

Tesis de Posgrado

Estudio químico de *Wedelia glauca* (Ort.) Hoffmann ex Hicken y *Wedelia buphthalmiflora* Lorentz (Familia compositae)

Schteingart, Claudio Daniel

1983

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:

Schteingart, Claudio Daniel. (1983). Estudio químico de *Wedelia glauca* (Ort.) Hoffmann ex Hicken y *Wedelia buphthalmiflora* Lorentz (Familia compositae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1818_Schteingart.pdf

Cita tipo Chicago:

Schteingart, Claudio Daniel. "Estudio químico de *Wedelia glauca* (Ort.) Hoffmann ex Hicken y *Wedelia buphthalmiflora* Lorentz (Familia compositae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1818_Schteingart.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTUDIO QUIMICO
DE
WEDELIA GLAUCA (Ort.) Hoffmann ex Hicken
Y
WEDELIA BUPHTHALMIFLORA Lorentz
(FAMILIA: COMPOSITAE)

Autor

Claudio Daniel Schteingart

Directora de Tesis

Dra. Alicia B. Pomilio

Lugar de trabajo:

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas
1983

1818
Ej. 2

A mis padres

Agradezco a la Dra. Alicia B. Pomilio,
directora de esta tesis, su dedicación,
su interés en mi formación científica,
y la confianza y calidez con que ha
sabido guiarme a lo largo de estos
años.

Agradezco también:

Al Ing. P.E. Steibel (Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa) por su ayuda en la recolección y por la identificación del material vegetal (*W. buphthalmiflora*).

Al Dr. J.C. Oberti y al Dr. L. Ariza Espinar (Universidad Nacional de Córdoba) por el envío y clasificación de *W. glauca*.

Al Ing. A. Cabrera y el Lic. A.A. Sáenz (Instituto de Botánica Darwinion) y a la Dra. Lilian Bravo y el Ing. Palacios (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A.) por sus consejos en lo referente a temas botánicos.

Al Dr. J.A. Izquierdo (Instituto de Fisiología "B.A. Houssay", Facultad de Medicina, U.B.A) por las pruebas farmacológicas realizadas.

Al Dr. F. Piozzi (Universidad de Palermo, Italia) por el envío de muestras de ácido grandiflorénico, atractiliginina y atractilósido.

A la Dra. A. Seldes por facilitarme un testigo de 2,4,6-tri-O-metilglucosa.

Al Lic. G. Aldomá por la realización de espectros de ^1H -RMN.

Al Dr. E. Rúveda por los espectros de ^{13}C -RMN realizados.

A UMYMFOR (CONICET-FCEN) por el equipo técnico suministrado.

Al Sr. J.A. Aznarez por la realización de los espectros de masas y cromatografías gas-líquido acopladas a espectrometría de masas.

A las Licenciadas M. Rivero y M.M. de Moglia por la realización de las cromatografías gas-líquido.

Al Sr. G. Arabehty, al Dr. G. Burton y a la Srta. A. Arenaza por los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN realizados.

A la Dra. B.B. Deferrari y a la Lic. Z.M. Marcote por la determinación de grupos sulfato realizada.

Al Dr. A.A. Viale y a la Lic. A.S. Lorenti (Cátedra de Microbiología e Inmunología del Departamento de Química Biológica, F.C.E. y N., U.B.A.) por los ensayos de actividad antimicrobiana efectuados.

Al Dr. A.A. Vitale por sus ingeniosas sugerencias.

A la Dra. M.D. González, al Dr. C.A. Buschi, a los Licenciados A.M. Iribarren, R.D. Rofi, R. Iñigo y a los compañeros y amigos que, con su constante estímulo y apoyo, hicieron más llevadero este trabajo.

A todo el personal del Departamento de Química Orgánica, profesores, compañeros y no docentes; por sus cordialidad y cooperación.

INDICE

	pág.
<u>CAPITULO I: FAMILIA COMPOSITAE</u>	1
Tribu <i>Heliantheae</i>	2
Género <i>Wedelia</i>	4
<i>Wedelia glauca</i> y <i>W. buphthalmiflora</i>	7
<u>CAPITULO II: DITERPENOS TETRACICLICOS</u>	11
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno	15
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C	22
Espectrometría de masas	36
<u>CAPITULO III: SAPONINAS TRITERPENICAS</u>	38
Métodos separativos	45
Estudio químico	47
Estudio estructural por métodos espectroscópicos	
Espectrometría de masas	51
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno	57
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C	61
Actividad biológica	68
<u>CAPITULO IV: GLICOSIDOS DE DITERPENOS TETRACICLICOS CON ACTIVIDAD BIOLOGICA</u>	70
El atractilósido y glicósidos relacionados	71
Efecto biológico del atractilósido y derivados	82
<u>CAPITULO V: DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTA TESIS</u>	87
<u>Estudio químico de <i>Wedelia buphthalmiflora</i> Lorentz</u>	
Extracción y fraccionamiento del material vegetal	87

<u>Estudio del extracto de éter de petróleo de <i>W. buphthalmiflora</i></u>	88
Hidrocarburos	88
Estudio estructural de acetato de β -amirina <u>78</u>	89
Purificación de los compuestos <u>10</u> , <u>9</u> , <u>48</u> y <u>82</u>	93
Análisis estructural de <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oato de metilo <u>9a</u>	93
Análisis estructural de <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dien-19-oato de metilo <u>10a</u>	97
Identificación de β -amirina <u>48</u> y lupeol <u>82</u>	102
Separación de los compuestos <u>14</u> , <u>84</u> , <u>85</u> , <u>49</u> y esteroides	106
Análisis estructural de 15- α -angeloiloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oato de metilo <u>14a</u>	106
Análisis estructural de 15- α -tigloiloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oato de metilo <u>8a</u>	117
Análisis estructural de 15- α -isobutiroiloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oato de metilo <u>84a</u> y 15- α -isovaleroiloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oato de metilo <u>85a</u>	119
Esteroides (<u>86</u> y <u>87</u>)	123
Análisis estructural de oleanolato de metilo <u>49a</u>	123
<u>Estudio del extracto etanólico de <i>W. buphthalmiflora</i></u>	128
Análisis estructural de los derivados metilados de los glicósidos triterpénicos <u>89</u> y <u>90</u> (<u>89a</u> y <u>90a</u>)	128
-Estudio de <u>89a</u> y <u>90a</u> por espectroscopía de ^1H -RMN	136
-Estudio de <u>89a</u> por espectrometría de masas	143
-Estudio de <u>89a</u> y <u>90a</u> por espectroscopía de ^{13}C -RMN	144
-Estudio de <u>89a</u> y <u>90a</u> utilizando el poder rotatorio	158
Comprobación química de las estructuras de <u>89a</u> y <u>90a</u>	161

<u>Estudio químico de <i>Wedelia glauca</i> (Ort.) Hoffmann ex Hicken</u>	
Extracción del material vegetal	167
<u>Estudio del extracto de éter de petróleo de <i>W. glauca</i></u>	
Hidrocarburos	168
Compuestos terpénicos <u>48</u> , <u>9</u> , <u>84</u> , <u>85</u> y <u>13</u> (ácido 15- α -cinamoiloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico)	168
<u>Estudio del extracto metanólico de <i>W. glauca</i></u>	
Glucósidos esteroidales <u>101</u> y <u>102</u>	173
Análisis estructural de atractilósido <u>59</u>	175
Importancia quimiotaxonómica de los componentes de <i>Wedelia buphthalmiflora</i> y <i>W. glauca</i>	196
Acción antimicrobiana de los extractos de <i>W. buphthalmiflora</i>	200
<u>CAPITULO VI: PARTE EXPERIMENTAL</u>	
Instrumentos y métodos empleados	201
Material vegetal	205
Estudio químico de <i>Wedelia buphthalmiflora</i>	206
Estudio químico de <i>Wedelia glauca</i>	234
Resumen	243
Bibliografía	247

CAPITULO I
FAMILIA COMPOSITAE

FAMILIA COMPOSITAE

Posee casi 1000 géneros y alrededor de 20 000 especies y es considerada la familia más grande de las *Angiospermas*. Dentro de las dicotiledóneas forma un orden separado : *Asterales* , en la subclase *Asteridae*.

Se las encuentra en todos los continentes, siendo más abundante en las regiones templado-cálidas, en especial en habitats que no están densamente forestados.

El nombre de la familia deriva de las cabezuelas compactas que semejan flores individuales, pero que en realidad están constituidas por flores más pequeñas y tubulares en el centro y liguladas en la zona marginal. Ejemplos típicos son los crisantemos, dalias, diente de león (*Taraxacum*), girasol (*Helianthus*), los cardos, etc.

La mayoría de las especies de las regiones templadas son herbáceas, pero muchas de las de las regiones templado-cálidas y tropicales son arbustos y algunos verdaderos árboles^{1,2}.

En la República Argentina crecen espontáneamente 197 géneros y alrededor de 1400 especies³.

La familia está dividida en trece tribus agrupadas en dos subfamilias^{2,3} , de acuerdo a la clasificación de Hoffmann⁴:

Subfamilia *Liguliflorae* (todas las flores de la cabeza liguladas, con látex)

tribu: *Cichorieae*.

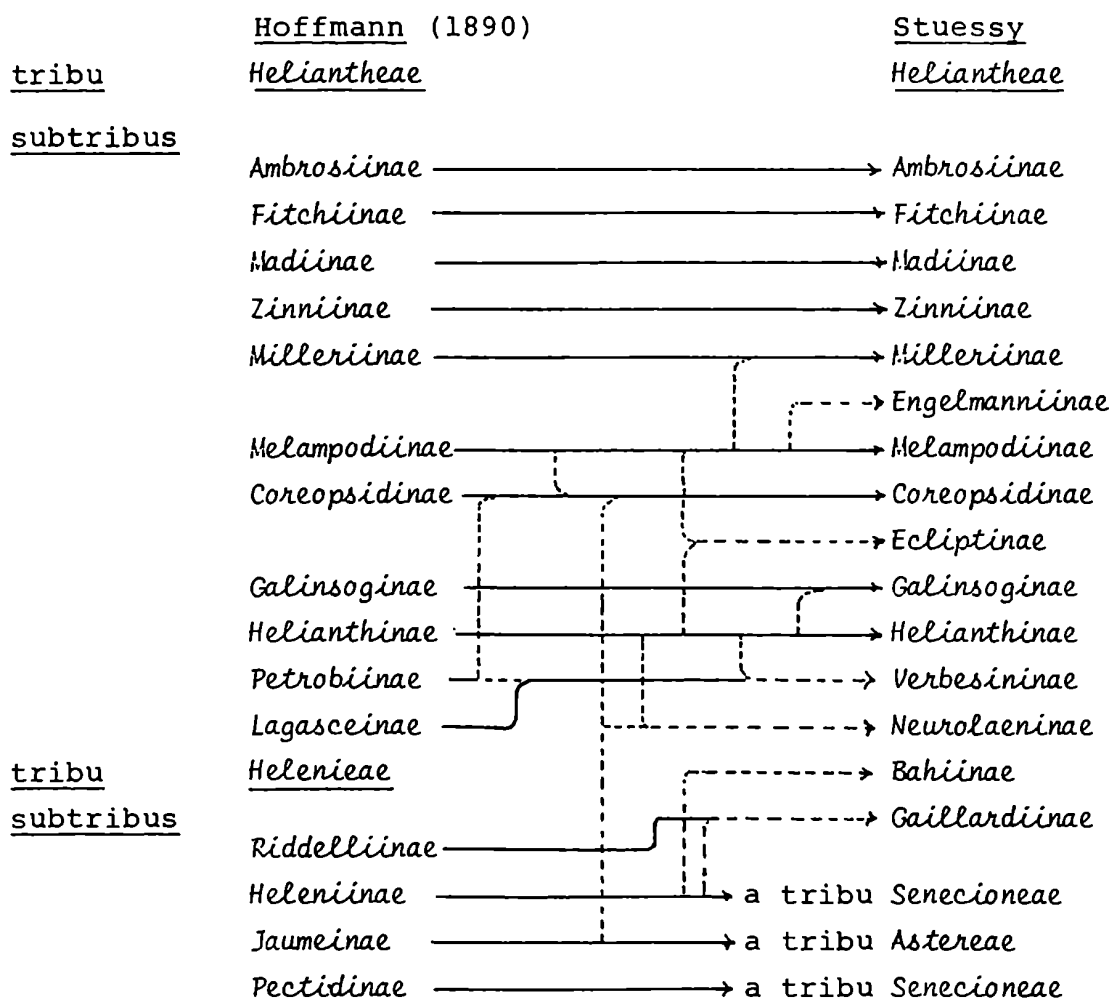
Subfamilia *Tubuliflorae* (algunas de las flores de la cabeza liguladas, sin látex)

tribus: *Vernonieae*, *Eupatorieae*, *Astereae*, *Inuleae*, *Heliantheae*, *Helenieae*, *Anthemideae*, *Senecioneae*, *Calenduleae*, *Arctotideae*, *Cynareae*, *Mutisieae*.

TRIBU HELIANTHEAE

La tribu *Heliantheae* es una de las más grandes, que posee la mayor diversidad morfológica de las compuestas y está considerada como la más primitiva de las trece tribus tradicionales de la familia.

El sistema de clasificación que, con modificaciones menores, se usa hoy en día, proviene originalmente de Bentham (1873), reformulado por Hoffmann (1890). Desde entonces, se han propuesto numerosos cambios, y el número de subtribus de las *Heliantheae* varía con el autor considerado; se expondrá aquí el sistema de Hoffmann, revisado por Stuessy⁵. Las flechas llenas señalan transferencia directa de subtribus, las punteadas indican la modificación de una porción de una subtribu.



Los cambios mayores corresponden a la inclusión en las *Heliantheae* de parte de los géneros de la tribu *Helenieae* en vías de disolución, y a la reestructuración de las subtribus *Melampodiinae* y *Helianthinae*. Esta última, debido a que estaba constituida por tres grupos reunidos artificialmente, ahora se separa en tres subtribus: *Helianthinae*, *Verbesininae* y *Ecliptinae*. La tribu comprende actualmente 209 géneros distribuidos en quince subtribus.

Los géneros de las subtribus *Helianthinae*, *Verbesininae* y *Ecliptinae* se transcriben a continuación:

Ecliptinae: *Aspilia*, *Baltimora*, *Lipochaeta*, *Melanthera*, *Plagiolaphus*, *Rensonia*, *Schizoptera*, *Thelechitonia*, *Wedelia* (70 especies, se encuentra en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo), *Wulffia*, *Blainvillea*, *Calyplocarpus*, *Eclipta*, *Eleutheranthera*, *Enhydra*, *Exomiocarpon*, *Fenixia*, *Garcilassa*, *Hoffmanniella*, *Synedrella*, *Synedrellopsis*.

Verbesininae: *Aldama*, *Montanoa*, *Rhysolepsis*, *Rojasianthe*, *Scalesia*, *Sclerocarpus*, *Dimerostemma*, *Notoptera*, *Otopappus*, *Salmea*, *Salmeopsis*, *Aspiliopsis*, *Hymenostephium*, *Oyedaea*, *Perymenium*, *Steiractinia*, *Zexmenia* (45 especies, trópicos y subtrópicos del nuevo mundo), *Achaenipodium*, *Astemma*, *Leptocarpha*, *Monactis*, *Monopholis*, *Podachaenium*, *Podanthus*, *Verbesina*, *Agiabampoa*, *Alvordia*, *Lagascea*.

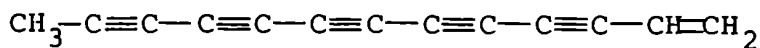
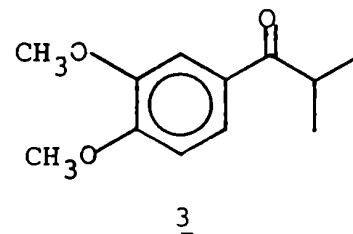
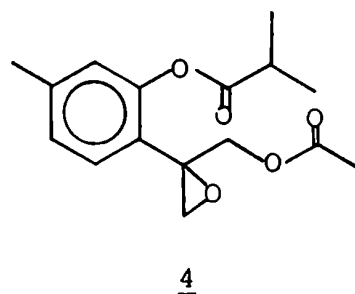
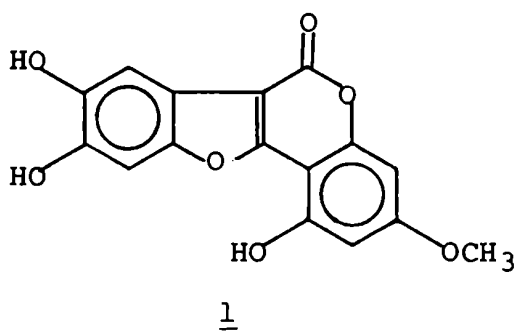
Helianthinae: *Axiniphyllum*, *Balsamorhiza*, *Chromolepsis*, *Encelia*, *Enceliopsis*, *Flourensia*, *Geraea*, *Gymnolomia*, *Haplocalymna*, *Helianthella*, *Helianthus*, *Hymenostephium*, *Jostephane*, *Pappobolus*, *Phoebanthus*, *Pionocarpus*, *Simsia*, *Syncretocarpus*, *Tetragonotheca*, *Tithonia*, *Vigethia*, *Viguiera*, *Wyethia*, *Dracopis*, *Echynacea*, *Ratibida*, *Rudbeckia*.

No hay delimitación clara entre las subtribus *Verbesininae* y *Ecliptinae*, existiendo lazos entre géneros como *Wedelia* y *Zexmenia*⁵.

GENERO WEDELIA

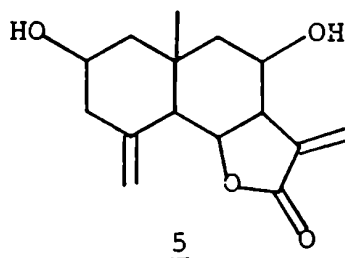
El género *Wedelia* está compuesto por setenta especies de las cuales sólo se han estudiado once, y de estas sólo una en el país. El primer estudio de una especie de este género se realizó en la India con *W. calendulacea* de donde se obtuvo la wedelolactona 1⁶. Este compuesto se encontró también en *Eclipta alba*; en ambas y en *E. erecta* se hallaron isoflavonoides, que no son frecuentes en las compuestas⁷.

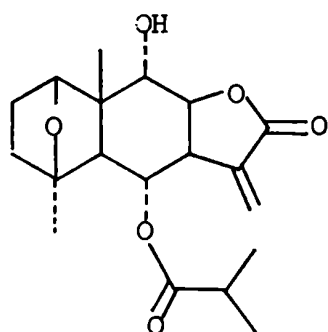
En *W. forsteriana* se identificaron compuestos poliacetilénicos como 2 y derivados aromáticos como 3 y 4, que es un éster de un epóxido del timol⁸.



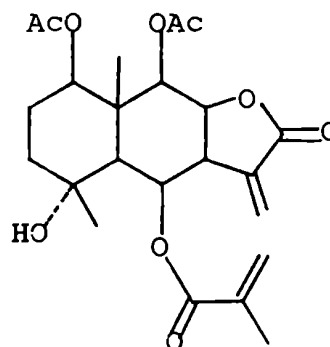
2

En *W. rugosa* se encontró ivalina 5, un eudesmanólido⁹, mientras que en *W. trilobata* se hallaron ésteres de eudesmanólidos como 6 y 7¹⁰.



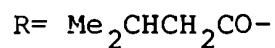
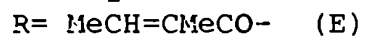
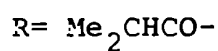
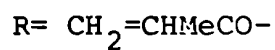
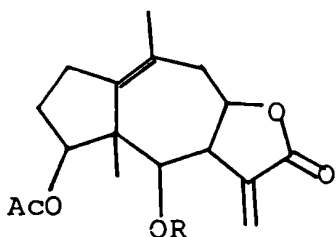


6



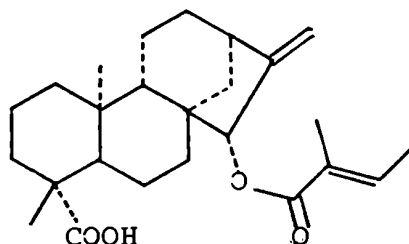
7

De *W. grandiflora* se aislaron ésteres del wedeliflórido, un pseudoguayanólido¹¹:



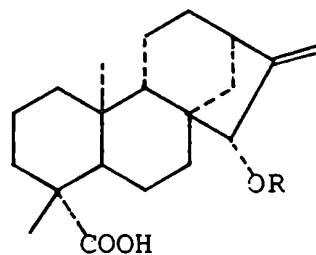
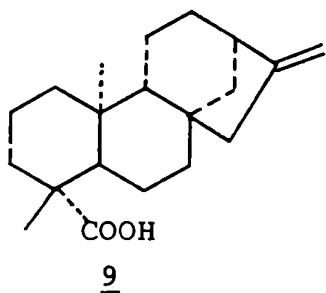
En general, las lactonas sesquiterpénicas se encuentran en pequeña cantidad, siendo más importantes los diterpenos y sus ésteres.

En *W. scaberrima* (recolectada en Brasil) se caracterizó el éster del ácido 15- α -hidroxikaurénico con el ácido tíglico 8¹².



8

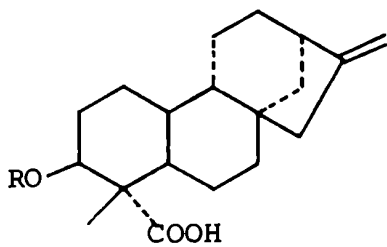
W. trilobata, *W. helianthoides* y *W. grandiflora* poseen ácido kaurénico 9, ácido grandiflorénico 10, ésteres del ácido 3-β-hidroxi-kaurénico como 11 y 12 y del ácido 15-α-hidroxikaurénico como 13, 14 y 15¹³.



13 R= PhCH=CHCO- (E) ác. cinámico

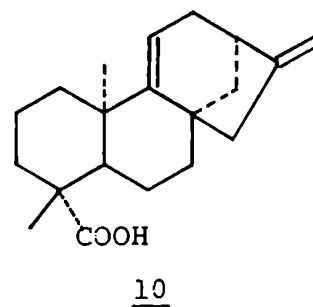
14 R= MeCH=CMeCO- (Z) ác. angélico

15 R= MeCH-CMeCO- ác. epoxiangélico

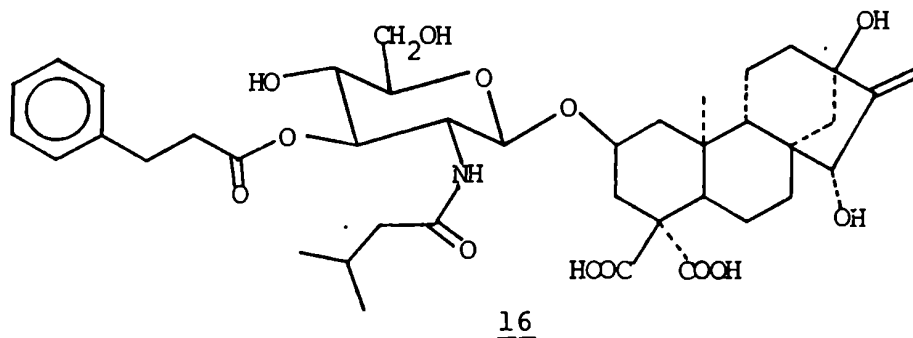


11 R= MeCH=CMeCO- (Z) ác. angélico

12 R= PhCH=CHCO- (E) ác. cinámico



Mientras *W. biflora* fue estudiada desde el punto de vista nutricional¹⁴, *W. asperima* causa gran mortandad de ovejas en Australia, y de ella se ha aislado un tóxico diterpénico que tiene la particularidad de ser un acilaminoglucósido llamado wedelósido 16¹⁵.



WEDELIA GLAUCA Y W. BUPHTHALMIFLORA

W. glauca es una planta herbácea, tóxica para el ganado e invasora para la agricultura; fue declarada plaga de la agricultura por decreto N° 8035 del 22 de agosto de 1932 que reglamentó la ley 4863.

Es una planta autóctona de la parte central de nuestro país, sur del Brasil y Uruguay, que ocasiona problemas en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fé, Córdoba, y en las zonas del noroeste que poseen irrigación. El nombre más difundido es "sunchillo", diminutivo de "sunchu" o "suncho", palabra que en quechua significa "arbusto o planta de flores amarillas", Otros nombres con que se la conoce son: yuyo sapo, flor de sapo, seca-tierra, clavel amarillo, mirasolcito, asolador, espantacolono, yerba del bicho colorado, etc. Algunos de estos nombres son usados para otras plantas que la población local confunde a veces con ésta.

Como maleza dificulta por competencia los cultivos estivales tales como maíz o maní; también es plaga de la vid y de la alfalfa. Su destrucción es difícil por la persistencia de sus rizomas que se desarrollan e invaden los campos.

Es conocida como planta tóxica desde hace mucho tiempo. Las intoxicaciones de animales por esta especie son frecuentes y están bien documentadas; sin embargo la incertidumbre acerca de qué planta ingiere el ganado y en qué época del año, ha dado por resultado informes contradictorios acerca de los animales susceptibles de intoxicación. Se ha informado la muerte por ingestión de esta planta de cabras, cerdos, ovejas, caballos y fundamentalmente bovinos; estos son generalmente los más afectados debido a que es el ganado más abundante y el que la come sin reparos. Los caballos se rehusan a comerla y preferieren morir de hambre.

En Mendoza, *W. glauca* invade los alfalfares y hace que el heno se vuelva tóxico, por contener una elevada proporción de la maleza, registrándose muertes de vacas, novillos y ovejas.

Otros informes dicen que la planta es tóxica al estado verde pero no, seca¹⁶. En nuestros días existe un cúmulo de informaciones, casos y juicios relativos a la intoxicación con *W. glauca* de vacunos¹⁷.

Giusti¹⁸ realizó experimentos farmacológicos con la planta y cocimientos, encontrando que era mortal para perros, caballos, conejos, ovinos y caprinos y que los cerdos morían cuando ingerían planta fructificada, siendo inocua en otros estadios. La conclusión de este trabajo es que existe una gran variabilidad en el efecto tóxico dependiendo de la procedencia, época del año y estadio de evolución de la planta, así como de la especie animal utilizada.

Domínguez²⁰ analizó químicamente en 1928 *W. glauca* encontrando "oxidasa, aceite esencial y una resina" y determinando que no contiene cianoglucósidos, alcaloides o saponinas.

Burkart y Carera¹⁶ postularon que la toxicidad podía deberse a la resina. Oberti, Pomilio y Gros²¹ estudiaron en 1980 el extracto de éter de petróleo de esta planta identificando los esteroides sitosterol y estigmasterol, el triterpeno β -amirina y los diterpenos ácido kaurénico 9 y ácido 15- α -cinamoiloxi-
-*ent*-kaur-16-en-19-oico 13, quedando sin estudiar el extracto polar, donde podrían encontrarse los compuestos responsables de su toxicidad.

W. buphthalmiflora es frecuente en suelos rocosos del centro de la República Argentina, encontrándose en Córdoba, San Luis, La Pampa y en las sierras de la provincia de Buenos Aires³. Esta planta, como muchas otras del género es considerada venenosa; sin embargo no se la ha estudiado desde el punto de vista químico ni farmacológico. La falta de informes sobre intoxicaciones podría deberse a que está menos distribuida que *W. glauca* y a que, a diferencia de ésta, es un arbusto sufruticoso, ramoso, con tallos ascendentes que la harían menos accesible al ganado.

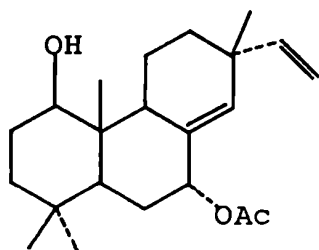
Recientemente, el Dr. Luis Ariza Espinar, de la Universidad de Córdoba, reclasificó a *W. buphthalmiflora* en base a características morfológicas exclusivamente²².

El nuevo nombre es:

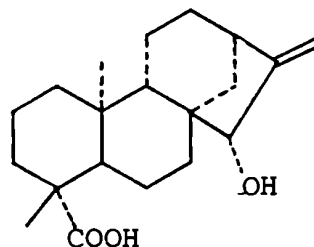
Zexmenia buphthalmiflora (Lorentz) Ariza comb. nov.

El estudio de la bibliografía del género *Zexmenia* reveló que sólo se estudiaron químicamente *Z. breviflora* y *Z. gnaphaloides* de México, *Z. hispida* de los Estados Unidos de Norteamérica y *Z. phyllocephala* de Guatemala.²⁰⁵⁻²⁰⁸

Se encontraron en estas especies fundamentalmente lactonas sesquiterpénicas, sesquiterpenos, compuestos acetilénicos, ácidos kaurénico y grandiflorénico y derivados del sandaracopimara-8(14),15-dieno como 17, pero no se informó en ningún caso la presencia de ésteres del ácido 15- α -hidroxikaurénico.



17



ácido 15- α -hidroxikaurénico

El material tipo examinado por el Dr. Ariza Espinar procedía de la provincia de Buenos Aires. Sin embargo, la mayoría de las especies del género *Zexmenia* son de zonas cálidas, concentrándose en América Central, Colombia, Venezuela, Brasil, con algunos ejemplares en Perú, Bolivia y Paraguay²³. La flora Patagónica y la de la provincia de Buenos Aires no registran, hasta el momento, ninguna especie del género; mientras que la de Entre Ríos informa sobre *Z. arnotti*, *Z. grisebachii* y *Z. hieronymii* y la de Jujuy registra *Z. brachylepis*, *Z. apensis*, *Z. aspilioides* y *Z. tenuifolia*^{24,19}. Ambas floras indican que estas especies se encuentran en zonas cálidas, siendo el límite meridional las provincias de Corrientes y Jujuy respectivamente.

La presencia de una especie de este género en las provincias de La Pampa, Córdoba y Buenos Aires, zonas templadas, es sorprendente y merece un estudio químico comparativo con las especies nortenas.

CAPITULO II

DITERPENOS TETRACICLICOS

DITERPENOS TETRACICLICOS

Los diterpenos son compuestos formados por 20 átomos de carbono que provienen de cuatro unidades de isopreno.

Dentro de éstos, los tetracíclicos constituyen un importante subgrupo que da origen a compuestos de interesantes propiedades biológicas y químicas.

Los diterpenos tetracíclicos se forman en plantas y hongos a partir del pirofosfato de geranilgeranilo 17, cuya ciclación da un intermediario estable: el pirofosfato de copalilo 18 (Fig 1). Este último tiene la particularidad de poseer la configuración 5β , 10α , inversa a la de los esteroides.

Sus derivados pertenecen a la serie *enantio* y deben nombrarse mediante el prefijo *ent-*, aunque en la práctica esta nomenclatura no es muy usada^{25,26}.

Se han postulado diversas teorías para explicar la génesis de los cuatro esqueletos básicos de la serie *enantio*: kaurano, atisano, beyerano y traquilobano (Fig 1). En general, en todas ellas interviene un intermediario catiónico como 19, por similitud con las reacciones de ciclación *in vitro* en medio ácido de geranilgeranilo y otros precursores.

En el hongo *Fusarium moniliforme* se aisló un único complejo enzimático que puede ciclar el pirofosfato de geranilgeranilo 17 a pirofosfato de copalilo 18 y éste a *ent*-kaureno²⁵.

Es de destacar que existen diterpenos tetracíclicos de configuración normal, como los derivados del filocladeno 20, que requieren una ciclación de 17 para dar intermediarios 5α , 10β ²⁷ (Fig. 1).

En general, la biosíntesis de estos compuestos no se estudió en profundidad, concentrándose los esfuerzos en la de las giberelinas (Fig. 2). Los derivados del kaureno son oxidados en C-19 hasta llegar al ácido, que luego por contracción del anillo B y oxidación, se transforman en giberelinas,

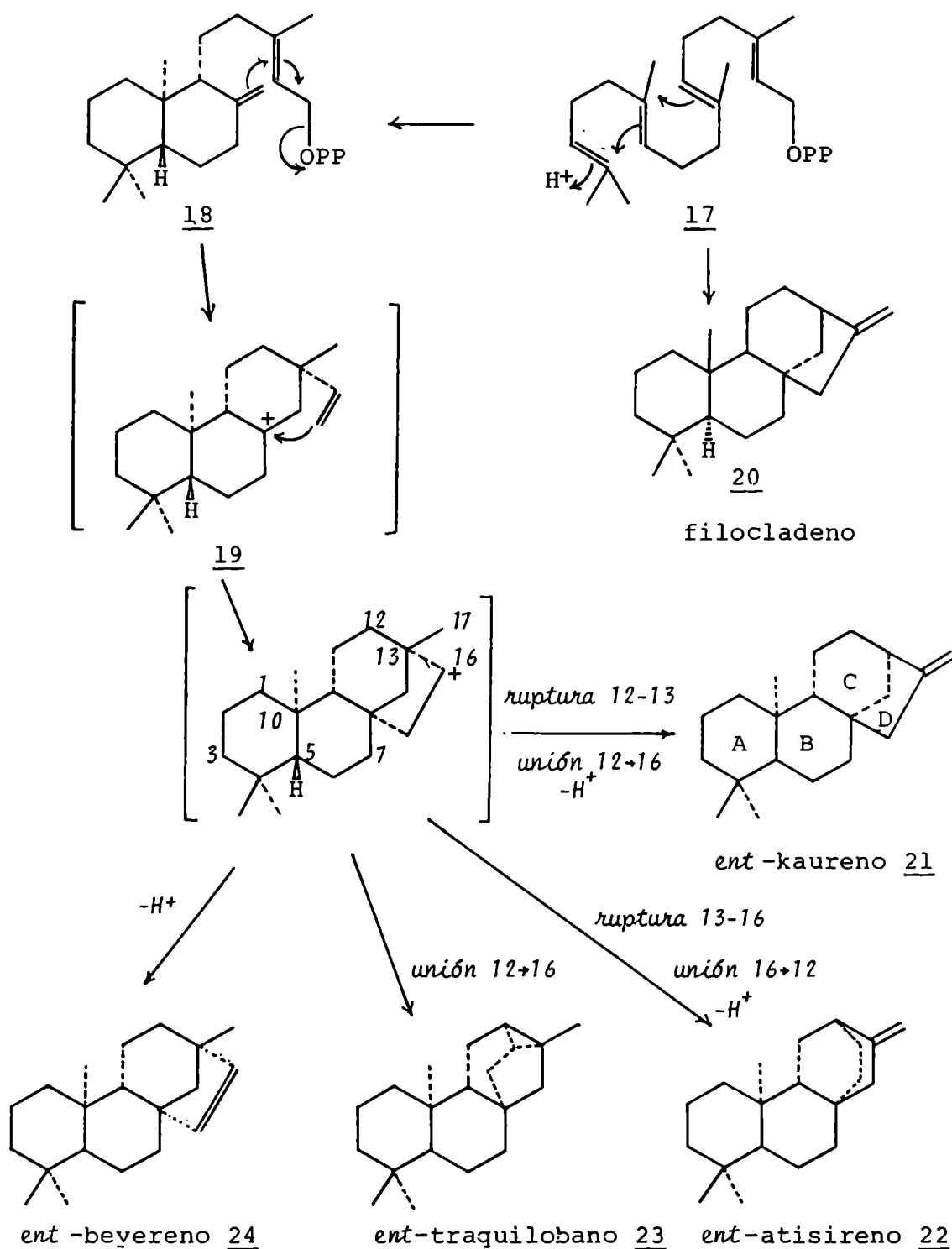


Figura 1: Biosíntesis de diterpenos tetracíclicos

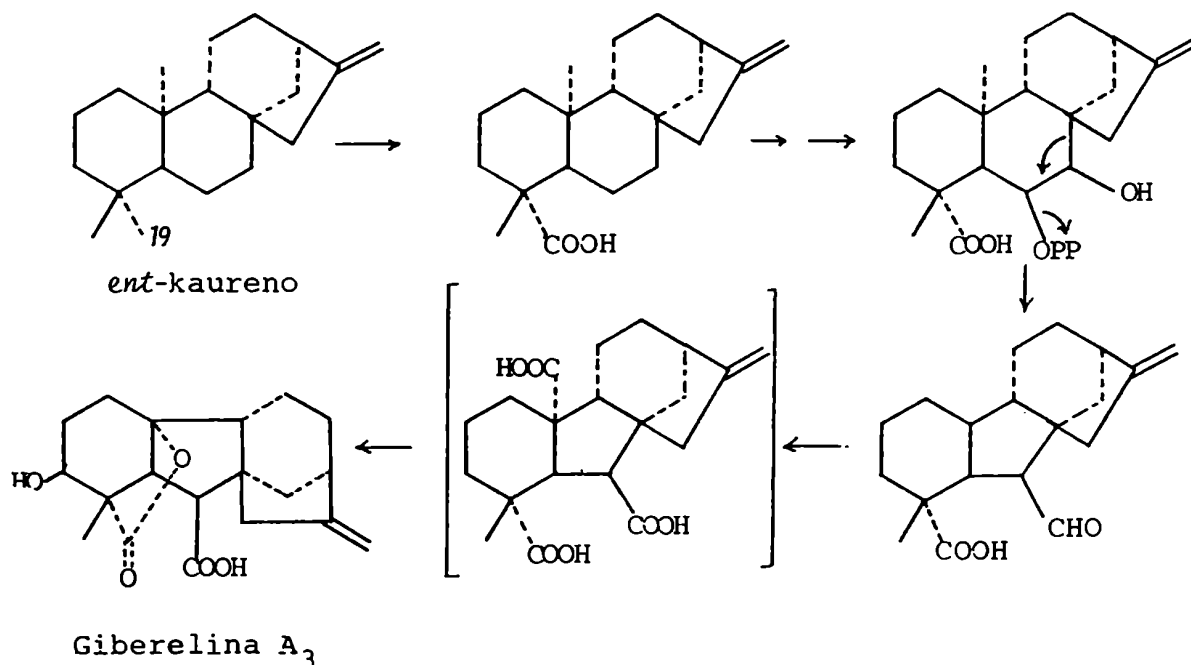
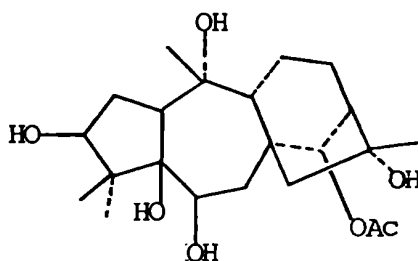


Figura 2: Biosíntesis de giberelinas.

importantes hormonas de las plantas, que estimulan el crecimiento y la floración²⁸. Si bien la primera y más abundante fuente de giberelinas es el hongo *Gibberella fujikuroi*, se las ha encontrado en pequeñas cantidades en plantas superiores²⁷.

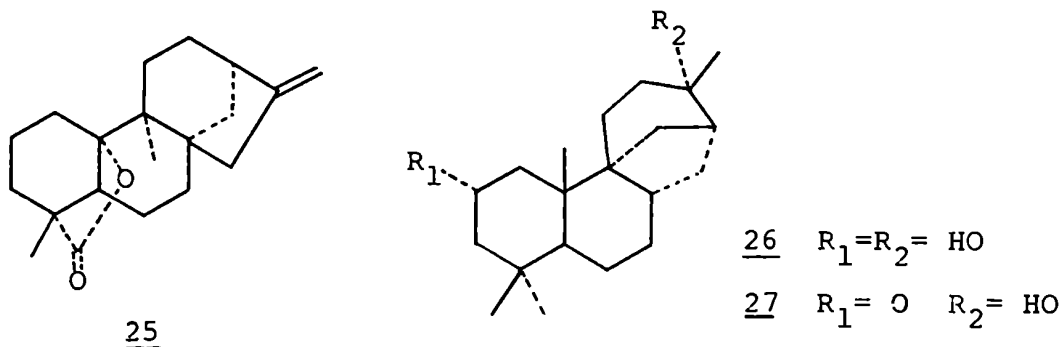
Se encuentran también compuestos naturales con esqueletos reordenados, como las grayanotoxinas, donde hay expansión del anillo B y contracción del A. La grayanotoxina 1 es el más difundido de estos agentes tóxicos, que se encuentran en especies de *Rhododendron*, *Kalmia* (*K. latifolia* = laurel de montaña) y otros miembros de las Ericáceas²⁷.



Grayanotoxina 1

La tetraquirina 25 es una lactona que se encontró en *Tetrachyron orizabaensis* (Compuestas), donde un metilo ha migrado del C-10 al C-9, con un cambio en la configuración de este último que transforma a la fusión de los anillos B/C en *trans*²⁹.

De las hojas de *Stemodia maritima* (*Scrophulariaceae*) se aislaron la estemodina 26 y la estemodinona 27 que presentan la configuración A/B *trans* (5α , 10β) y anillos C y D novedosos³⁰.



Sin embargo, los compuestos más difundidos en plantas superiores son los derivados de los esqueletos de kaureno 21, beyereno 24, atisireno 22 y traquilobano 23, generalmente con grupos alcohol, aldehído y fundamentalmente ácidos en C-18 o C-19, que además están hidroxilados en las posiciones 1,2,6,7,9,11,12,13 o 15.

La determinación estructural de los esqueletos básicos de cada serie se realizó por métodos químicos. Estudios posteriores utilizaron ^1H -RMN, pero siempre fue necesaria la interrelación química. Actualmente, cuando se aísla de una fuente natural un compuesto con un nuevo tipo de esqueleto, su estructura se confirma usualmente por cristalografía de rayos X.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

La espectroscopía de ^1H -RMN es de mucha utilidad en la determinación estructural de los compuestos derivados de los esqueletos básicos del kaureno 21, atisireno 22, beyereno 24, traquilobano 23 y filocladeno 20. Debido a su complejidad, estos esqueletos poseen un número pequeño de carbonos de cada tipo: primario, secundario o terciario; lo que permite determinar fácilmente la posición de los grupos funcionales presentes por el examen de los acoplamientos de o con los hidrógenos vecinos. Se encuentran a lo sumo dos o tres posiciones posibles, que se pueden diferenciar por otros métodos.

En general, las señales de los grupos metilo de C-4 no son afectadas por el tipo de esqueleto de la molécula, ya que los anillos A y B son idénticos en todos los compuestos.

En la serie *enantio* el grupo axial corresponde a C-19 y el ecuatorial a C-18 (Fig. 3).

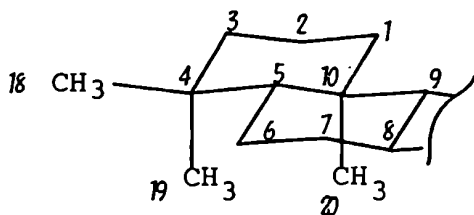
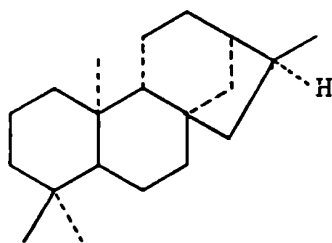
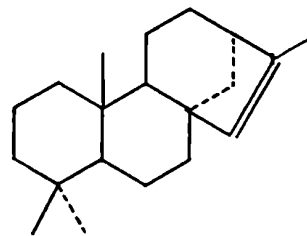


Figura 3: Anillos A y B de los diterpenos de la serie *enantio*.

En los hidrocarburos filocladeno 20, kaureno 21, traquilobano 23, beyereno 24, kaurano 28 e isofilocladeno 29 estos metilos aparecen a 0,85 y 0,81 ppm.^{34,35}.

2829

Cuando la molécula posee un grupo funcional oxigenado sobre C-4, es posible determinar si éste está ubicado en C-18 o C-19; la reducción de éste al grupo hidroximetilo da en el espectro de ^1H -RMN un sistema AB con $J \approx 11$ Hz que aparece en distintas posiciones según sea ecuatorial o axial y que además, puede confirmarse por acetilación (Tabla 1) ^{31,32,33}.

Tabla 1: Desplazamientos químicos de grupos $-\text{CH}_2\text{OR}$ (ppm.).

<u>Grupo</u>	$-\text{CH}_2\text{OH}$	$-\text{CH}_2\text{OAc}$
Axial	3,58	4,05
Ecuatorial	3,23	3,75

Por otra parte, la reducción de un grupo carboximetilo ecuatorial en C-4 a alcohol produce un desplazamiento a campos altos del metilo geminal axial de $\approx 0,4$ ppm, mientras que la misma reducción de un grupo axial ocasiona una protección del metilo ecuatorial de sólo 0,2 ppm ^{31,34}.

