184-185° (act esp: $5,84 \times 10^5$ dpm/mM) (Ohta et al, 1953).

El producto obtenido fué identificado como 4,7,8-trimetoxi-3-etil-2-quinolona, mediante comparación de su pf y espectro IR con los de una muestra inactiva, la cual había sido identificada mediante su espectro RMN.

d) Oxidación de la 4,7,8-trimetoxi-3-etil-2-quinolona según el método de Kuhn-Roth

El producto anterior (36 mg) se trató con 4 g de CrO_3 disueltos en 12 ml de SO_4H_2 30 %, se calentó la solución a ebullición y se destiló hasta recoger 70 ml de destilado manteniendo el volumen en el balón de reacción por agregado de agua destilada.

Para el caso del acetato de sodio se utilizó el siguiente procedimiento: acetato de sodio (10 mg) disuelto en agua (5 ml) fué tratado con 20 mg de clorhidrato de 1-naftilamina y 100 mg de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. Después de agitar unos minutos con una varilla de vidrio el precipitado aceitoso primeramente formado solidificó, y se filtró después de 10 min . El producto fué secado y purificado por sublimación (140°, 0,01 Torr).

El sublimado blanco se recristalizó de benceno-éter de petróleo, obteniéndose 1-acetamido naftaleno (6 mg pf: 159-160°, act esp: $3,9 \times 10^3$ dpm/mm).

El derivado correspondiente al propionato de sodio fué obtenido de una manera similar a la indicada. El 1-propionamido naftaleno tenía un pf: 124-126° (act esp: $6,97 \times 10^3$ dpm/mm).

e) Demetilación de skimmianina

Se utilizó en esta experiencia el aparato descrito en la figura de la pag 51.

Se trataron 50 mg de skimmianina con 12 ml de IH 50 % a reflujo durante 2 h .El yoduro de metilo formado se arrastró con N₂, que previamente había sido purificado por pasaje a través de cal sodada y SO₄H₂ concentrado.

La corriente gaseosa emergente del balón de reacción se hizo pasar sucesivamente por una solución saturada de SO₄Cd , una solución saturada de S₂O₃Na₂, y finalmente por una solución de trietilamina 5 % en etanol absoluto, enfriada en un baño de hielo seco-metilcellosolve.

Una vez completada la reacción se dejó la solución etanólica una noche a temperatura ambiente y luego se evaporó al vacío el etanol y el exceso de trietilamina. El residuo obtenido (120 mg) se recristalizó de etanol absoluto-acetato de etilo.

Se obtuvieron 60 mg de yoduro de trietil metil amonio (act esp : $1,85 \times 10^5$ dpm/mm).

El espectro IR del yoduro de trietil metil amonio obtenido resultó ser idéntico al correspondiente a una muestra auténtica.

RESUMEN

1) Se describen individualmente los alcaloides aislados hasta el presente de la planta Fagara coco, indicándose brevemente en cada caso el método seguido para efectuar las determinaciones de estructura.

2) Se enumeran las hipótesis existentes y los trabajos realizados acerca de la biosíntesis de los alcaloides furoquinolínicos.

3) Se describen las experiencias realizadas en este trabajo de investigación, las cuales consistieron en lo siguiente:

I) Aplicación de métodos ya descriptos para el aislamiento de skimmianina y β -sitosterol en cada uno de las experiencias.

II) Ensayo con material inactivo de las degradaciones que se utilizaron luego con los alcaloides radiactivos. Dichas degradaciones fueron:

a) Oxidación de skimmianina a ácido skimmianínico y posterior descarboxilación del mismo, captándose el dióxido de carbono formado, cuya actividad representaba la del C-3 del alcaloide, y aislándose el producto descarboxilado.

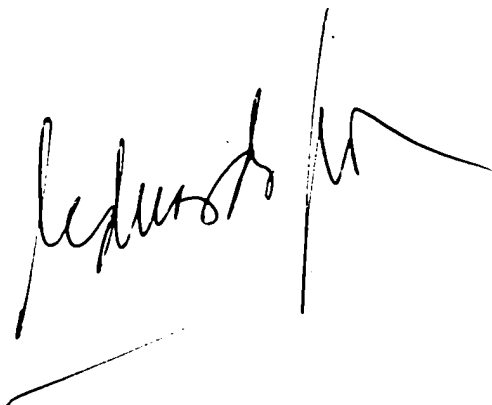
b) Aislamiento de los carbonos correspondientes a los grupos metilos de los metoxilos.

c) Reducción de skimmianina a su tetrahidro derivado, y posterior oxidación de éste, aislándose ácido propiónico, que representaba la actividad de los C-11, C-3 y C-2, y ácido acético, cuya actividad representaba la de los C-3 y C-2.