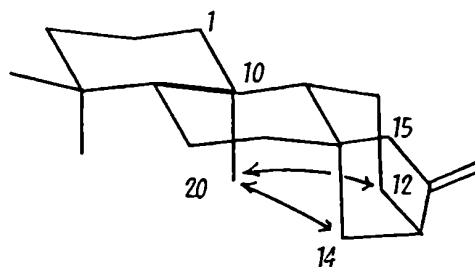
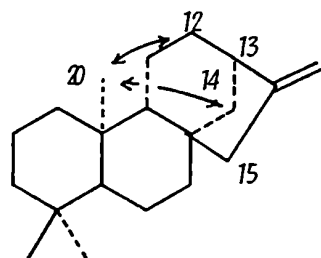
En los compuestos derivados de los cinco esqueletos básicos mencionados, que poseen un grupo oxigenado axial y un metilo ecuatorial, ambos sobre C-4, éste último posee los siguientes desplazamientos químicos: ^{33,34,36-39}

<u>Grupo axial</u>	δ_{H} <u>del Me ecuatorial</u> (ppm).
-CH ₃	0,83
-CH ₂ OH	0,92-0,96
-CH ₂ OAc	0,90-0,94
-CHO	0,99
-COOH	1,24
-COOMe	1,12-1,15

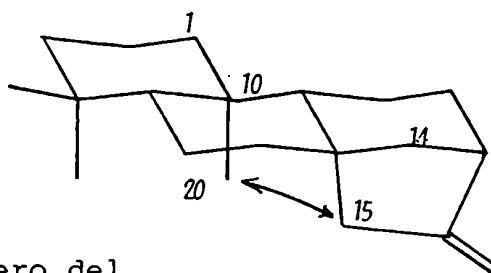
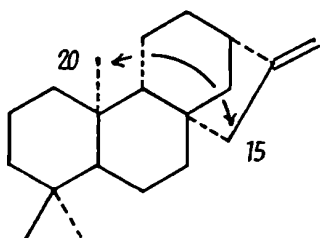
Conocido el grupo funcional oxigenado de C-19 (C-18 en la serie "normal") de un compuesto, se puede asignar fácilmente la señal del Me-18 ecuatorial, independientemente del tipo de esqueleto diterpénico, quedando en el espectro solamente la del Me-20, que puede dar indicios sobre las posibles variaciones en el anillo C.

La señal del Me-20 aparece en el espectro de ¹H-RMN del hidrocarburo kaureno 21 a 1,0 ppm, mientras que en el filocladeno 20 lo hace a 0,92 y en el dihidrofilocladeno a 0,89 ppm. Esto se debe a que en el kaureno (Anillos A,B y C con configuración *trans-anti-cis*) existe una interacción 1,3-diaxial entre Me-20 y CH₂-12 que no se encuentra en los derivados del filocladeno de configuración *trans-anti-trans*³⁴ (Fig 4). En el traquilobano 23, el Me-20 aparece a 0,94 ppm y en el atisireno 22 a 0,96 ppm, algo más desprotegido que en el filocladeno, debido a la mayor interferencia estérica entre este metilo y el CH₂-14, disminuida en parte en el traquilobano por la formación del anillo ciclopropánico^{33,40} (Fig 4).

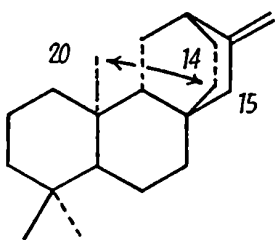
En el estaqueno o beyereno 24, el Me-20 se encuentra a 0,73 ppm, debido al efecto protector del doble enlace de C-15(16), que se halla cercano y del mismo lado de la molécula que dicho metilo. La eliminación de la insaturación por hidrogenación desprotege al Me-20 en 0,15-0,20 ppm (Fig 5).



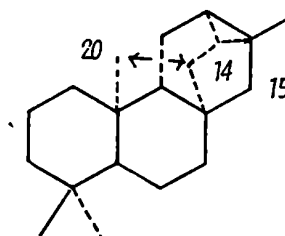
ent-kaureno 21



31 enantiómero del
(+)-filocladeno (20)



atisireno 22

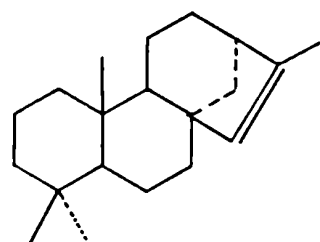


traquilobano 23

Figura 4: Interacciones espaciales del Me-20.

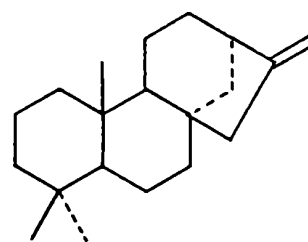
Lo mismo ocurre en el isofilocladeno 29, donde la señal de este metilo, que aparece a 0,74 ppm, se desplaza a 0,89 ppm por hidrogenación o a 0,92 ppm en el filocladeno 20.

Por otro lado, en el isokaureno 30, con el doble enlace de C-15(16) del lado opuesto de la molécula, el Me-20 aparece en la misma posición que en el kaureno y que en el kaurano 28 (Fig. 5). 27,34,35.



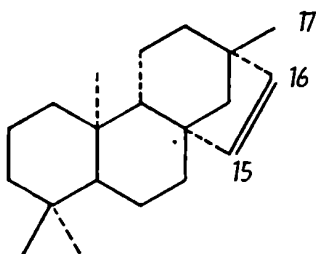
isofilocladeno 29

δ_{H} Me-20: 0,74



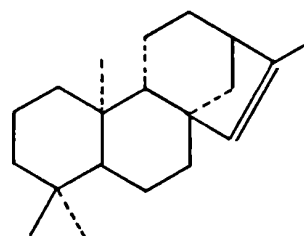
filocladeno 20

δ_{H} Me-20: 0,92



beyereno 24

δ_{H} Me-20: 0,73 (0,90)



isokaureno 30

δ_{H} Me-20: 0,83 (0,83)

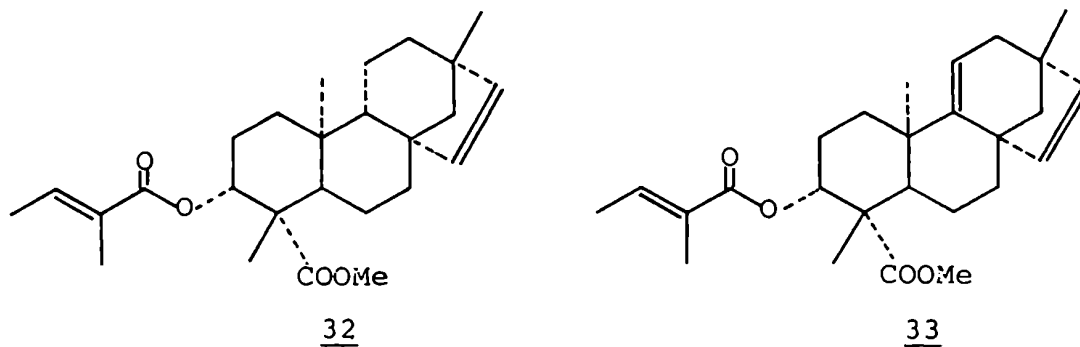
Figura 5: Efecto de la insaturación de C-15 sobre la señal del Me-20 (en ppm, se indican entre paréntesis las señales correspondientes a los compuestos hidrogenados)

La presencia de grupos oxigenados en C-19 (axial) también produce variaciones en la posición de la señal del Me-20, como puede verse en la tabla 2, para los derivados del kaureno³⁴. Es de destacar que, la metilación de un grupo carboxilo axial en C-4 produce una protección sobre el Me-20 de $\sim 0,12$ ppm, mientras que este efecto no se observa para un carboxilo ecuatorial, permitiendo así decidir la posición del sustituyente de C-4. Se supone que en la conformación más estable del grupo carboximetilo, el Me-20 se encuentra en la zona de protección del grupo carbonilo³⁴.

Tabla 2: Desplazamientos químicos del Me-20 según el grupo funcional de C-19 (en ppm).

<u>Grupo funcional</u>	δ_H <u>del Me-20</u>
-CH ₃	1,00
-CH ₂ OH	0,99
-CH ₂ OAc	1,02
-CHO	0,86
-COOH	0,94
-COOMe .	0,82

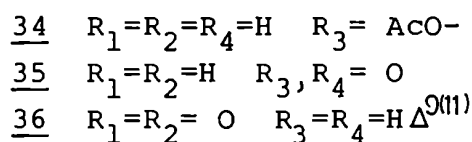
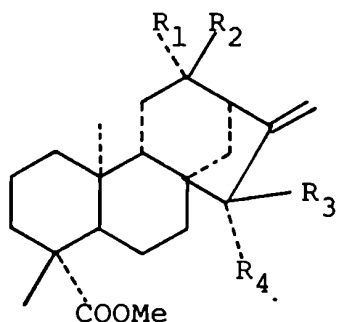
Una insaturación en C-9 produce una desprotección del Me-20 de 0,1 a 0,2 ppm³⁶ como en los derivados del ácido estaquenoico 32 y 33³⁸ (estaqueno=beyereno).



En los kaurenos, no influye sobre el Me-20 la presencia de un doble enlace en C-6 ni grupos hidroxilo o éster en las posiciones 3 α , 3 β , 15 α o 15 β .

En los derivados del kaureno 21, se encuentra que las señales de los dos H-17 dan un solo singulete ancho a 4,8 ppm, diferenciándose entre sí por introducción de grupos oxigenados en C-15. Así, por ejemplo, en el ácido 15- β -acetoxi-

- *ent*-kaur-16-en-19-oico 34 aparecen a 4,98 y 5,19 ppm, y en el 15-ceto derivado 35 a 5,2 y 5,9 ppm⁴². También en los derivados del kaureno con un grupo funcional en C-12 pueden distinguirse los H-17, como por ejemplo en el 12-cetograndifloronato de metilo 36 donde éstos aparecen como dos singuletes anchos a 5,0 y 5,26 ppm.⁴¹



En cambio, en los derivados del atisireno 22, los dos H-17 están siempre diferenciados, dando dos señales a 4,70 y 4,55 ppm, la primera como un singulete ancho o cuarteto y la segunda como un cuarteto con $J = 2$ Hz; lo cual permite distinguirlos fácilmente de los derivados del kaureno³⁷.

El filocladeno 20 se diferencia del kaureno por las señales de los hidrógenos alílicos; mientras que en el kaureno el H-13 aparece a 2,65 ppm como un singulete ancho, y los H-15 a 2,06 ppm (singulete ancho), en el filocladeno el H-13 se encuentra a 2,95 ppm (singulete ancho) y los H-15 a 2,58 (multiplete ancho).³⁴

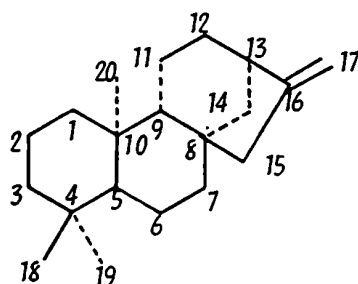
Los hidrógenos olefínicos del beyereno dan un sistema AB característico a 5,48 y 5,70 ppm con $J = 6$ Hz que, junto con la presencia del Me-17 a 1,0 ppm permite distinguir este esqueleto del kaureno y del atisireno^{27,32,38}.

Los derivados del traquilobano 23 no presentan hidrógenos olefínicos, apareciendo el Me-17 cerca de 1,10 ppm; los dos hidrógenos del anillo de ciclopropano dan multipletes entre 0,55 y 0,90 ppm, que permiten distinguir este esqueleto de los restantes^{31,33}.

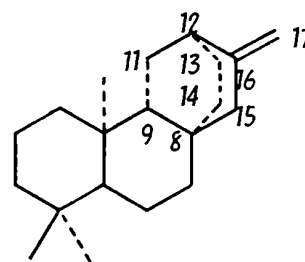
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C .

La espectroscopía de ^{13}C -RMN es de gran utilidad en el campo de los diterpenos tetracíclicos. Conocido el espectro del compuesto base, se pueden asignar las señales de cualquier derivado, comparando su espectro con el calculado usando modelos simples, obteniendo así las posiciones de los grupos funcionales de la molécula⁴³.

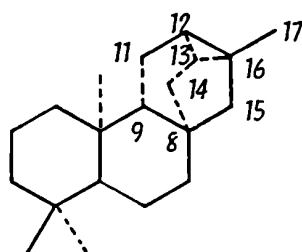
En la figura 6 se muestran los esqueletos de los compuestos de la serie *enantio* con la numeración más usada.



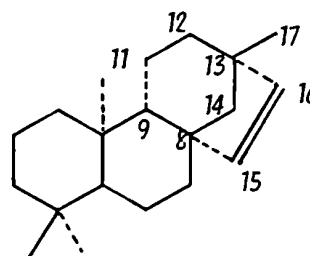
kaureno 21



atisireno 22



traquilobano 23



beyereno 24

Figura 6: Numeración de los diterpenos tetracíclicos.

El atisireno, traquilobano y beyereno presentan unión B/C *trans*, con puentes por debajo del plano de la molécula entre carbonos 8 y 12, 8 y 12 (16) y 8 y 13 respectivamente.

En el beyereno, el C-14 está por encima de dicho plano, mientras que en los otros tres restantes el C-14 está por debajo. El kaureno presenta fusión de los anillos B/C *cis*

con un puente por encima del plano de la molécula entre C-8 y C-13.

Se describen a continuación las características principales de los espectros de ^{13}C -RMN de estos compuestos, analizando las modificaciones introducidas por los grupos funcionales más comunes y las señales que permiten distinguir los distintos esqueletos.

Dada su similitud, todos los hidrocarburos presentan señales idénticas para los carbonos del anillo A y sus apéndices^{43,45,46} (Tabla 3).

Tabla 3: Desplazamiento químico de los carbonos del anillo A de los diterpenos tetracíclicos (en ppm).

	kaureno <u>21</u>	atisireno <u>22</u>	beyereno <u>24</u>
1	40,5	39,6	39,3
2	18,7	18,2	18,7
3	42,1	42,3	42,2
4	33,3	33,1	33,3
5	56,3	56,4	56,1
10	39,4	37,4	37,4
18	33,7	33,7	33,8
19	21,7	21,7	22,0

Beierbeck y Saunders⁴⁹ determinaron reglas semiempíricas para predecir el desplazamiento químico de los carbonos de hidrocarburos en ^{13}C -RMN (Tabla 4) para derivados del ciclohexano con conformación silla.

Una interacción HC se origina cuando el carbono en cuestión lleva un átomo de hidrógeno que puede tener una interacción del tipo 1,3-*sin*- diaxial con otro átomo de hidrógeno de la molécula, como en los carbonos marcados en los modelos de la figura 7. El llamado efecto "gama" consiste en la eliminación de uno de estos hidrógenos y por introducción de

cualquier grupo funcional.

Tabla 4: Valores base y efecto de las interacciones en ^{13}C -RMN, en ppm.

<u>carbono</u> primario	7,4
secundario	17,6
terciario	24,2
cuaternario	26,5
<u>por cada interacción</u>	<u>sumar</u>
HC	4,55
CC	1,85
δ	2,56

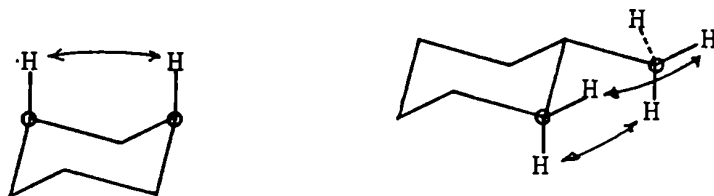


Figura 7: La interacción HC.

La interacción CC aparece cuando existe posibilidad de que los hidrógenos de los carbonos de una secuencia $\text{H}-\text{C}_\alpha-\text{C}-\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta-\text{H}$ estén próximos en el espacio. En la práctica esto ocurre cuando el primero y cuarto carbono tienen configuración *gauche* y al menos uno de ellos es exocíclico (Fig 8).

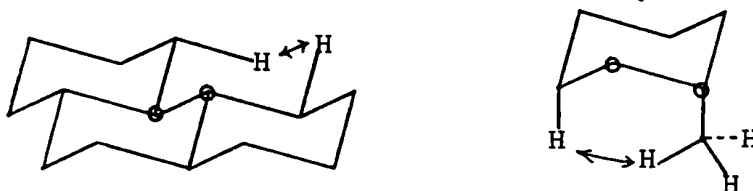


Figura 8: La interacción CC⁴⁷.

La interacción δ aparece cuando un carbono se encuentra en relación 1,3-*sin* - diaxial con otro grupo cualquiera, como el C-7 del modelo de la figura 9.

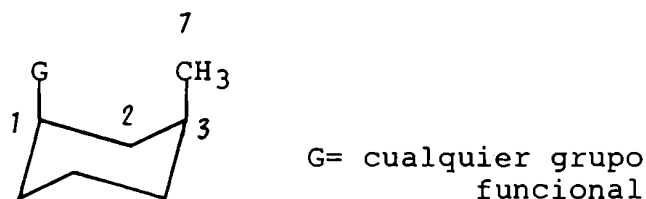


Figura 9: La interacción δ .

Si bien en los diterpenos tetracíclicos hay anillos de cinco miembros y de seis en forma bote, estas reglas permiten identificar los factores que influyen sobre la señal de un carbono de acuerdo a su entorno.

La introducción de un grupo carboxilo en C-19 trae como consecuencia cambios idénticos en todos los esqueletos, paralelos a los que ocurren al pasar de cualquier hidrocarburo al correspondiente ácido: el carbono α se desprotege ~ 10 ppm y el β se protege en 7 ppm^{44} . Tomando como ejemplo el ácido kaurénico 9, se observa que, con respecto al kaureno 21, el C-4 se desprotege en $10,8 \text{ ppm}$, pero los carbonos β , C-3 y C-5 sufren desplazamientos distintos. (Tabla 5).

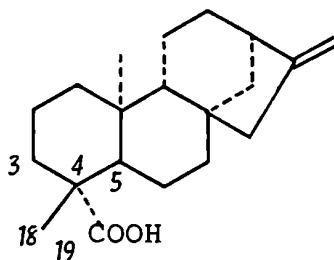


Tabla 5: Desplazamiento químico de los carbonos del anillo A de ácidos diterpénicos (en ppm).

	ácido kaurénico <u>9</u>	atisirenoato de metilo <u>37</u>	ácido traquilobánico <u>38</u>
1	41,1	39,6	39,5
2	19,8	18,8	18,7
3	38,6	38,2	37,8
4	43,8	43,8	43,7
5	57,1	57,1	57,0
10	39,9	38,2	38,9
18	29,3	28,7	28,9
19	179,9	177,7	184,7

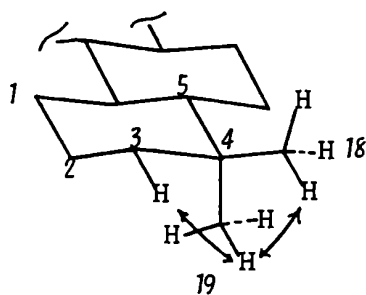


Figura 10: Interacciones HC en el anillo A de diterpenos.

La eliminación del Me-19, por transformación en la función carboxilo (Fig. 10), hace desaparecer la interacción HC de los hidrógenos de este metilo con el H-3 α ; produciendo así la protección de C-3 en 3,5 ppm. Por la misma razón que el C-3, el C-18 se protege en 4,4 ppm. En la tabla 5 se puede ver que los valores de los carbonos del anillo A en los ácidos son similares para todos los esqueletos^{31,45,46}. El H-5 no tiene interacción con los H-19 en el kaureno y por lo tanto esta transformación no afecta al C-5 que se protege solamente en 0,8 ppm.

Las señales de los carbonos 6 y 7 son poco sensibles a los cambios de esqueleto que ocurren en los anillos C y D.

Tabla 6: Desplazamiento químico de los carbonos del anillo B de diterpenos tetracíclicos (en ppm).

	kaureno <u>21</u>	atisireno <u>22</u>	ácido traquilobánico <u>38</u>	beyereno <u>24</u>
6	20,3	18,8	21,8	20,3
7	41,3	39,5	39,2	37,4
8	44,3	33,5	40,8	49,1
9	56,1	52,9	52,2	53,0
20	17,6	13,9	12,5	15,1

El C-8 varía en un rango amplio ya que es el punto donde se originan los diferentes anillos que caracterizan a cada esqueleto (Tabla 6) . En el beyereno 24 se encuentra el valor más alto (49,1 ppm), dado que está unido a un carbono olefínico (C-15) y formando parte de un anillo. La diferencia de la señal de C-8 entre el kaureno 21 (44,3) y el atisireno 22 (33,5 ppm), es paralela a la que existe en el C-1 del [3,2,1]-biciclooctano (35,2 ppm) y el del [2,2,2]-biciclooctano (24,0 ppm)⁴⁸ (Fig 11). En los compuestos naturales los valores son mayores por ser carbonos cuaternarios y por la influencia del resto de la molécula. En el ácido traquilobánico el C-8 se encuentra a 40,8 ppm, por las modificaciones introducidas por el anillo de ciclopropano.

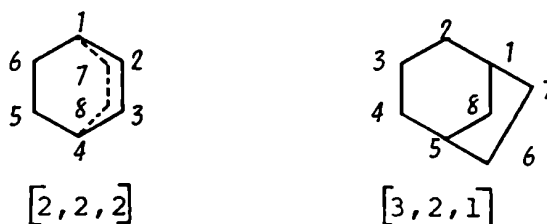
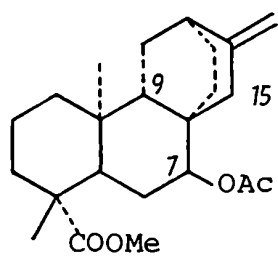
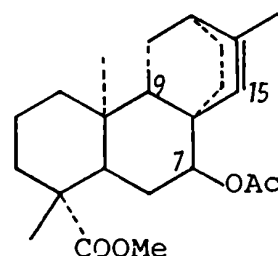
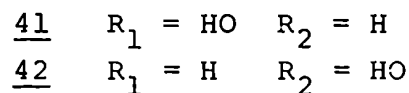
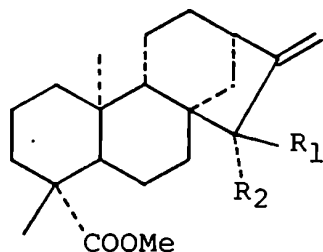


Figura 11: Numeración de los biciclooctanos.

El C-9 permanece invariable a 52-53 ppm en los compuestos con fusión B/C *trans*, mientras que en el kaureno 21 aparece a 56,1 ppm, por ser menor en este último la distancia existente entre el H-15 β y el H-9 β , lo que introduce una interacción del tipo HC de mayor magnitud. La eliminación de esta interacción en el 15- β -hidroxikaurenato de metilo 41 desplaza la señal del C-9 a 46 ppm⁴⁵. Similarmente, en el isokaureno 30 esta señal aparece a 48,2 ppm, una protección respecto al kaureno de 7,9 ppm. Al comparar el 7- β -acetoxiatisirenoato de metilo 39 con el 7- β -acetoxiisoatisirenoato de metilo 40, se observa que no se protege el C-9, indicando que el H-15 β y el H-9 no estaban en 39 en posición favorable para contribuir con una interacción HC al valor de la señal del C-9, posiblemente por deformaciones del anillo C⁴⁶.

3940

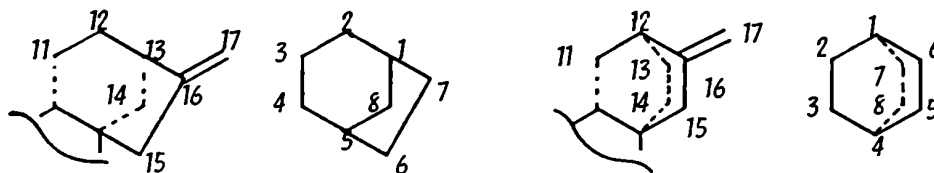
El C-20 aparece en el kaureno 21 a 17,6 ppm, mientras que en el ácido traquilobánico 38 lo hace a 12,5 ppm y en el atisireno 22 a 13,9 ppm. Esto se debe a que, como ya se mencionó anteriormente, en el kaureno el Me-20 tiene dos interacciones δ con los metilenos 12 y 14, mientras que en el atisireno

y traquilobano sólo existe una con el metileno 14. En el beyereno 24 la posición de este metilo es intermedia, aunque no se ha cuantificado la interacción δ con un carbono olefínico y nada se puede afirmar sobre la causa de este desplazamiento.

En los carbonos de los anillos C y D se encuentran diferencias significativas que permiten distinguir los diferentes tipos de esqueletos. Los carbonos olefínicos del atisireno 22 se diferencian poco de los del kaureno 21, y en ambos son alterados por funcionalidad en otras partes de la molécula; no son de utilidad para el diagnóstico del tipo de esqueleto, pero sí lo son, los otros carbonos de los anillos C y D. Las diferencias entre el kaureno y el atisireno se explican bien recurriendo a los compuestos modelo $[2,2,2]$ - y $[3,2,1]$ -biciclooctano (Tabla 7) ⁴⁸.

Tabla 7: Desplazamiento químico de los carbonos de los anillos C y D de 21 y 22 comparados con los de los biciclooctanos (en ppm).

	<u>21</u>	$[3,2,1]$	<u>dif.</u>	<u>22</u>	$[2,2,2]$	<u>dif.</u>
11	18,2	3 19,1		28,7	2 26,0	
12	33,3	2 32,8		36,6	1 24,0	12,6
13	44,0	1 35,2	8,8	28,7	7 26,0	
14	39,9	8 39,7		27,4	8 26,0	
15	49,2	6 28,9	20,3	48,4	5 26,0	22,4
16	156,0			152,7		
17	102,8			104,2		

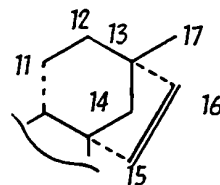
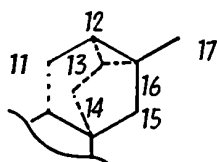


Se observa en la tabla 7 que todos los carbonos de los anillos C y D del kaureno y del atisireno son cercanos a los modelos, excepto los que están α a los dobles enlaces: 13 y 15 para el kaureno y 12 y 15 para el atisireno.

Al pasar del ciclopentano al metilenciclopentano el C- α al doble enlace se desprotege en ~ 7 ppm⁴⁴, lo que explica la dif.= 8,8 ppm del kaureno. En forma similar, al comparar el ciclohexano con el metilenciclohexano el C- α se desplaza en $\sim +11$ ppm⁴⁴, mientras que el C-12 del atisireno tiene dif.= 12,2 ppm. Si a estos desplazamientos se suman alrededor de 10 ppm, provenientes de las dos interacciones HC entre H-7 α e H-15 α y entre H-7 β e H-15 β , se explican las posiciones de los C-15 en ambos compuestos.

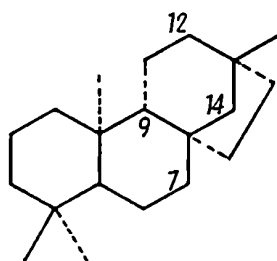
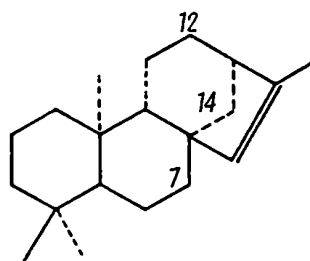
Tabla 8: Desplazamiento químico de los carbonos de los anillos C y D de 38 y 24, en ppm.

	ácido traquilobánico <u>38</u>	beyereno <u>24</u>
11	19,7	20,5
12	20,6	33,7
13	24,3	43,6
14	33,1	61,3
15	50,4	135,2
16	22,4	136,1
17	20,6	25,0



La formación del anillo ciclopropano en el traquilobano 23, trae aparejados diversos cambios respecto del atisireno 22. La desaparición del doble enlace exocíclico y la aparición del Me-17, en general a 20 ppm, es el rasgo distintivo de este esqueleto. El C-16 se encuentra entre 20 y 24 ppm, un valor muy bajo para un carbono cuaternario, que usualmente se encuentra entre 30 y 40 ppm, lo que tiene valor diagnóstico indicando la presencia de anillo ciclopropano. También C-13 y especialmente C-12 se desplazan a campos altos, el último por la desaparición de la olefina. El C-14 aparece a campos más bajos ya que ahora forma parte de un anillo de cinco miembros.

En el beyereno 24, el Me-17 se encuentra a 25 ppm y los carbonos olefínicos a 135,2 y 136,1 ppm, característicos de este tipo de sustitución. El C-13 aparece ahora a campos más bajos por estar α al doble enlace, casi como en el kaureno; al cual se parecen además los carbonos 11 y 12. El C-14 se encuentra en el beyerano 43 a campos anormalmente bajos: 57,7 ppm⁴⁸ y se desplaza más aún por influencia del doble enlace en el beyereno hasta 61,3 ppm. En el isokaureno, por el contrario, el C-14 aparece a 39,7 ppm. La diferencia estriba en que el C-14 del beyereno tiene interacciones HC entre su hidrógeno β y los hidrógenos: 7 β , 9, 12 β y 17 y entre el H-14 α y 7 α y 17, mientras que en el isokaureno 30, debido a que el anillo C es *cis* al B, sólo existe interacción HC entre el H-12 α y el H-14 α y entre el H-14 β y el 7 α .

4330

Esta señal también es diagnóstica de este tipo de esqueleto, ya que son pocas las que aparecen a campos tan bajos para un carbono sin funcionalizar.

El problema más frecuente en este campo es la determinación de la posición de un grupo hidroxilo (libre o acilado), que se puede resolver aplicando reglas sencillas.

Como modelo de las modificaciones producidas por un grupo hidroxilo, podemos considerar los cambios ocurridos al pasar del *t*-butilciclohexano al *cis* o *trans* 4-*t*-butilciclohexanol y del ciclohexano al ciclohexanol⁴⁴ (Tabla 9).

Tabla 9: Desplazamientos producidos por la hidroxilación en anillos de cinco o seis miembros, en ppm; un valor negativo indica protección.

	ciclohexano HO- ecuatorial	ciclohexano HO- axial	ciclohexano ciclohexano
C- α	+43	+38	+48
C- β	+ 8	+ 5	+10
C- γ	- 1,1	-6 a -7	- 1,9

En los derivados del ciclohexano el efecto γ de -6 a -7 ppm se debe a la eliminación de una interacción HC. Usando las reglas de Beierbeck⁴⁹, se puede generalizar que aquellos carbonos γ que tengan interacción HC con el que lleva el hidroxilo axial estarán protegidos en ~ 5 ppm, mientras que los carbonos γ a un hidroxilo ecuatorial sufren un efecto de protección de 1,3 ppm, sólo si este carbono es *anti* al hidroxilo. Además, un grupo hidroxilo produce un efecto δ análogo al ya mencionado, de un valor cercano a +2,8 ppm⁴⁹.

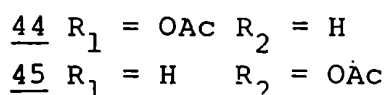
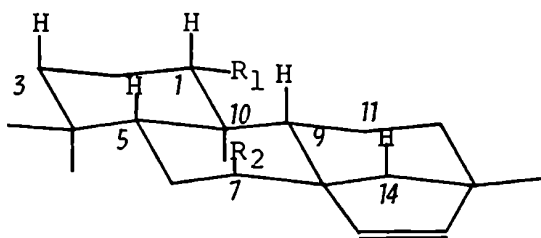
En la tabla 10 se dan los valores de desplazamiento químico de los carbonos afectados por introducción de un hidroxilo en posición 15 del kaurenato de metilo 9a⁴⁵.

Tabla 10: Desplazamiento químico de algunos carbonos de 9a, 42 y 41 (en ppm), se indican las diferencias con 9a.

	kaurenato de metilo	15- α - HO- kaurenato de metilo	dif.	15- β - HO- kaurenato de metilo	dif.
	<u>9a</u>	<u>42</u>		<u>41</u>	
7	41,4	36,6	-4,8	36,8	-4,6
8	44,4	48,2	3,8	46,3	1,9
9	55,1	54,0	-1,1	46,0	-9,1
14	39,8	36,2	-3,6	39,4	-0,4
15	49,1	82,6	33,5	82,2	33,1
16	155,7	161,1	5,4	159,6	3,9
17	103,6	107,8	4,2	104,4	0,8

Tanto en 41 como en 42, el C-15 se desprotege en ~ 33 ppm, valor menor que el correspondiente a un ciclopentano debido a las diferencias que presentan los anillos C y D del kaurenato con respecto al modelo. Los C- α 8 y 16 se desprotegen, aunque C-8, en 41, en pequeña proporción. En 42, se protegen C-7 y C-14 debido a la eliminación de interacciones HC entre H-15 α e H-7 α y, entre H-15 α e H-14 β . El C-9 se protege en -1,1 ppm pues se puede considerar que tiene relación γ *anti* con el hidroxilo 15 α . En el derivado 41 se protege el C-7 por eliminación de la interacción HC entre el H-7 β e H-15 β , el C-14 en 0,4 ppm por interacción γ *anti* y el C-9 en 9,1 ppm por eliminación de la interacción HC entre H-15 β e H-9.

La acetilación de un alcohol secundario produce un desplazamiento a campos bajos del C- α de 1,5-4 ppm y de los C- β a campos altos de $\sim 1-5$ ppm⁴⁴, pero, con respecto al hidrocarburo de partida, estos últimos siguen estando desprotegidos.

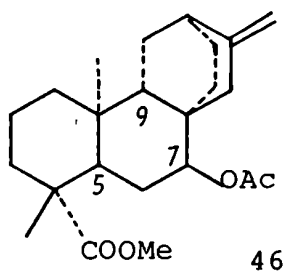


En el beyereno⁴³, un grupo acetoxilo en C-1 α , 44, produce un desplazamiento del C-1 típicamente ecuatorial (+42,7 ppm) y de los C- β de +6,5 (C-2) y +4,7 (C-10) ppm.

El efecto sobre los carbonos γ , 3,5 y 9, es pequeño, ya que sigue existiendo la interacción HC entre H-1 β e H-3 β , H-5 e H-9.

Los carbonos *anti* al acetoxilo se protegen: C-3 en 2,7 ppm y C-5 en 0,9 ppm, no así el C-9 que es *gauche* (-0,1 ppm).

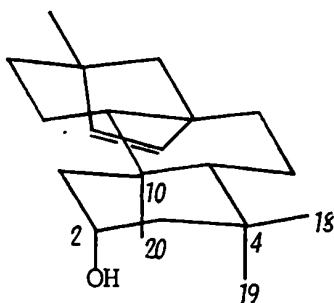
El C-11 se desprotege en 2,3 ppm ya que está en relación δ con el grupo acetilo.



En un derivado del beyereno con acetoxilo en C-7, si este último es axial, 45, se produce un desplazamiento de 38,8 ppm (típicamente axial), de 5,2 ppm en C-6 (C- β) y de 3,7 ppm en C-8 (C- β). Los carbonos γ se protegen por eliminación de interacción HC: el C-9 en 4,4 ppm, el C-14 en 4,3 ppm y el C-5 en 8,0 ppm; lo que indica un cierto grado de plegamiento en el anillo B del compuesto original (beyereno).

Lo mismo ocurre en el derivado del atisireno 46, pues el C-5 se protege en 8,0 ppm respecto al ácido atisirenoico, mientras que el C-9 lo hace sólo en 4,9 ppm⁴⁶.

Es interesante el caso del beyereno con hidroxilo axial en C-2, 47; el efecto α es 48,8 ppm, el β (C-1) 6,6 y el β (C-3) 4,4 ppm. Sobre los C- γ , 4 y 10, no hay hidrógenos axiales sino metilos; por lo tanto estos carbonos no se afectan por la eliminación del H-2 axial y varían respecto al beyereno en -0,7 y -0,1 ppm respectivamente. En cambio, los metilos 19 y 20 sufren un efecto δ de +3,0 y +2,7 ppm, mientras el C-18 casi no resulta afectado (-0,4 ppm)⁴³.

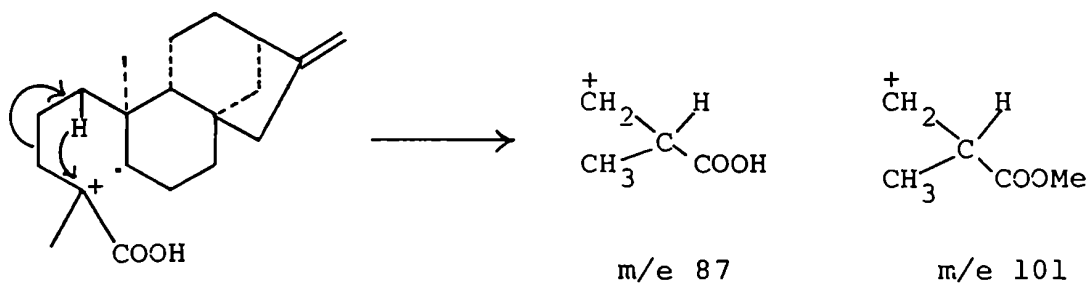


47

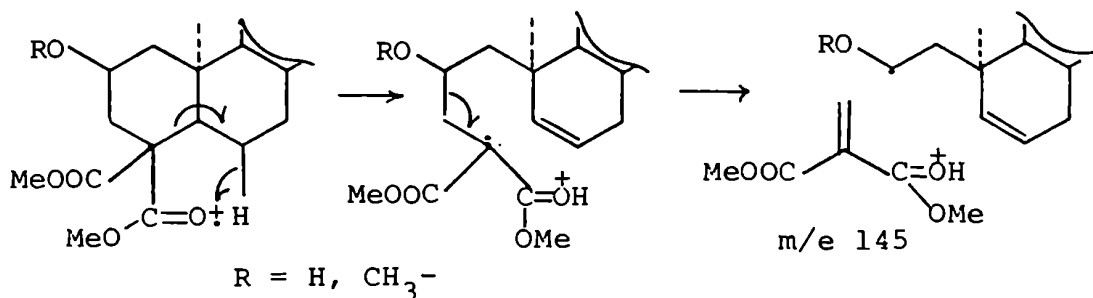
Espectrometría de masas.

En general, este método es de poco valor en la elucidación estructural y su uso se limita al informe del ión molecular (a veces de alta resolución). Se pueden observar usualmente, las pérdidas de agua provenientes de alcoholes, o de ácido acético en los acetatos. Los grupos carboxilo originan pérdidas de agua, grupo carboxilo o ácido fórmico, que son diagnósticos del grupo funcional³⁹. Se conoce un trabajo sobre E.M. de derivados del ácido 18-kaurénico, pero sus conclusiones no son de mucha utilidad y los mecanismos no han sido corroborados por métodos de marcación isotópica⁵⁰.

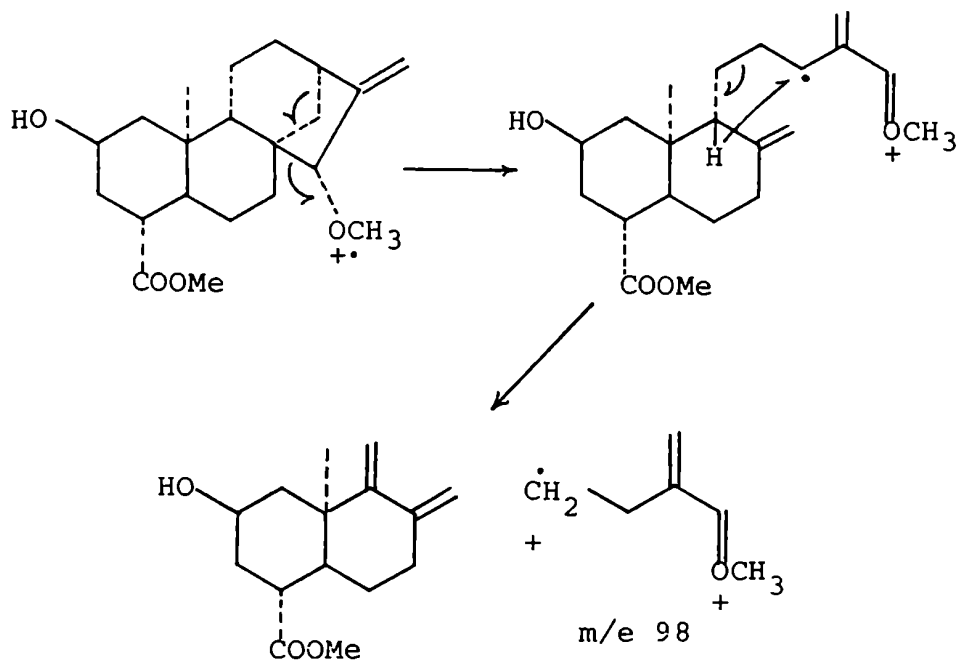
La ruptura de mayor valor diagnóstico es la que origina el ión a m/e 87 en los ácidos (m/e 101 en los ésteres metílicos), que señala la presencia de un grupo carboxilo geminal a un metilo, sobre C-4 :



Si un compuesto oxigenado en C-2 posee dos grupos carboximetilo sobre C-4, aparece un ión intenso a m/e 145 cuya formación se postuló de la siguiente manera^{51,52}:



La presencia de un ión a m/e 98 en derivados del kaureno es diagnóstico de una función 15-metiléter⁵³:



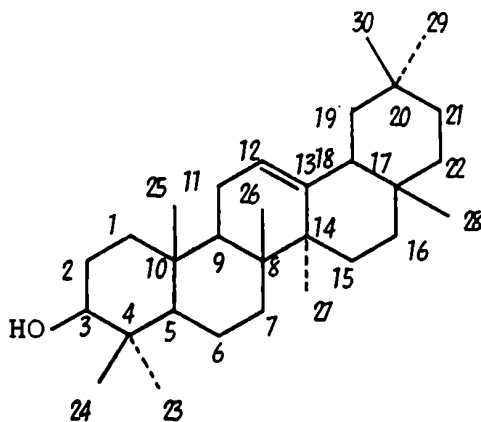
CAPITULO III

SAPONINAS TRITERPENICAS

SAPONINAS TRITERPENICAS

Las saponinas son un grupo de productos naturales que se caracterizan por formar abundante espuma cuando se agitan en una solución acuosa. Son glicósidos que por hidrólisis liberan una o más (hasta doce) unidades de azúcar y una aglicona que se suele llamar sapogenina. Si bien los métodos químicos y espectroscópicos aplicados a su elucidación estructural son comunes a todos los glicósidos, serán tratados aquí con preferencia aquellos derivados de los triterpenos pentacíclicos.

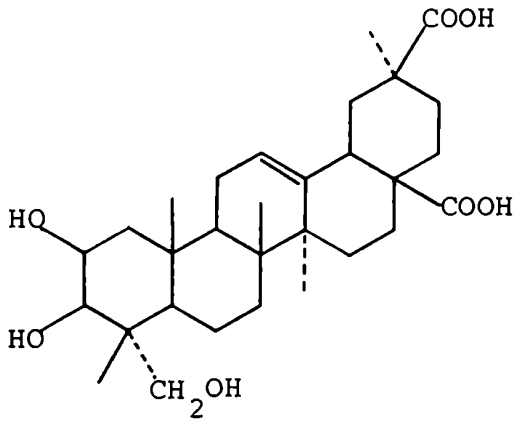
Las saponinas triterpénicas están muy ampliamente distribuidas en el reino vegetal, encontrándose en más de noventa familias de plantas. Las sapogeninas derivadas de la β -amirina (esqueleto de Δ^{12} -oleaneno) 48 son las de más frecuente aparición y las que más variedad presentan⁵⁴.



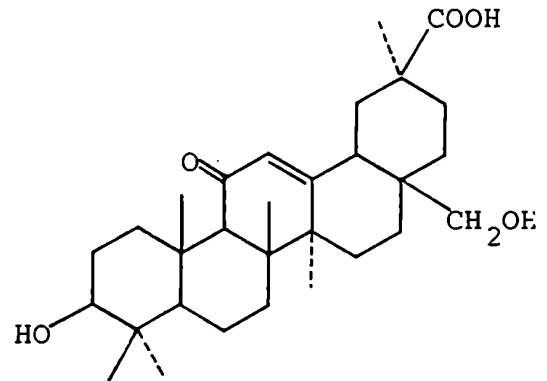
β -amirina 48

A la insaturación de C-12 pueden agregarse otras en los carbonos 9(11) o 15, un grupo ceto en C-11, grupos aldehído sobre C-23 o C-30 y grupos carboxilo en C-28, -29 o -30. También existen agliconas hidroxiladas en las más

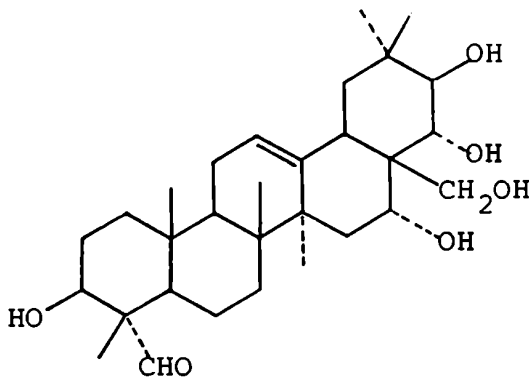
variadas posiciones (además de C-3): 1,2,5,6,15,16,19,21,22, 23 o 28. Algunos ejemplos son⁵⁴⁻⁵⁶:



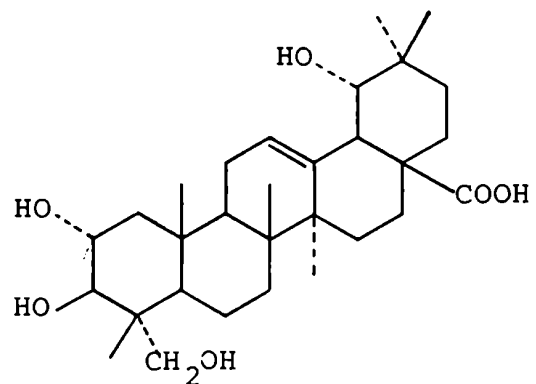
Acido jaligónico



Acido 28-hidroxiglicirrético

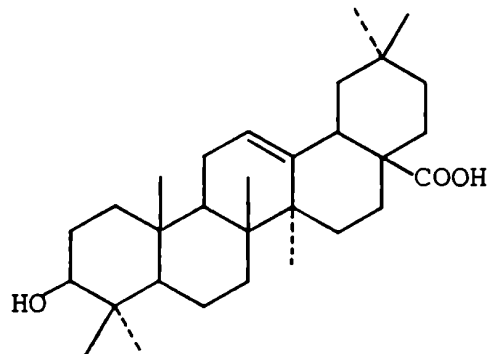


Teasapogenol E

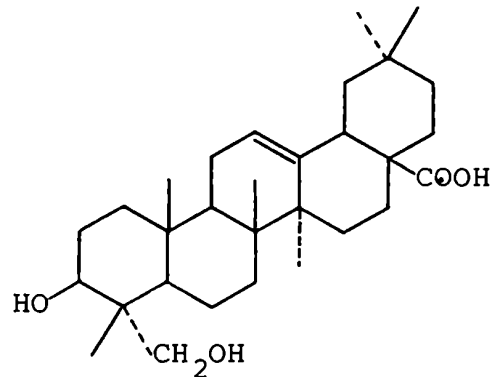


Arjungenina

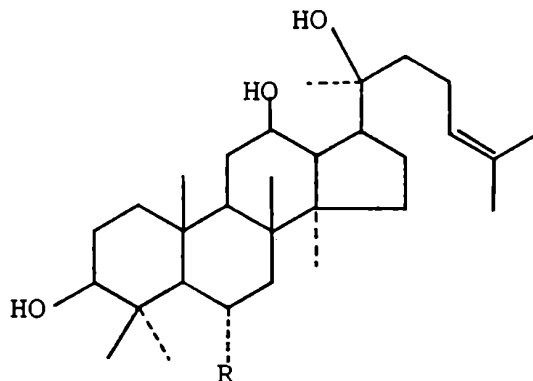
Pero mucho más frecuentes son las agliconas más simples, como:



Acido oleanólico 49



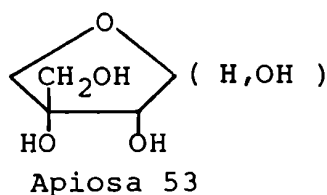
Hederagenina 50



51 Protopanaxadiol R = H

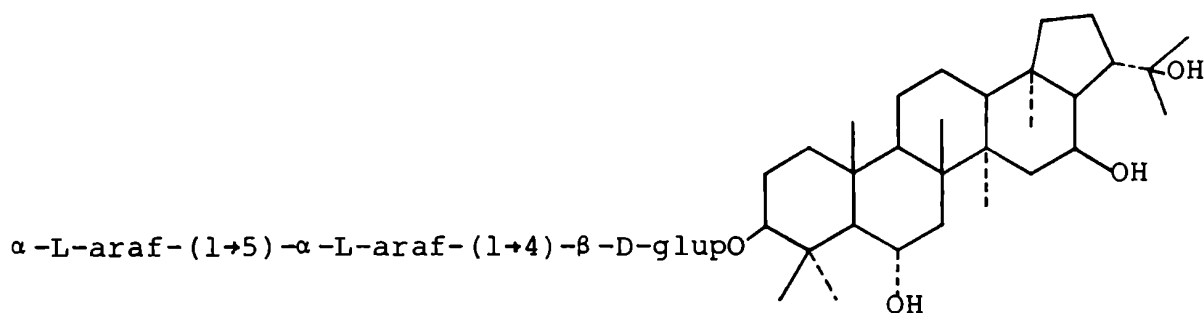
52 Protopanaxatriol R = OH

Los azúcares más comunes que se han encontrado formando parte de las saponinas vegetales son (se indica en cada caso la configuración del carbono anomérico) : α -L-ramnosa, β -D-glucosa, β -D-galactosa, ácido β -D-glucurónico, β -D-ribosa; α -L-arabinosa, β -D-fucosa y β -D-xilosa; apareciendo ocasionalmente la 3-metilglucosa, quinovosa (6-desoxiglucosa) y apiosa 53.



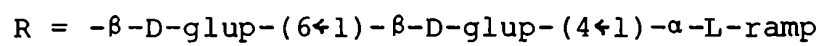
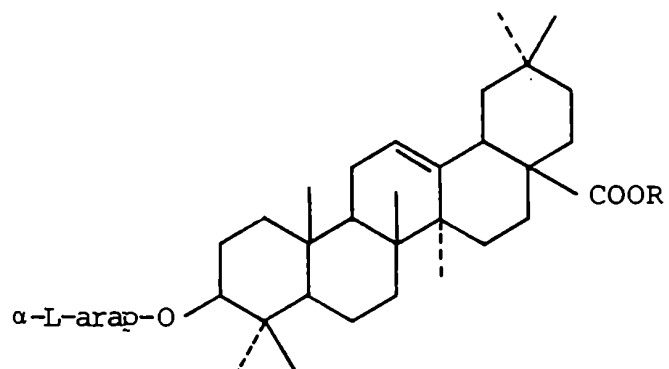
En las saponinas derivadas de triterpenos pentacíclicos, las cadenas de hidratos de carbono están unidas al HO-3 de la aglicona en todos los casos, a través de una unión glicosídica; a veces también al grupo carboxilo 28 por una unión éster con el hidroxilo anomérico del primer azúcar de la cadena, aún cuando haya otros grupos hidroxilo o carboxilo disponibles en otras posiciones de la molécula.

Sólo recientemente, con el uso extendido de métodos espectroscópicos se ha investigado convenientemente la configuración de los enlaces glicosídicos y la conformación de los anillos. En prácticamente todos los casos los azúcares están en la forma piranósica C1, o bien 1C en los azúcares de la serie L. La L-arabinosa suele encontrarse tanto en la forma piranósica como en la furanósica:

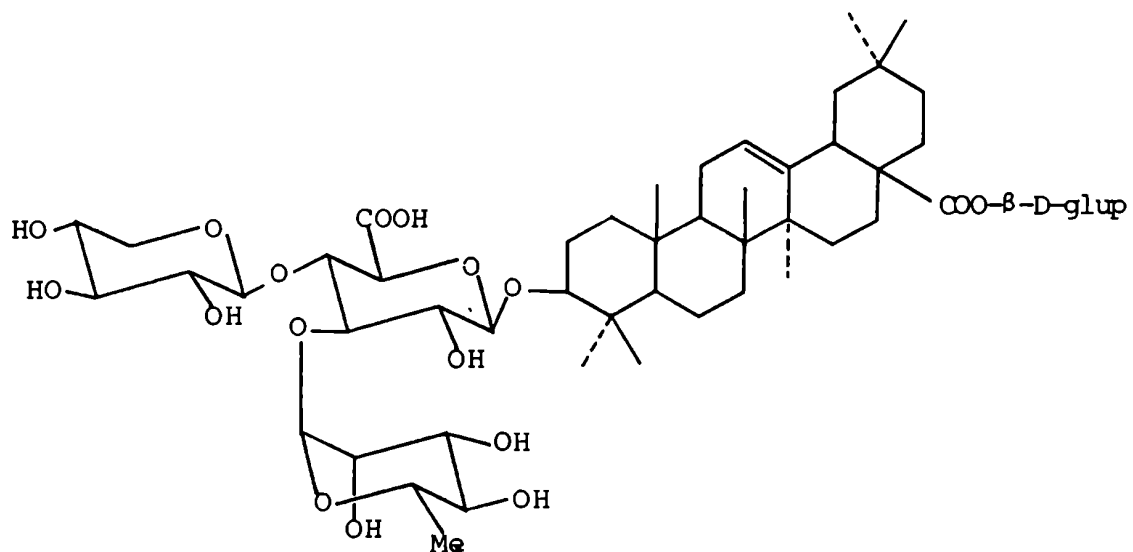


Molugocina A
de *Mollugo hirta*⁵⁸

Existe una tendencia a que las pentosas y la ramnosa ocupen una posición más alejada de la aglicona, cuando están presentes las hexosas o los ácidos urónicos⁵⁶, como por ejemplo en el Caulósido D, aislado de *Caulophyllum robustum* y en el Putranósido D, de *Putranjiva roxburghii*⁵⁴:

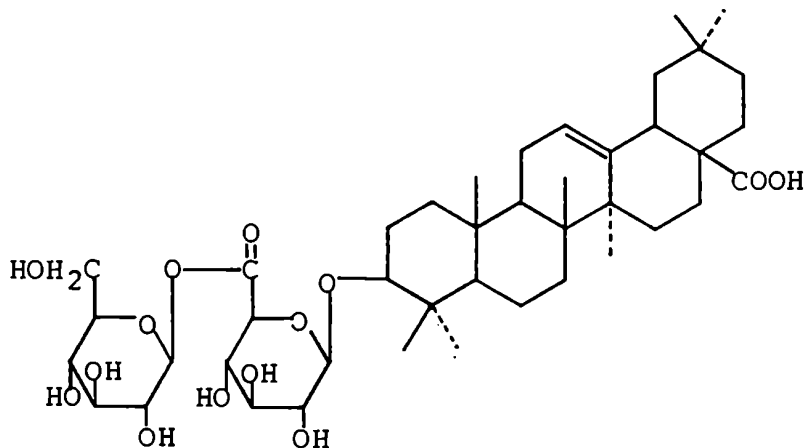


Caulósido D



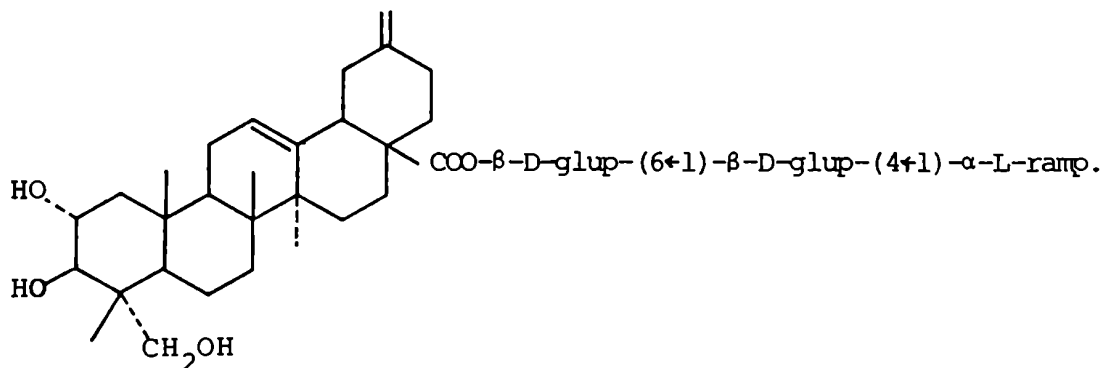
Putranósido D

Se encontró un caso de una unión éster entre el carboxilo de un ácido glucurónico y el hidroxilo anomérico de otro azúcar⁵⁷:



Chikusetsusaponina II de *Panacis japonici*⁵⁷

Más raras son las saponinas con el HO-3 libre y glicosidadas en el carboxilo 28, como por ejemplo 54, que además presenta la característica de tener una aglicona de 29 átomos de carbono, el ácido norarjunólico⁵⁴:



Métodos separativos.

Se han usado todas las variantes de métodos separativos para aislar y purificar saponinas. Cuando existe un producto mayoritario, el aislamiento se realiza por disolución de un extracto en metanol y reprecipitación con éter etílico repetidas veces. Para mezclas complejas se recurre a la cromatografía en placa o columna de silicagel, celulosa o poliamida.

Se usaron también: DEAE-Sephadex, resinas de intercambio iónico y electroforesis en papel^{54,56,59}.

Un nuevo método que ha dado excelentes resultados es la cromatografía en contracorriente a gotas (DCCC, del inglés: droplet counter-current chromatography), que es un refinamiento del clásico método de extracción en contracorriente. La separación ocurre por distribución de los componentes de la muestra entre una fase fija y otra móvil, siendo ambas la fase superior e inferior de un sistema bifásico obtenido por mezcla de solventes adecuados. La fase fija está contenida en 300 a 600 tubos de 2 a 4 mm de diámetro y 30 cm de altura, mientras la móvil asciende o desciende (de acuerdo a la densidad relativa) a través de la anterior en forma de pequeñas gotas.

Sus ventajas son la excelente resolución, la ausencia de emulsiones, ya que en ningún momento se agitan las fases, y el hecho de que no existe una fase sólida polar que retenga las sustancias por adsorción ocasionando pérdidas de material.

El análisis del eluido se realiza por pesada de las fracciones obtenidas, cromatografía en placa delgada, ultravioleta, etc.

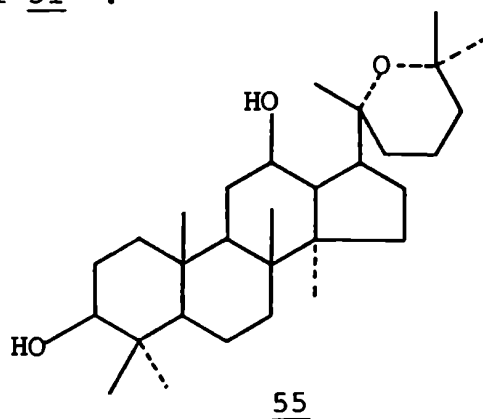
El fraccionamiento por DCCC de un subextracto de *Hedera helix* (*Araliaceae*), con HCCl_3 -MeOH- H_2O , 7:31:8, usando como fase móvil la inferior no polar, permitió obtener cuatro saponinas puras, derivadas de la hederagenina 50. El tiempo de separación , para 1,2 g de extracto, fue de 23 hs y el volumen total de de fase móvil utilizado fue de 300 ml⁶⁰⁻⁶².

La homogeneidad del glicósido aislado se prueba por sus propiedades físicas (punto de fusión, poder rotatorio), cromatografía en capa delgada y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sin embargo, es frecuente encontrar mezclas de saponinas que se comportan como sustancias puras de acuerdo a los criterios anteriores; la espectroscopía de ^{13}C -RMN es de fundamental importancia en estos casos para asegurar la pureza de la muestra⁶⁴.

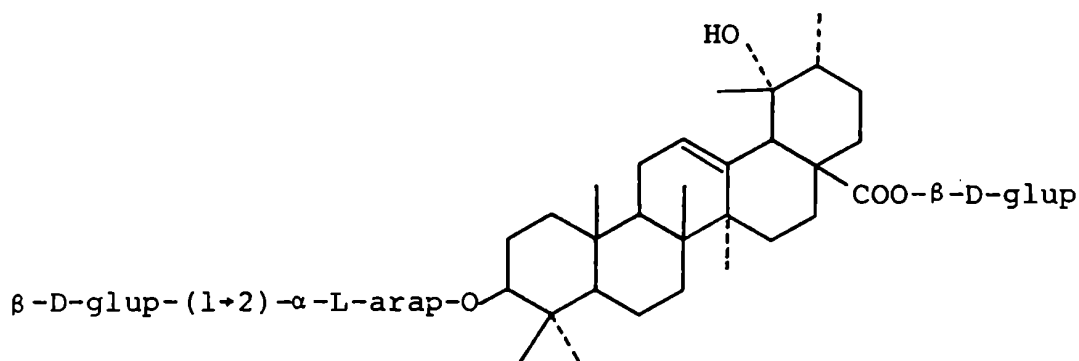
Estudio químico.

El estudio químico de las saponinas comienza por la hidrólisis, para identificar la aglicona y los azúcares.

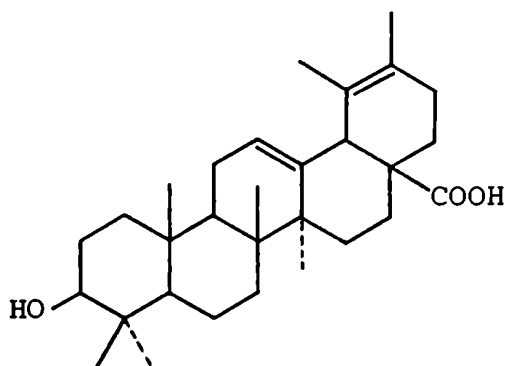
Generalmente se realiza en medio ácido acuoso con agregado de algún cosolvente como alcoholes, ácido acético o tetrahydrofurano. Es frecuente la aparición de compuestos artificiales provenientes de la aglicona. Uno de los casos más conocidos es el panaxadiol 55, obtenido por ciclación durante la hidrólisis de glicósidos del *Ginseng*, cuya aglicona es en realidad el protopanaxadiol 51⁵⁴.



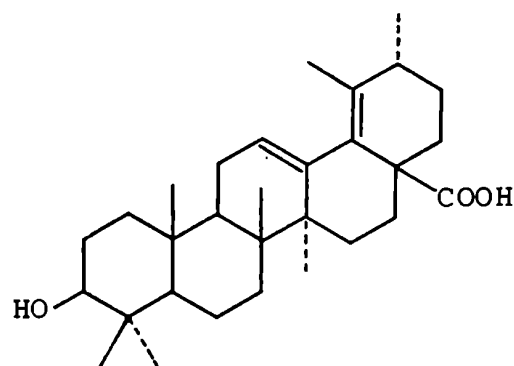
La hidrólisis ácida del glicósido del ácido pomólico 56, extraído de *Ilex cornuta*, da una mezcla de ácido tomentosólico



y ácido vangerólico, que son en realidad los productos de deshidratación de la aglicona original⁶³.



Acido tomentosólico



Acido vangerólico

Los métodos espectroscópicos permiten saber si la aglicona aislada corresponde a la original en el glicósido.

El tratamiento básico suave produce la hidrólisis selectiva de la cadena de hidratos de carbono unida a un grupo carboxilo (COOH-28), pudiéndose determinar entonces qué azúcares se encuentran sobre C-28 y cuáles en C-3.

La hidrólisis enzimática se ha usado cuando la aglicona es sensible a los ácidos, por ejemplo: enzimas de bacterias del suelo, de la microflora interna de la rata, preparados de hongos^{54,56} o el contenido gástrico de caracoles⁶⁴.

Las agliconas aisladas pueden ser identificadas por los métodos espectroscópicos usuales, existiendo actualmente suficiente sistematización con respecto a los triterpenos pentacíclicos.

Budzikiewicz y Djerassi⁶⁵ estudiaron los espectros de masas de diversos derivados de los distintos esqueletos usuales de los triterpenos pentacíclicos, y Ogunkoya delineó un procedimiento para obtener el esqueleto básico de un triterpeno en base a estos y otros datos⁶⁶.

Las señales en ^1H -RMN de los derivados del oleaneno, urseno y lupano fueron estudiadas por Tursch y col.⁶⁷ y por Cheung y col.⁶⁸. El efecto del benceno en los ^1H -RMN de los tres tipos de esqueleto fue estudiado por Wilson⁶⁹.

Las señales de ^{13}C -RMN de derivados del Δ^{12} -urseno y -oleaneno fueron asignadas por Tori y col.^{70,71,91}, las de lupanos y lupenos por González y col.¹¹³.

Los azúcares se estudian por los métodos clásicos de cromatografía en placa delgada de celulosa o silicagel, cromatografía gaseosa de sus derivados trimetilsililados o de sus alditoles acetilados, pudiendo cuantificarse por cualquiera de ellos. Se ha añadido recientemente el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los perbenzoatos utilizando una columna de μ -porasil con hexano-éter etílico, 9:1 como solvente de elución. La cantidad de azúcar necesaria es de 1 a 2 μg y la separación es muy buena. La benzoilación origina casi exclusivamente el anómero α , eliminando el problema de los picos dobles de los derivados trimetilsililados⁷².

Para la elucidación completa de la cadena de hidratos de carbono es necesario a veces realizar una hidrólisis parcial con ácidos diluidos, aislando glicósidos más sencillos, que son analizados nuevamente. Los inconvenientes son la obtención de mezclas de productos y, los rendimientos generalmente bajos.

La posición y el orden de unión de los azúcares se obtienen por metilación, hidrólisis y análisis de los azúcares metilados. Los métodos de metilación más comúnmente usados son los de Kuhn, con Ag_2O y IMe en dimetilformamida⁷³ y el de Hakomori, con anión dimetilsulfinilo en dimetilsulfóxido y IMe⁷⁴. Para compuestos lábiles a las bases se puede utilizar el trifluorometanosulfonato de metilo y 2,6-diterbutilpiridina en fosfato de metilo⁷⁵, método rápido que no ocasiona eliminación ni transposición de posibles grupos acilantes en los azúcares. El producto metilado se purifica, generalmente por cromatografía en columna de silicagel y se hidroliza en medio

ácido, para obtener azúcares parcialmente metilados o, se somete a metanolisis (HCl en HOME seco) para obtener metilglicósidos parcialmente metilados.

Los productos obtenidos se comparan con testigos por cromatografía en papel, en placa delgada de celulosa o silicagel, por cromatografía gaseosa de los metilglicósidos o de sus derivados trimetilsililados. El procedimiento más usado es el análisis por cromatografía gaseosa de los alditoles acetilados, obtenidos por reducción de los azúcares con borohidruro de sodio y posterior acetilación. Las columnas que se emplean son la ECNSS-M y OV-225^{76,77}; cuando no se dispone de testigos y, en los casos de isómeros de tiempo de retención muy cercanos o en mezclas muy complejas, se recurre a la cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas, ya que estos derivados presentan rupturas características⁷⁷.

La reducción del grupo carbonilo del azúcar trae como consecuencia la pérdida de su identidad y se obtiene el mismo alditol a partir de dos azúcares diferentes, por ejemplo: las 2-O-metil y 4-O-metilpentosas o las 3-O-metil y 4-O-metilhexosas. Si son derivados de la manosa se obtiene el mismo compuesto, en el caso de la galactosa se obtienen compuestos enantiómeros que no se separan por cromatografía gaseosa.

Esto se resuelve usando BD_4Na como reductor y analizando los productos por espectrometría de masas.

La determinación de la configuración de los enlaces glicosídicos se realiza fundamentalmente por métodos espectroscópicos; en ausencia de éstos, son útiles los métodos enzimáticos y el poder rotatorio. Se utiliza con notable éxito la regla de Klyne⁷⁸, que establece que la rotación molecular M_D de un glicósido es la suma de las rotaciones moleculares de la aglicona y de los metilglicósidos de cada uno de los azúcares constituyentes. El margen de error es muy grande, pero aún así sus resultados son de mucha utilidad.

$$M_D = \frac{\alpha_D \cdot PM}{100}$$

Estudio estructural por métodos espectroscópicos.

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas por impacto electrónico de glicósidos requiere una derivatización previa para aumentar su volatilidad. La espectrometría de masas por desorción de campo (FDMS : " Field Desorption Mass Spectrometry ") ha resultado muy útil, ya que no sólo se observa un importante ión molecular, sino que además da información sobre la clase y secuencia de las unidades de azúcar⁷⁹.

Se obtiene un ión muy intenso, correspondiente a la molécula entera más un catión, generalmente Na^+ o K^+ de las sales que inevitablemente acompañan a las muestras. En FDMS éstas se destacan, ya que la cationización está favorecida cinética y energéticamente, para dar complejos catión-molécula $(\text{M}+\text{Cat})^+$, que son más estables que los iones radicales moleculares o las moléculas protonadas. Se puede agregar a la muestra pequeñas cantidades de sales con el propósito de intensificar las señales, siendo generalmente más efectivo el sodio que el potasio.

Se encuentran también iones doblemente cargados $(\text{M}+2\text{Na})^{++}$ que son muy útiles para confirmar el peso molecular.

Los iones más importantes, procedentes de rupturas, son los que se originan por fisión de las uniones glicosídicas, por un mecanismo similar a la hidrólisis ácida en solución.

Un protón, proveniente del solvente (usualmente MeOH o H_2O), o generado por alguna reacción térmica en la superficie del emisor, se fija sobre el átomo de oxígeno de la unión glicosídica y ocasiona la eliminación de un ión oxonio (Fig 12).

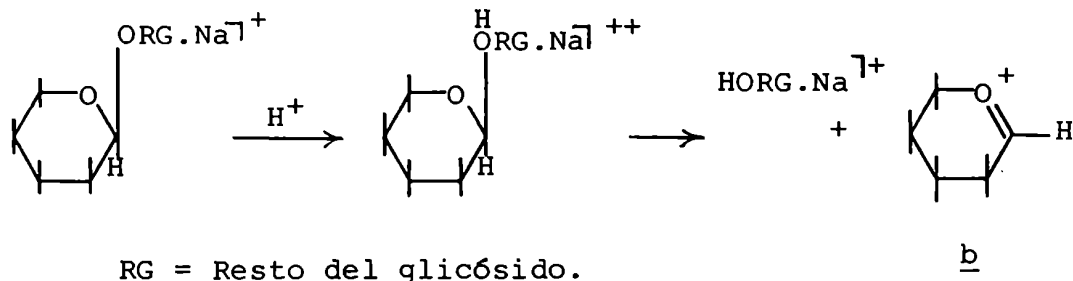


Figura 12: Mecanismo propuesto para la fisión de las uniones glicosídicas en espectrometría de masas por desorción de campo (FDMS).

La frecuente aparición de iones del tipo "b" (Fig 12), que además, tienen valor informativo acerca del tipo de azúcar terminal, justifica este mecanismo.

Los iones más intensos corresponden a la pérdida del azúcar terminal (147 uma para la ramnosa, 133 uma para las pentosas y 163 uma para las hexosas), observándose también la pérdida de disacáridos o de trisacáridos, pero con menor intensidad (309 uma para ramnohexosa, 293 uma para ramnosilramnosa, 325 uma para glucosilhexosa, etc.). Dependiendo del glicósido y de las condiciones, pueden observarse casi todas las combinaciones posibles de pérdidas de distintos oligosacáridos.

La saponina G de *Akebia quinata* ^{54,80,81} es un ejemplo de un 3,28-bis-O-glicósido donde se pueden apreciar estas rupturas y otras características de la unión éster entre el carboxilo 28 y un oligosacárido. Se indica la masa perdida en cada una de las rupturas indicadas (Fig 13). Son de destacar las rupturas A y B que ocurren con transferencia de hidrógeno hacia el fragmento cationizado y la ruptura C entre el oxígeno glicosídico y el C-3 de la aglicona, también con transferencia de hidrógeno, para dar el ión a m/e 949.

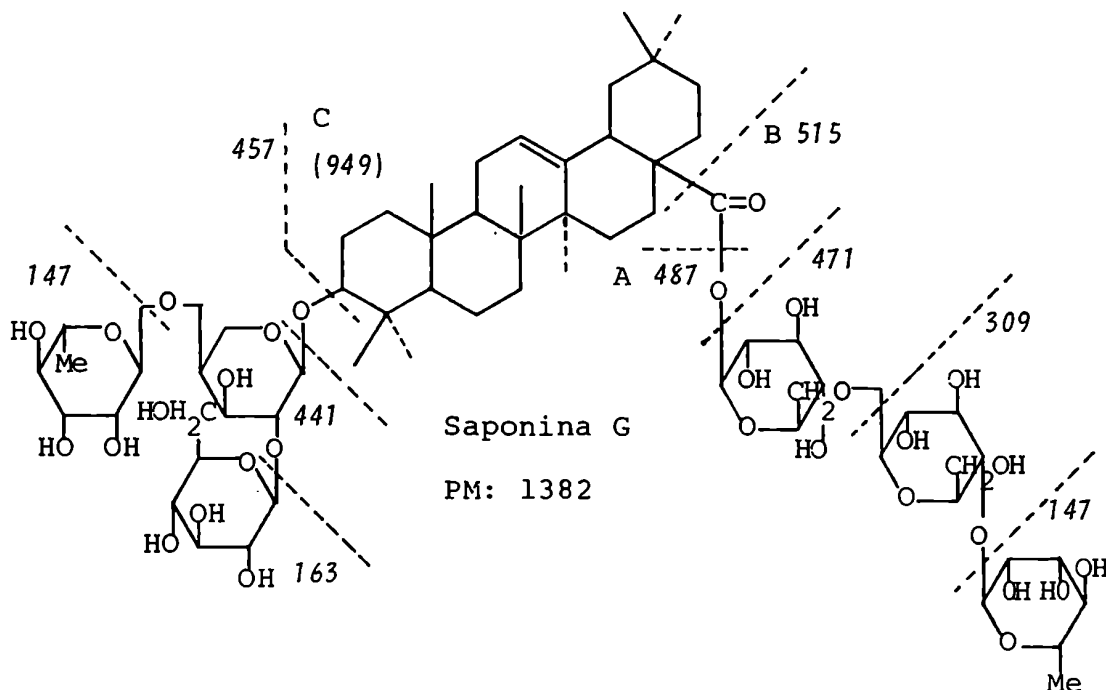


Figura 13: Fragmentaciones de la saponina G en FDMS.

Los derivados más utilizados para realizar espectros de masas por impacto electrónico son los permetilados. Los espectros de masas de diecisiete saponinas del ácido oleanólico, hederagenina y del ácido norarjunólico fueron estudiados por Higuchi y col.⁸².

Los 3-O-glicósidos permetilados dan un ión molecular y un M-COOMe, por eliminación de este grupo del C-17. La ruptura A (Fig. 14) entre el oxígeno glicosídico y el C-3 de la aglicona produce el ión A-17 (A = aglicona), mientras que esta ruptura, con transferencia de hidrógeno hacia el azúcar da A-18, que a su vez origina los fragmentos característicos de la aglicona^{65,82}. La fisión del enlace entre el carbono anamérico y el oxígeno glicosídico (A') forma un ión oxonio característico del glicósido; también se observan iones oxonio provenientes del azúcar terminal. Sus valores de m/e son:

Pentosa	175	Pentosa-hexosa	379
Hexosa	219	Ramnosa-hexosa	393
Ramnosa	189	Hexosa-hexosa	423
		Pentosa-pentosa	335
		Ramnosa-pentosa	349
		Ramnosa-hexosa-pentosa	553
		Ramnosa-pentosa-pentosa	509
			<i>etc.</i>

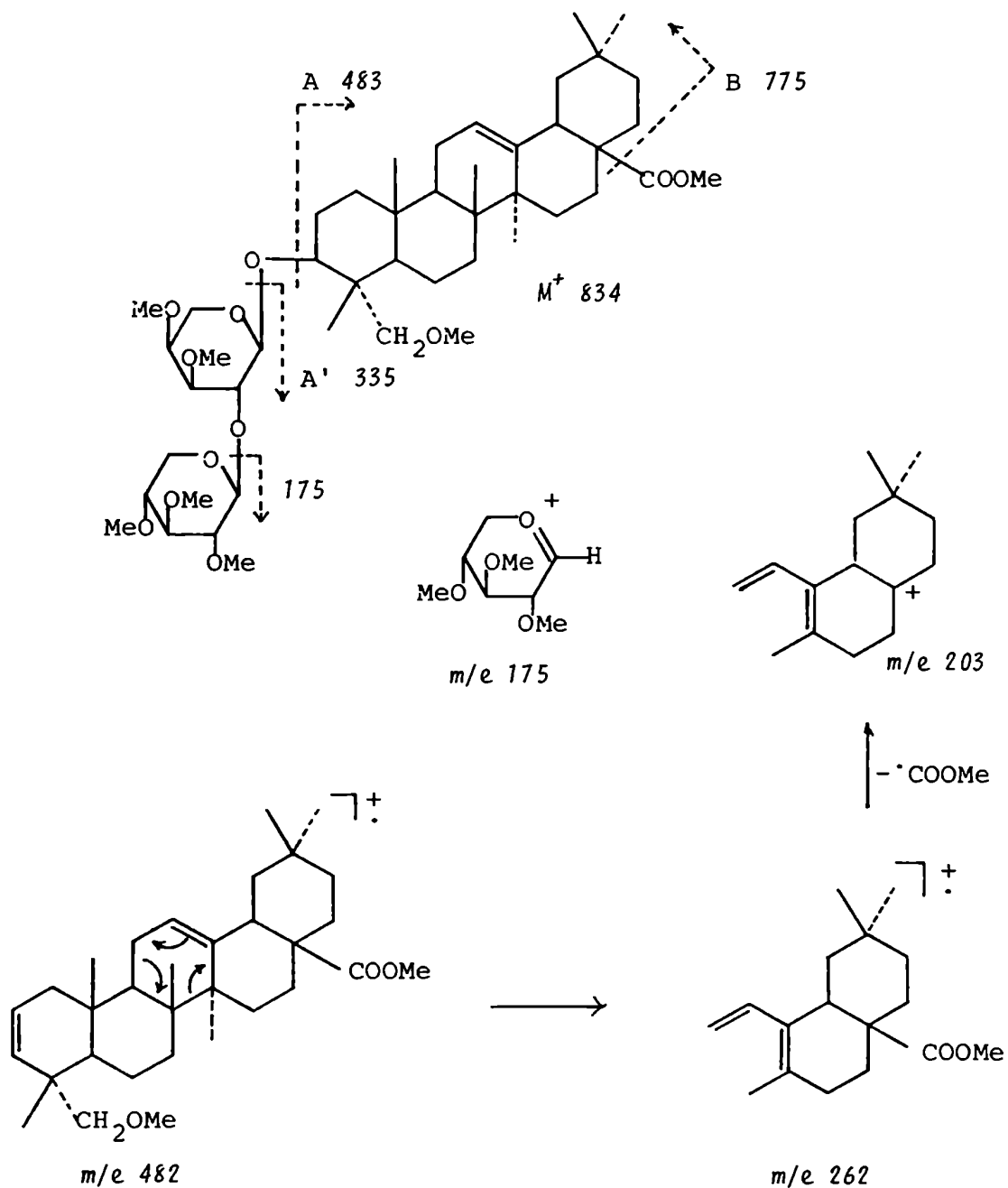


Figura 14: Fragmentaciones de un 3-O-glicósido permetilado.

Los 28-O-glicósidos presentan rupturas características que los diferencian de los 3-O-glicósidos. El ión molecular está ausente, y la ruptura distintiva es en este caso B' (Fig. 15), donde se rompe la unión éster con la cadena de azúcares con transferencia de hidrógeno hacia la aglicona, observándose entonces un ión correspondiente al ácido libre, y no a su éster metílico, que sufre las rupturas propias de estos Δ^{12} -triterpenos. La misma ruptura, B', pero con retención de carga sobre el oligosacárido, da un ión de m/e par característico de este último (Az-H)⁺. La suma de las masas de estos dos fragmentos da el M⁺. La pérdida del sustituyente angular de C-17 con o sin transferencia de hidrógeno hacia la parte neutra, conduce a dos iones característicos de la aglicona (ruptura B). Se ejemplifica con la saponina PH, derivada del ácido norarjunólico, aislada de *Akebia quinata*^{54,82} (Fig. 15).

Los 3,28-bis-O-glicósidos dan las rupturas B, con y sin transferencia de hidrógeno, el ión par correspondiente al oligosacárido de posición 28 (B'), los iones impares de los dos azúcares terminales de las dos cadenas sustituyentes y el que proviene del oligosacárido de posición 3 (A'). Las fragmentaciones A y B' con transferencia de hidrógeno conducen al ion correspondiente a la aglicona con pérdida de agua (A-18), que posteriormente sufre las rupturas que le son propias.

Otros derivados que se pueden usar son los acetilados⁸⁵, deuterometilados en casos especiales y trimetilsililados; estos últimos se investigaron en el campo de los glicósidos de flavonoides^{83,84}. En esta tesis se comprobó que son igualmente aplicables a las saponinas.

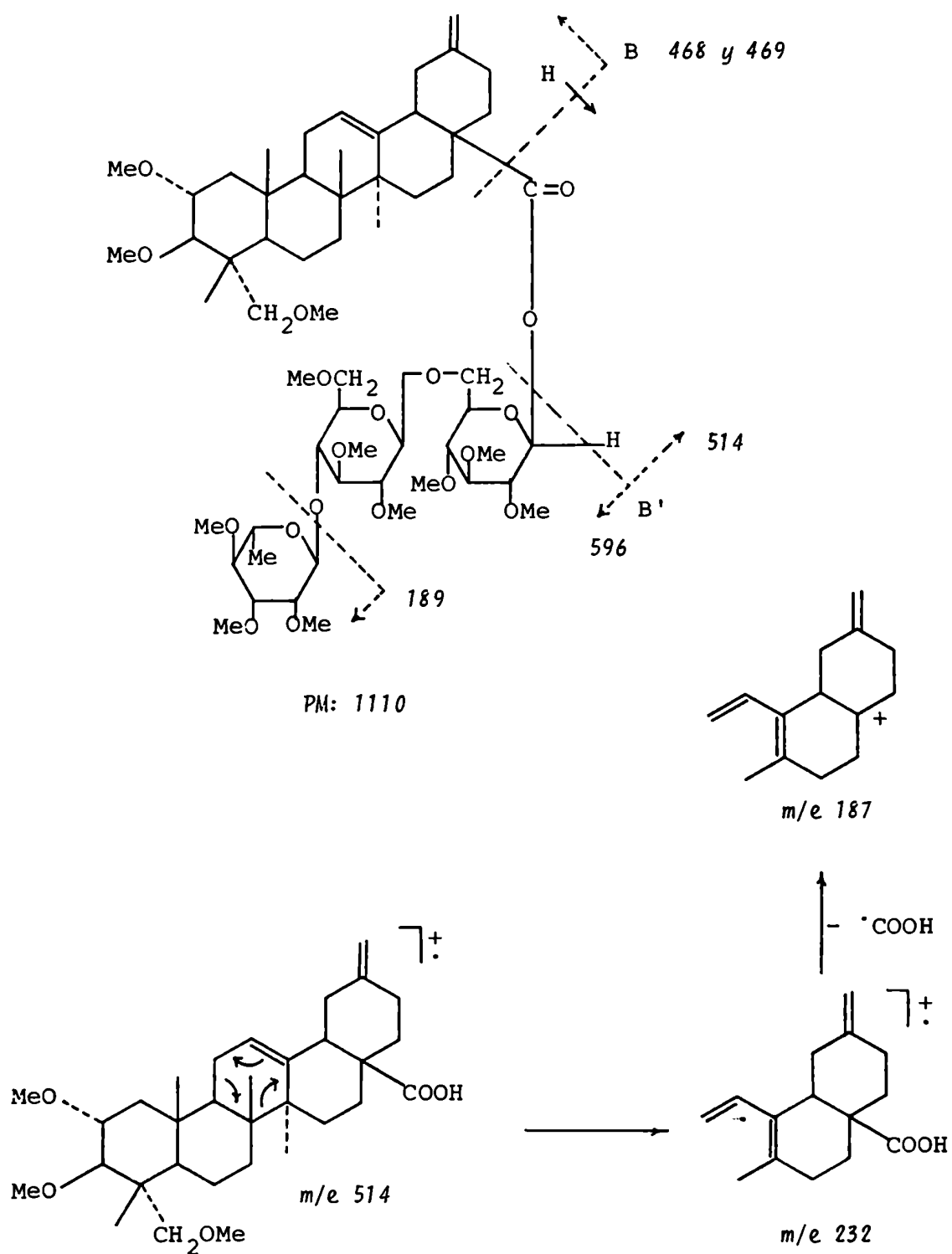


Figura 15: Fragmentaciones de un 28-O-glicósido permetilado.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

Generalmente se realizan los espectros de derivados solubles en DCCl_3 para evitar el uso de piridina deuterada, solvente en que son solubles la mayoría de los glicósidos, pero que produce cambios en las posiciones de las señales complicando la interpretación del espectro. Los más frecuentemente empleados son los derivados permetilados, que se preparan para el estudio químico de la saponina. En sus espectros de ^1H -RMN se puede contar el número de grupos metoxilo (entre 3,3 y 3,6 ppm) y por ende el de hidroxilos de la molécula. Se destacan además las señales características de la aglicona (metilos, hidrógenos olefínicos), y a campos bajos, los hidrógenos anoméricos, cuyo número indica la cantidad de unidades de azúcar de la molécula.

Los derivados acetilados permiten contar el número de grupos acetilo (a ~ 2 ppm) incorporados, pero tiene la desventaja que las señales de los hidrógenos metínicos de los azúcares aparecen a campos más bajos que en el azúcar libre, superponiéndose a las señales de los hidrógenos anoméricos⁸⁶.

Los derivados trimetilsililados han sido preparados para el estudio de glicósidos de flavonoides, pero no son usados con frecuencia en saponinas, aunque presentan las mismas ventajas que los metilados y son más fáciles de preparar.

Los estudios realizados con D-aldopiranosas acetiladas (conformación preferida C1) demostraron que en aquellos azúcares con el H-2 axial, como glucosa, galactosa, xilosa o ribosa, se pueden distinguir los anómeros α y β por el valor de la constante de acoplamiento entre el hidrógeno anomérico y el H-2 ($J_{1,2}$). Los anómeros β tienen el H-1 axial y $J_{1,2}$ (axial-axial) es grande (6-8 Hz), mientras que los α tienen el H-1 ecuatorial y $J_{1,2}$ (ecuatorial-axial) es pequeño (2-3 Hz)⁸⁷ (Fig. 16).

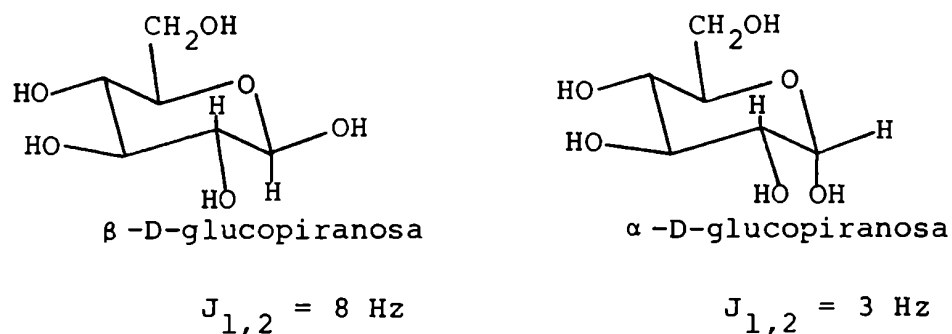


Figura 16: Constantes de acoplamiento de D-aldopiranosas con H-2 axial.

El estudio de metilglicósidos dió resultados similares en cuanto al $J_{1,2}$, pero mostró además que el desplazamiento químico del H-1 es mayor en los anómeros α (5-5,2 ppm), donde éste está en posición ecuatorial, que en los β (4,5-4,7 ppm), donde es axial^{87,88}. Como en general el cambio del metilo por una aglicona más complicada produce variaciones pequeñas de esta señal (salvo que la aglicona sea aromática), este valor también da información sobre la configuración de los azúcares.

En los azúcares con el H-2 ecuatorial en su conformación preferida, no pueden distinguirse ambos anómeros por ser el ángulo diedro de 60° (si no hay distorsiones en los anillos) en los dos casos, que por la relación de Karplus, conduce a un valor idéntico del $J_{1,2}$ ($J \sim 3 \text{ Hz}$) (Fig. 17).

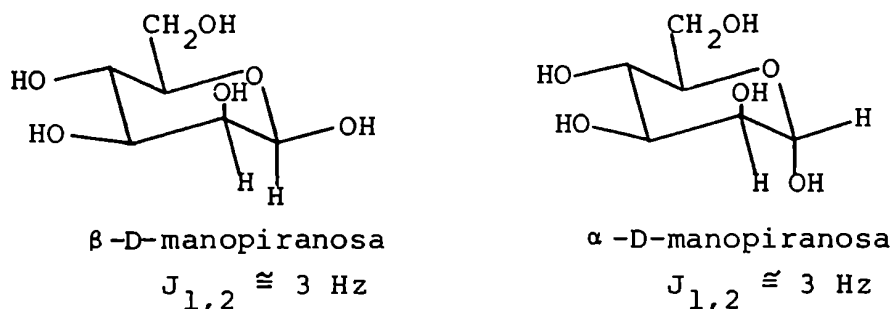
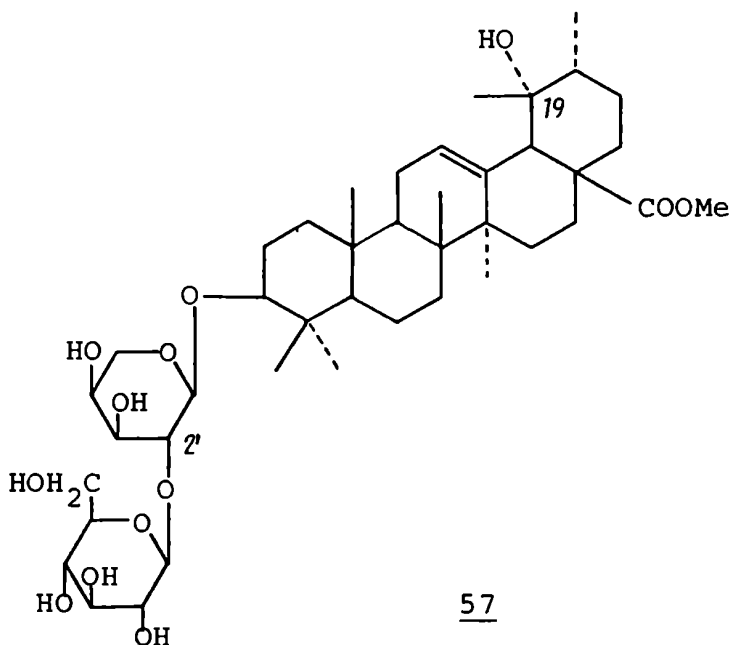


Figura 17: Constantes de acoplamiento de piranosas con H-2 ecuatorial.

En realidad, en los espectros de ^1H -RMN de hasta 100 MHz, se observa un singlete ancho para ambos anómeros, que sin embargo, pueden distinguirse porque el H-1 ecuatorial (anómero α) aparece a campos más bajos (5,0-5,9 ppm) que el H-1 axial (anómero β) que lo hace a 4,5-4,9 ppm⁸⁹.