III) Síntesis del alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C y del ácido 3,3-dimetilacrílico-1-¹⁴C partiendo de acetato de sodio-1-¹⁴C

IV) Se describen las experiencias de inoculación a ejemplares de Fagara coco, en ensayos separados con acetato de sodio-1-¹⁴C, formiato de sodio-¹⁴C, ácido mevalónico-4-¹⁴C, ácido mevalónico-5-¹⁴C, alcohol 3,3-dimetilalílico-1-¹⁴C, y ácido 3,3-dimetilacrílico-1-¹⁴C.

4) En base a los resultados obtenidos con las experiencias mencionadas, se propone una teoría sobre la biosíntesis de skimmianina, según la cual dicho alcaloide se formaría por condensación del pirofosfato de dimetilalilo con un compuesto del tipo de la 2,4-dihidroxiquinolina, con posterior ciclación y pérdida de acetona del compuesto resultante. Se propone un mecanismo para este último paso.



BIBLIOGRAFIA

- 1) Aneja, R., Mukerjee, S. K. , Seshadri, T. ; Tetrahedron, 4, 256, (1958).
- 2) Arthur, H. R., Hui, W.H., Ng, Y.L.; J. Chem. Soc., 1840, (1959); Chem. Ind. (London), 1514, (1958).
- 3) Asahina, Y., Inubuse, M., Chem. Ber.; 63, 2054, (1930). A
- 4) Asahina, Y., Nakanishi, S.; Chem. Ber., 63 , 2057, (1930). B.
- 5) Barilari, E. M., Comin, J.; Anales Asoc. Química Arg., 43, 180, (1955).
- 6) Beke, D. ; Advances in Heterocyclic Chemistry, 1, 167, (1963)
- 7) Bailey, A. S., Worthing, C.R.; J. Chem. Soc., 4535, (1956).
- 8) Bell, C., Newton Hayes, F.; Liquid Scintillation Counting, Pergamon Press, N.Y., (1958).
- 9) Berinzaghi, B., Muruzábal, A., Labriola, R., Deulofeu, V.; J. Org. Chem. 10, (1945), 181.
- 10) Bernfeld, P.; The biosynthesis of natural compounds, 2^o ed, Pergamon Press, Oxford, 1967.
- 11) Birch, A. J. , English, R. J. , Massy- Westropp, R. A., Smith, H.; J. Chem. Soc. , 369, (1958 , A).
- 12) Birch, A. J., Fryer, R. J., Thomson, P.J., Smith, H.; Nature, 190, 441, (1961).
- 13) Birch, A. J. , Smith, H.; Chem. Soc. London, Special Publication 12, 1 , (1958), B).
- 14) Bötting, H. G.; Ergebnisse der Alkaloid Chemie bis 1960, Akad. Verlag, Berlin, (1961), pag. 716.
- 15) Bowman, R. M., Collins, J. F., Grundon, M. F. ; Chem. Commun., 1131, (1967-A).
- 16) Bowman, R. M., Grundon M.F.; J. Chem. Soc. (C), 1504, (1966)

- 17) Bowman, R.M., Grundon, M.F.; J. Chem. Soc., (C) 2368, (1967-B)
- 18) Büchner, J.A., Büchner, C.C.; Ann., 24, 228, (1837); (ver cita N° 60, 4, 84).
- 19) Chevallier, M., Pelletan, G. ; J. Chem. Med.; 2, 314, (1826); (ver cita N°55, 4, 84).
- 20) Chatterjee, A. Mitra, S.S., J. Am. Chem. Soc, 71, 606, (1949).
- 21) Clayton, J.R.; Quart. Reviews, 19, 168, (1965).
- 22) Cobet, M., Lückner, M.: European J. Biochem., 4, 76, (1968).
- 23) Comar, C. L., Radioisotopes in Biology and Agriculture, (1955) Mc Graw-Hill, N. Y.
- 24) Comin, J., Tesis, (1953), Fac. Cs. Exactas y Nat., U.B.A.
- 25) Comin, J., Deulofeu, V.; J. Org. Chem., 19, 1774, (1954)
- 26) Comin, J., Deulofeu, V.; Anales Asoc. Quim. Argentina., 43, 83, (1955).
- 27) Comin, J., Deulofeu, V., Tetrahedron, 6, 63, (1959).
- 28) Conforth, J.W., Conforth, R. H., Pelter, A., Horning, G., Popjâk, G.; Tetrahedron, 5, 311, (1959).
- 29) Collins, F. J., Grundon, M.F., Chem. Commun., 621, (1969).
- 30) Colonna, A. O., Gros, E. G., Chem Commun., 674, (1970)
- 31) Deulofeu, V. , Labriola, R., De Langhe, J., J. Am. Chem. Soc., 64, 2326, (1942).
- 32) Diment, J.A., Ritchie, E., Taylor, W. C.; Aust. J. Chem., 20, 565, (1967).
- 33) Diment, J.A., Ritchie, E., Taylor, W.C., Aust. J. Chem., 22, 1797, (1969).
- 34) Feist, K. Sanstede, G., Arch. Pharm., 256, 1, (1918); (ver cita N° 60, 4, 93).

- 35) Ferguson, J.J., Durr, J.F., Rudney, H.; Proc. Natl. Acad. U.S., 45, 499, (1959).
- 36) Fieser, Louis, F.; Expts. in Org. Chem., 3^a ed., Heath and Co., Boston, 1967.
- 37) Floss, H.G., Mothes, U.; Phytochemistry, 5, 161, (1966)
- 38) Freeman Allen, G., Kalin. M.J.; Org. Synthesis, Coll. Vol. IV, 616, (1963), J. Wiley & Sons, N.Y.
- 39) Gadamer, J.; Arch. Pharm., 240, 450, (1902); (ver cita N^o 60 4, 43)
- 40) Gadamer, J.; Arch. Pharm., 243, 31, (1905); (ver cita N^o 60 4, 90).
- 41) Gadamer, J.; Arch. Pharm., 257, 298, (1919); (ver cita N^o 60 4, 90).
- 42) Geissman, T.A., Hinreiner, E.; Bot. Reviews, 18, 229, (1952)
- 43) Ghosal, S.; Sci. Cult. Calcutta, 30, 142, (1964); C.A. 12248d, 61
- 44) Giacobello, D., Deulofeu, V., Comin, J.; Tetrahedron, 20, 2971, (1964)
- 45) Gopinath, , K.W., Kohli, J.M., Kahn, M.S.Y., Kidwai, A.R.; Indian J. Of Chem., 1, 99, (1963); C.A. 6451 (1963)
- 46) Gröger, D.; Lloydia, 32, 221, (1969).
- 47) Haworth, R.D.; Annual Reports, 345, (1937), The Chem. Soc. (London)
- 48) Haworth, R.D., Perkin Jr., W.H.; J. Chem. Soc., 445, (1926).
- 49) Herberg, R.J.; Packard Technical Bull., N^o 15, (1965)
- 50) Honda, J.; Arch. Exptl. Path. Pharmacol., 52, 68, (1904); - (ver cita N^o 60 , 3, 69).
- 51) Horner, L., Hoediger, H.; Chem. Ber., 91, 437, (1958).
- 52) Isler, O., Guttman, H., Montavon,, M., Ruegg, R., Ryser, G. Zeller, P.; Helv. Chim. Acta., 40, 1242, (1967)
- 53) Kögl, F., Emmelot, P., van der Bolt, J.; Ann., 589, 1, (1954)

- 54) Kowanko, N., Leete, E., J. Am. Chem. Soc., 4919, (1962).
- 55) Kuck, A. M., Albónico, S. M., Deulofeu, V., Escalante, M.G.:
Phytochemistry, 6, 1541, (1967).
- 56) Lahey, F.N., Mc Camish, M., Tetrahedron Letters, , 1525, (1968).
- 57) Lange N.A., Handbook of Chemistry, 1943, 5° ed. p.1174.
- 58) Lavié, D. , Danielli, N., Weitman, R., Glotter, E., Tetrahedron,
24, 3011, (1968).
- 59) Leete E., Gregory, H., Gros, E. G.; J. Am. Chem. Soc., 88, 3475,
(1965).
- 60) Manske, R.H.F., Holmes, H.L., The Alkaloids, Chemistry and
Physiology, Academic Press, N.Y.
- 61) Matsuo, M., Kasida Y., Chem. Pharm. Bull., (Tokyo), 14, 1108, (1966)
- 62) Matsuo, M., Yamasaki, M., Kasida Y.; Biochem. Biophys. Res. Commun.
23, 679, (1966).
- 63) Monković, I., Spenser, I.D., Plunkett, A.O., Can. J. Chem., 45,
1935, (1967).
- 64) Mueller, A. F., Larson, T. E., Lennarz, W. J., Anal. Chem. 30
41, (1958).
- 65) Nakano, T.; Pharm. Bull., (Tokyo), 2, 326, (1954-A).
- 66) Nakano, T.; Pharm. Bull., (Tokyo), 2, 329, (1954-B).
- 67) Newton Hayes, F.; Packard Technical Bulletins, N° 1 (1963).
- 68) Ohta, T., Miyasaki, T., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1, 181, (1953)
C. A., 47, 10544i.
- 69) Perkin, Jr, W.H.; J. Chem. Soc., 55, 63, (1889).
- 70) Perkin Jr., W.H., Robinson, R., J. Chem. Soc., 97, 305, (1910);
(ver cita N° 60, 4, 88).