En los azúcares furanósicos, que ocasionalmente se encuentran en saponinas, también se pueden diferenciar los anómeros por el valor del $J_{1,2}$, pero no por el desplazamiento químico. Los compuestos con hidrógenos 1,2- *trans* tienen un $J_{1,2}$ menor que 2 Hz, mientras que los que los tienen en *cis* tienen $J_{1,2} \sim 4$ Hz⁸⁸.

El hidrógeno anomérico del azúcar directamente unido por una función éster al carboxilo 28 de una aglicona triterpénica aparece a campos mucho más bajos que el de azúcares unidos por glicosidación al HO-3 o a otro azúcar. Su desplazamiento químico depende de la aglicona y del solvente, siendo en los β - glucósidos cercano a 5,5 ppm^{63,90}.



57

Ester metílico
de Ilexsida I

Recientemente se ha publicado la elucidación estructural de Ilexsida I, 57, e Ilexsida II, 56, de *Ilex cornuta*⁶³, realizada completamente por ^1H -RMN (400 MHz). El espectro de ^1H -RMN de 57 en piridina deuterada mostró las señales de los hidrógenos metínicos de los azúcares y de los de los hidroxilos (incluido el de C-19). La ausencia de acoplamiento entre el H-2' de la arabinosa y el protón de su hidroxilo indicó que la glucosa estaba unida a él. Por trifluoroacetilación se observó que el H-2' era el único que no se desplazaba a campos bajos, confirmando el resultado anterior. La asignación de las señales de los protones de los azúcares fue completa en ambos casos, confirmándose por experimentos de doble resonancia.

Este trabajo amplía enormemente la utilidad de este método espectroscópico en el campo de los glicósidos.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C .

La espectroscopía de ^{13}C -RMN es el método de elección cuando se desea estudiar la estructura de un glicósido sin recurrir a hidrólisis o a metilación. Conocidos los espectros de los azúcares (o derivados) y de la aglicona, se puede deducir la estructura por medio de las reglas de sustitución adecuadas.

Las señales de la aglicona permiten determinar si el producto obtenido corresponde al original o si se trata de un arteificio. En el caso de que hubiera más de una posición posible de glicosidación, puede distinguirse aquella afectada ya que es la única cuya señal cambia de posición en el espectro.

Seo y Tomita⁹² estudiaron el efecto de la α y β glucosidación sobre el carbono anomérico de la glucosa y sobre los carbonos α y β de la aglicona, en todos los casos un alcohol secundario. Sus resultados para la β glucosidación se resumen en la tabla 11; un valor negativo de Δ significa protección del carbono en el glicósido respecto al compuesto original: metilglicósido o aglicona. Los carbonos β *sin* y *anti* de la aglicona se definen de acuerdo a su posición respecto al oxígeno piranósico en la conformación mostrada en el dibujo de la tabla.

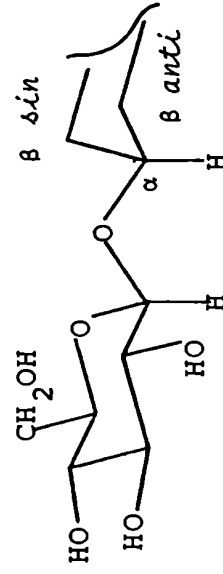
En los metilglicósidos, la señal del carbono anomérico aparece 6 a 8 ppm a campos más bajos que en el correspondiente azúcar libre⁹³, pues se ha introducido una interacción HC (pág. 23) entre el hidrógeno anomérico y los hidrógenos del metilo^{47,94}. El reemplazo del metilo por una aglicona sin hidrógenos en el C- α hace que el valor del desplazamiento químico del carbono anomérico sea casi igual al original en el azúcar libre, como por ejemplo en el compuesto 58 de la figura 18⁹⁵.

Tabla 11: Variación en el desplazamiento químico de los carbonos de un glucósido respecto a sus constituyentes (metilglucósido o aglicona), en ppm.

Aglicona	$\Delta\delta_{az}$ (C _{anom})	$\Delta\delta_{agl}$ (C- α)	$\Delta\delta_{agl}$ (C- β <i>sin</i>)	$\Delta\delta_{agl}$ (C- β <i>anti</i>)
I. 1 o 2 sustituyentes en el C- β <i>sin</i>	-4,2	+5,5	-2,2 (CH) -0,5 (C)	-5,1
sin sustituyentes en C- β	-2,6	+7,2	-2,2	-4,0
II.1 o 2 sustituyentes en el C- β <i>anti</i>	0.	+10,4	-1,7	-1,3 (CH) 0. (C)

Los valores de esta tabla corresponden a glucósidos β , para los α -D-glucósidos se mantienen los mismos valores, pero intercambiando los casos I y II y las columnas *sin* y *anti*.

az = azúcar
 Meaz = metilglucósido
 agl = aglicona
 glic = glucósido



$$\Delta\delta_{az} = \delta_{glic} - \delta_{Meaz}$$

$$\Delta\delta_{agl} = \delta_{glic} - \delta_{agl}$$

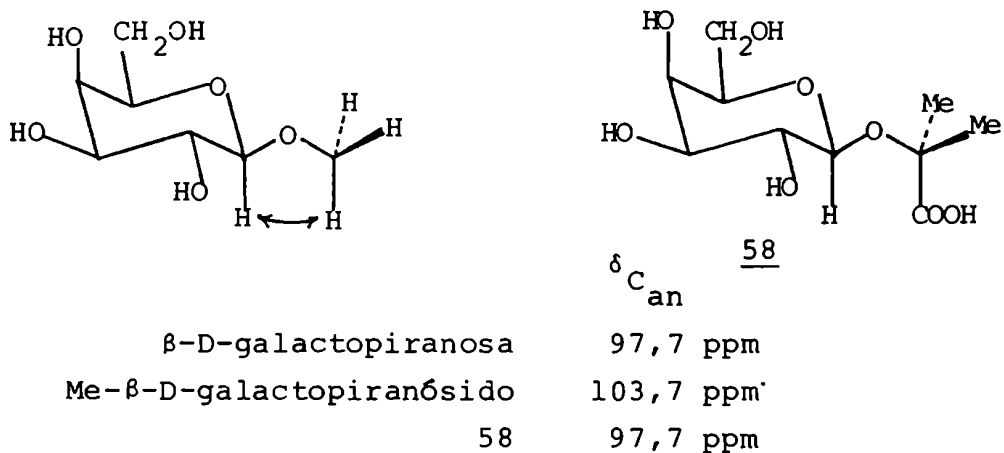


Figura 18: Interacción HC en metilglicósidos.

En los glicósidos donde el azúcar está unido a un carbono secundario de la aglicona, el desplazamiento químico del carbono anomérico depende de la conformación preferida.

Lemieux y Koto⁹⁶ dedujeron de evidencias múltiples, que para todos los β -D-glicósidos, el ángulo diedro formado por el protón anomérico, el carbono anomérico, el oxígeno glicosídico y el C- α de la aglicona era constante y cercano a los 55° (Fig. 19).

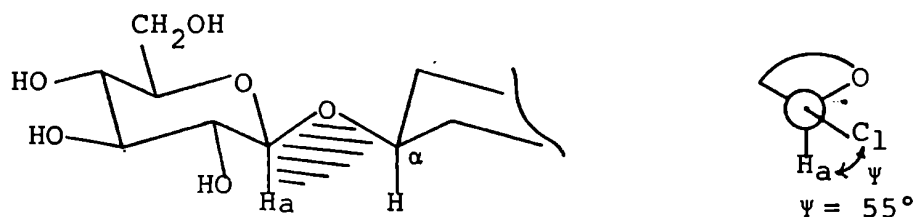


Figura 19.

El desplazamiento químico del carbono anomérico dependerá de la posición relativa de la aglicona, por rotación de ésta alrededor del enlace entre el oxígeno glicosídico y el C-1 (C- α) de la aglicona. Cuanto más "paralelos" sean los enlaces C_{anom}-H_{anom} y C₁-H₁, más parecida será la interacción de los átomos de hidrógeno a la 1,3-diaxial en el ciclohexano, y por lo tanto, más desprotegidos estarán ambos carbonos.

Por cálculos teóricos, usando el modelo de esfera impenetrable y basándose en valores del poder rotatorio, encontraron que cuando la aglicona es el ciclohexano, la conformación preferida es aquella donde el H-1 de la aglicona es coplanar con el enlace C_{anom}-O_{glic} y el ángulo diedro marcado en la figura 20 es nulo.

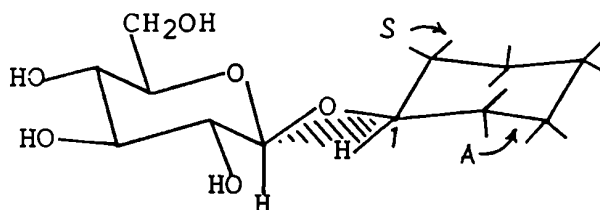


Figura 20.

La introducción de grupos alquilo ecuatoriales en el C-*sin* hace girar el anillo de la aglicona en el sentido de la flecha "S" tendiendo a separar al sustituyente del plano general de la molécula. El H-1 se separa más del hidrógeno anomérico y el desplazamiento químico del carbono anomérico pasa de 100,9 ppm en el β -glucopiranosido del ciclohexano a 100,1 ppm en el 2-metilderivado. La introducción de un metilo ecuatorial en el C-*anti* crea apreciable tensión estérica que se elimina por giro de la aglicona en sentido contrario (flecha "A"). El H-1 se acerca más al hidrógeno anomérico y el desplazamiento

químico del carbono anomérico aumenta a 104,0 ppm, casi como en el metilglicósido (104,1 ppm).

El mismo argumento explica las variaciones de desplazamiento químico del C- α de la aglicona, lo que se puede apreciar en la tabla 11, que muestra que cuanto más desprotegido aparece el carbono anomérico más lo está el C- α de la aglicona.

Los desplazamientos que sufren los carbonos β no han sido explicados, pero son muy útiles para confirmar la configuración del carbono anomérico del azúcar unido directamente a la aglicona, o conocida ésta, determinar la configuración del C- α de la aglicona.

Se han realizado experimentos similares para α y β -L-ramnosilación y para α y β -D-manosilación⁸⁹, como también con glicósidos de arabinosa⁹⁷, con resultados similares. La α -L-ramnosa, muy frecuente en saponinas naturales, tiene un efecto similar al de la β -D-glucosa, ya que la configuración del carbono anomérico es R en ambos casos.

Teniendo los espectros de ¹³C-RMN de los metilglicósidos modelo, y sabiendo cuál es la aglicona, puede determinarse la configuración de todos los enlaces glicosídicos por comparación directa. En general se encuentra que el desplazamiento químico del carbono anomérico de un azúcar que está unido a otro azúcar es muy cercano al del metilglicósido y no existen mayores complicaciones, excepto cuando los valores de los dos anómeros de los metilglicósidos son muy cercanos, como en el caso de la L-ramnosa y D-manosa.

Los espectros de los metilglicósidos de los azúcares más comunes fueron asignados por Gorin y Mazurek (piranosas)⁹⁸ y Ritchie y col. (furanosas)⁹⁹ y corregidos por Walker¹⁰², usando en todos los casos D₂O como solvente.

La mayoría de los espectros de ¹³C-RMN de glicósidos naturales deben realizarse en piridina deuterada por razones de solubilidad (si se utiliza metanol deuterado las señales del solvente interfieren con las de la aglicona en zonas de interés), y es sabido que este solvente produce cambios

significativos en los espectros. Es necesario contar con compuestos modelo en este solvente, pero en este caso sólo existen en la literatura trabajos dispersos^{89,92,100,101,103}.

Así como la unión de la aglicona con un azúcar produce cambios en sus carbonos β , también ocurren pequeños cambios en la señal del C-2 del azúcar, que no han sido convenientemente estudiados.

La determinación de la posición de un azúcar, al que está unido el siguiente en la cadena de la porción de oligosacárido, se hace con los mismos elementos usados para la aglicona. El carbono directamente afectado (α) sufre un desplazamiento a campos bajos que depende del azúcar glicosidante.

Para glucosa es del orden de 8 ppm, pero para la ramnosa se encuentran valores entre 2 y 10 ppm predominando los bajos (menores de 5 ppm), dependiendo de la posición de sustitución.

Los carbonos β se protegen en un valor que puede llegar a 3 ppm, aunque hay casos donde esto no se observa o aún hay una pequeña desprotección^{100,101,104,105}. Tanaka y col.¹⁰⁶ hicieron estudios con glicósidos del *trans* 1,2-ciclohexanodiol como compuestos modelo, encontrando en la serie de los β -D-glucósidos valores de protección de C- β similares a los de compuestos con grupos alquilo ya vistos.

La estructura deducida de esta manera puede confirmarse por comparación con el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto peracetilado o trifluoroacetilado. Las señales de los carbonos que llevan hidroxilos libres se desplazan a campos bajos (2-4 ppm) y los vecinos a éstos a campos altos (1-3 ppm)^{104,107,108}.

Otra manera de confirmar la asignación de los carbonos de los azúcares es por medio del desplazamiento inducido por deuterio, que ya fue medido para diferentes hidratos de carbono^{101,109}. Al reemplazar el hidrógeno de un hidroxilo por deuterio el carbono portador se desplaza a campos altos en 0,1 ppm, mientras que si no tiene hidroxilo se desplaza entre 0 y 0,05 ppm. En un carbono con grupos carbinoles ve-

cinos se intensifica la protección: la variación es de 0,13 a 0,15 ppm para un carbono que lleva un hidroxilo y tiene un grupo carbinol vecino y de 0,17 a 0,19 si tiene dos.

La constante de acoplamiento directa $^1J_{C-H}$ entre el carbono e hidrógeno anoméricos permite diferenciar la configuración del enlace glicosídico en piranosas. Si el hidrógeno es ecuatorial el $^1J_{C-H}$ es 10 Hz mayor que el del anómero con el hidrógeno axial (Tabla 12)^{89,110,111}.

Tabla 12: Constante de acoplamiento a un enlace C-H en piranosas, en Hz.

Glicósido de	$^1J_{C-H}$	
	anómero α	anómero β
D-manosa } L-ramnosa }	164-168	152-158
D-xilosa	170	158-160
D-arabinosa (1C)	160	168-169
D-glucosa } D-galactosa }	~ 170	~ 160

Esta constante de acoplamiento es independiente de la aglicona, aún cuando ésta sea aromática.

Un azúcar esterificado por el HO-1, como en 54 o 56, puede diferenciarse fácilmente de los unidos por glicosidación ya que el carbono anomérico aparece prácticamente en la posición del azúcar libre dado que, como se ha descrito, el efecto de la acilación es de pequeña magnitud⁹⁰.

Actividad biológica.

Las saponinas poseen una intensa actividad hemolítica (destruyen la membrana plasmática del eritrocito con liberación de hemoglobina) a muy bajas concentraciones: 1-5 $\mu\text{g/ml}$.

Schlösser y Wulff¹¹² estudiaron los requerimientos estructurales para los compuestos derivados de la β -amirina encontrando que también las agliconas poseen actividad hemolítica, cuando tienen el HO-3 libre y un grupo moderadamente polar en C-17 como el carboximetilo. Si este último es metilo, carboxilo o hidroximetilo la actividad se pierde, al igual que si se acetila el HO-3. La presencia de un grupo ceto en C-16 aumenta considerablemente la actividad, independientemente ahora de la función de C-17; en todos los casos el agregado de otros grupos funcionales oxigenados en los anillos D o E, además de los mencionados, inhibe el poder hemolítico.

En los 3-O-glicósidos, se observa actividad para todas las funciones oxigenadas de C-17 (pero no para un grupo metilo), que varía con la naturaleza de la cadena de hidratos de carbono, aunque no se han hecho correlaciones estructura-actividad. También en este caso, otros grupos polares en los anillos D o E inhiben la actividad, como así también la presencia de una cadena de azúcares esterificando el grupo carboxilo de C-17. Esto podría constituir un mecanismo de protección interna de la planta, ya que sólo bajo determinadas condiciones (infección debida a hongos, parásitos, destrucción por termitas, etc.) podrían entrar en contacto la saponina inactiva con una enzima hidrolítica para dar un compuesto activo que actuaría contra el ofensor. Es frecuente encontrar en plantas un 3,28-bis-O-glicósido y el 3-O-glicósido correspondiente.

Las saponinas poseen una gran variedad de actividades biológicas: antiinflamatoria, antimitótica, fungistática,

antireumática, antibiótica, etc.⁵⁴. La raíz del *Ginseng* (*Panax ginseng*) tiene propiedades tónicas, que unidas a una larga tradición folklórica de virtudes han estimulado su estudio.

Las saponinas de las especies de *Panax* estudiadas son en su mayoría derivadas de agliconas de triterpenos tetracíclicos (protopanaxadiol 51 y protopanaxatriol 52), siendo las restantes derivadas del ácido oleanólico. Producen estimulación de la incorporación de precursores en el ARN y de leucina marcada, en el suero. El ensayo con saponinas puras mostró que sus efectos variaban de acuerdo a la estructura: algunas estimulan la síntesis de colesterol, otras estimulan el sistema nervioso central, otras tienen efecto sedante, pero todas tienen actividad antifatiga⁵⁴.

Las saikosaponinas de *Bupleurum falcatum*, del tipo del oleaneno, muestran actividad antiinflamatoria, estimulan la síntesis de proteínas en el hígado de rata, aumenta su contenido de glucógeno y aceleran la colesterogénesis. Sin embargo, el aumento del nivel de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en plasma, por ingestión de colesterol, se ve reducido, puesto que se aceleran la eliminación de colesterol de plasma y su excreción.

Las saponinas de *Caltha palustris* disminuyen en ratas el nivel de colesterol en sangre y aumentan el de azúcar a dosis de 100 mg/kg p.o. o i.v.⁵⁴.

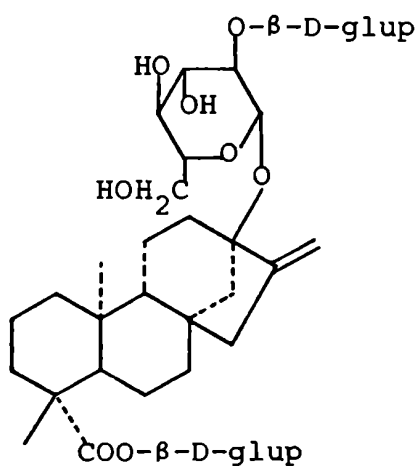
CAPITULO IV

GLICOSIDOS DE DITERPENOS TETRACICLICOS

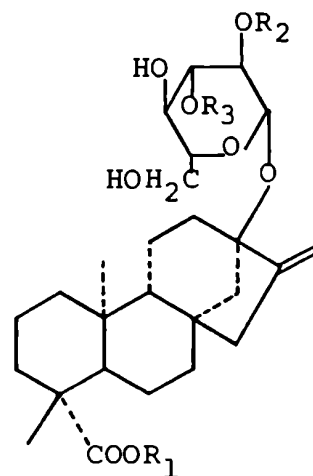
CON ACTIVIDAD BIOLOGICA

GLICOSIDOS DE DITERPENOS TETRACICLICOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Dentro de la familia de los diterpenos tetracíclicos se conocen algunos glicósidos con actividad biológica como los esteviósidos de *Stevia rebaudiana*, con características edulcorantes¹⁴⁶ (Fig. 21), y varios que presentan toxicidad, confirmada por experimentos en animales. Resulta de interés, analizar especialmente estos últimos, ya que, como se ha encontrado en este trabajo de tesis, a ellos se deben las propiedades de *Wedelia glauca* .



Esteviósido



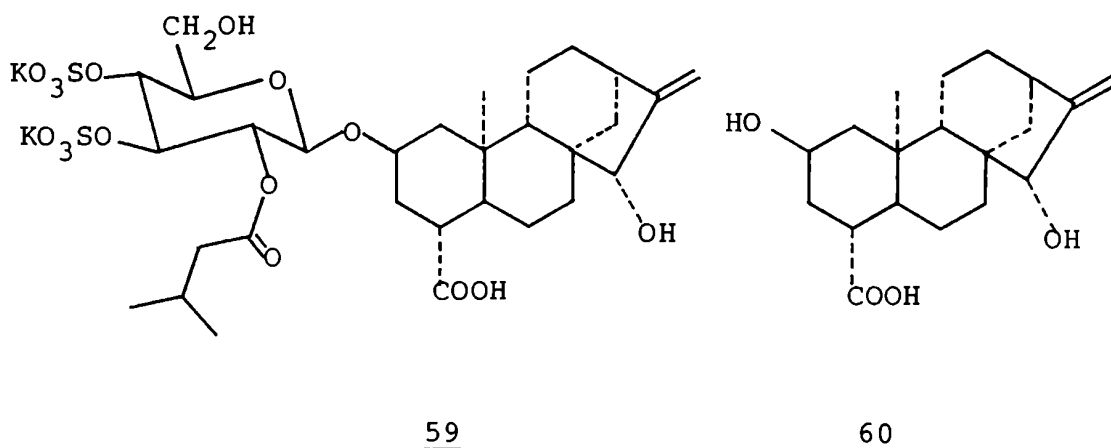
Rebaudiósido A $R_1=R_2=R_3= \beta\text{-D-glup}$

Rebaudiósido B $R_1=H R_2=R_3=\beta\text{-D-glup}$

Figura 21: Algunos glicósidos edulcorantes de *Stevia rebaudiana*.

El atractilósido y glicósidos relacionados.

El atractilósido 59 es un glicósido norditerpénico sulfatado de interesantes propiedades biológicas, entre las que se destacan, su toxicidad.



Fue aislado por primera vez por Lefranc^{114,115} de rizomas de *Atractylis gummiifera* L. en 1868. Esta planta, de la familia de las compuestas, se encuentra en España, Grecia, Asia menor, Argelia y el sur de Italia, donde era conocida desde la antigüedad por sus propiedades farmacológicas, ahora olvidadas.

Los primeros trabajos realizados lograron reconocer la presencia de ácido isovalérico, dos grupos sulfato y una unidad de glucosa por cada unidad de aglicona, denominada atractiligenina 60¹¹⁶. La determinación de la estructura de esta última fue más laboriosa; los estudios químicos mostraron que era un diol ácido, y con un único doble enlace que generaba formaldehído por ozonólisis; su fórmula molecular, $C_{19}H_{28}O_4$, indicaba que era un norditerpeno tetracíclico. La deshidrogenación con selenio de la aglicona hidrogenada dió una serie de derivados del fenantreno que, en principio, indicaron que

la atractiligenina estaba relacionada con el filocladeno 20.

Estos son: fenantreno, 2-metilfenantreno, 2-etilfenantreno, pimantreno, 1-metil-7-etil-fenantreno y reteno. (Fig. 22).

El hecho que en algunos derivados se haya perdido el sustituyente de C-1 indicaba que en esa posición se encontraba el grupo carboxilo, que se podía reducir en algunos casos a metilo¹¹⁷.

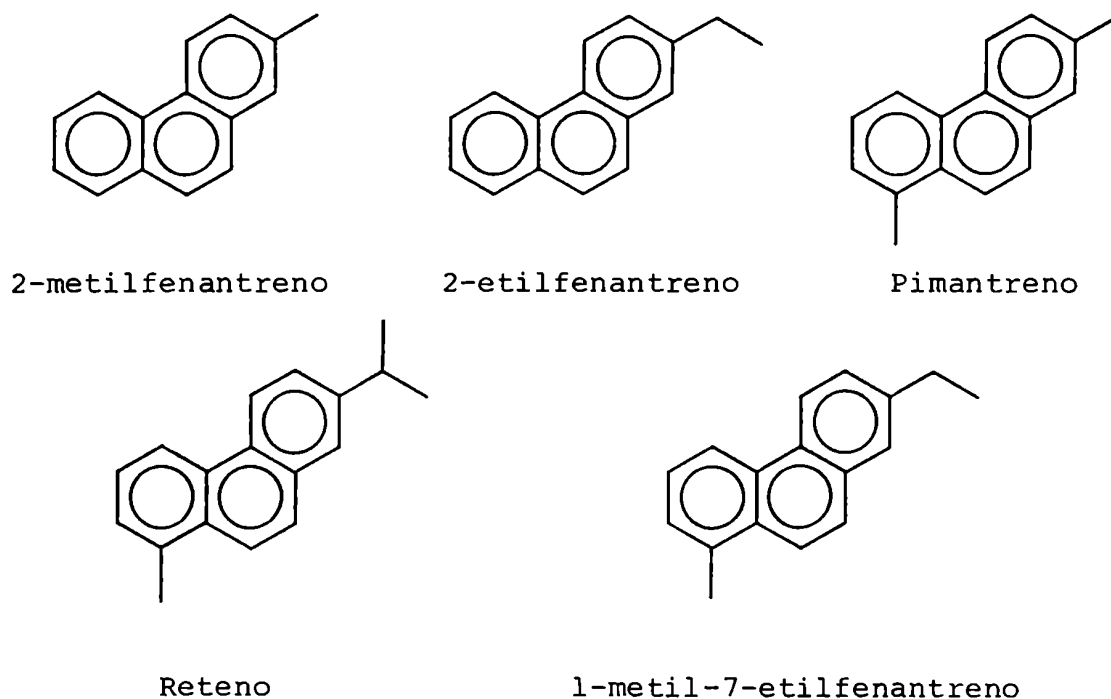


Figura 22: Productos de la deshidrogenación con Se de 60.

Uno de los grupos hidroxilo fue ubicado en C-2 en posición axial, ya que en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ el H-2 aparece como un triplete de triplete ($J = 4$ y 10 Hz) y es el único que posee dos hidrógenos vecinos ecuatoriales y dos axiales. El otro hidroxilo se ubicó en posición 15^α , porque en la dicetona 61 (Fig. 23), los H-17 y 17' se diferencian apreciablemente en el $^1\text{H-RMN}$ y porque el H-15 β aparece como un doblete con $J = 3,5$ Hz en 62. La configuración del C-4

fue determinada por los acoplamientos del H-4 con los H-3 y por formación de la lactona 63. La consideración del efecto Cotton de diversos derivados de la atractiligenina permitió asignar su configuración absoluta como la misma que la del *ent*-kaureno 21^{118,119}.

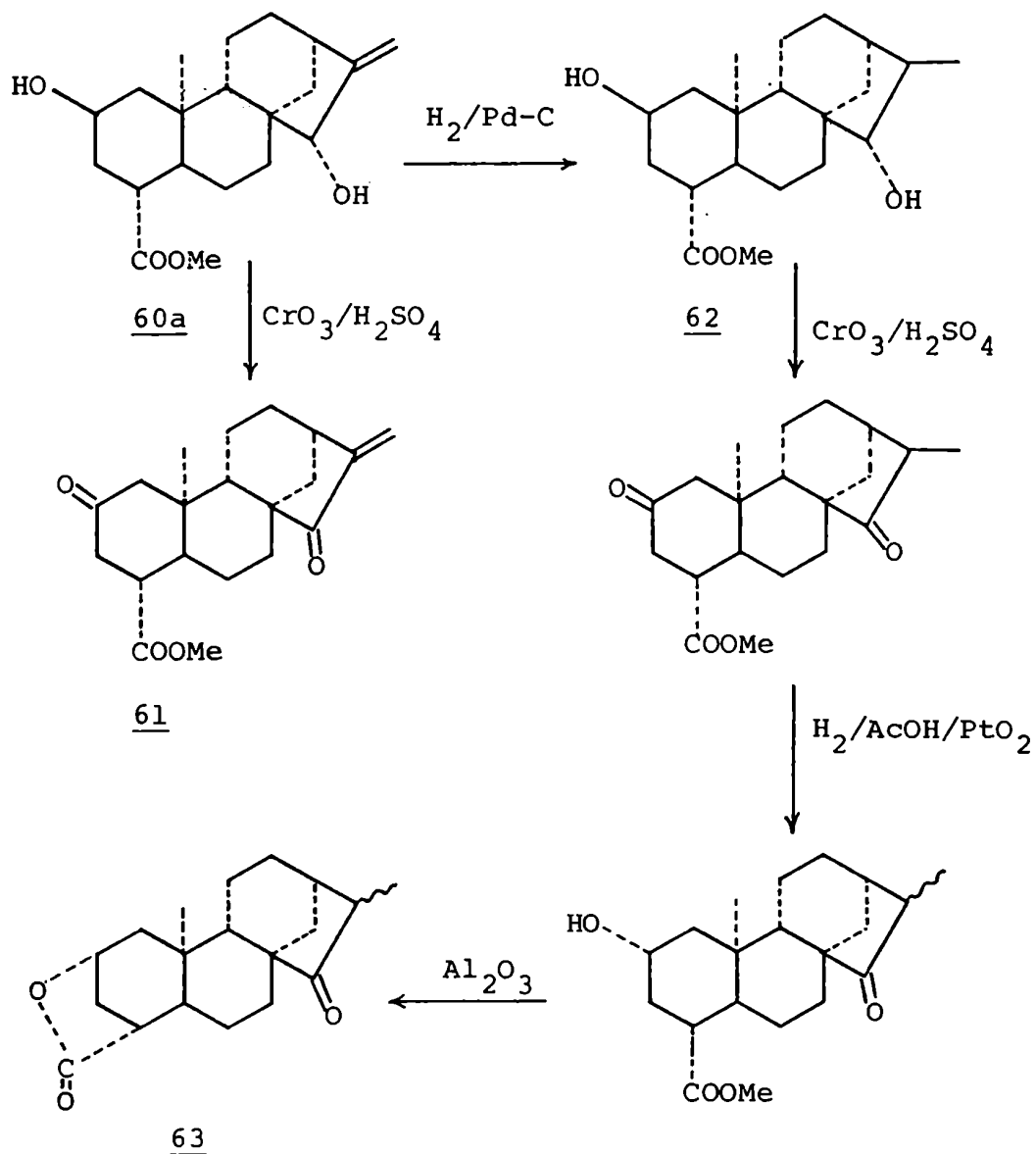


Figura 23: Algunas transformaciones químicas utilizadas en la determinación de la estructura de 60

La estructura de la aglicona fue confirmada por cristalografía de rayos X de la epoxibromoatractiligenina 64, obtenida durante las transformaciones químicas realizadas para su elucidación estructural (Fig. 24). Se encontró que todos los anillos de ciclohexano estaban en forma silla ¹²².

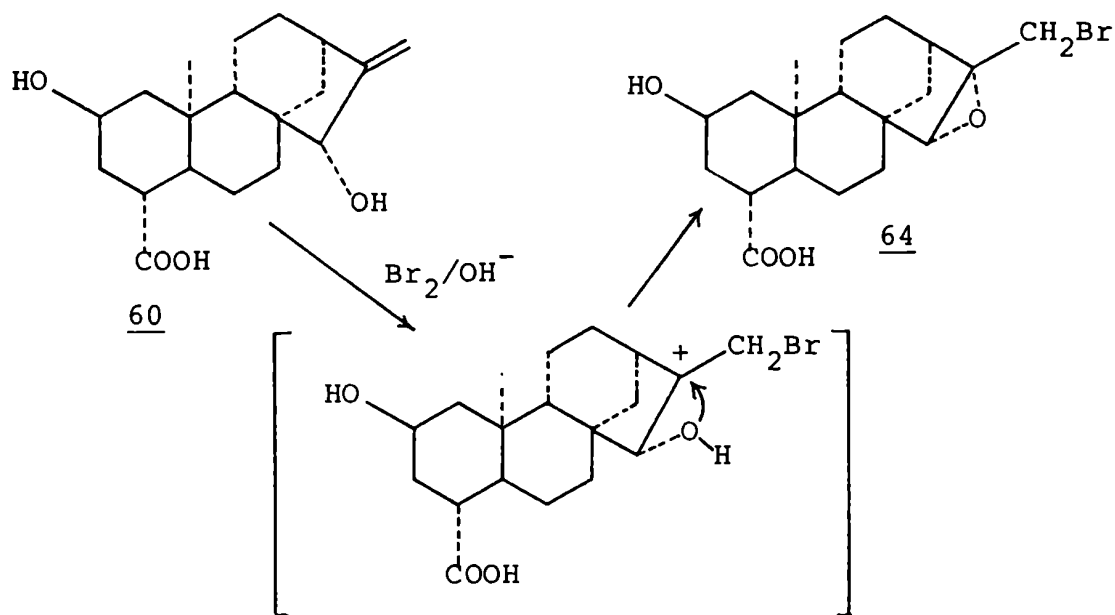


Figura 24: Obtención de 64.

Una vez conocida la estructura de la aglicona, se pudo determinar la del glicósido ¹²⁰. La obtención del derivado 65 (Fig. 25) indicó que la glucosa estaba unida al HO-2 de la aglicona por el hidroxilo anomérico, ya que ni el atractilósido ni sus derivados eran reductores.

En la figura 25 se dan los resultados de la reacción con ácido periódico y los productos obtenidos por metilación (*), para diversos derivados del atractilósido que condujeron a la estructura 59.

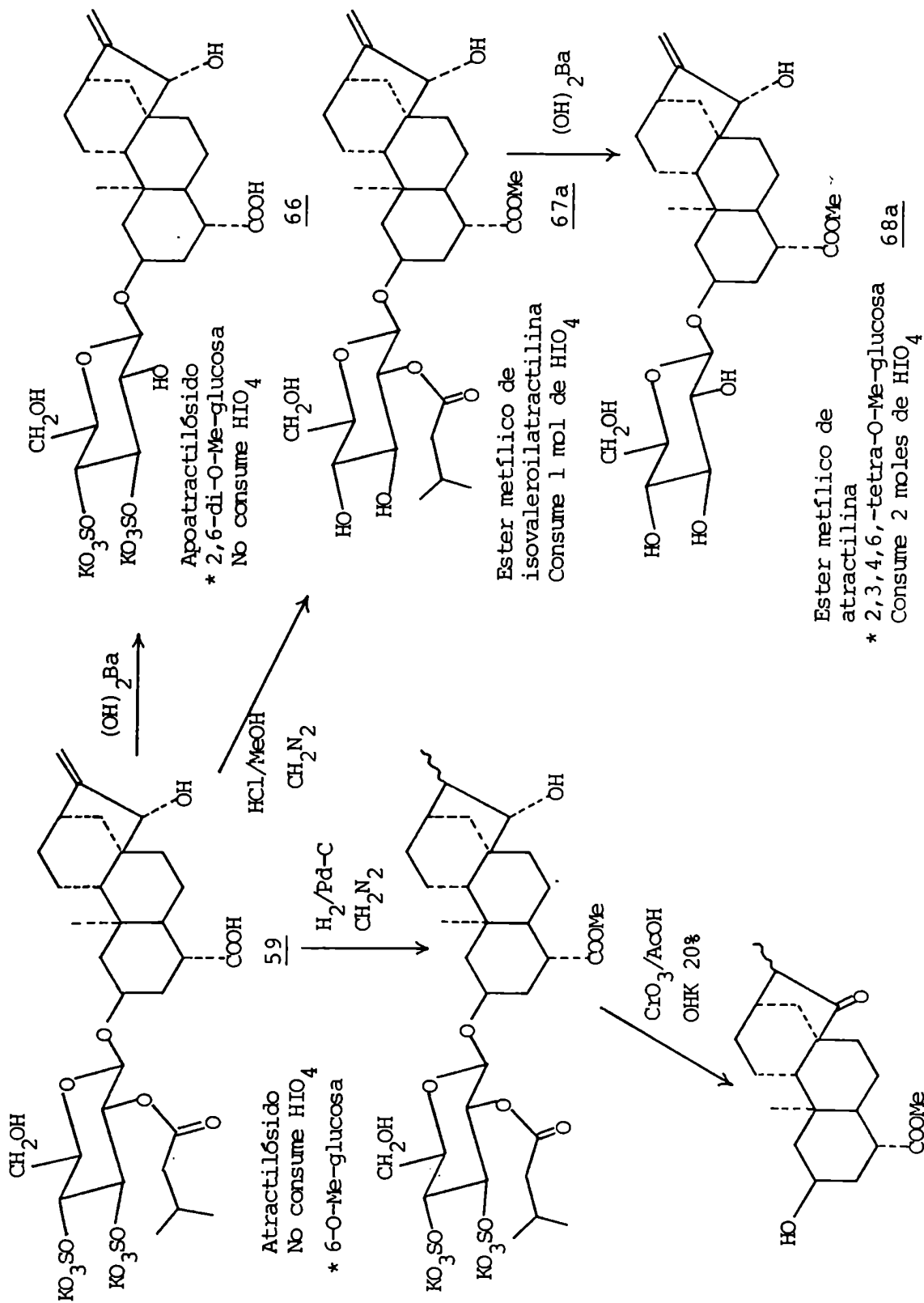


Figura 25: Transformaciones químicas que condujeron a la estructura 59.

Inicialmente se le asignó al carbono anomérico la configuración α , porque la emulsina no hidrolizaba al atractilósido ni a ninguno de sus derivados. Posteriormente Defaye y Horton¹²¹ estudiaron el espectro de ^1H -RMN a 220 MHz de la tetraacetilisovaleroilatractilina (derivado acetilado de 67), encontrando que el hidrógeno anomérico aparecía a 4,68 ppm con $J = 8,0$ Hz, lo que indicaba claramente una configuración β .

Comprobaron también que ni una β -glucosidasa ni una α -glucosidasa hidrolizaban a 59, 66 o a la atractilina 68.

Si bien no se han realizado análisis de los espectros de ^1H - ni ^{13}C -RMN del glicósido completo (atractilósido 59), se estudiaron en cambio los espectros de masas de sus derivados trimetilsililados¹³². (Fig. 26). El tratamiento directo

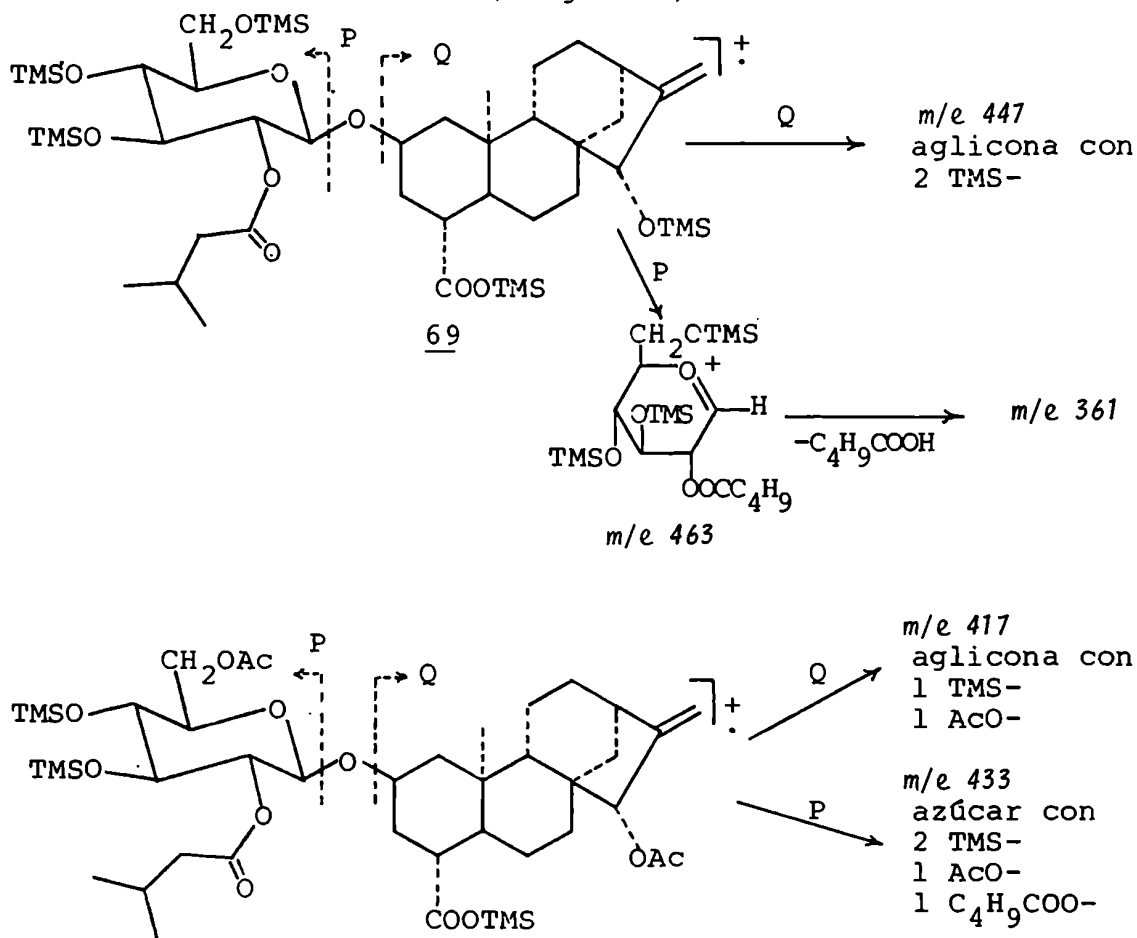


Figura 26: Fragmentaciones de derivados trimetilsililados de 59.

del atractilósido 59 con una mezcla sililante produce la pérdida de los grupos sulfato dando 69. Su espectro de masas da el ión a m/e 463 (ruptura P) correspondiente al azúcar con tres grupos trimetilsililo y otro a m/e 447 (ruptura Q) correspondiente a la aglicona con dos trimetilsililos. A partir de m/e 463 se observa la pérdida de 102 uma, que revela la naturaleza del grupo acilante (ácido isovalérico), mientras que el ión a m/e 85 confirma la existencia de este sustituyente. Si previamente a la sililación se acetila el atractilósido, puede deducirse la cantidad de hidroxilos libres en la molécula, ya sea en el azúcar como en la aglicona. De la comparación de los espectros de masas de estos dos derivados (Fig. 26) se llega a la conclusión que la aglicona tiene un hidroxilo libre, que el azúcar tiene una unidad de ácido isovalérico y un hidroxilo libre, y por lo tanto, dos sulfatos estaban presentes en la molécula original.

En 1972 Danieli y col.⁵¹ informaron la presencia en rizomas de *A. gummifera* L. de un nuevo glicósido diterpénico sulfatado que llamaron carboxiatractilósido 70. Su estructura fue confirmada por descarboxilación de 70 a atractilósido y de la aglicona, carboxiatractiligenina 71 a atractiligenina 60.

La obtención del isómero con el grupo carboxilo en posición 4 α exclusivamente se justificó por la mayor velocidad de protonación del enol intermedio desde la posición ecuatorial, menos impedida (Fig. 27).

Estos compuestos han sido aislados de otras fuentes.

En 1977 Candy y col.¹²⁴ estudiaron la especie *Callilepis laureola* (*Compositae*), una hierba medicinal utilizada por la tribu Zulú y otras de origen africano, casi siempre con resultados fatales debido a lesiones en el hígado, encontrando que contenía atractilósido. Como éste no produce toxicidad hepática, es evidente que en este caso la toxicidad se debe a una combinación de sustancias que no han sido estudiadas.

De *Xanthium strumarium* (*Compositae*) se aisló una sustan-

cia hipoglucémica, que inclusive llegó a ser patentada como tal¹²⁵, encontrándose posteriormente que era el carboxiatractilósido¹²⁶.

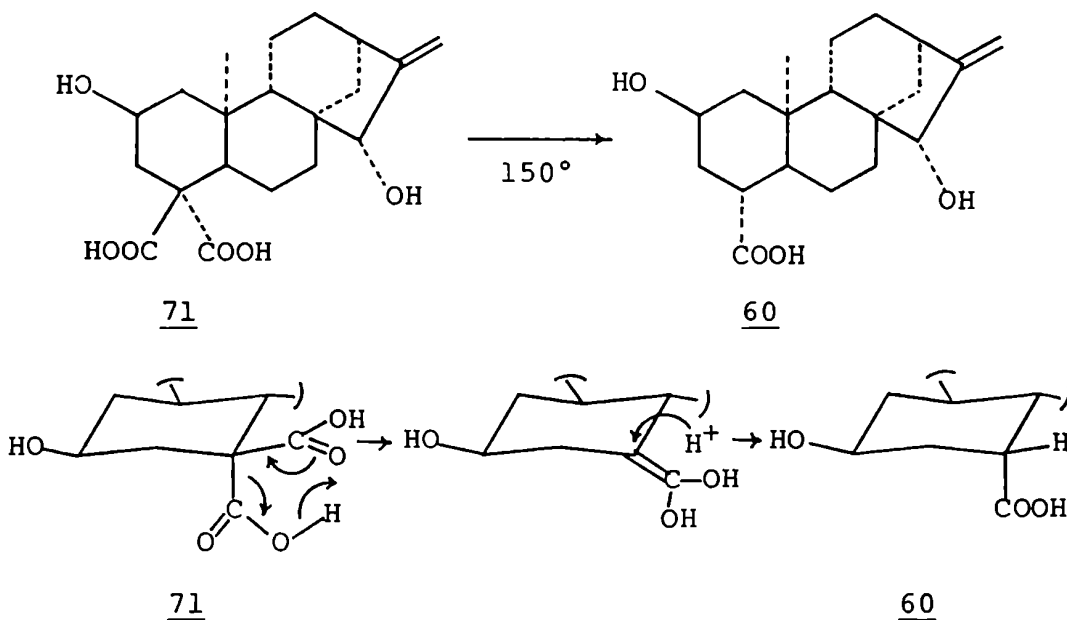
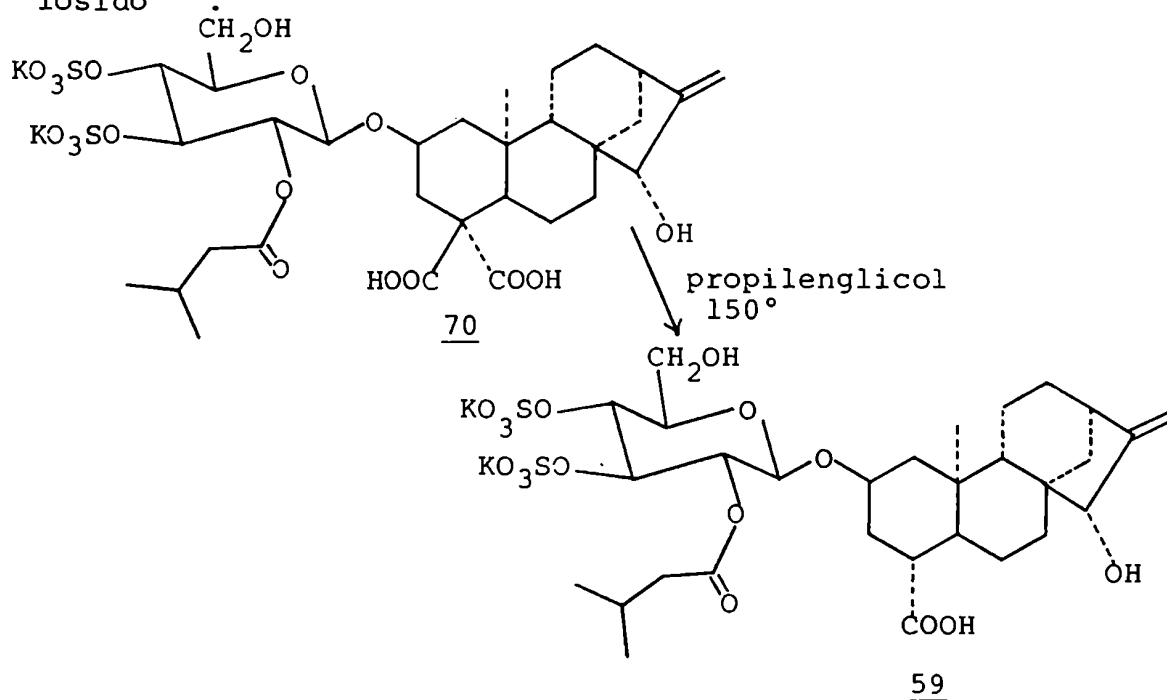
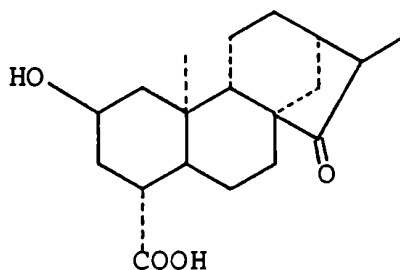


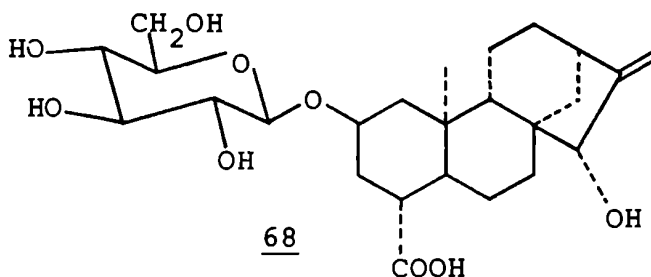
Figura 27: Descarboxilación de 70 a 59 y de 71 a 60.

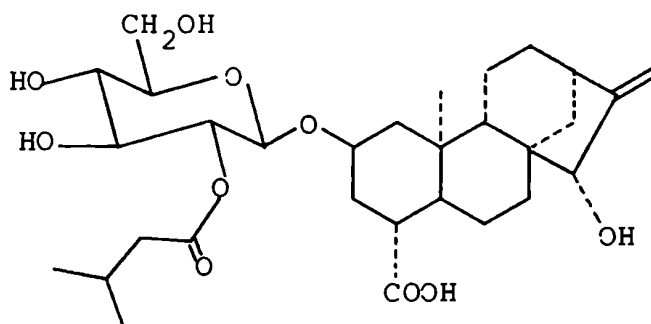
Sorprendentemente, se informó la presencia de un inhibidor de la fosforilación oxidativa en el látex de *Euphorbia chacracias* (*Euphorbiaceae*), identificado como atractilósido por cromatografía en papel y placa delgada. Si la identidad del compuesto se confirma, ésta es la primera vez que 59 aparece en una planta fuera de las Compuestas¹²⁷..

Mientras estudiaban los esteroides de orina humana, Obermann y Spiteller¹²⁸ encontraron en la orina de personas que habían bebido café un glucurónido del ácido 2 β -hidroxi-15-oxoatractilán-4- α -carboxílico 72.

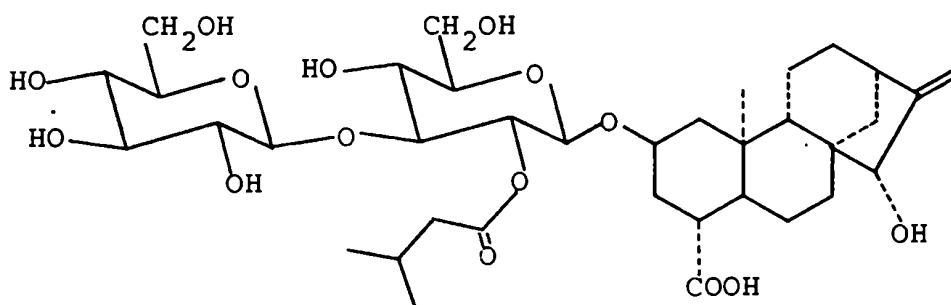
72

Estudiaron entonces los granos de café tostado, *Coffea arabica* (*Rubeaceae*), hallando en forma de glucurónidos o sulfatos la atractiligenina (0,1 % del grano tostado), que se elimina del cuerpo humano a partir de las 24 hs de la ingesta como un glucurónido de 72¹²⁹. Esto los llevó a estudiar en detalle los granos de café verdes^{53,130}, donde identificaron los glicósidos de la atractiligenina: atractilina 68, isovaleroil-atractilina 67 y 73.

68



67

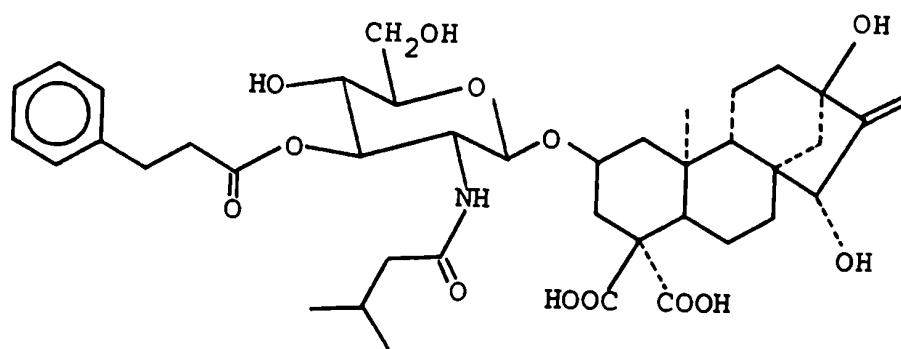


73

Estos hallazgos tienen una importancia significativa, ya que, como se expondrá después, éstos compuestos pueden presentar actividad biológica parecida al atractilósido y carboxiatractilósido, aunque no su toxicidad.

Un compuesto tóxico de estructura relacionada con 59, el wedelósido 16, se aisló de *Wedelia asperima*, una planta de Australia que provoca serias pérdidas de ganado ovino¹³¹.

Su estructura es la de un glicósido diterpénico, donde la aglicona es la 13-hidroxicarboxiatractiligenina y el azúcar es la glucosamina, acilada con una unidad de ácido 3-fenilpropiónico y otra de ácido isovalérico^{15,52}.



16

Efecto biológico del atractilósido y derivados.

Los rizomas de *Atractylis gummifera* se usaban con fines terapéuticos o criminales desde la antigüedad. Su ingestión produce accidentes que en la mayoría de los casos llevan a la muerte. El estudio toxicológico realizado con la planta o extractos se ve complicado por la presencia simultánea de atractilósido (ATR) y carboxiatractilósido (GUM) de mayor poder tóxico; sin embargo, como su efecto es el mismo, los síntomas de envenenamiento de ambos compuestos sólo presentan diferencias menores que no invalidan las observaciones.

Se ha encontrado que la rana, el sapo, los reptiles e invertebrados son poco sensibles a la acción de ATR, mientras que para la paloma, el conejo, el cobayo, pájaros y mamíferos en general es un veneno mortal¹³⁴.

Los informes más confiables indican que la dosis letal (DL) mínima del atractilósido puro en perros, por vía intravenosa (i.v.) es de 5 mg/kg en invierno y 4 o 5 veces mayor en verano¹³⁵.

Los estudios hechos con el extracto de *A. gummifera* mostraron una toxicidad mayor de la que podía esperarse del atractilósido solo¹²³. Al reexaminar el extracto de los rizomas, se encontró un segundo producto biológicamente activo que se denominó "gumiferina" (GUM), nombre con el que fue utilizado por mucho tiempo en investigaciones en química biológica^{136,137}. Posteriormente se demostró que la gumiferina era el carboxiatractilósido aislado por Danieli y col.; su DL₅₀ i.p. en ratones es 10,7 mg/kg, mientras que en las mismas condiciones la DL₅₀ del atractilósido es 124 mg/kg^{136,138}.

Los efectos de la intoxicación aguda por dosis mortales i.v. de extracto de rizoma o frutos de *A. gummifera* en perros son comparables a los observables en intoxicaciones humanas accidentales o criminales y son similares a los

provocados por atractilósido puro. Aumenta primero el ritmo cardíaco y respiratorio, mientras que la tasa de glucemia se eleva transitoriamente; luego ésta empieza a bajar hasta alcanzar un valor de 20 mg/100 ml (normal: 100 mg/100 ml), y se establece una hipotensión progresiva y definitiva, a la vez que el ritmo cardíaco disminuye. A continuación se instala una respiración periódica que precede a la apnea definitiva.

El electrocardiograma no muestra problemas graves hasta último momento, donde hay una fibrilación simultánea con la hipotensión y anoxia total. A estos síntomas se agregan: la hipotermia, aumento de la diuresis y luego, anuria total.

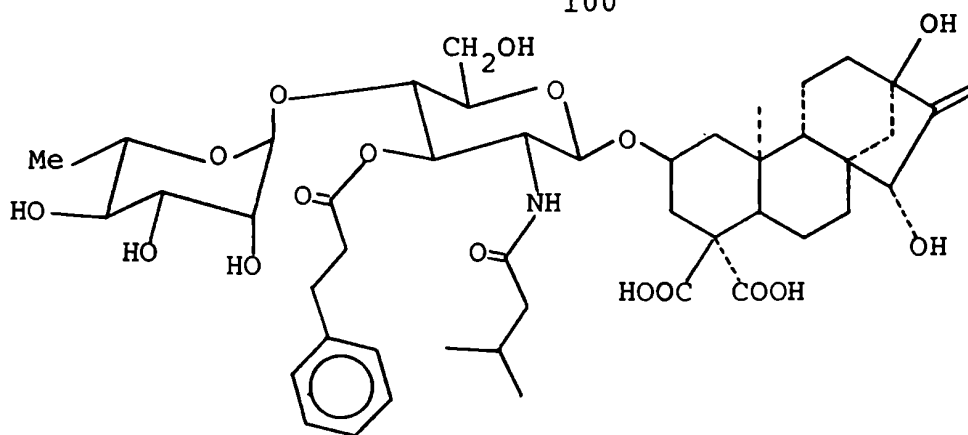
Las convulsiones que acompañan a la hipoglucemia son habituales en el hombre intoxicado por ingestión de planta, pero no se producen siempre en la intoxicación experimental con extractos por vía endovenosa en animales.

El tratamiento más eficaz es el lavaje de estómago inmediato a la ingestión, pero como los síntomas aparecen tardíamente y el proceso es irreversible, no es posible aplicarlo en la mayoría de los casos. La inyección de soluciones de glucosa inhibe las convulsiones, pero no impiden la muerte y el animal sucumbe en un estado de depresión profunda, aún cuando se compense la acidosis y se mantenga la respiración artificialmente.¹³⁴

Se ha informado que ATR tiene un efecto nefrotóxico en ratas¹³⁹. Con una dosis de 50 mg/kg i.p. se produce nefrosis tubular a las 3hs, acompañada por un aumento de excreción de agua, proteinuria, glucosuria, cetonuria y kaliuria. Un efecto similar se observó en ratones, pero no en conejos o cobayos. Con 2 mg/kg p.o. GUM no tenía efecto en el riñón de ratas, ni producía alteraciones en el hígado o corazón, lo que podría deberse a que su DL_{50} es más baja o a que penetró menos en las células tubulares¹⁴⁰.

Se patentó el uso de GUM como antiinflamatorio, basándose en pruebas en ratas para las cuales las DL_{50} resultaron: 2,9 (i.p.), 5,3 (s.c.) y 350 mg/kg (p.o.)¹⁴³.

Comparativamente, la DL_{100} del wedelósido 16 es 1 mg/kg en ratas o ratones. Un derivado de éste, también aislado de *Wedelia asperima*, 74, presentó también el mismo nivel de toxicidad. El wedelósido demostró tener actividad antitumoral (tumores inducidos por aflatoxina B_1) en ratas a una dosis diez veces inferior a la DL_{100} ¹⁴¹.



74

Como se había observado en los experimentos farmacológicos que ATR producía agotamiento de las reservas de glucógeno, aumento de ácido láctico en sangre y que disminuía el consumo de oxígeno, se lo consideró adecuado para estudiar la respiración celular en tejido vivo¹⁴². Experimentos posteriores demostraron que ATR inhibía la fosforilación oxidativa del ADP externo en las mitocondrias, pero no la del ADP interno, sin desacoplar la cadena oxidativa. Se dedujo que ATR interfería específicamente algún paso relacionado con el transporte del ADP a través de la membrana mitocondrial interna¹⁴⁴.

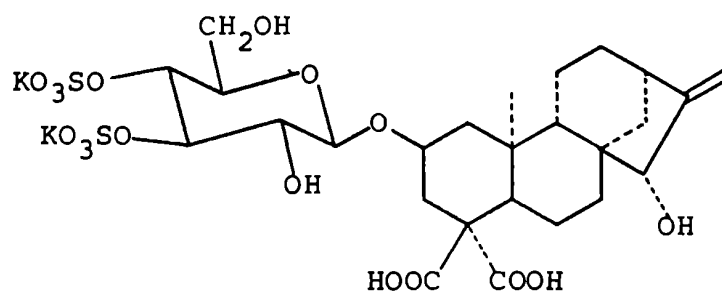
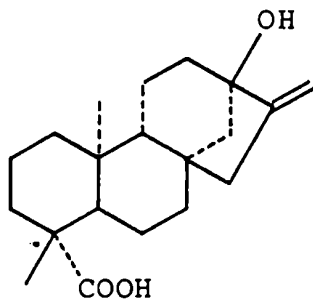
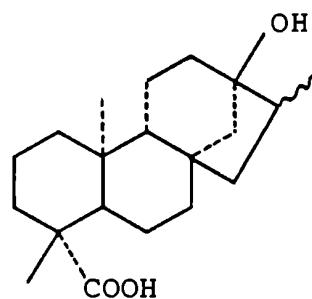
La experimentación con ATR llevó a la identificación de un "translocador" de nucleótidos en la membrana mitocondrial interna, que funciona intercambiando ADP y ATP entre el compartimiento interno y el intermembranal.

Las mitocondrias de mamíferos y levaduras exhiben gran afinidad por ATR y GUM, pero las de plantas sólo por GUM.

El transporte de ADP en plantas no es inhibido por ATR, o solamente a muy alta concentración.

Ambos inhibidores se unen a la membrana exclusivamente del lado externo, aunque se cree que no lo hacen en el mismo sitio que el ADP. Se supone que la región no polar de la aglicona penetra en la membrana, mientras que la porción de la glucosa sulfatada sobresale interactuando con grupos iónicos de la proteína transportadora.

Es interesante notar que mientras GUM es un inhibidor no competitivo (se une al sitio específico irreversiblemente), el apocarboxiatractilósido 75 es un inhibidor competitivo (reversible por agregado de ADP). Por otro lado, tanto ATR como la atractiligenina 60 son inhibidores competitivos, aunque la última con eficiencia mucho menor que el primero. Son inhibidores no competitivos el esteviol y el dihidroesteviol 76 y 77, que tienen un hidroxilo sobre el C-13, igual que el wedelósido 16¹⁴⁵.

757677

Se postuló que la diferencia de conformación entre el apocarboxiatractilósido 75 y GUM podría ser la responsable de su diferente tipo de inhibición. La interacción hidrofóbica

entre el grupo isovalerófilo y la aglicona haría tomar una conformación plegada a la molécula, mientras que la ausencia de esta unidad daría mayor libertad conformacional al apocarboxiatractilósido. Esto se evidencia en el ^1H -RMN a 220 MHz en DMSO- d_6 de ATR, pues los dos metilos del ácido isovalérico aparecen juntos a 0,89 ppm (doblete, $J = 7$ Hz), mientras que en el espectro de GUM estos se diferencian y se encuentran como dos dobletes con $J = 7$ Hz, a 0,86 y 0,89 ppm. La sensibilidad de estos metilos a un cambio en una posición tan alejada de la molécula como el C-4, indicaría que ambos grupos se hallan cercanos en el espacio¹⁴⁵. El experimento fue realizado con los ésteres metílicos de ambos compuestos y no en agua, sin embargo, es de esperar que la conformación se mantenga por ser los dos solventes muy polares.

La diferencia de afinidad entre ATR y GUM está relacionada con la presencia en este último de un grupo carboxilo extra, que haría la unión al receptor más fuerte e irreversible. El nuevo grupo es ecuatorial y mucho más ácido que el axial en ATR, como se ve en la tabla 13.

Tabla 13: pK de los grupos COOH de ATR, GUM y derivados.

	<u>GUM</u> <u>70</u>	apoGUM <u>75</u>	ATR <u>59</u>	apoATR <u>66</u>
pK_{ax}	6,7	5,7	5,7	5,7
pK_{ec}	3,4	4,0	-	

La disminución de la acidez del grupo carboxilo axial al pasar del apocarboxiatractilósido (apoGUM) a GUM, sugiere que existe un puente de hidrógeno intramolecular entre éste y el carbonilo del grupo isovalerófilo. El grupo ecuatorial está mucho más libre para solvatar su anión y además no tiene el impedimento estérico del metilo de C-10¹⁴⁵.

CAPITULO V

DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

EN ESTA TESIS

DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTA TESIS*

ESTUDIO QUIMICO DE WEDELIA BUPHTHALMIFLORA Lorentz

Extracción y fraccionamiento del material vegetal

La planta molida y seca se extrajo con éter de petróleo como se indica en la parte experimental (pág. 206). Al concentrar este extracto se separó un precipitado formado por material céreo que fue desechado. El residuo vegetal remanente se extrajo a continuación con etanol, originándose por concentración de este extracto un precipitado de KCl (reacción con AgNO_3 y cromatografía en capa delgada, parte experimental, pág. 233).

Los compuestos aislados e identificados de esta planta provienen de las separaciones cromatográficas de estos dos extractos.

- * Abreviaturas utilizadas: EP: éter de petróleo, THF: tetrahydrofurano, DMSO: dimetilsulfóxido, TMS: trimetilsililo, p.f.: punto de fusión, p.eb.: punto de ebullición, CC: cromatografía en columna, CCD: cromatografía en capa delgada, CGL: cromatografía gas-líquido, I.R.: infrarrojo, E.M.: espectrometría de masas, ^1H -RMN: resonancia magnética nuclear de hidrógeno, ^{13}C -RMN: resonancia magnética nuclear de ^{13}C , isot.: isotérmico, a: indica el éster metílico del compuesto de igual numeración.

ESTUDIO DEL EXTRACTO DE ETER DE PETROLEO DE W.BUPHTHALMIFLORA

El fraccionamiento de este extracto mediante una columna de silicagel, según se indica en la parte experimental (pág. 206), permitió obtener las siguientes fracciones:

<u>Fracción</u>	<u>Componentes</u>
1	Hidrocarburos.
2	Ceras.
3	Triterpeno <u>78</u> .
4	Alcoholes.
5	Diterpenos <u>10</u> y <u>9</u> , triterpenos <u>48</u> y <u>82</u> , alcoholes.
6	Diterpenos acilados <u>14</u> , <u>8</u> , <u>84</u> y <u>85</u> , esteroides <u>86</u> y <u>87</u> , triterpeno <u>49</u> , diterpenos menores.
7	aceite negro.

Las fracciones 2,4 y 7 no fueron estudiadas.

Hidrocarburos

El análisis por CGL de la fracción 1 , en condiciones isotérmicas,mostró que ésta estaba constituida por una serie homóloga de compuestos, que debían ser hidrocarburos, ya que en su espectro I.R. sólo presentaba bandas a 2880, 1450, 1380 y 720 cm^{-1} . El análisis de esta mezcla por CGL-E.M. en condiciones isotérmicas, reveló que se trataba de hidrocarburos lineales, puesto que se observaban en los E.M. una serie de picos separados 14 una entre sí, con caída exponencial de las intensidades hacia masas altas¹⁴⁷. El ión molecular aparecía

en todos los casos, lo que permitió determinar la presencia de hidrocarburos lineales saturados de 21 a 32 átomos de carbono, siendo los más importantes los impares (en especial los de 29 y 31 átomos de carbono), que se forman por descarboxilación de ácidos grasos pares¹⁴⁸. La representación gráfica de los logaritmos naturales de los tiempos de retención en función del número de átomos de carbono dio una recta con coeficiente de correlación: 0,9994. (Fig. 28).

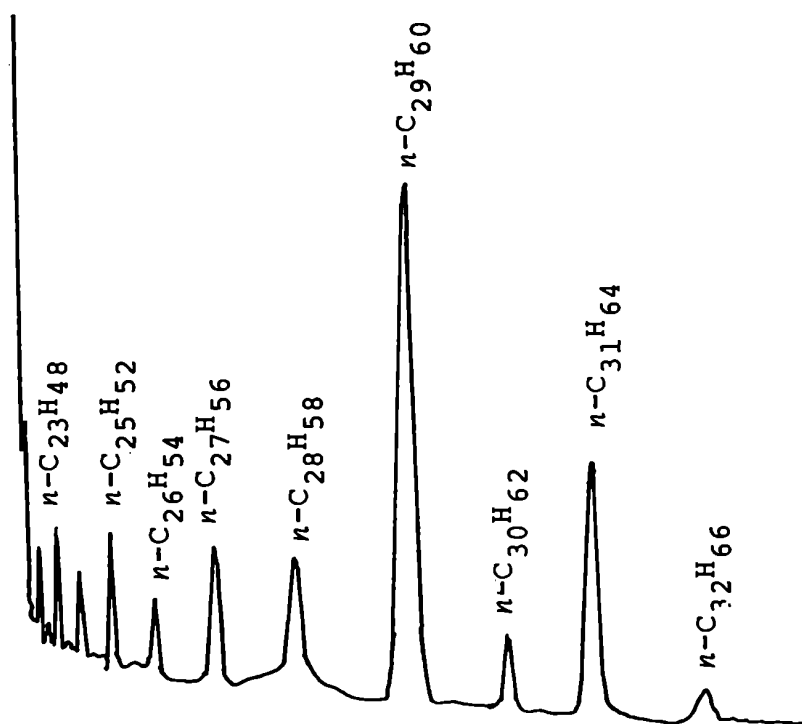


Figura 28: Cromatograma de la fracción 1 (SE-30, 220°, isot.)

Estudio estructural del triterpeno 78

De la fracción 3 se pudo aislar, por repetidas cristalizaciones de acetona-MeOH, 1:1, un compuesto de p.f. 243-244,5° pero muy poco polar, ya que tenía un R_f : 0,60 en CCD

de silicagel con benceno-EP, 1:1, como solvente de elución.

La naturaleza terpénica del compuesto, 78, estaba demostrada por el hecho de revelar de color anaranjado con anisaldehído/ H_2SO_4 y posterior calentamiento.

El espectro I.R. mostraba las señales características de éster a 1730 y 1250 cm^{-1} , como así también otra, indicativa de doble enlace a 815 cm^{-1} .

El espectro de masas (Fig. 29) presentaba un ión molecular a m/e 468 y pérdidas de 15 y 60 uma para dar los iones a m/e 453 y 393 respectivamente, que junto al pico base a m/e 218 y el ión a m/e 203, indicaban que se trataba de un triterpeno pentacíclico acetilado con insaturación entre los carbonos 12 y 13⁶⁵. El pico base a m/e 218 provenía de una reacción de retro Diels-Alder en el anillo C, con retención de la carga en los anillos D y E. El ión a m/e 203 con una abundancia relativa de solamente 41,8 % indicaba la presencia de un grupo metilo en el C-17: en estos triterpenos, cuanto más voluminoso es el sustituyente de C-17, más fácilmente se pierde, dando así un ión m/e 203 de mayor intensidad⁶⁵.

El ión a m/e 249, correspondiente a los anillos A y B, permitió ubicar el hidroxilo acetilado en esta porción de la molécula. Se encontraba también el ión a m/e 189 proveniente de la pérdida de ácido acético a partir de m/e 249 y a la pérdida de 29 uma a partir del ión m/e 218 (Fig. 29).

Se consideró entonces que 78 podría ser el acetato de α -amirina 79 o el acetato de β -amirina, que pertenecen a la serie del Δ^{12} -urseno y Δ^{12} -oleaneno respectivamente, y que no pueden distinguirse por sus espectros de masas.

El espectro de 1H -RMN de 78 en $DCCl_3$ (Fig. 30) mostró un singulete a 2,05 ppm correspondiente a un grupo acetato y un doble doblete ($J_{ae} = 6$ y $J_{aa} = 10$ Hz) a 4,4 ppm, típico de un H-3 axial acoplado con los hidrógenos vecinos de C-2 (axial y ecuatorial)¹⁴⁹. A 5,2 ppm se observaba un multiplete correspondiente al H-12 olefínico, característico de las series del Δ^{12} -urseno y -oleaneno y a 0,84, 0,88, 0,98 y 1,14

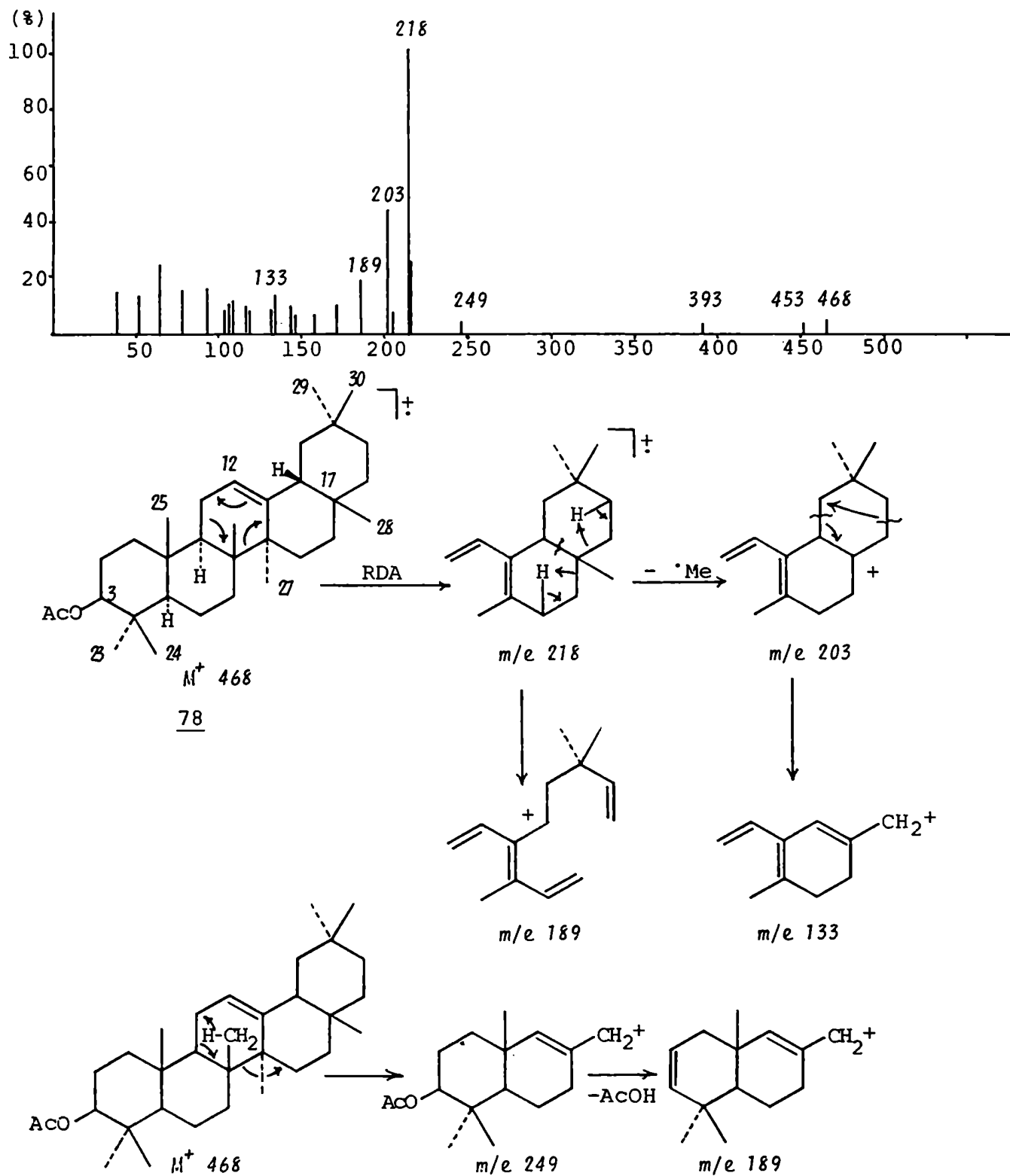


Figura 29: Espectro de masas y fragmentaciones principales de acetato de β -amirina 78.

ppm cuatro singületes correspondientes a siete metilos angulares: Me-28, Me-23,24,29,30, Me-25,26 y Me-27 respectivamente, con desplazamientos químicos coincidentes con un esqueleto de Δ^{12} -oleaneno⁶⁷, asignándose entonces la estructura de acetato de β -amirina al triterpeno 78, que fue confirmada por comparación con un testigo auténtico (CCD, CGL y I.R.) e identidad del ^1H -RMN con el de literatura⁶⁹.

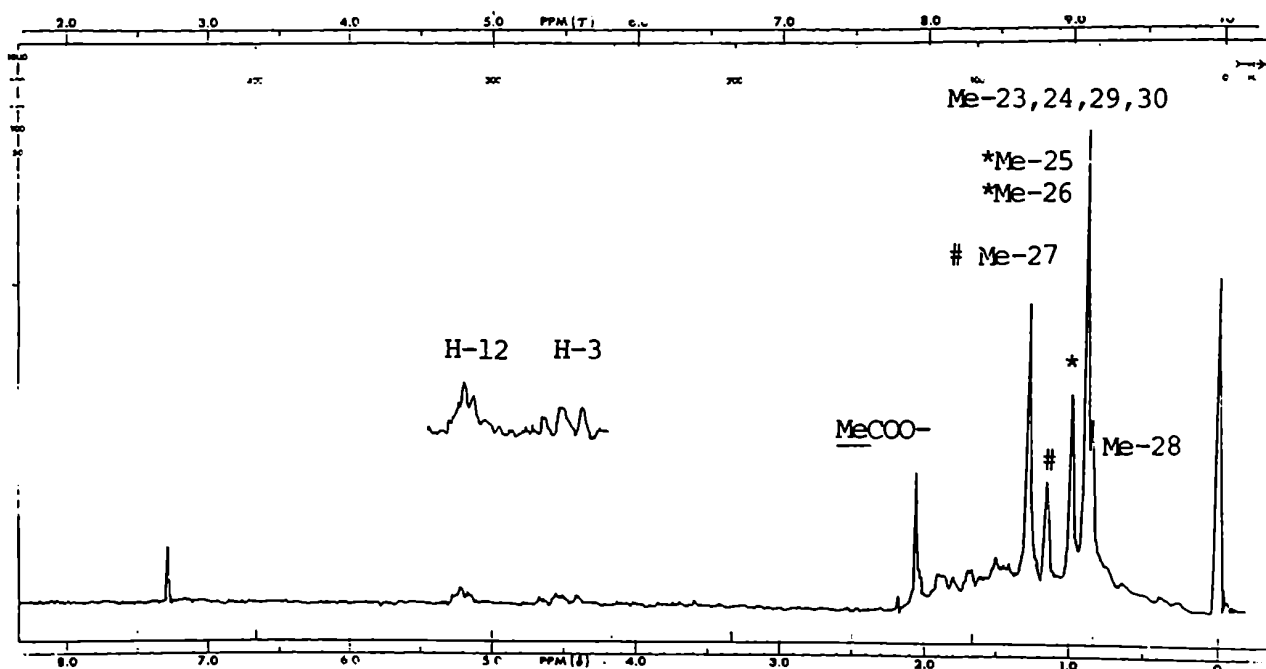
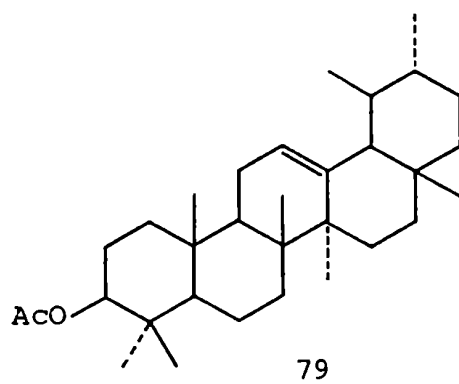


Figura 30: Espectro de ^1H -RMN de 78 en DCCl_3 (60 MHz).



Purificación de los compuestos 10, 9, 48 y 82.

La fracción 5 fue cromatografiada nuevamente en una columna de silicagel obteniéndose cuatro subfracciones (parte experimental, pág. 207). La segunda de éstas mostraba en CCD una mancha alargada, que se redondeaba al desarrollar el cromatograma con solventes que contenían ácido acético en su composición. Se sospechó entonces que se trataba de compuestos de naturaleza ácida, por lo que se metiló una pequeña porción con diazometano etéreo, obteniéndose dos sustancias metiladas de R_f : 0,75 y 0,70 (silicagel, EP-benceno, 2:1) que revelaban con anisaldehído/ H_2SO_4 color rosa y marrón respectivamente.

Los intentos de separar las dos sustancias ácidas de la subfracción 2 en estado libre no fueron exitosos, pero, en cambio, por cromatografía en columna de silicagel de la mezcla previamente metilada pudieron aislarse los ésteres metílicos de los ácidos 10 y 9 (10a y 9a respectivamente).

De la tercera subfracción pudo obtenerse por una nueva cromatografía en columna una mezcla en la que se detectaron los terpenos 48 y 82 y una mezcla de alcoholes lineales.

Análisis estructural de 9a

El éster metílico de 9 (9a, R_f 0,70) fue obtenido como un aceite incoloro que se oscurecía con el tiempo.

Su espectro I.R. mostraba las bandas de carbonilo de éster a 1725 cm^{-1} y las correspondientes a doble enlace a 1655 y 880 cm^{-1} .

El espectro de 1H -RMN (Fig. 31) presentaba un singulete a 3,65 ppm que integraba para tres hidrógenos, característico de un éster metílico. A 4,77 ppm aparecía una señal

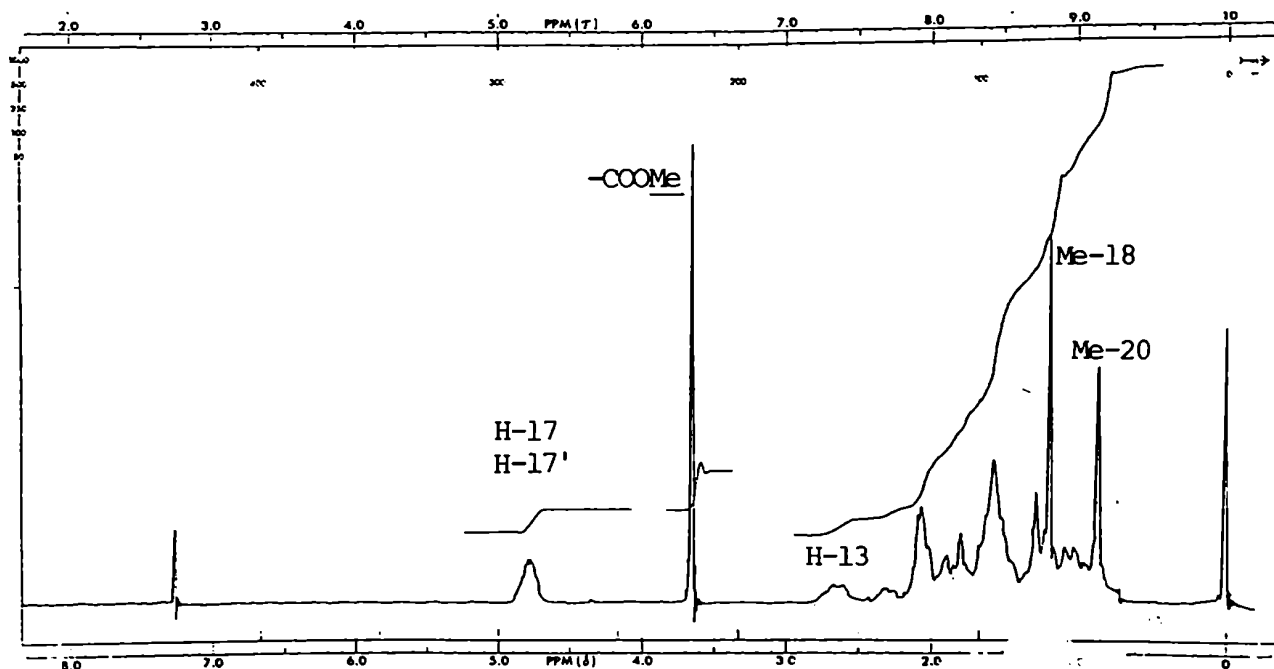


Figura 31: Espectro de ^1H -RMN de 9a en DCCl_3 (60 MHz).

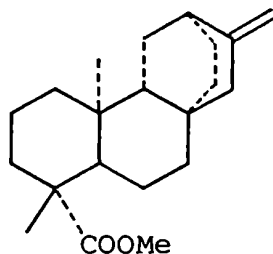
ancha que integraba para dos hidrógenos pertenecientes a un grupo metileno terminal. Ambos hidrógenos presentan, en general, una constante de acoplamiento pequeña ($J \sim 0-2 \text{ Hz}$)¹⁵⁰, y en este compuesto, evidentemente, se diferencian poco entre sí, por lo que dan una única señal a 60 MHz.

La presencia de un solo doble enlace, y el hecho de obtener un ión molecular a m/e 316 en el E.M. de 9a, permitió deducir que 9 era un ácido diterpénico tetracíclico.

Las señales correspondientes a dos metilos cuaternarios, singuletes a 0,85 y 1,17 ppm, junto con el multiplete correspondiente a un hidrógeno alílico a 2,63 ppm (H-13), indicaban que se trataba de un esqueleto del tipo del kaureno 21 o atisireno 22. El metilo a 1,17 ppm se encuentra desplazado a campos bajos por la presencia de un sustituyente electro-negativo geminal. Corresponde entonces esta señal al Me-18,

unido al C-4, en el cual se encuentra también el grupo carboximetilo, lo que se confirma por la aparición en el E.M. de un ión a m/e 101⁵⁰. Al someter 9a a condiciones de saponificación, se encontró que permanecía inalterado, resultado que indicaba que el grupo carboximetilo se encontraba en posición axial^{34,151,152}. Esto se confirmó pues en el espectro I.R. aparecía una banda prominente a 1150 cm^{-1} ; en el caso de grupos carboximetilo ecuatoriales esta banda se encuentra³⁹ a 1244 cm^{-1} .

El desplazamiento químico del metilo restante (Me-20), 0,85 ppm, indicaba que se encontraba en *cis* respecto al grupo carboxilo, configurando de esta manera un esqueleto de *ent*-kaureno o *ent*-atisireno. Sin embargo, este último puede descartarse porque los dos hidrógenos del grupo metileno exocíclico se diferencian apreciablemente en el espectro de ^1H -RMN, como en el caso del *ent*-atisir-16-en-19-oato de metilo 37 donde estos aparecen a 4,52 (cuarteto, $J = 2\text{ Hz}$) y 4,68 ppm (cuarteto, $J = 2\text{ Hz}$). En los derivados del kaureno estos hidrógenos se distinguen en el ^1H -RMN solamente cuando existe una función oxigenada sobre C-15⁴².



37

El Me-20 aparece a 1,0 ppm en los compuestos derivados del kaureno con grupos metilo, hidroximetileno o acetoximetileno axiales en C-4; si este sustituyente es un grupo carboxilo se desplaza a 0,94 ppm y en el caso de carboximetilo a 0,82 ppm. Como consecuencia del impedimento estérico, el grupo carboximetilo debe ubicarse en una posición donde el átomo de

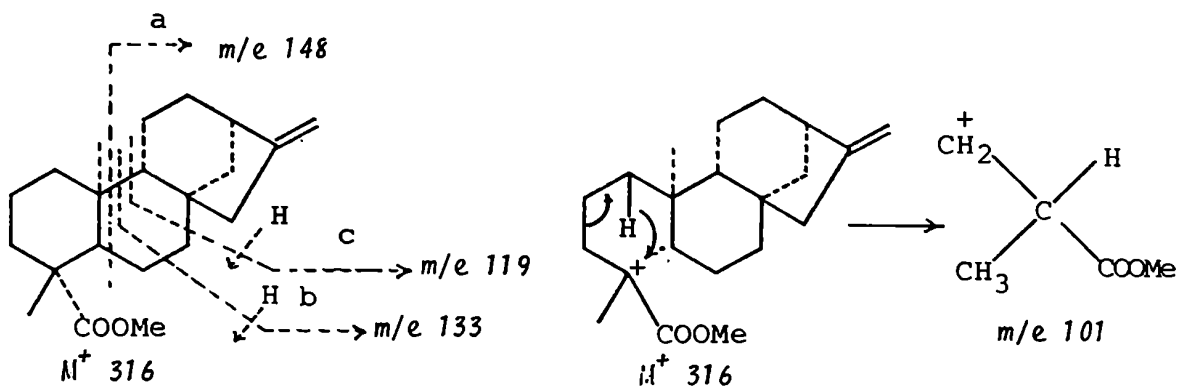
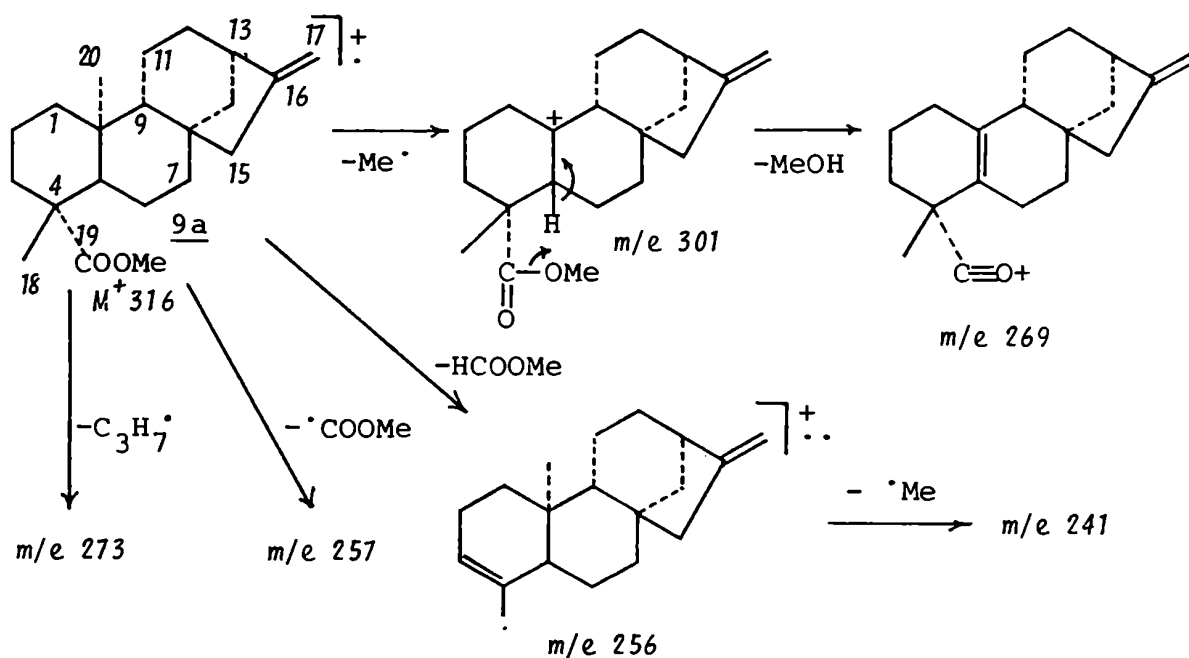
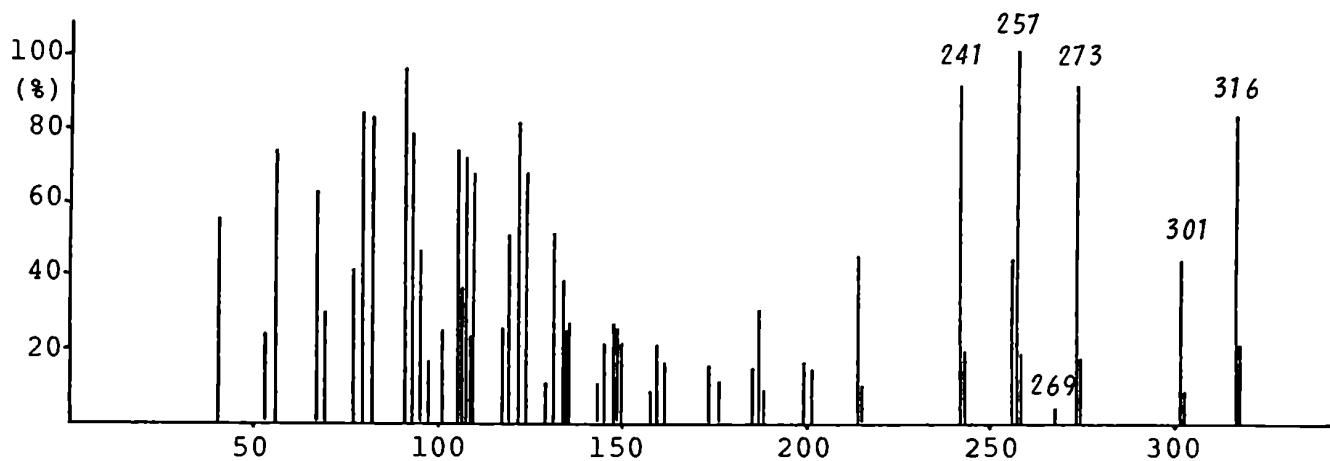


Figura 32: Espectro de masas y fragmentaciones de **9a**.

oxígeno sp^2 y el grupo -OMe estén equidistantes del Me-20, según se puede apreciar en un modelo molecular, quedando éste en la zona de protección del grupo carbonilo ^{34,150}. Si el grupo carboxilo de C-4 es ecuatorial, como en el ácido *ent*-kaur-16-en-18-oico, no influye sobre el Me-20, que aparece entonces a 1,05 ppm, mientras que el Me-19 lo hace a 1,1 ppm¹⁵³.