- 71) Perrins, J.D.,; J. Chem Soc., 15, 339, (1862); (ver cita N° 60, 4, 84).
- 72) Pleninger H., Immel, H.,; Chem Ber., 98, 414, (1965).
- 73) Pregl, F., Quantitative Organic Microanalysis, 4° ed. , The Blakiston Co., Philadelphia, (1946)
- 74) Price J.R., Willis, J.B., Aust. J. Chem., 12, 589, (1959)
- 75) Probst, M.J.; Ann.,29, 120, (1839);(ver cita N° 60, 5, 202)
- 76) Rapkin, E.; Packard T. Bull., (1962)N° 7
- 77) Rapkin, E., Gibbs, J.A., Packard T. Bull. , (1965).
- 78) Rapoport, H. Holden, K.G.,; J. Am Chem. Soc., 81, 3738, (1959); 82, 4395, (1960).
- 79) Redeman, C. E., Wisegarver, B.B., Alles, G.A.; J. Am Chem. Soc. 71, 1030, (1949).
- 80) Reti, J. ; Compt, Rend., Soc. Biol., 114, 811, (1933).
- 81) Robertson, A. V., Aust. J. Chem., 16, 451, (1963)
- 82) Robinson, R.; The Structural relations of natural compounds, Clarendon Press, Oxford, (1955),.
- 83) Sakami, W., Evans, W. E., Gurin, S, J. Am. Chem. Soc., 69, 1110 (1947).
- 84) Scheparz, B., Gurin, S.; J. Biol. Chem., 180, 663, (1949).
- 85) Selle, F.; Arch. Pharm., 228, 441, (1890), ver cita N° 60,4, 94).
- 86) Späth, E., Pikl, J.; Ber., 62, 2244, (1929).
- 87) Späth, E., Kuffner, F., Ber., 64, 1123, (1931);(ver cita 60,4, 258)
- 88) Späth, E., Ber., 70 A, 83, (1937).
- 89) Stuckert, G.V., Invest. Lab. Quim Biol., 1, 69, (1933), Fac. Cs. Médicas, Univ. Nac. de Córdoba.

FOYHBA

- 90) Tavormina, P.A., Gibbs, M.H., Huff, J.W.; J. Am. Chem. Soc., 78, 4498, (1956).
- 91) Wenkert, E.; *Experientia*, 15, 165, (1959).
- 92) Wolff, D.E., Hoffmann, C.E., Aldrich, P.E., Skeggs, H.R., Wright L.D., Folkers, K; (1956); J. Am. Chem. Soc., 78, 4499, (1956).

INDICE

pag.

CAPITULO 1

1) Aislamiento e identificación de los alcaloides de <u>Fágaro coco</u>	1
2) Determinación de la estructura de los alcaloides de <u>Fágaro coco</u>	2

CAPITULO 2

Biosíntesis de alcaloides furoquinolínicos	10
--	----

CAPITULO 3

Estudio sobre la biosíntesis de skimmianina en Fágaro coco.

Descripción del trabajo realizado	34
1) Objeto del trabajo realizado	34
2) Inoculación de las sustancias radiactivas	38
3) Aislamiento y purificación de skimmianina. Método general.....	39
4) Aislamiento y purificación del β -sitosterol. Método general	40
5) Reacciones de degradación del alcaloide radiactivo.	43
6) Síntesis del alcohol 3,3-dimetilalílico-1- ¹⁴ C y del ácido 3,3-dimetilacrílico-1- ¹⁴ C	55
Descripción de los resultados obtenidos	61
Tabla 1	66
Tabla 2	67
Discusión de los resultados obtenidos	68

CAPITULO 4

Parte experimental

Mediciones de radiactividad	85
Método de administración de los productos radiactivos.	100
Aislamiento y purificación de skimmianina.	
Método general.....	102
Aislamiento y purificación de β -sitosterol	103
Reacciones de degradación del alcaloide skimmianina...	104
Resumen	122
Bibliografía	124