Estos datos, y el valor negativo del poder rotatorio, condujeron a que 9 era el ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico, comúnmente llamado ácido kaurénico.

El espectro de masas de 9a (Fig. 32) mostró las pérdidas de metilo, metanol y formiato de metilo, características de los terpenos con grupos éster sobre C-4⁵⁰. La pérdida de C_3H_7 corresponde a los metilenos 1, 2 y 3 del anillo A. Las rupturas del anillo B (Fig 32) originan los picos a, b y c; en los picos b y c, así como en el fragmento m/e 149 ocurre una transferencia de hidrógeno⁵⁰.

Finalmente, se confirmó su estructura por comparación con un testigo auténtico por CCD y CGL del éster metílico y por sus propiedades espectroscópicas²¹.

Análisis estructural de 10a

El compuesto 10a, indudablemente muy relacionado con 9a, presentaba en el E.M. los mismos fragmentos que éste, pero desplazados en dos unidades de masa, indicando que tenía una insaturación más (Fig. 34). No se observó el ión a m/e 271, correspondiente al m/e 273 de 9a, originado por la pérdida de los metilenos 1, 2 y 3, pero en cambio aumentó la intensidad relativa de los picos provenientes de las pérdidas de metilo y formiato de metilo, indicando un cambio estructural en el esqueleto carbonado.

En el espectro I.R. de 10a se apreciaba una complicación de la zona correspondiente a las deformaciones C-H

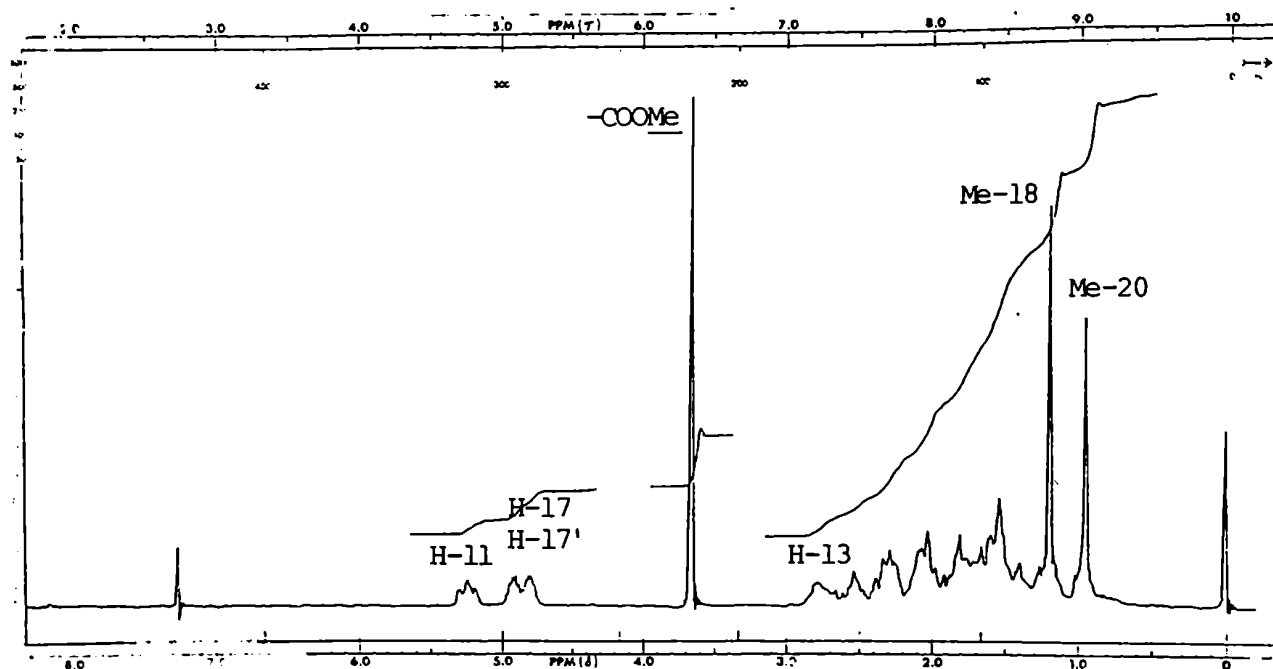


Figura 33: Espectro de ^1H -RMN de 10a en DCCl_3 (60 MHz).

de dobles enlaces, apareciendo una nueva banda a 820 cm^{-1} , mientras que el resto del espectro mostraba las características de 9a.

En el espectro de ^1H -RMN se observaban las señales típicas del esqueleto del kaureno: dos metilos a 0,95 y 1,19 ppm, el H-13 a 2,78 ppm, el metilo de éster a 3,65 ppm, dos multipletes a 4,82 y 4,92 ppm correspondientes a los H-17 acoplados entre sí y con los hidrógenos alílicos de C-13 y C-15, y una nueva señal, un triplete deformado correspondiente a un hidrógeno olefínico a 5,25 ppm acoplado con dos hidrógenos con $J = 5$ y 6 Hz (Fig. 33).

Todos estos datos indicaban que 10 era un compuesto derivado del ácido kaurénico con un segundo doble enlace, que, según lo visto en el espectro de ^1H -RMN, debía estar ubicado sobre un carbono cuaternario, ya que sólo aparecía un hidrógeno

olefínico adicional. Este requerimiento restringe las posiciones posibles de este doble enlace a C-5 y C-9, ambas con un metileno vecino al hidrógeno olefínico. La posición 12 debe descartarse ya que C-13 es cabeza de puente.

Examinando el espectro de $^1\text{H-RMN}$ se llega a la conclusión que la insaturación se encuentra entre C-9 y C-11. La señal del Me-18 y la del metilo del éster (1,19 y 3,65 ppm respectivamente) permanecen invariables respecto a las del éster metílico del ácido kaurénico, mientras que las señales de los dos hidrógenos 17 y 17' son ahora distintas y están a campos más bajos; el Me-20 sufrió un efecto de desprotección pasando de 0,85 a 0,95 ppm.

Al inspeccionar los modelos moleculares de los dos compuestos posibles, se encuentra que aquel con el doble enlace en C-9 sufre un cambio grande en la disposición relativa de los anillos C y D, acercando considerablemente C-17 hacia el centro de la molécula y haciendo, por lo tanto, más notable la diferencia entre los entornos de los hidrógenos 17 y 17'.

También el Me-20 sufre un efecto de desprotección por su cercanía al doble enlace, que sin embargo, es similar al producido por una insaturación entre C-5 y C-6.

En el compuesto que posee esta última insaturación se puede observar que el grupo carboximetilo y el Me-18 quedan muy próximos al doble enlace, encontrándose los hidrógenos de este último en su zona de desprotección. En cambio, los entornos de los H-17 no presentan mayores modificaciones. El hecho de que en el espectro de 10a se observe variación en las señales de los hidrógenos 17 y 17' y que la del Me-18 permanezca invariable respecto a las correspondientes de 9a, permite asegurar que el doble enlace se encuentra entre C-9 y C-11.

Un efecto similar se observa al comparar los $^1\text{H-RMN}$ de los compuestos 80 y 81¹⁵⁵. En éstos, al trasladar el doble enlace de C-13 a C-9, varía la señal del metilo 17 de 0,75 ppm a 0,98 ppm, mientras que las del Me-15 y el metilo del éster permanecen invariables a 1,2 y 3,7 ppm respectivamente (Fig. 36).

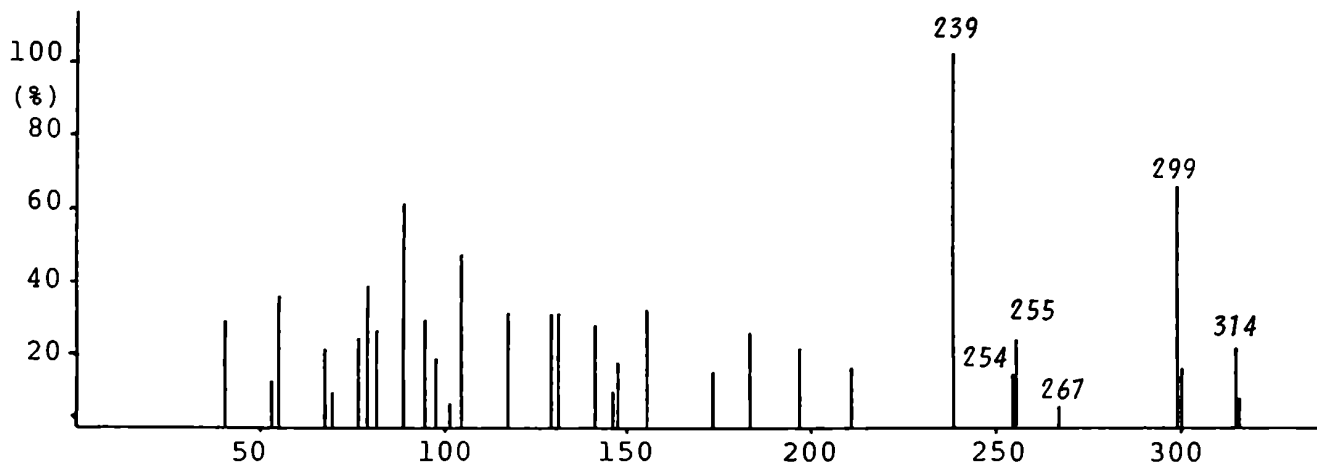


Figura 34: Espectro de masas de 10a.

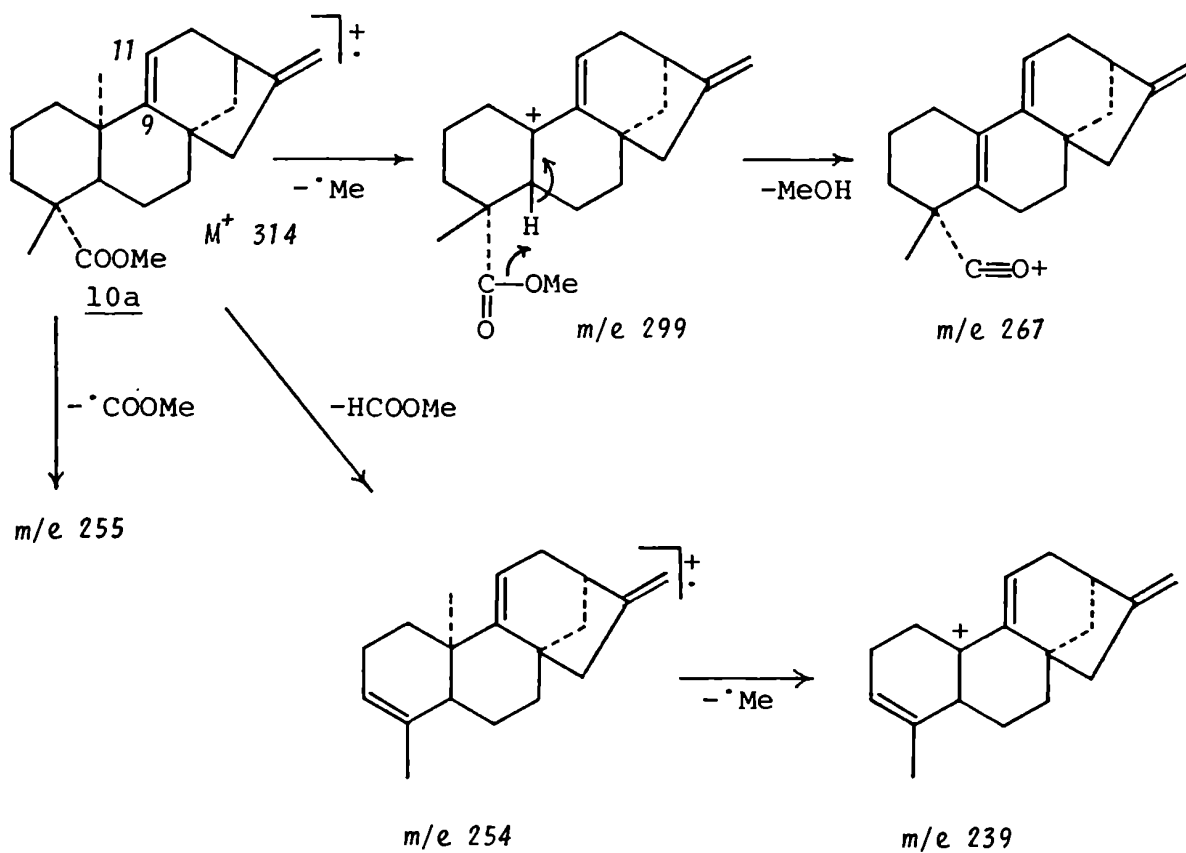


Figura 35: Fragmentaciones principales de 10a.

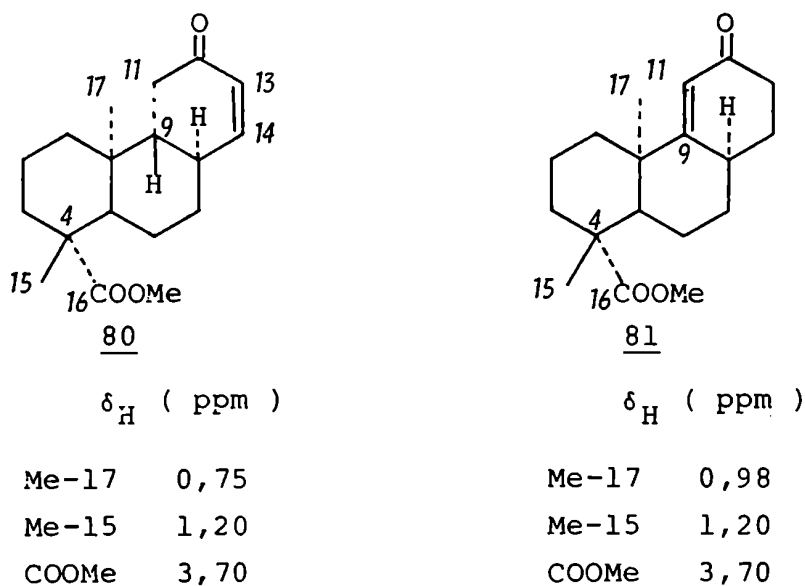


Figura 36: Efecto de la insaturación de C-9 en las señales de los metilos de C-4 y C-10.

En el espectro de masas de 10a se observan intensificadas las pérdidas de metilo (m/e 299), y de formiato de metilo y metilo, posiblemente por la formación de un catión alílico estabilizado sobre el C-10 (Fig. 35). Aparece también el pico a m/e 101, característico de diterpenos tetracíclicos con grupo carboximetilo sobre C-4 y los correspondientes a los iones a, a+1, b y c (m/e 146, 147, 131 y 117) de 9a (Fig. 32) pese a que éstos involucrarían rupturas de uniones vinílicas, que pueden no ser tales, ya que es sabido que los dobles enlaces sufren migraciones en el espectrómetro de masas.

El compuesto 10 es entonces el ácido *ent* - kaur-9(11),16-dien-19-oico, también llamado ácido grandiflorénico, cuyas propiedades físicas y químicas resultaron coincidentes con las de un testigo auténtico (en ambos casos se usaron los ésteres metílicos) y con las de literatura^{36,154}.

Identificación de los triterpenos 48 y 82

El análisis por cromatografía gaseosa de la tercera subfracción, proveniente de la fracción 5 del extracto de éter de petróleo, mostró tres sustancias principales con tiempos de retención 1,45, 5,82 y 6,78 min (Fig. 37). La acetilación de esta mezcla produjo otra de composición idéntica, indicando la presencia de alcoholes.

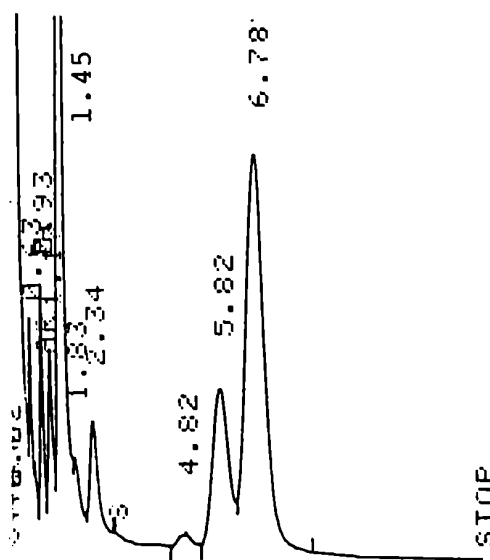


Figura 37: Cromatograma de la subfracción 3 de la fracción 5 (OV-17, 265°, isot.)

El estudio por CGL-E.M. de esta mezcla evidenció que la sustancia de t_r 1,45 min era un alcohol lineal de 26 átomos de carbono. Se observaba en su E.M. los picos característicos de la parte hidrocarbonada a masas bajas, y un pico a m/e 386 correspondiente a M-18-28, ya que generalmente el ión molecular no se observa. Acompañaban a éste pequeñas cantidades de alcoholes lineales de C_{21} a C_{28} , que fueron identificados por CGL de la mezcla acetilada (parte experimental, pág. 213).

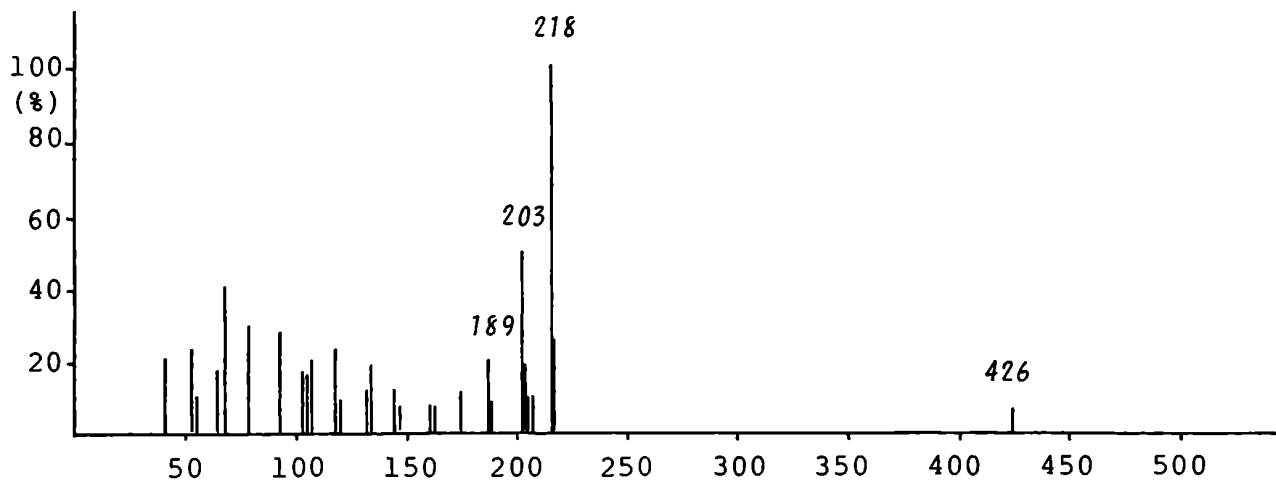


Figura 38: Espectro de masas de β -amirina 48.

La sustancia de t_r 5,82 min (48) presentó en el E.M. (Fig. 38) un ión molecular a m/e 426, pico base a m/e 218, así como también fragmentos a m/e 207, 203 y 189.

Esto indicaba, como ya se analizó para el compuesto 78, que 48 era α - o β -amirina, realizándose la identificación por CGL contra testigos auténticos y también contra derivados acetilados. De esta comparación surgió que el compuesto 48 era β -amirina.

El espectro de masas del compuesto de t_r 6,78 min (82) presentaba un M^+ 426 con subsiguiente pérdida de agua (m/e 408). El pico base aparecía a masas bajas (m/e 95) acompañado de otros muy intensos a m/e 69, 81, 109, 121 y 135, y no ofrecía mayores indicios acerca de la clase de triterpeno de que se trataba. Los picos a m/e 218 y 189 tenían intensidades de 40 y 70 % respectivamente, mientras que el pico a m/e 203 presentaba una abundancia baja (30%) y estaba acompañado por iones de abundancia similar a m/e 204, 205 y 206.

Esto indicaba que 82 era un triterpeno pentacíclico isómero

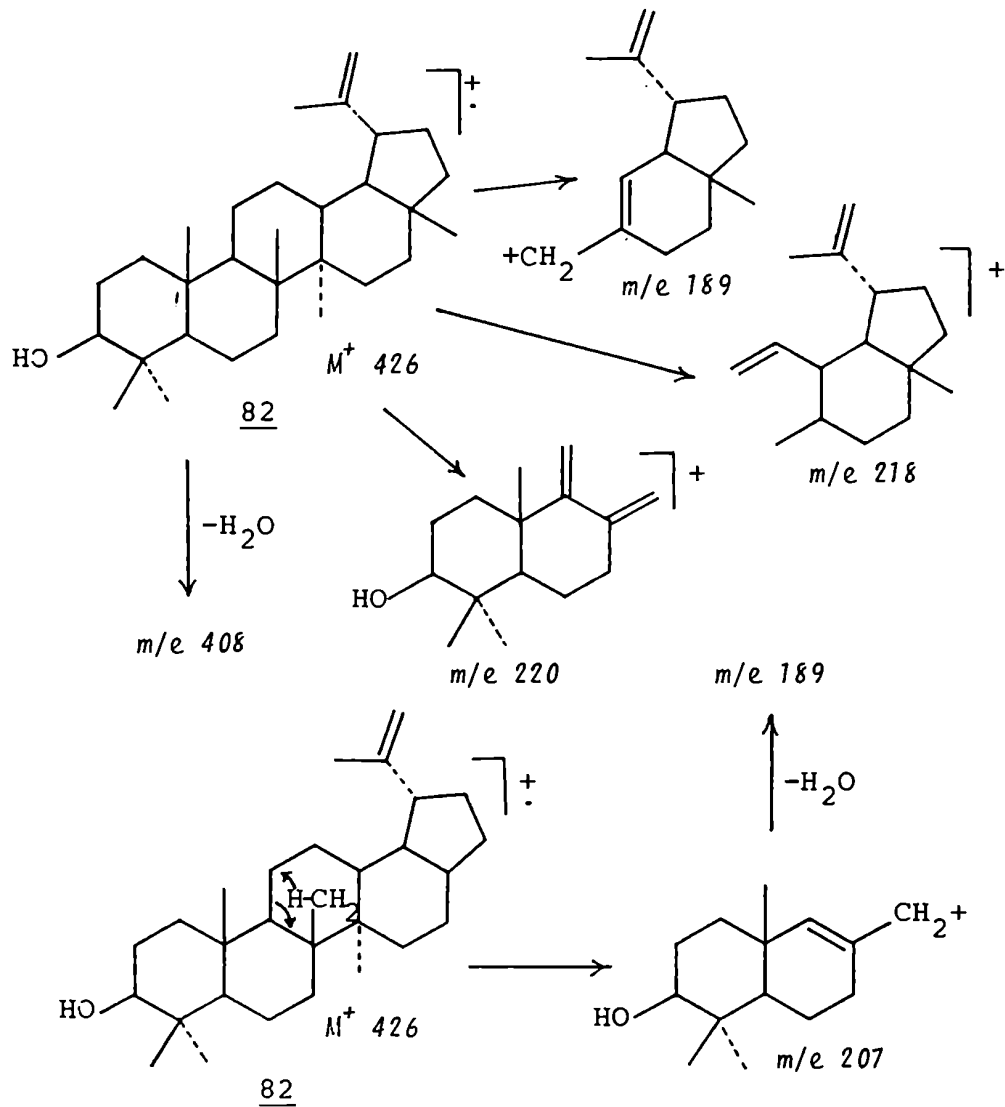
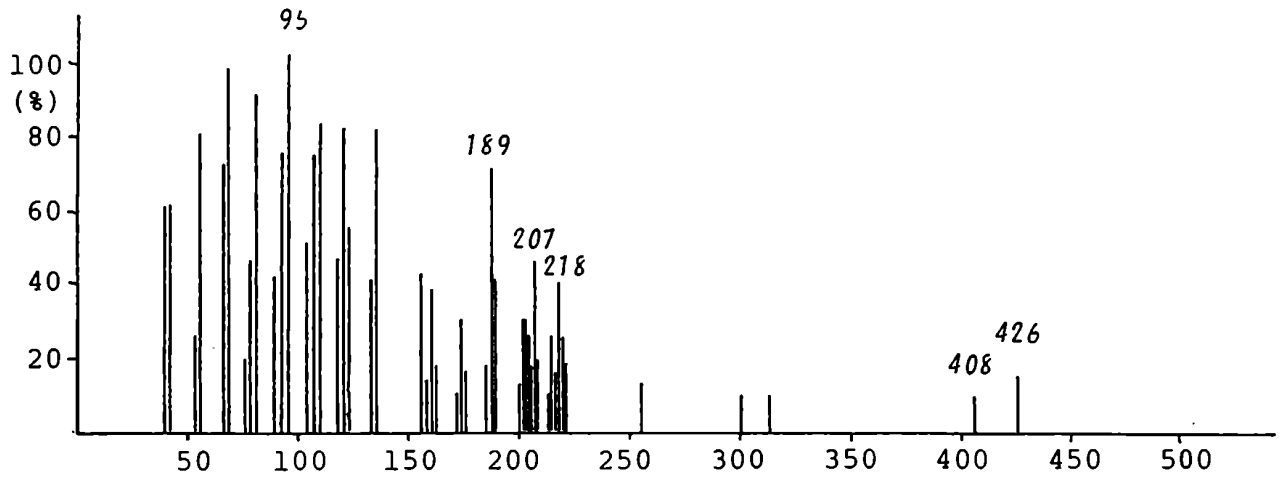
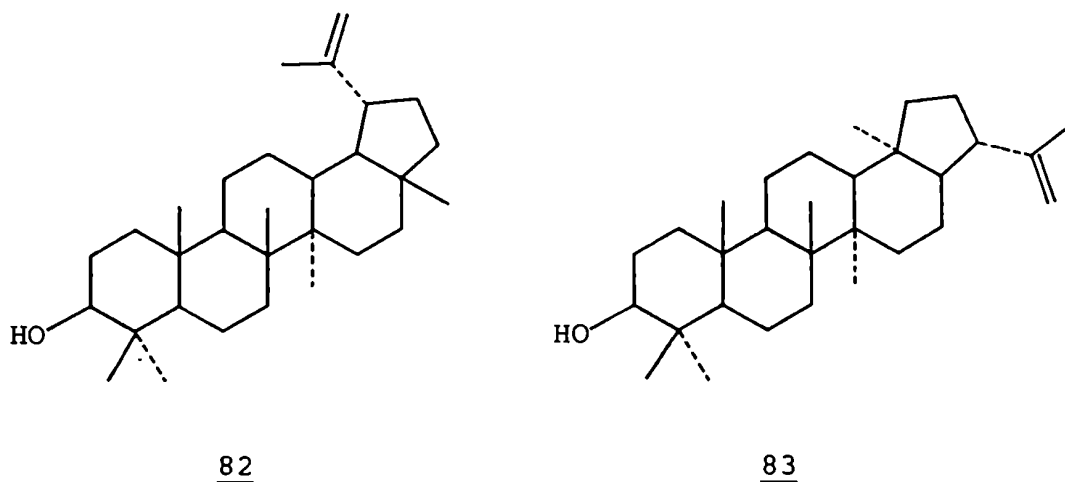


Figura 39: Espectro de masas y fragmentaciones de lupeol 82.

de la β -amirina. La presencia de un ión a m/e 207 con abundancia relativa de 45% señalaba que el hidroxilo debía encontrarse en los anillos A o B de donde procede este fragmento (Fig. 39), mientras su elevada intensidad mostraba que esta ruptura estaba favorecida con respecto a la misma en la β -amirina, donde la fragmentación está dirigida por la insaturación de C-12 para dar el pico base a m/e 218. En los triterpenos saturados, por ausencia de grupos directores, el ión a m/e 207 para los alcoholes, es el único abundante a masas altas.

La presencia de un doble enlace en la molécula, junto al hecho de que m/e 218 es todavía muy importante, permitió deducir que 82 podía ser un derivado del lupeno u hopeno, posiblemente lupeol 82 u hopeol 83^{65,66}.



La comparación por CGL con un testigo acetilado permitió determinar que 82 era lupeol. En la figura 39 se esquematizan las fragmentaciones más importantes de este triterpeno.

Separación de los compuestos 14, 84, 85, 8, 49
y esteroides 86 y 87

La fracción 6 del extracto de éter de petróleo fue cromatografiada nuevamente en una columna de silicagel con un gradiente de solventes que comenzaba con EP-AcOEt, 50:3 hasta llegar a AcOEt puro (parte experimental, pág. 207). De esta manera, fueron eluidos en orden sucesivo los siguientes compuestos:

- a. Una mezcla de ácidos grandiflorénico 10 y kaurénico 9.
- b. Un nuevo ácido 14 que fue metilado y purificado por posterior cromatografía en columna para dar 14a, R_f : 0,57 (silicagel, EP-benceno, 1:1, 4 desarrollos).
- c. Una mezcla de ácidos, que por metilación y separación en una nueva columna de silicagel con EP-benceno, 2:1, dió sucesivamente 10a y 9a, 14a, los ésteres metílicos de 84, 85 y 8 (84a, 85a y 8a respectivamente) y finalmente 8a puro, R_f : 0,45 (silicagel, EP-benceno, 1:1, 4 desarrollos).
- d. Una fracción compleja que, por recromatografía usando HCCl_3 como solvente de elución, dió una mezcla de los esteroides 86 y 87.
- e. Una mezcla de ácidos que, metilados, por sucesivas cromatografías en columna, dió el éster metílico de 49 (49a) y trazas de dos compuestos ácidos que no fueron estudiados por falta de material.

Análisis estructural del diterpeno 14a

El espectro I.R. indicaba la presencia de grupo carbonilo (1710 cm^{-1}) y de doble enlace ($1648, 920, 850$ y 815 cm^{-1}).

En el espectro de ^1H -RMN (Fig. 40) se observaban las señales características del kaurenato de metilo: tres singuletes que integraban cada uno para tres hidrógenos a 0,84 (Me-20), 1,15 (Me-18) y 3,60 ppm ($-\text{COOMe}$), un multiplete a 2,78 ppm correspondiente al H-13 y dos singuletes anchos a 5,03 y 5,08 ppm (H-17 y 17'), a las que se añadían otras nuevas.

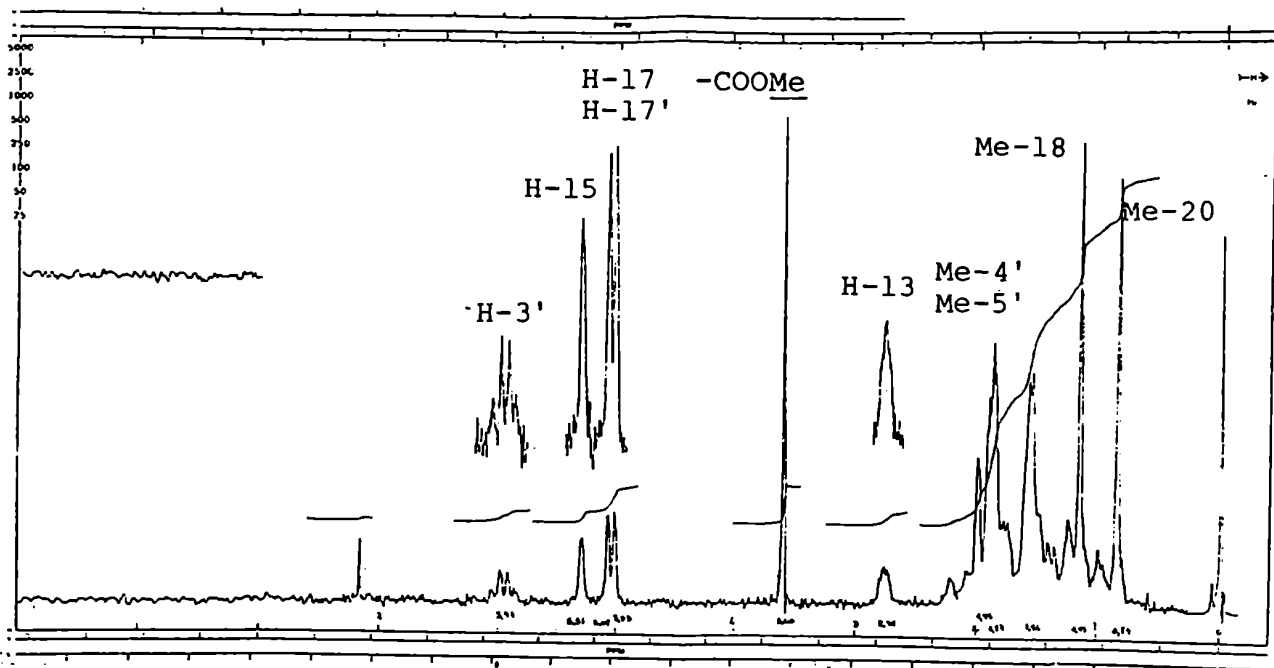


Figura 40: Espectro de ^1H -RMN de 14a en DCCl_3 (100 MHz).

Comparando el espectro de ^{13}C -RMN de 14a con el del kaurenato de metilo 9a⁴⁵ se observó la aparición de cinco nuevas señales: dos metilos a 15,8 y 20,6 ppm, dos carbonos olefínicos a 128,1 y 137,0 ppm y un carbono carbonílico a 167,7 ppm (Tabla 14). Simultáneamente ocurrían cambios en el esqueleto carbonado, especialmente en los carbonos 7, 8, 9, 13, 14, 15 y 17, encontrándose ahora una señal a 82,4 ppm

Tabla 14: Desplazamiento químico (^{13}C -RMN) de los carbonos de los compuestos 14a y 8a comparados con los de 9a y 42 (en ppm respecto al TMS, en DCCl_3).

	<u>9a</u> ⁴⁵	<u>42</u> ⁴⁵	<u>14a</u>	<u>8a</u>
1	40,9	40,9	40,6	40,6
2	19,2	19,2	19,1	19,1
3	38,1	38,1	37,9	37,9
4	43,9	43,9	43,7	43,7
5	57,2	57,1	56,5	56,6
6	21,9	21,1	20,9	20,9
7	41,4	36,3	35,0	34,9
8	44,3	47,8	47,5	47,7
9	55,2	53,5	52,9	52,9
10	39,5	39,7	39,6	39,9
11	18,4	18,3	18,4	18,4
12	33,2	32,6	32,6	32,6
13	43,9	42,3	42,5	42,5
14	39,7	35,3	37,3	37,3
15	49,0	82,7	82,4	82,7
16	155,8	160,3	155,4	155,3
17	103,1	108,2	109,7	109,7
18	28,8	28,8	28,6	28,6
19	180,0	178,0	177,7	177,7
20	15,9	15,7	15,6 ^a	15,6
1'			167,7	166,4
2'			128,1	128,8
3'			137,0	136,7
4'			15,7 ^a	14,3
5'			20,6	12,2
Me	51,1	51,2	51,0	51,0

^aLos valores pueden intercambiarse.

característica de los carbonos que llevan unido un átomo de oxígeno.

Estos datos, junto con la aparición en el E.M. (Fig. 43) de un M^+ a m/e 414 y un pico base a m/e 83 indicaban que 14a debía ser un éster de un hidroxikaurenato de metilo con un ácido de fórmula C_4H_7COOH .

La ubicación del hidroxilo en el esqueleto del kaureno se dedujo de la aparición en el espectro de 1H -RMN de un singulete ligeramente ensanchado ($W_{1/2} = 4$ Hz) a 5,31 ppm correspondiente al hidrógeno base del alcohol esterificado y del hecho de que las señales de los H-17 y 17' estaban diferenciadas. Estos datos son sólo compatibles con una función oxigenada sobre C-15, ya que éste es el único en la molécula que no tiene hidrógenos vecinos, presentando el H-15 solamente acoplamiento alílico con los hidrógenos de C-17, y produciendo además, como ya se mencionó anteriormente, su diferenciación⁴².

La configuración del C-15 fue sugerida por el desplazamiento químico del C-9 en el espectro de ^{13}C -RMN. Este aparece a 54 ppm en el 15- α -hidroxikaurenato de metilo 42 y a 46 ppm en el 15- β -hidroxikaurenato de metilo 41 (pág. 33).

En el compuesto 14a se encuentra a 52,9 ppm, lo que indica la existencia de una interacción HC entre H-9 e H-15 β ; por lo tanto la función oxigenada de C-15 posee una configuración α .

Para confirmarlo se hidrolizó el compuesto 14a con KOH en EtOH-H₂O (parte exp., pág. 217) obteniéndose 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42 cuyo p.f. coincidía con el de literatura para este isómero (isómero α p.f.: 101°¹⁵², isómero β p.f.: 166-167°⁴²).

El espectro I.R. mostraba las bandas de HO- libre y asociado a 3460 y 3320 cm^{-1} , carbonilo de éster a 1720 cm^{-1} y varias bandas de deformación C-H entre 750 y 940 cm^{-1} correspondientes al doble enlace exocíclico.

El espectro de masas de 42 (Fig. 41) mostró el M^+ correcto a m/e 332, las pérdidas características de metilo, agua, metanol, formiato de metilo y la presencia del ión

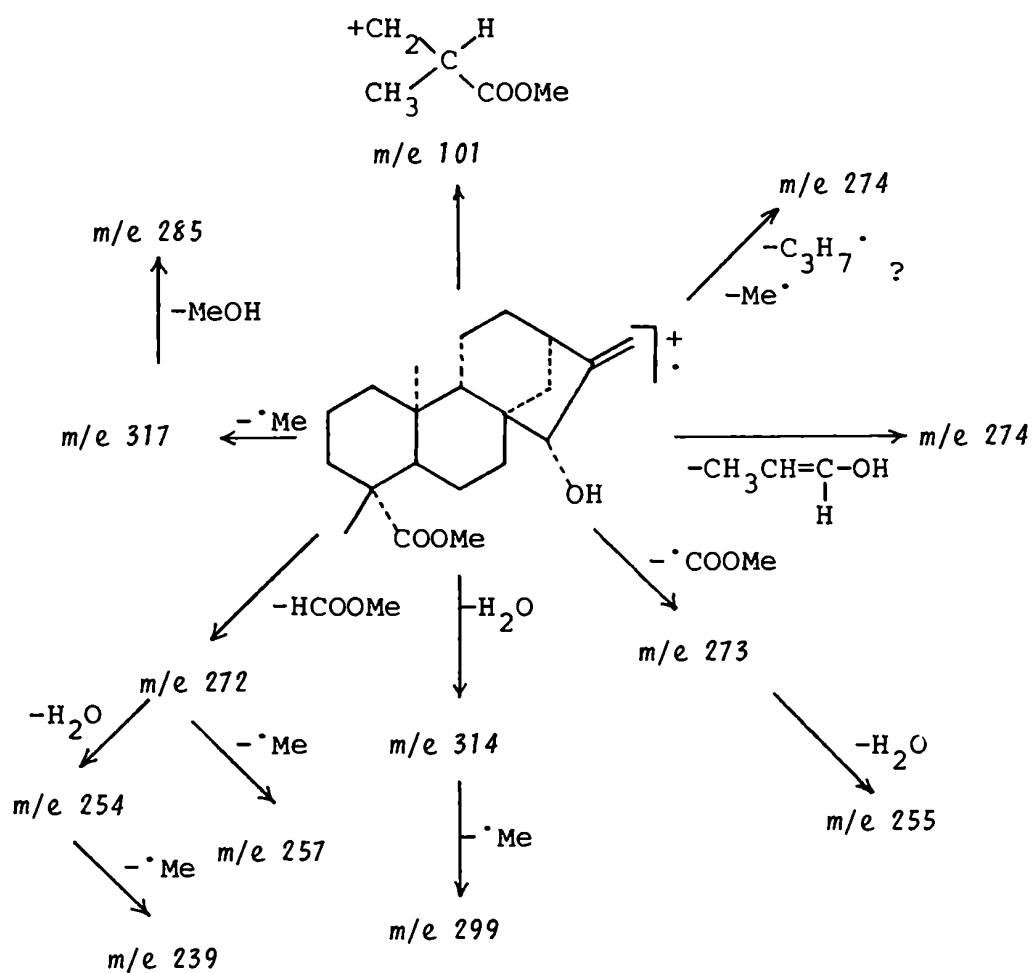
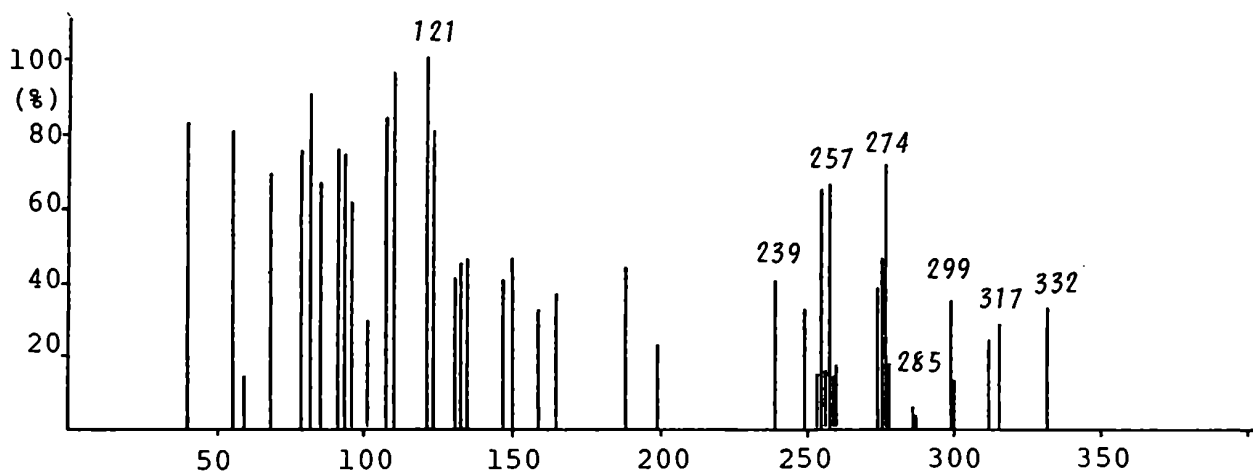
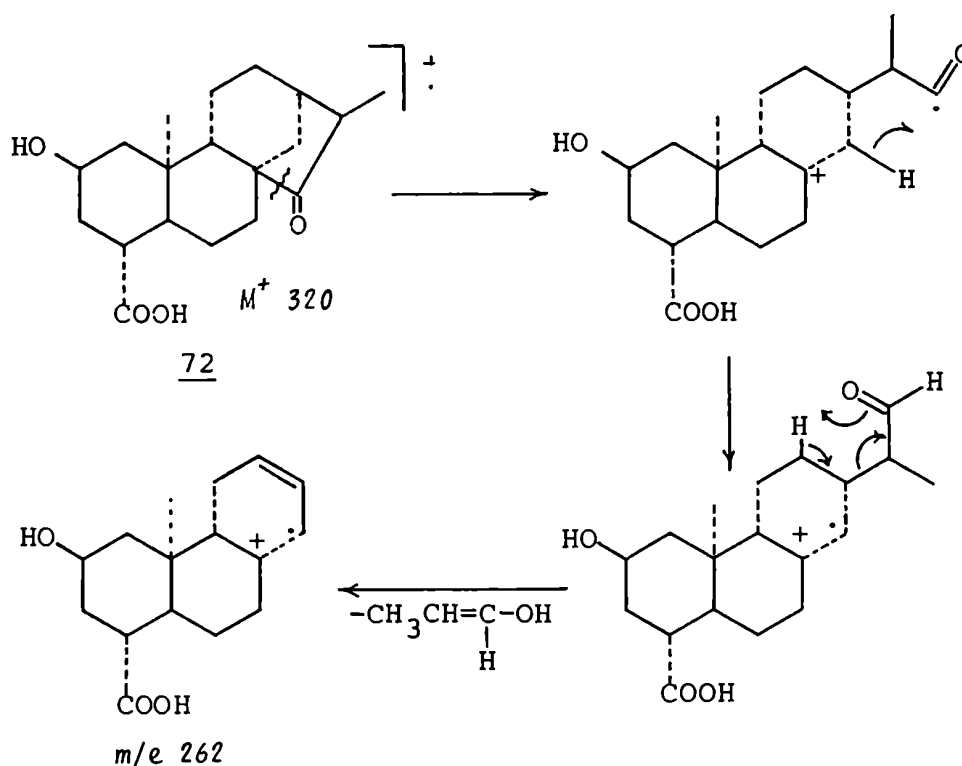


Figura 41: Espectro de masas y fragmentaciones de 42.

m/e 101 correspondiente al C-4 sustituido. La presencia del ión a m/e 274 con una abundancia relativa del 71% puede explicarse también considerando la pérdida de 58 una que ocurre en el ácido 2β-hidroxi-15-oxoatractilano-4-α-carboxílico 72¹²⁸, donde esta ruptura es el pico base:



Podría ocurrir una isomerización previa de 42 al compuesto cetónico correspondiente, que daría la ruptura indicada. Es sabido que los kaur-16-en-15-β-oles se isomerizan a kauran-15-onas en medio ácido¹⁹⁸.

El estudio del espectro de ¹H-RMN de 42 (Fig. 42) confirmó que se trataba del 15-α-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo, ya que presentaba las señales de los H-17 y 17' a 5,06 y 5,21 ppm, coincidentes con las de literatura para este éster¹⁵⁶. Las señales de estos hidrógenos en el 15-β-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo aparecen a 4,94 y 5,08 ppm⁴².

Las señales de los metilos 18 y 20 y la del metilo del éster no difieren apreciablemente en ambos compuestos.

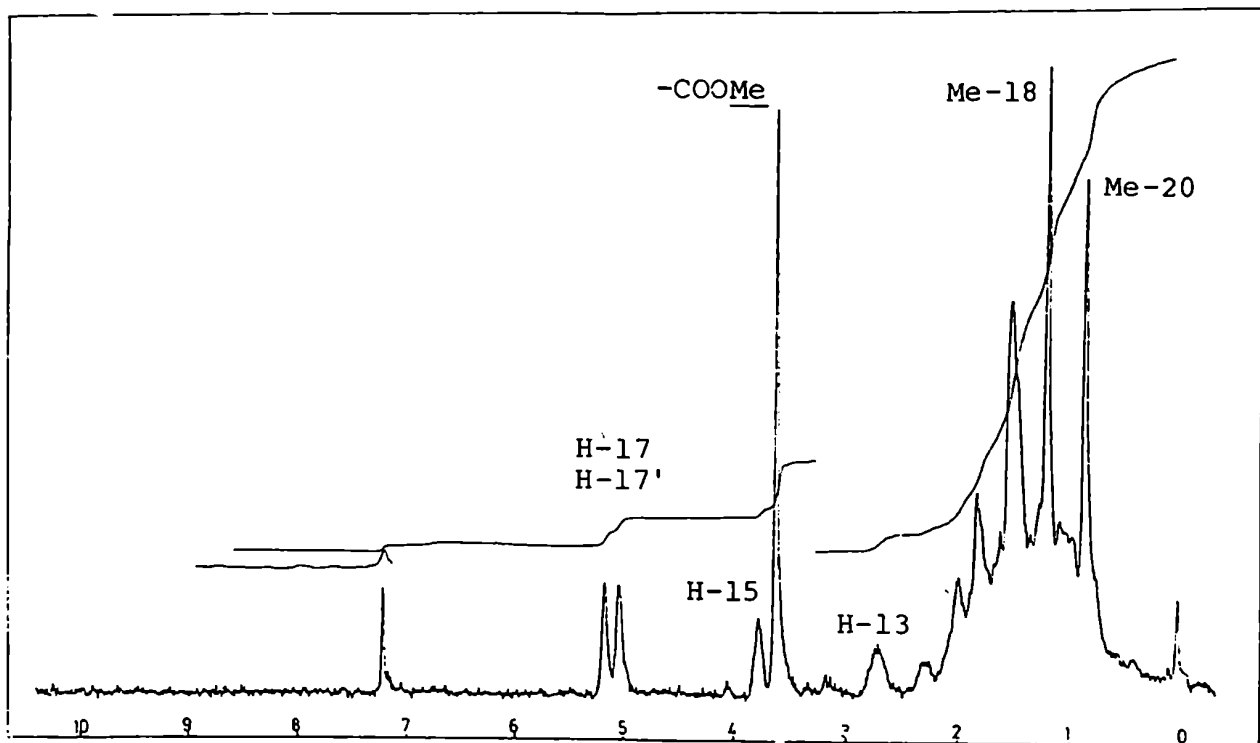


Figura 42: Espectro de ^1H -RMN de 42 en DCCl_3 (60 MHz).

Quedaba por dilucidar la naturaleza del ácido que esterificaba el $\text{HO-15}\alpha$ de 14a.

De los datos espectroscópicos (^{13}C -RMN y E.M.) era evidente que éste podía ser el senécico, el angélico o el tíglico, los cuales pueden diferenciarse entre sí con relativa facilidad por ^1H -RMN utilizando como compuestos modelo sus ésteres metílicos^{157,158} (Tabla 15).

En el ^1H -RMN de 14a (Fig. 40) se observaba un cuarteto de cuartetos con $J = 1$ y 7 Hz a $5,97$ ppm, que integraba para un hidrógeno. A campos altos aparecía un doblete ensanchado con $J = 7$ Hz a $1,95$ ppm y un singulete ancho a $1,87$ ppm.

Estas señales corresponden claramente al H-3 y los metilos

Tabla 15: Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento de los hidrógenos de los ésteres metílicos de los ácidos tíglico, angélico y senécico (en Cl_4C).

	H (ppm)	J (Hz)	
Me-4	1,75	$J_{3,4} = 7,2$	<p>Tiglato de metilo</p>
Me-5	1,80	$J_{3,5} = 1,4$	
H-3	6,72	$J_{4,5} = 1,2$	
Me-4	1,95	$J_{3,4} = 7,0$	<p>Angelato de metilo</p>
Me-5	1,87	$J_{3,5} = 1,2$	
H-3	5,97	$J_{4,5} = 1,5$	
Me-4	1,89	$J_{2,4} = 1,3$	<p>Senecioato de metilo</p>
Me-5	2,13	$J_{2,5} = 1,3$	
H-2	5,60	$J_{4,5}$ no medible	

4 y 5 respectivamente del ácido angélico.

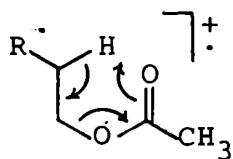
El espectro de ^{13}C -RMN de 14a (Tabla 14) confirmaba esta asignación pues las señales de los metilos del ácido aparecían a 15,7 y 20,6 ppm, dentro del rango usual para los ésteres de este ácido. El ácido tíglico, por el contrario, origina dos señales alrededor de 12 y 14-15 ppm y el senécico una señal a 19 ppm para el metilo *trans* al carbonilo y otra a 26 ppm para el metilo *cis* ¹⁶⁸.

No hay concordancia entre los diversos autores acerca

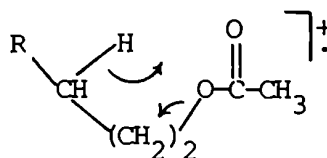
de la asignación de cada una de las señales de los dos metilos del ácido tíglico y del ácido angélico¹⁵⁹. Así pues, para diversos ésteres del ácido angélico con sesquiterpenos, asigna Herz^{160,161} el valor ~ 20 ppm al Me-4 y el de $\sim 15,7$ ppm al Me-5, mientras Mabry¹⁶⁵ y Bohlmann¹⁶² asignan a la inversa. En el caso de los ésteres del ácido tíglico, en productos similares, Herz^{161,163} atribuye el valor $\sim 14,5$ ppm al Me-4 y el de ~ 12 ppm al Me-5; en cambio, Mabry¹⁶⁴ lo hace a la inversa.

Recientemente el Dr. P. Joseph-Nathan, en una conferencia dictada en este Departamento, informó acerca de la asignación definitiva de estas señales, realizada por experimentos de RMN bidimensional (correlación $^{13}\text{C}-^1\text{H}$). En el ácido angélico el C-4 aparece a 16 ppm y C-5 a 20 ppm, en el ácido tíglico el C-4 se encuentra a 14 ppm y C-5 a 11 ppm.

En la figura 43 se muestran el espectro de masas y las fragmentaciones características de 14a. Es significativa la ausencia de picos a m/e 100 y 101 (este último, de baja abundancia, proviene del fragmento que contiene el C-4) debidos al ácido libre y protonado, que generalmente se observan en los E.M. de los ésteres cuando se produce un reordenamiento de Mc Lafferty y posterior transferencia de hidrógeno. La pérdida del ácido para dar el ión a m/e 314 presumiblemente se debe a un reordenamiento con transferencia de un H- γ , ya que no hay H- β . Podrían ser estos el H-7 α o el 14 β . Biemann¹⁶⁷ encontró que cuando se pierde ácido acético a partir del acetato de pentilo, el hidrógeno abstraído proviene en un 55% del H- β y en un 45% del γ y postuló los caminos A y B para estas pérdidas:



A



B

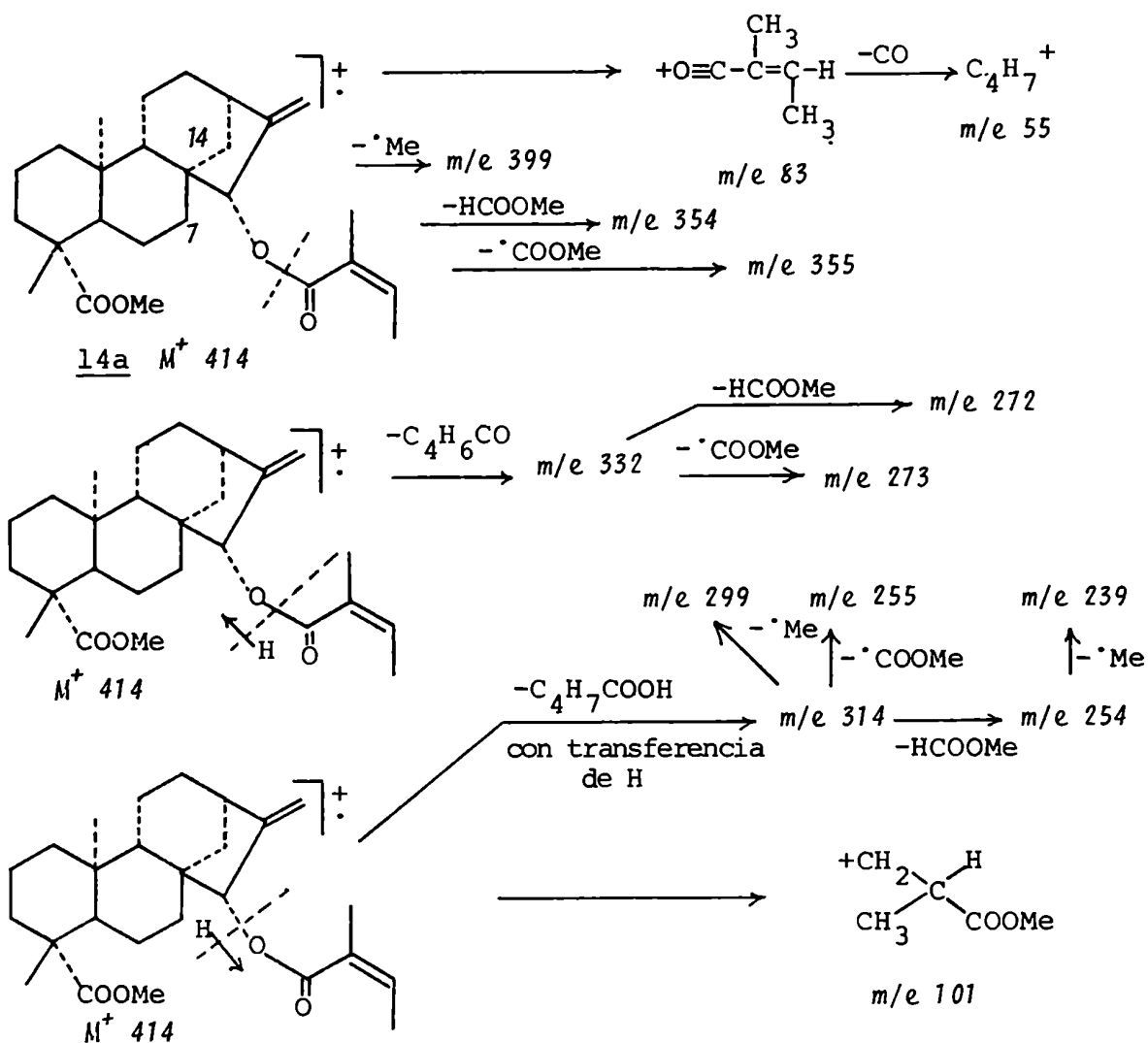
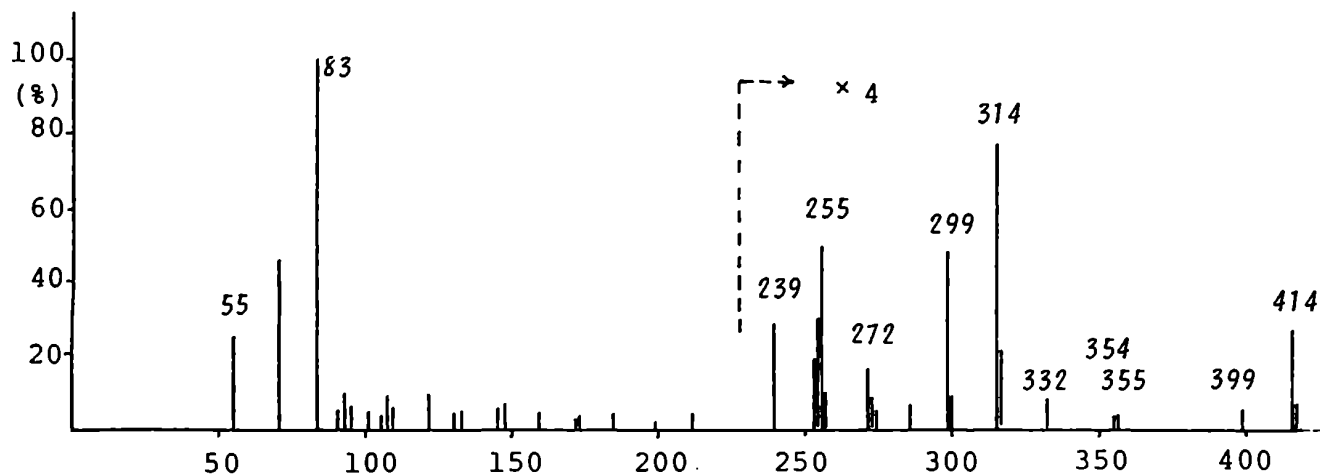
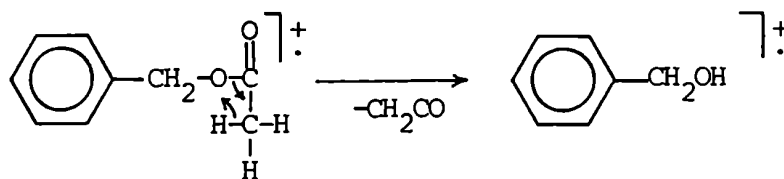


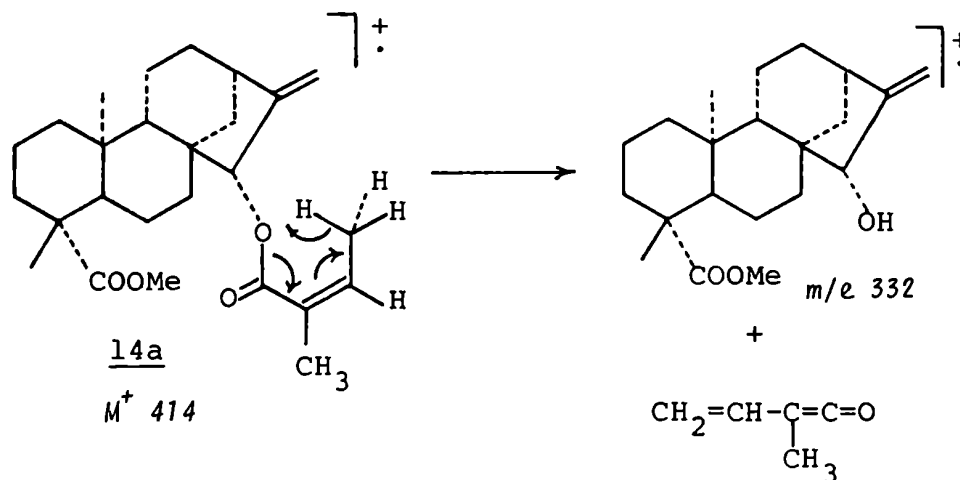
Figura 43: Espectro de masas y fragmentaciones de 14a.

En el compuesto 14a el camino B implicaría un intermediario de cinco miembros involucrando el oxígeno sp^3 y el H-7 α o 14 β , mientras que el A conduciría a anillos de siete miembros incluyendo el oxígeno carbonílico y el H-14 β o 7 α . Este último parecería ser el más razonable, aunque sería necesario realizar experimentos de marcación específica para resolver esta cuestión.

La pérdida del grupo acilo con transferencia de hidrógeno hacia el diterpeno, para dar el ión a m/e 332, es formalmente similar a la de cetena en los ésteres de alcoholes aromáticos, donde la eliminación del ácido es imposible²¹²:



En 14a puede postularse un intermediario análogo de seis miembros:



De todo lo anterior se deduce que el compuesto 14a es el 15- α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo, como se comprueba por la identidad de sus propiedades con las del compuesto ya registrado en literatura^{29,166}.

Análisis estructural del diterpeno 8a

El compuesto 8a tenía un comportamiento cromatográfico muy similar a 14a y el mismo espectro de masas (Fig.44), indicando que era también un éster insaturado derivado de un hidroxikaurenato de metilo.

El espectro I.R. de 8a mostró cambios significativos en la zona de las deformaciones C-H de olefinas; a 1700 y 1125 cm^{-1} aparecían las bandas de éster, mientras que a 1648, 925 y 770 cm^{-1} estaban ahora las de doble enlace.

El espectro de ^{13}C -RMN de 8a era muy similar al de 14a (Tabla 14), diferenciándose apreciablemente en las señales de los metilos 4' y 5', que en el nuevo compuesto aparecían a 12,2 y 14,3 ppm. Se observaban diferencias menores en los carbonos 7, 8, 10, 15 y 16, que indicaban una modificación en el sustituyente de C-15 (Fig. 46), cuya configuración no tendría que haber variado, ya que el C-9 poseía el mismo desplazamiento químico en los espectros de ambos compuestos.

El espectro de ^1H -RMN mostró las señales del esqueleto del kaurenato de metilo: tres singuletes a 0,83 (Me-20), 1,14 (Me-18) y 3,61 ppm (-COOMe), un singulete ancho a 5,03 ppm (H-17 y 17') y un multiplete que integraba para un hidrógeno (H-13) a 2,75 ppm (Fig. 45). Aparecía también un singulete ancho ($W_{1/2} = 4 \text{ Hz}$) correspondiente al H-15 y un doble cuarteto ($J = 1 \text{ y } 7 \text{ Hz}$) a 6,77 ppm. En la zona de campos altos se observaba un doblete a 1,74 ppm, una de cuyas ramas estaba superpuesta con un singulete a 1,83 ppm, correspondiente cada una a un metilo ubicado sobre doble enlace.

Estos datos concordaban con un grupo tigolato (Tabla 15), que se confirmaba por el desplazamiento de estos metilos en el espectro de ^{13}C -RMN, como ya se describió (pág. 113).

El compuesto 8a es entonces el 15- α -tigloiloxi-ent-kaur-16-en-19-oato de metilo, cuyos datos concuerdan con los de literatura¹² (Fig. 46).

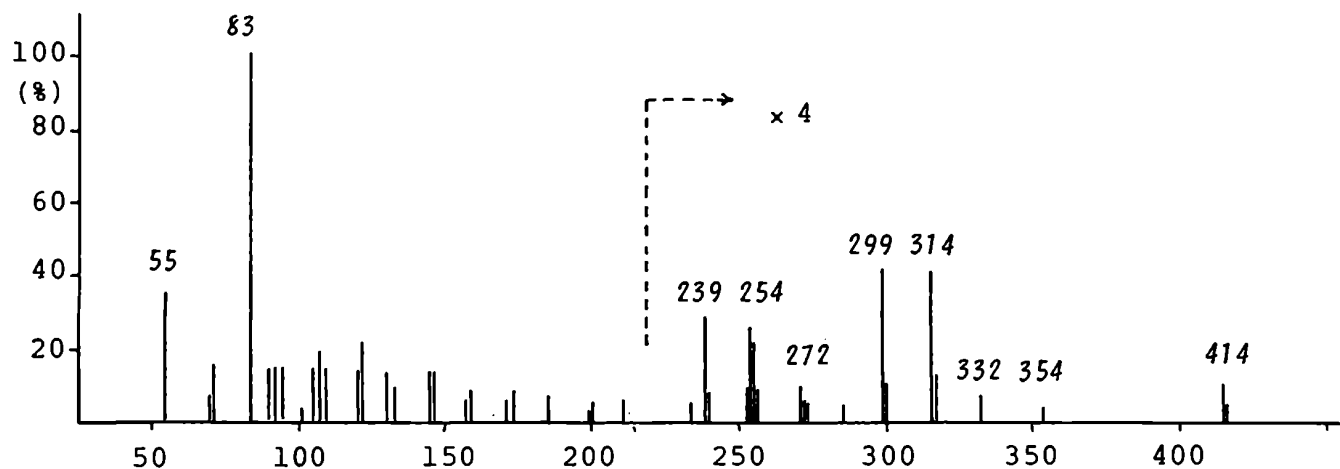


Figura 44: Espectro de masas de 8a.

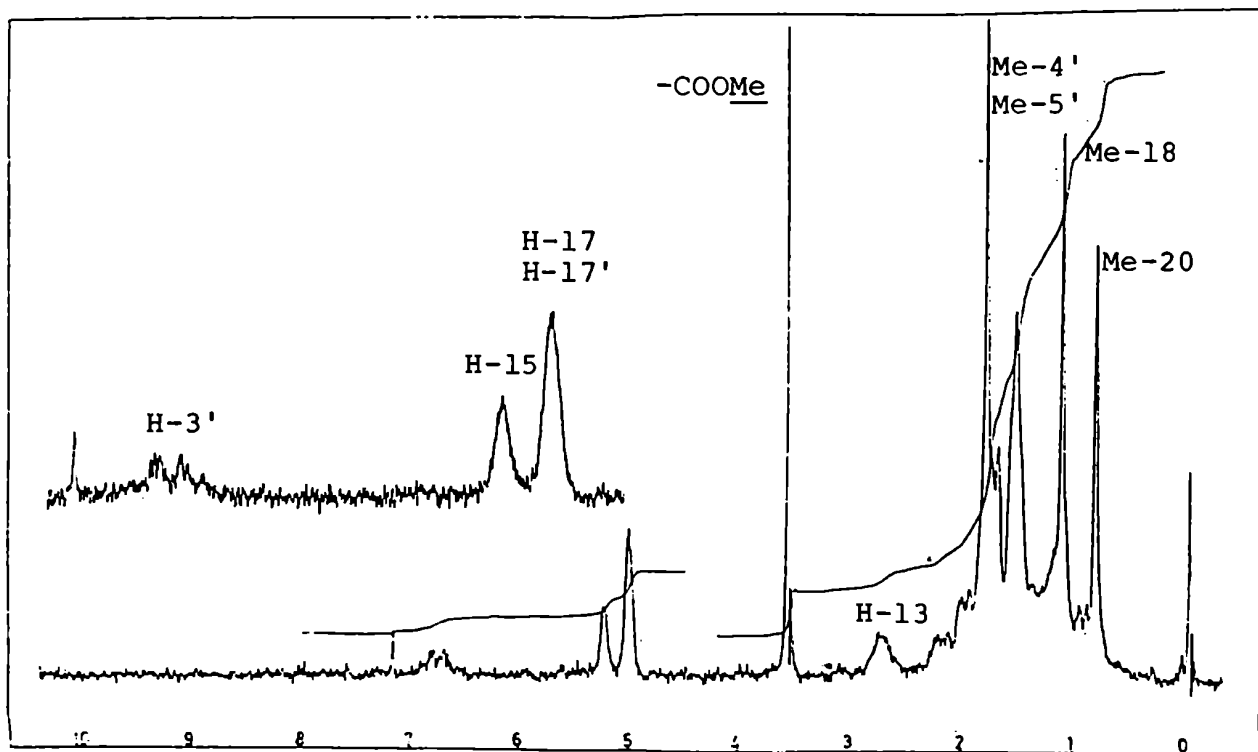


Figura 45: Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de 8a en DCCl_3 (60 MHz).

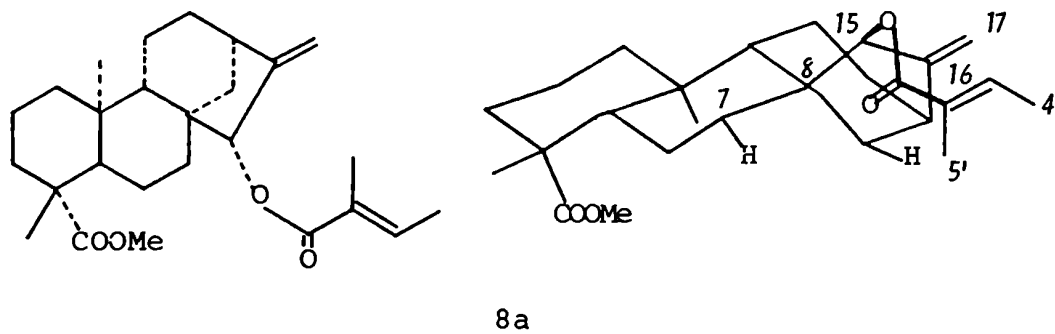


Figura 46.

Análisis estructural de los diterpenos 84a y 85a

Los compuestos 84a, 85a y 8a daban una sola mancha por CCD, pero, por la mayor abundancia de este último, se lo pudo obtener puro por cromatografía en columna. Sin embargo, no se logró separar la mezcla de 84a, 85a y 8a, pese a los diversos intentos realizados, por lo que fue necesario estudiarla por CGL-E.M. El análisis por CGL de esta mezcla (Fig. 48) mostró que el componente principal de t_r 6,27 min era 8a, mientras que 84a (t_r 4,06 min) se encontraba en un 11,7% y 85a (t_r 4,94 min) en un 12,6%.

Sometiendo la mezcla a CGL-E.M. se pudieron obtener los espectros de masas de los compuestos minoritarios 84a (Fig. 49) y 85a (Fig. 47). El compuesto 84a presentaba un M^+ 402, mientras que en 85a éste aparecía a m/e 416. Sin embargo, la presencia en ambos compuestos de los picos a m/e 332, 314, 299, 273, 272 y 255 indicaba que ambos eran ésteres del 15- α -hidroxient-kaur-16-en-19-oato de metilo, ya que estos iones se originan por la pérdida del acilo con transferencia de hidrógeno, del ácido y del grupo carboximetilo de C-4 y deben su masa únicamente al esqueleto del alcohol diterpénico (Fig. 43).

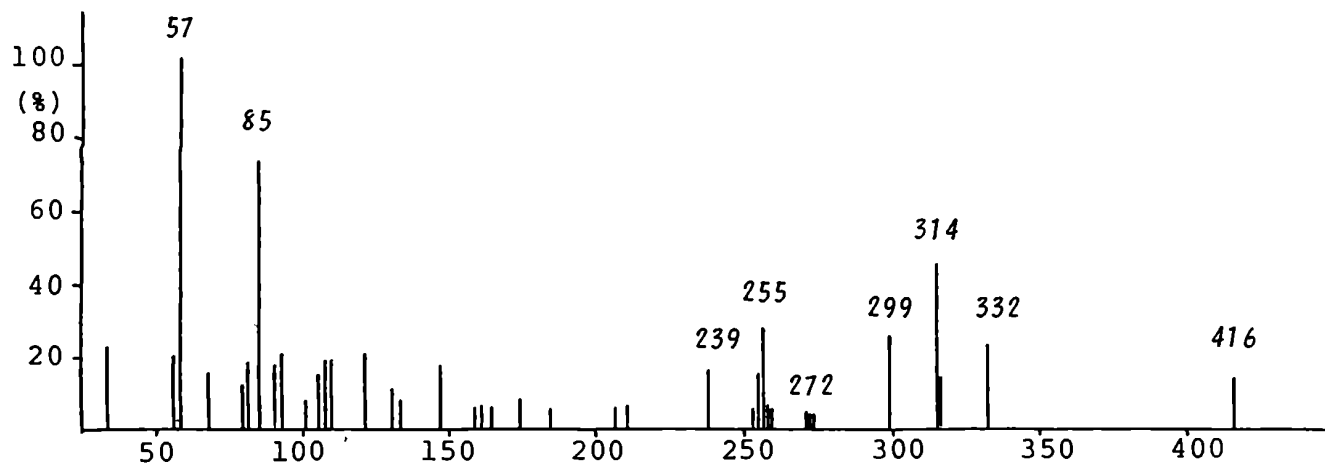


Figura 47: Espectro de masas de 85a.

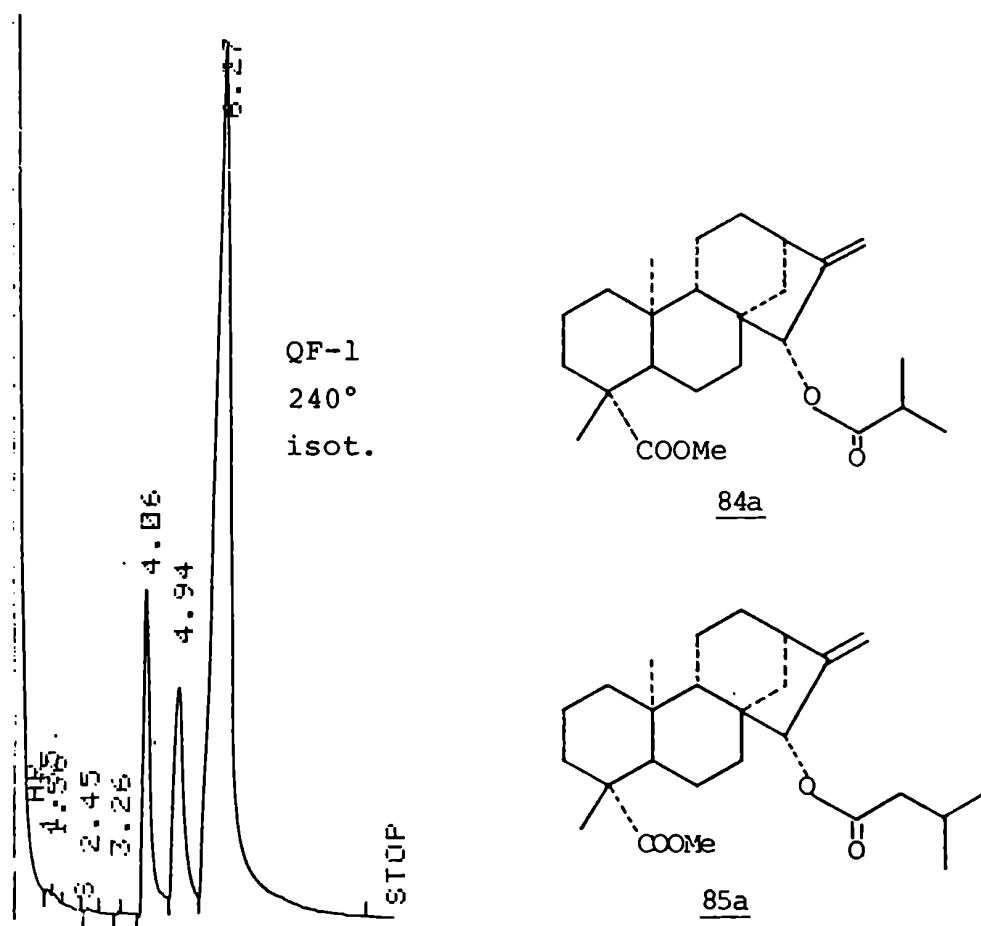


Figura 48: Cromatograma de la mezcla de 84a, 85a y 8a.

Los iones moleculares indicaban que 84a era un éster de un ácido C_3H_7COOH , mientras que 85a lo era de C_4H_9COOH , ambos sin insaturación en la cadena carbonada.

Coincidentemente, en la zona de masas bajas del espectro de masas de 84a aparecía un ión a m/e 71, correspondiente a un acilo $C_3H_7CO^+$ y otro a m/e 43, por pérdida de monóxido de carbono del anterior para dar $C_3H_7^+$. En el espectro de 85a se encontraban los iones correspondientes a m/e 85 ($C_4H_9CO^+$) y m/e 57 ($C_4H_9^+$).

Para verificar esto, se hidrolizó la mezcla en condiciones básicas, encontrándose por análisis por CGL, solamente 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42, lo que permite descartar cualquier isómero de éste. Por lo tanto, 84a y 85a debían ser los ésteres de 42 con los ácidos butírico y valérico respectivamente, no siendo posible determinar por E.M. si éstos eran los isómeros lineales o los ramificados.

Se decidió sintetizar los ésteres con los ácidos isobutírico e isovalérico, ya que eran los más probables desde el punto de vista biogenético. Para ello se hizo reaccionar el 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo, obtenido por hidrólisis del éster angélico 14a, con cloruro de isobutiroilo y piridina en diclorometano a reflujo, obteniéndose un único producto, cuyo E.M. resultó idéntico al de 84a. El éster con el ácido isovalérico fue preparado utilizando anhídrido isovalérico en piridina¹⁶⁶; el E.M. del producto obtenido resultó idéntico al de 85a.

La comparación por CGL de la mezcla de 84a y 85a mostró que estos eran idénticos a los testigos sintéticos de 15- α -isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo y 15- α -isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo respectivamente. En el esquema de la figura 49 se ilustran las fragmentaciones de 84a, indicándose entre paréntesis las masas para 85a cuando existen diferencias entre ambos.

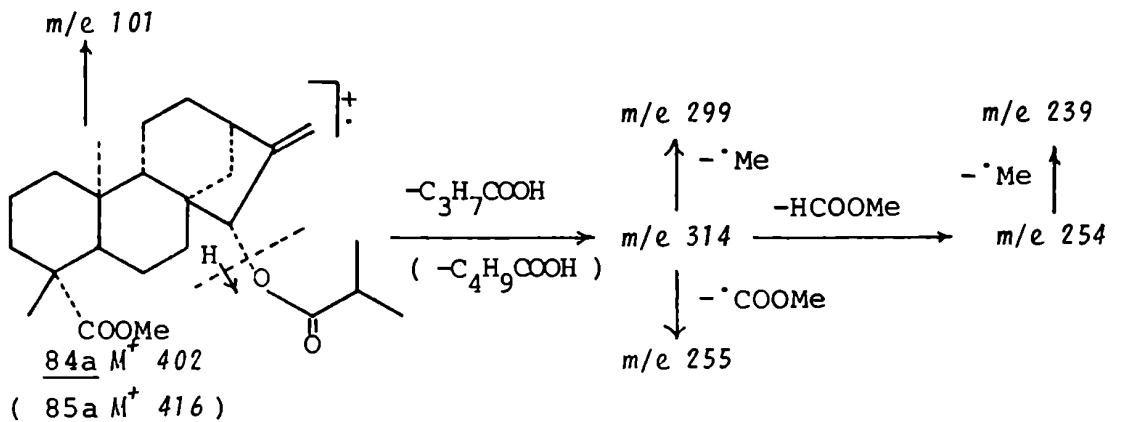
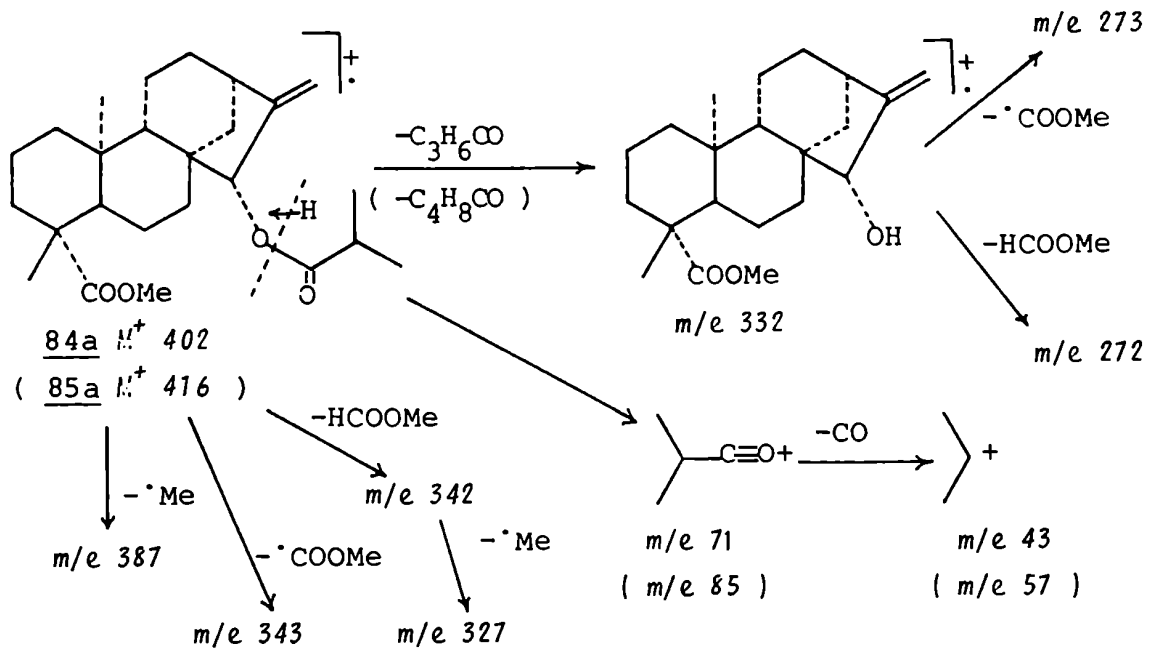
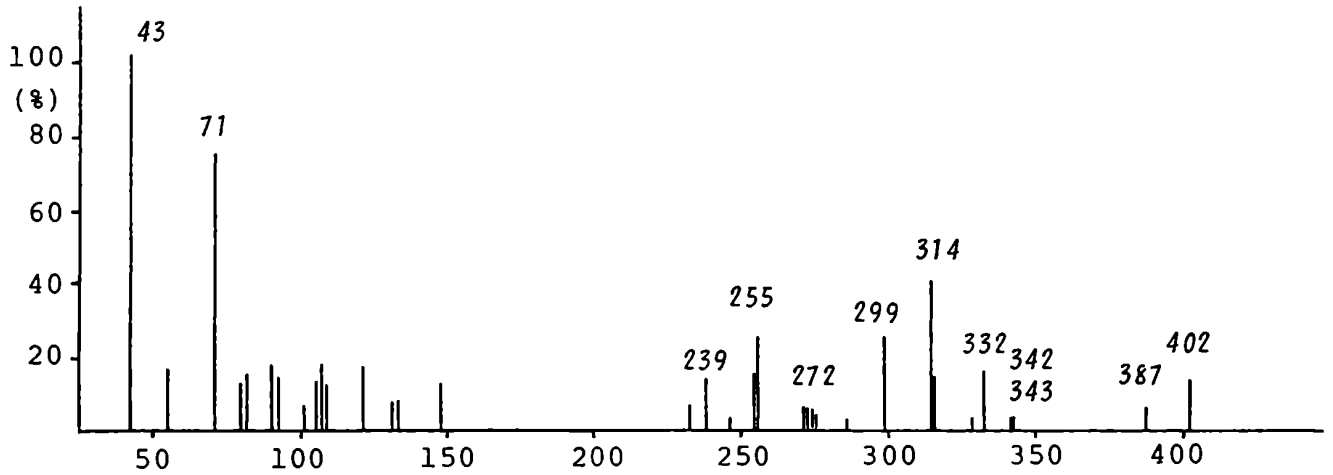


Figura 49: Espectro de masas y fragmentaciones de 84a.

indicaron^{65,66} un esqueleto del tipo Δ^{12} -oleaneno o Δ^{12} -urseno con un grupo carboximetilo en los anillos D o E. La presencia de un ión a m/e 207 mostraba la existencia de un grupo hidroxilo en los anillos A o B. La abundancia relativa del ión a m/e 262 respecto a la de m/e 203 ponía de manifiesto⁶⁵ que el grupo carboximetilo se encontraba en C-17. En general, en los triterpenos pentacíclicos con insaturación en C-12, la facilidad con que se pierde el sustituyente angular de C-17 del ión a para dar c (Fig. 50) depende de su volumen; si este es un metilo, como en las amirinas, el ión a es de mayor importancia que c, si es un carboxilo o carboximetilo sus intensidades son comparables, mientras que para un grupo $-\text{CH}_2\text{OAc}$, c es varias veces mayor que a.

El compuesto 49a podía ser muy probablemente entonces el oleanolato de metilo (49a) o el ursolato de metilo 88.

Estos compuestos pueden distinguirse entre sí por ^1H -RMN puesto que los metilos 29 y 30 de 49a son singuletes, mientras que los de 88 son multipletes complejos del tipo AB_3 ^{67,68} que no se destacan de la señal conjunta de los metilenos (Tabla 16).

Tabla 16: Desplazamiento químico de los metilos de los derivados acetilados de 49a y 88 en DCCl_3 (60 MHz, en ppm).

<u>Me</u>	<u>49a</u> (acetilado)	<u>88</u> (acetilado)
23	0,86	0,86
24	0,86	0,86
25	0,91-0,96	0,95
26	0,74	0,75
27	1,14	1,08
29	0,91-0,96	m
30	0,91-0,96	m

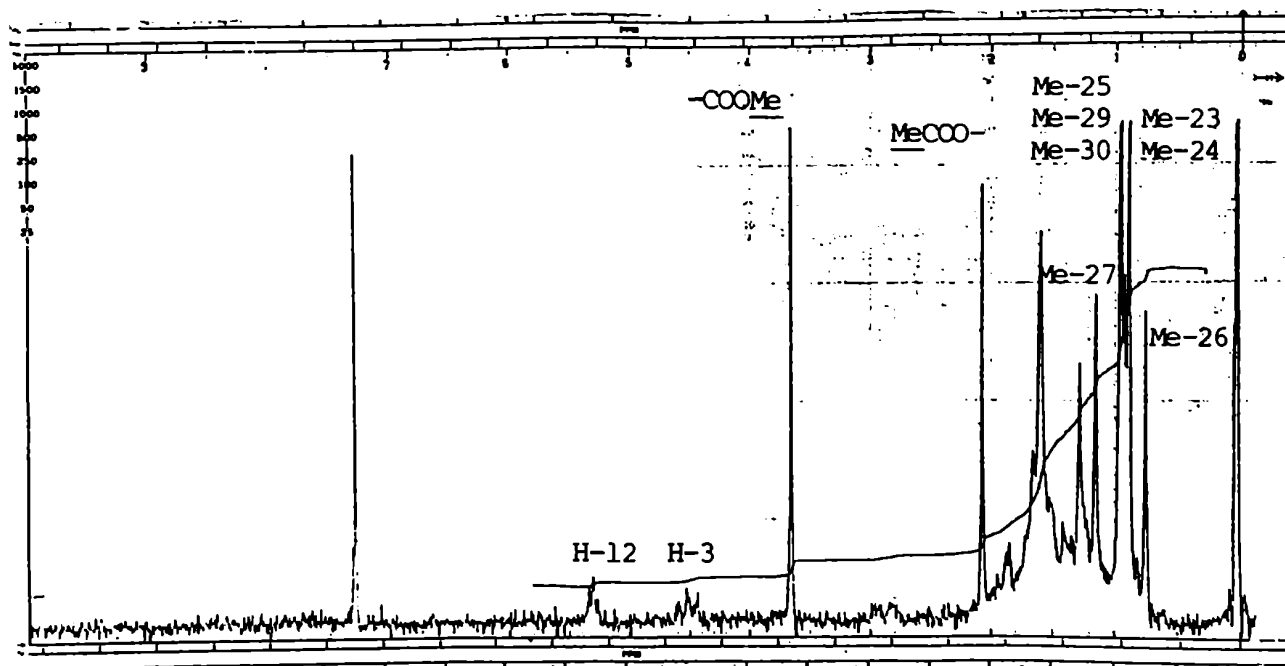
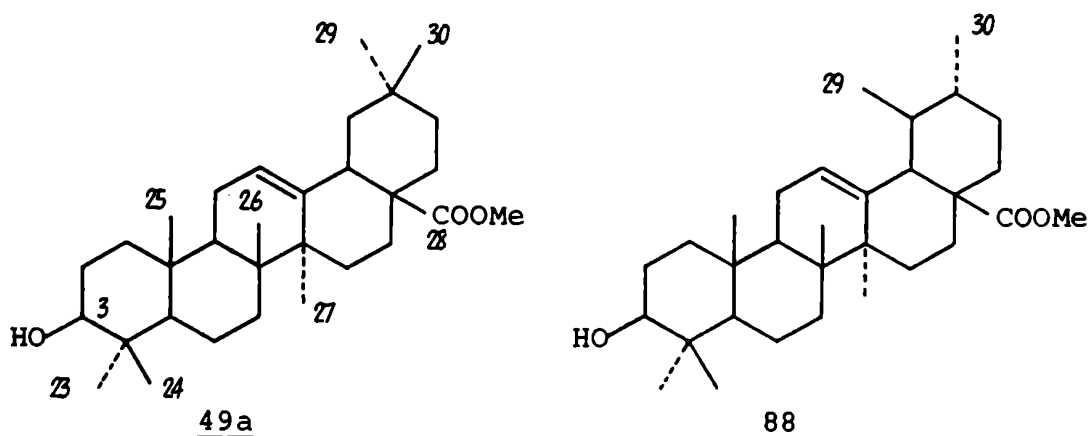


Figura 51: Espectro de ^1H -RMN del derivado acetilado de 49a en DCCl_3 (100 MHz).



El espectro de ^1H -RMN (100 MHz) de 49a coincidió perfectamente con el del oleanolato de metilo (ambos acetilados)⁶⁹, observándose la señal del H-3 axial a 4,45 ppm, el H-12 a 5,28 ppm y el metilo del éster a 3,65 ppm. A esta resolución se observó la separación de uno de los metilos (Me-25, 29 o 30) de los otros dos, no siendo posible predecir específicamente cuál, sin experimentos diseñados para tal fin. La identidad

de 49a fue confirmada por comparación por CGL de su derivado acetilado con un testigo auténtico de acetiloleanolato de metilo con el cual coincidió también su punto de fusión.

ESTUDIO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE W. BUPHTHALMIFLORA

El fraccionamiento cromatográfico del extracto etanólico se realizó empleando una columna de silicagel, con un gradiente de metanol en cloroformo (parte experimental, pág 222).

Se eluyeron primero una serie de compuestos terpénicos menores, que no fueron estudiados. A continuación se obtuvo el glicósido 89, luego una mezcla de los glicósidos 89 y 90, glicósido 90 y finalmente productos polares y cloruro de potasio.

Con el fin de purificar estos glicósidos fue necesario metilarlos con CH_2N_2 /éter-metanol, recromatografiarlos y recrystalizarlos de $\text{MeOH-H}_2\text{O}$. El glicósido 90, mayoritario, pudo ser aislado también directamente a partir del extracto etanólico. Para ello se disolvió el extracto en metanol y se precipitó el glicósido con éter etílico; el producto fue disuelto y reprecipitado varias veces de la misma manera, luego metilado, purificado por CC y recrystalizado de $\text{MeOH-H}_2\text{O}$.

Análisis estructural de los derivados metilados de 89 y 90
(89a y 90a)

Los glicósidos 89 y 90 mostraron ser de naturaleza terpénica, ya que revelaban de color rojo con anisaldehído/ H_2SO_4 .

Su comportamiento cromatográfico indicaba que eran muy polares; en CCD (silicagel, $\text{HCCl}_3\text{-MeOH-AcOH-H}_2\text{O}$, 30:8:1,5:1) sus R_f eran 0,51 y 0,24 respectivamente. Se trataba evidentemente de glicósidos terpénicos ácidos, ya que por metilación con diazometano se obtuvieron los compuestos 89a y 90a de R_f 0,45 y 0,15 (silicagel, tolueno-EtOH, 20:7) y el ensayo de Molisch para azúcares (α -naftol/ H_2SO_4) dió positivo para ambos compuestos. Sin embargo éstos eran no reductores pues dieron negativo el ensayo de Tollens.

El espectro I.R. de 89a mostró las bandas características de hidroxilo a 3370 cm^{-1} , carbonilo de éster a 1740 cm^{-1} y doble enlace a 1630 , 860 y 760 cm^{-1} .

Su espectro de masas (Fig. 52) proporcionó información acerca de la aglicona. Se obtuvo un espectro muy similar al del oleanolato de metilo 49a, con un A^+ a m/e 470 , pico base a m/e 203 y un ión a m/e 262 con una abundancia del 70%.

La diferencia más notable era la aparición de un pico a m/e 453 correspondiente a la pérdida de 17 uma a partir de la aglicona. Estos resultados pueden interpretarse como producidos por la fisión de los azúcares con transferencia de un átomo de hidrógeno hacia la aglicona que luego sufre las rupturas características, y ruptura de la unión glicosídica entre el oxígeno y el C-3 para generar el fragmento aglicona - 17 uma. Pero no es factible determinar si la formación del fragmento A^+ ocurre antes o después de la ionización (Fig. 52).

La hidrólisis ácida de 89a dio como aglicona oleanolato de metilo, identificado por CCD, CGL, p.f. y p.f. del derivado acetilado. Quedaba claro entonces que 89a era un glicósido del ácido oleanólico, con el azúcar unido al HO-3, mientras el grupo carboxilo estaba libre, ya que pudo ser metilado con diazometano. La hidrólisis ácida no afectó al éster metílico de C-17 debido a que éste es resistente tanto al tratamiento ácido como al básico¹⁶⁹ por la posición estéricamente impedida que ocupa.

El espectro de masas del glicósido 90a (Fig. 53) mostró un A^+ 456, pico base a m/e 248 y un pico a m/e 203 con una abundancia relativa del 85%, que indicaban que la aglicona era un triterpeno pentacíclico, con insaturación en C-12 y con un grupo carboxilo en C-17 e hidroxilo en los anillos A o B⁶⁵.

La hidrólisis ácida de 90a dio como aglicona ácido oleanólico 49 identificado por CCD y E.M., CCD y p.f. del derivado metilado y CCD y CGL del derivado acetilado y metilado. Estos datos mostraban que 90 era un glicósido del ácido oleanólico

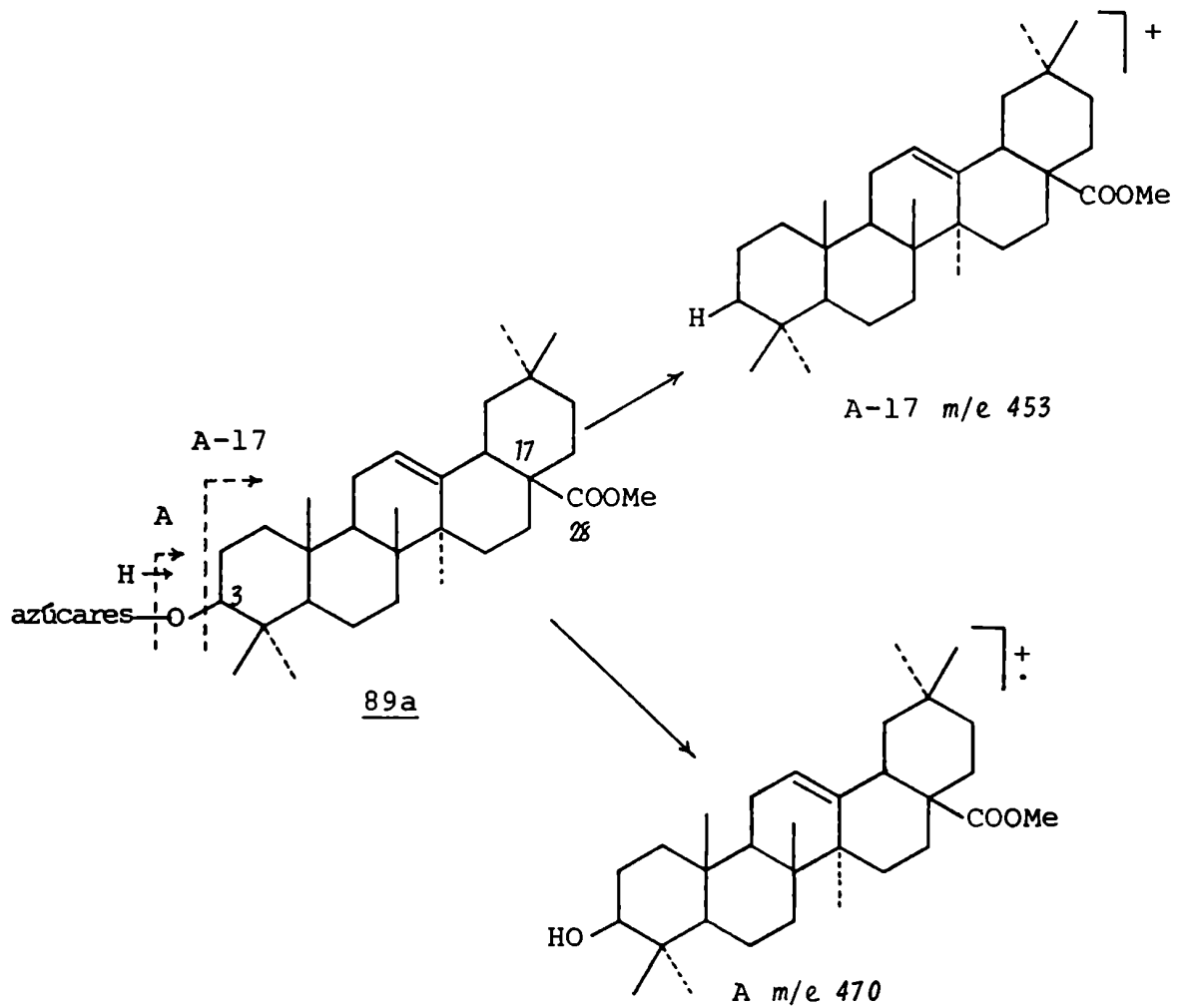
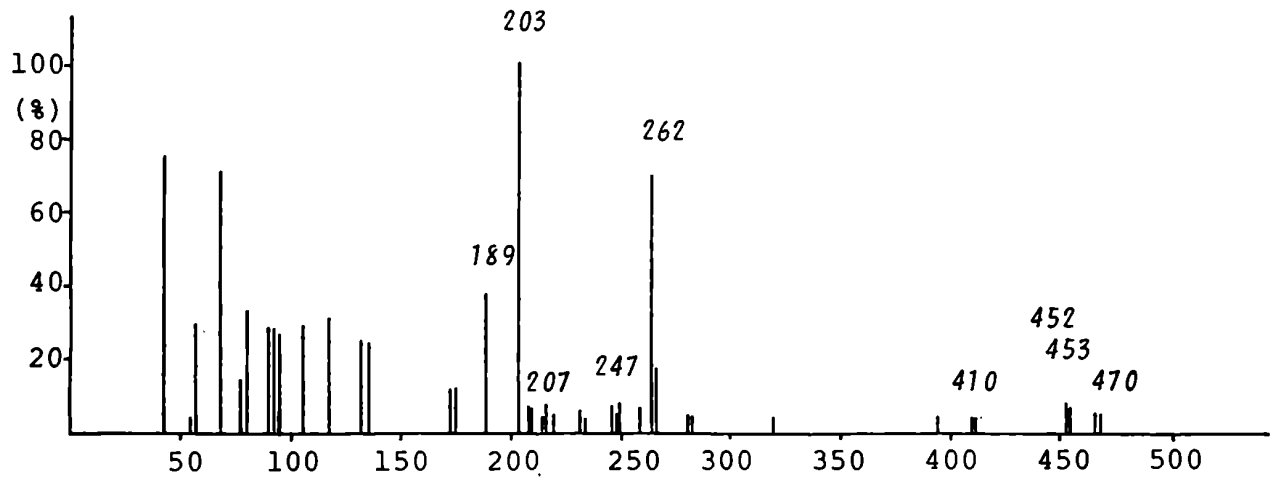


Figura 52: Espectro de masas de **89a** y fragmentaciones que conducen a los iones **A** y **A-17**.

unido a carbohidratos por el HO-3 y el carboxilo 28, ya que éste no se había metilado con diazometano.

Como el compuesto 90 se había metilado, pero por hidrólisis se obtenía ácido oleanólico, indicando que el grupo carboxilo estaba glicosidado, debía existir en la molécula otro grupo carboxilo libre que evidentemente tenía que estar ubicado en la porción de hidratos de carbono.

La hidrólisis de 90a con NH_3 (c) a 100° durante 2 hs, condiciones de ruptura de uniones éster, pero no de uniones glicosídicas¹⁷⁰ condujo a un producto que, metilado con diazometano etéreo en metanol y purificado por CC, resultó idéntico al glicósido 89a (CCD, p.f., p.f.m.). Es decir que, los glicósidos 89 y 90 se encuentran relacionados entre sí, siendo 90 un éster del glicósido 89 con un azúcar unido al carboxilo 28.

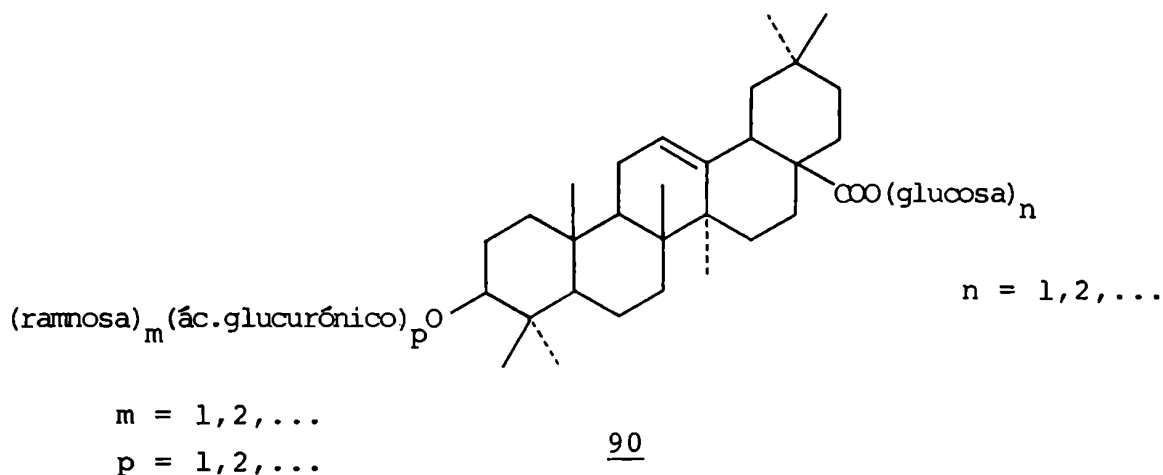
La posibilidad de que el grupo ácido que se encontraba en la porción de carbohidratos proviniera de un ácido dicarboxílico (por ej. ácido oxálico) pudo descartarse porque se hubiera perdido durante la hidrólisis básica de 90a para dar 89a, lo que no se observó, de acuerdo a los datos de $^1\text{H-RMN}$ que se expondrán después.

La hidrólisis ácida de 90a, con posterior extracción de la aglicona con cloroformo, dio una solución acuosa que contenía los azúcares, que neutralizada y tratada con una resina de intercambio ácida fuerte (forma H^+), se analizó por CCD (silicagel, $\text{HCCl}_3\text{-MeOH-AcOH-H}_2\text{O}$, 35:15:1,5:2). Al revelar con naftoresorcinol/ H_2SO_4 ¹⁷¹ se obtuvieron: una mancha amarilla de R_f 0,73 coincidente con ramnosa, una gris rosado de R_f 0,53 correspondiente a una hexosa, una mancha de R_f 0,20 color gris rosado correspondiente a un ácido urónico y una serie de manchas de R_f mayor de 0,80 que se deben a productos de descomposición de este último en medio ácido.

Algunos de los productos de descomposición ácida (pH 3,5, 96° , 48 hs) de ácidos urónicos han sido aislados e identificados por varios autores^{172,173} como: ácido 2-furanoico, 2-acetil-2,3,5-trihidroxí-ciclohexanona, ácido 5-formil-2-fura-

hidrólisis de 90a provenía de la parte esterificada.

Con los resultados obtenidos hasta ese momento la estructura de 90 podría formularse así:



siendo 89 el compuesto con el carboxilo 28 libre.

Para identificar el ácido urónico se redujo el glicósido 90a con H_4LiAl en THF⁵⁹ a reflujo durante 16 hs, obteniéndose el glicósido 92. Junto con la reducción del grupo carboximetilo del ácido urónico ocurre la del éster de C-28 con la consiguiente pérdida de los carbohidratos esterificados (Fig. 55). La hidrólisis ácida de 92 dió como aglicona el eritrodiol 93, que fue comparado (CCD y CGL) con un testigo obtenido por reducción del oleanolato de metilo; los azúcares fueron analizados por CCD de celulosa y por CGL de sus alditoles acetilados, encontrándose ramnosa y glucosa. Como ninguno de los azúcares unidos al HO-3 de 90a correspondía a glucosa, de acuerdo con los resultados de su hidrólisis ácida, y en cambio ésta se obtenía de la hidrólisis de 90a reducido, se hacía evidente que el ácido urónico unido al HO-3 era el ácido glucurónico.

En la figura 56 se resumen los resultados de estas transformaciones químicas y los productos de hidrólisis obtenidos.

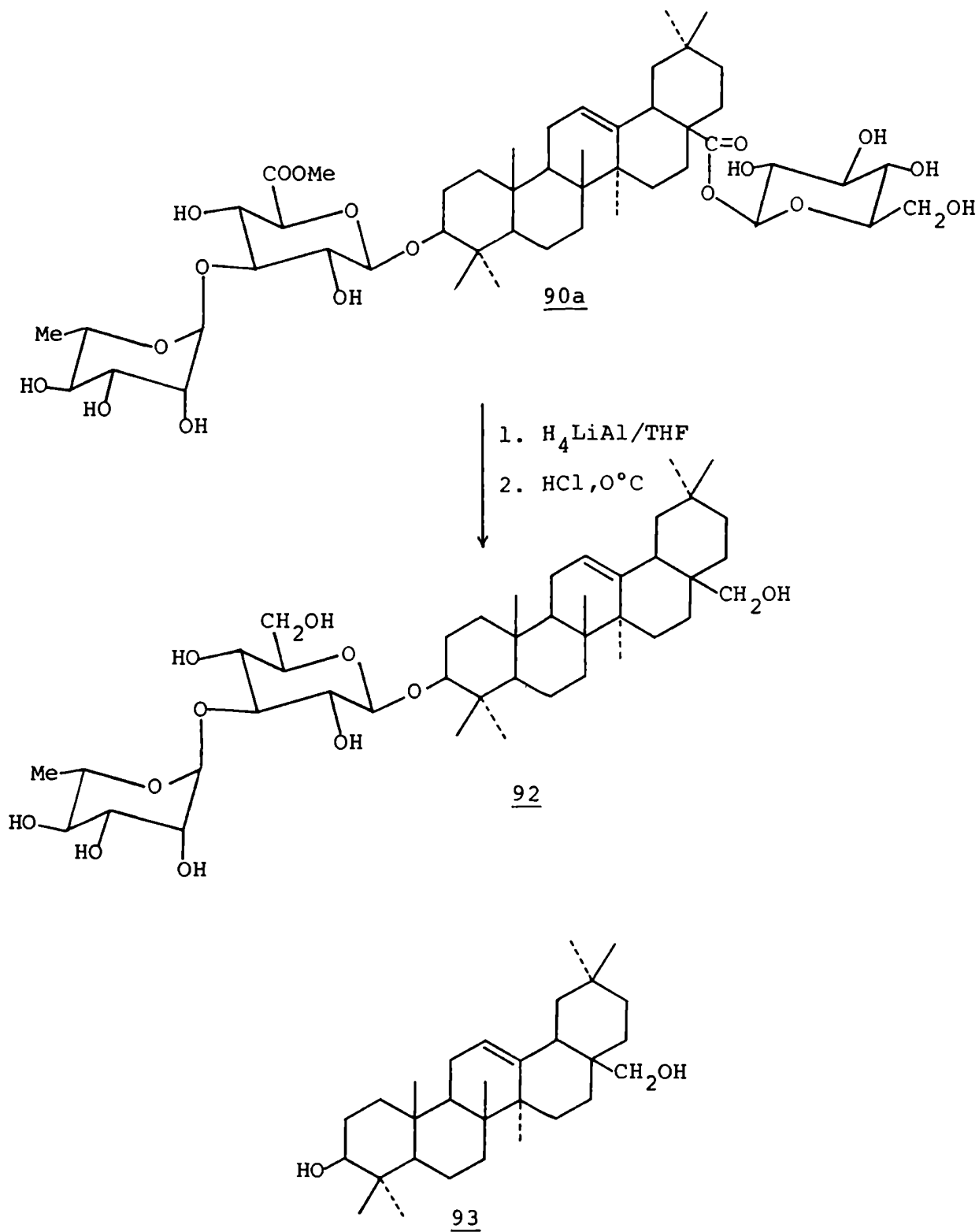


Figura 55: Reducción de 90a a 92.

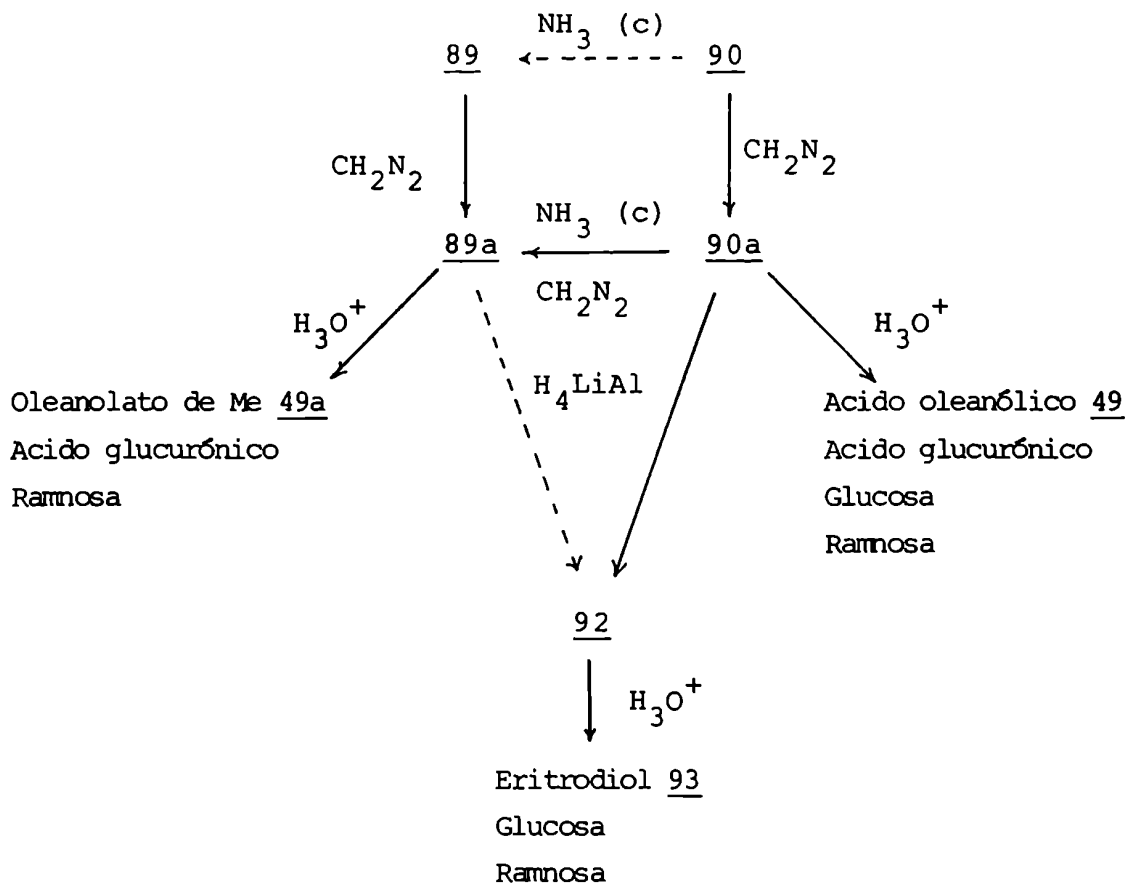


Figura 56: Relación entre los compuestos 89, 90 y 92 y productos de hidrólisis.

Estudio de 89a y 90a por espectroscopía de ^1H -RMN

La determinación del número de unidades de cada azúcar y la configuración de los carbonos anoméricos pudo hacerse estudiando los espectros de ^1H -RMN de los derivados trimetilsililados de 89a y 90a. Tanto el espectro de 89a como el de 90a trimetilsililados (Figuras 57 y 59) mostraron las señales características de los siete metilos del ácido oleanólico confirmando los resultados obtenidos respecto a la aglicona. En el espectro de 89a aparecía a 5,11 ppm un pico agudo formado por

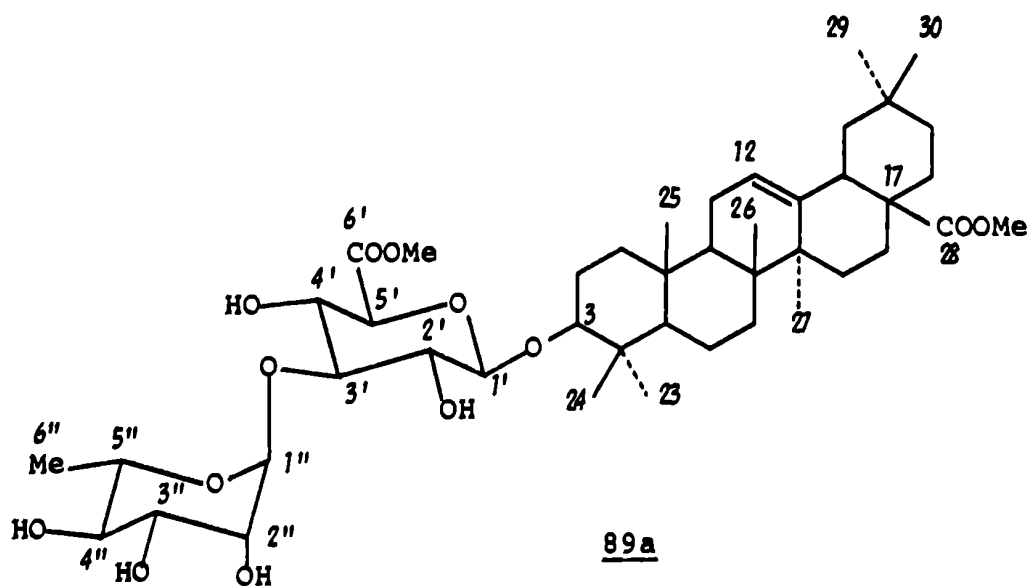
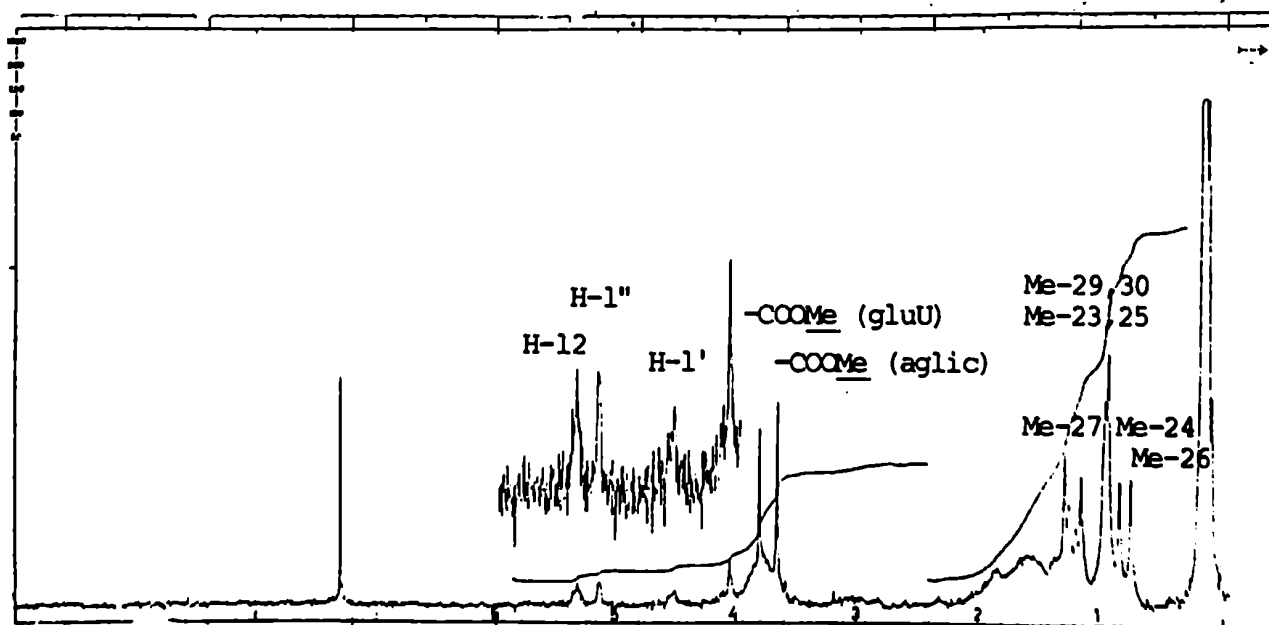


Figura 57: Espectro de ^1H -RMN de 89a TMS en DCCl_3 (100 MHz).

un doblete mal resuelto con $J = 2$ Hz, que integraba para un hidrógeno, correspondiente al hidrógeno anomérico de una L-ramnopiranosica. La ramnosa se encuentra en solución en la forma piranósica 1C, pero no siempre es posible distinguir por el $J_{1,2}$ (entre 1 y 3 Hz) los anómeros α y β , si bien en la forma α existe acoplamiento ecuatorial-ecuatorial entre H-1 e H-2 y en la β es ecuatorial-axial. Sin embargo resulta importante el desplazamiento químico de ese hidrógeno puesto que aparece entre 5 y 5,9 ppm para la configuración α y entre 4,5 y 4,9 ppm para la β ⁸⁹, lo que indicaría una configuración α en este caso, bastante difundida en los ramnósidos naturales.

A 5,30 ppm aparecía una señal compleja que integraba para un hidrógeno, correspondiente al H-12 del triterpeno.

La señal a 4,52 ppm, un multiplete ($W_{1/2} = 7$ Hz) que integraba para un hidrógeno, correspondía al H-1' del ácido glucurónico, cuya configuración debía ser β , en base al desplazamiento químico que presentaba y a su constante de acoplamiento: en el colesterol-3-O- β -D-glucuronopiranósido acetilado el H-1' se encuentra a 4,64 ppm con un $J = 8$ Hz¹⁸⁷.

El H-3 de la aglicona, originariamente a 3,20 ppm⁶⁹, no se destaca sobre el ruido de la línea de base debido a las particiones con los hidrógenos de C-2; el desplazamiento producido por la β glicosidación en este hidrógeno es pequeño ($\sim 0,1$ ppm) como se puede observar en los metilglicósidos de los azúcares.

Entre 3,5 y 4,1 ppm aparecían los hidrógenos metínicos de los azúcares, superpuestos con dos singuletes a 3,80 y 3,64 ppm, que integraban para tres hidrógenos cada uno, correspondientes a los metilos que esterifican al carboxilo del ácido glucurónico y el de la aglicona respectivamente; este último con un valor coincidente con el del acetiloleanolato de metilo.

De estos datos se infiere que 89a posee una unidad de oleanolato de metilo, una de ramnosa y una del éster metílico del ácido glucurónico.

La señal del éster metílico de C-6 de la ramnosa aparece entre 0,9 y 1,3 ppm como un doblete o multiplete, según la aglicona y su posición de unión a otros azúcares¹⁷⁵, pero en 89a su señal se confunde con las de los metilenos y metinos de la aglicona.

El análisis detallado de las señales de los metilos de la aglicona mostró (Tabla 17) que los más afectados por la glicosidación son Me-23 y Me-24, ubicados sobre el C-4 del anillo A. Un efecto similar se observa en la betulina-3-O-β-D-glucopiranosido⁸⁶. El que presenta mayores desplazamientos es el Me-23, que está en posición ecuatorial y sus hidrógenos tienen interacción con el grupo trimetilsililo de C-2' del ácido glucurónico, directamente unido al HO-3 de la aglicona, como se describirá más adelante. El Me-24, es poco afectado en el rotámero más favorable desde el punto de vista estérico: aquel donde la unión C-1'/ oxígeno glicosídico es *gauche* a los enlaces C-3/H-3 y C-2/C-3 de la aglicona⁹⁶ (Fig. 58).

Tabla 17: Desplazamiento químico de los metilos de las agliconas de 89a y 90a (en ppm, derivados trimetilsililados).

<u>Me</u>	<u>49a</u> ⁶⁷	<u>89a TMS</u>	<u>90a TMS</u>
23	1,00	0,93	0,92
24	0,80	0,82	0,82
25	0,91-0,95	0,92-0,94	0,92
26	0,74	0,75	0,78
27	1,15	1,15	1,12
29	0,91-0,96	0,92-0,94	0,92
30	0,91-0,96	0,92-0,94	0,92

El espectro de ¹H-RMN de 90a trimetilsililado (Fig. 59) mostró, por comparación con el de 89a TMS, una nueva señal a 5,60 ppm, un doblete ancho con J = 6 Hz que integraba para un hidrógeno. Esta señal correspondía al hidrógeno anomérico

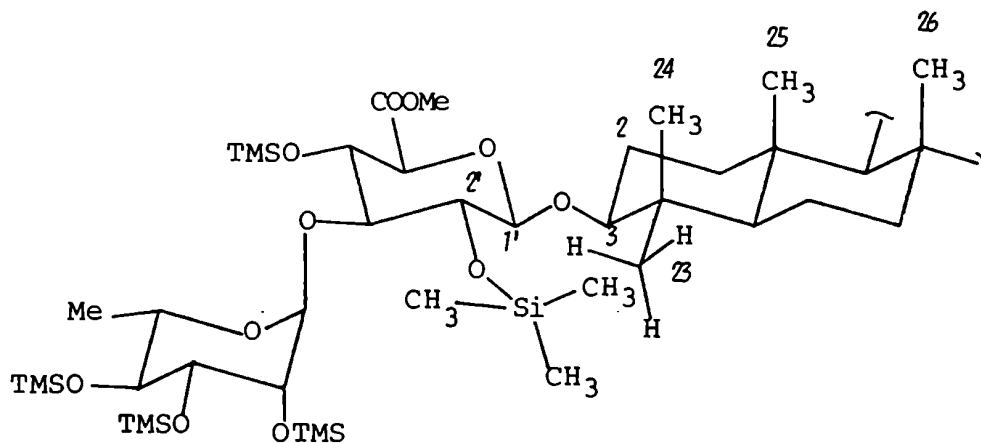
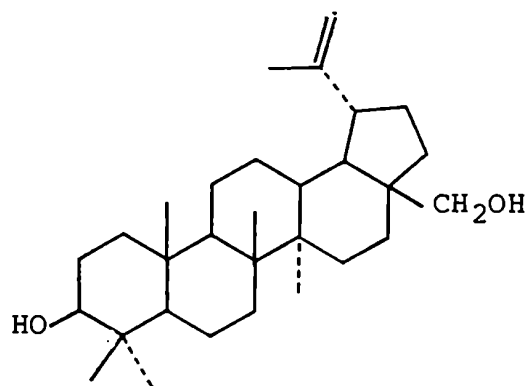


Figura 58: Interacciones en 89a TMS.



Betulina

de la glucosa, que está formando un éster por medio del HO-1, desprotegido por la acilación en una proporción comparable a la que sufre el hidrógeno anomérico de la β -D-glucopiranososa al pasar al pentaacetilderivado: de 4,74 ppm a 5,76 ppm^{69,174}.

Las señales de los hidrógenos anoméricos del ácido glucurónico y de la ramnosa, el H-12 de la aglicona y el grupo metilo del carboximeto del ácido glucurónico permanecen invariables respecto a 89a TMS. Por otro lado, se aprecia un aumento del área de las señales de los hidrógenos de los azúcares entre 3,4 y 4,2 ppm y la desaparición de la señal del grupo carboximeto del C-28 de la aglicona.

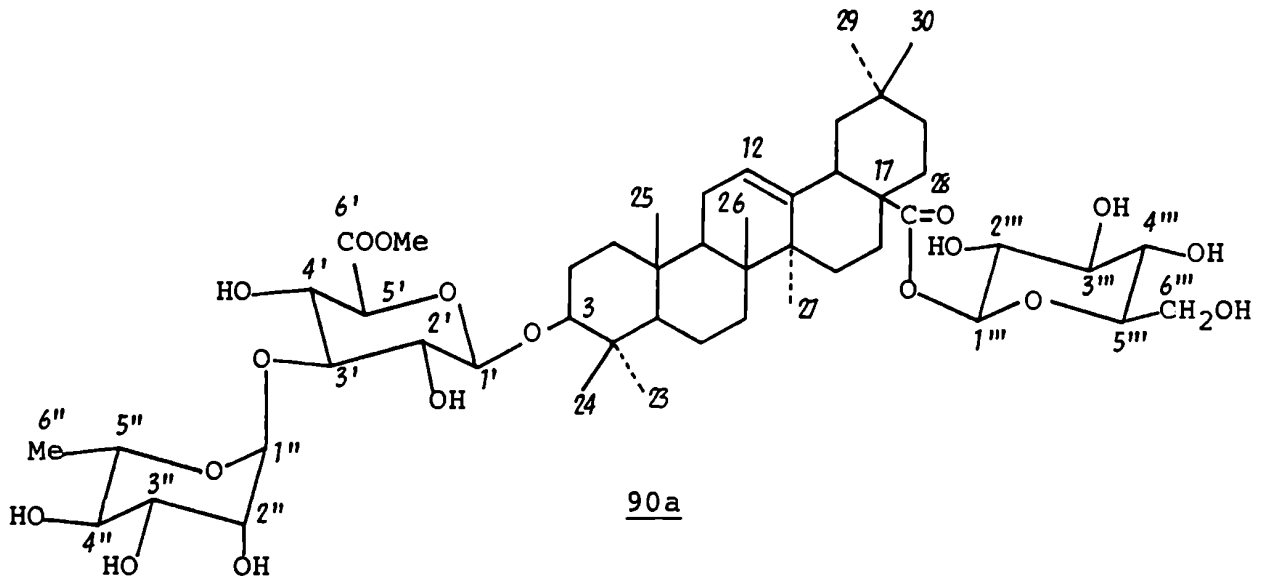
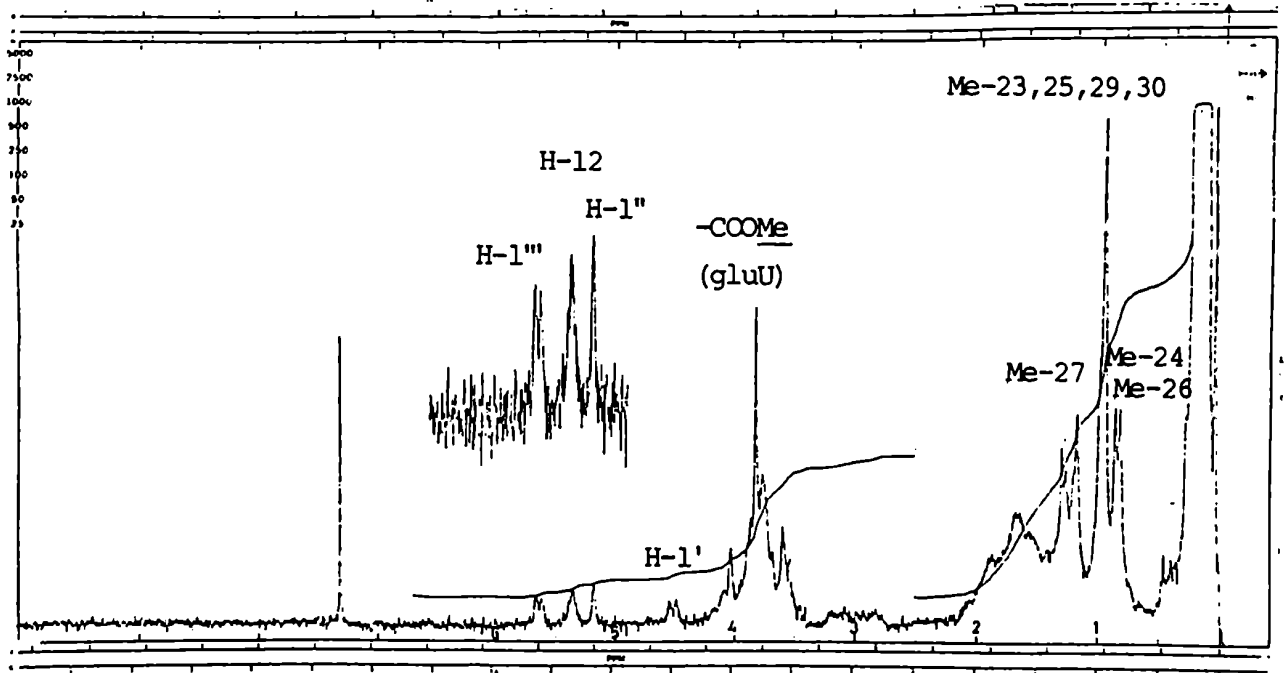
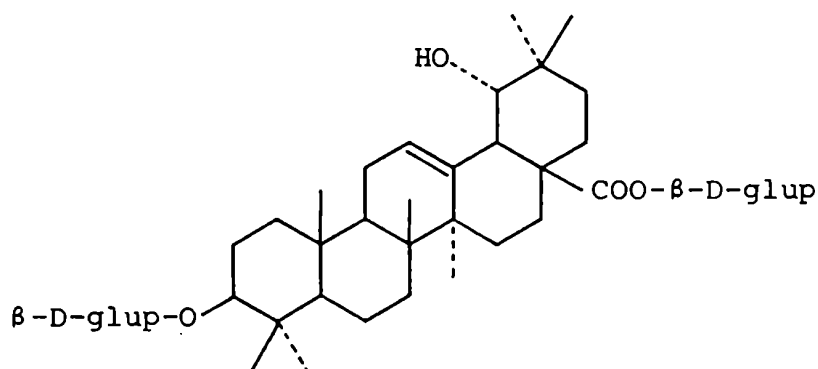


Figura 59: Espectro de ^1H -RMN de 90a TMS en DCCl_3 (100 MHz).

Estos resultados confirman lo ya encontrado por hidrólisis básica y el ensayo de Tollens: el glicósido 90 es el éster de 89 con una molécula de glucosa. La constante de acoplamiento del H-1" con el H-2" de esta glucosa es 6 Hz, indicativa de una configuración β^{176} . Así por ejemplo, en el 3,28-bis-O-glucósido del ácido 19- α -hidroxiarjunólico 94 esta misma constante de acoplamiento es de 7 Hz⁶⁴.



94

Se observó también en el espectro de 90a TMS una desprotección del Me-26, respecto al espectro de 89a TMS (Tabla 17) por estar cercano y del mismo lado de la molécula que el grupo carboxilo de C-17. Al esterificar este último grupo con una glucopiranososa, mucho más voluminosa que un metilo, también se afecta el Me-26 (Fig. 60).

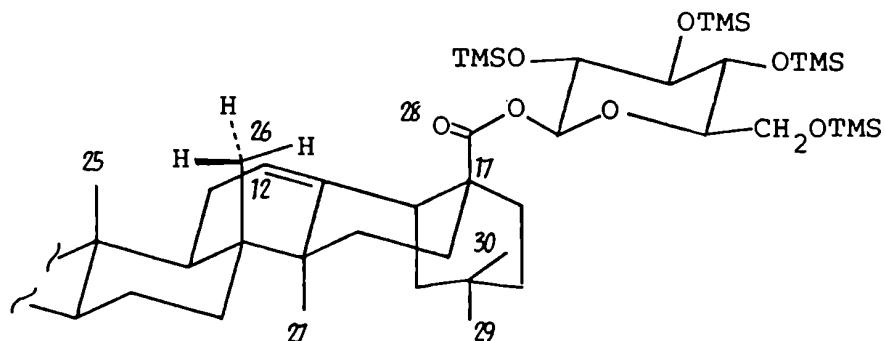


Figura 60.

Estudio de 89a por espectrometría de masas

Para determinar el orden de unión de los azúcares que glicosidaban la posición 3 del ácido oleanólico se realizó el espectro de masas del derivado trimetilsililado de 89a (Fig. 61).

Se obtuvo un pico base a m/e 204, característico de estos derivados trimetilsililados. La presencia de un ión a m/e 363 con una abundancia relativa del 73%, que no se encontraba en el E.M. de la aglicona ni en el espectro de 89a sin derivatizar, indicó que la ramnosa era el azúcar terminal. No se observó el fragmento compuesto por la ramnosa y el éster metílico del ácido glucurónico.

Estos resultados son similares a los que se obtienen en los espectros de masas de derivados trimetilsililados de diglicósidos de flavonoides^{83,84} donde el azúcar terminal se escinde para dar un ión del tipo oxonio muy intenso (hasta 80%), a veces con pérdida de hidrógeno, cuya m/e da información sobre la clase de azúcar de que se trata: m/e 451 (hexosa), 363 (ramnosa), 407 (éster metílico del ácido glucurónico), etc.

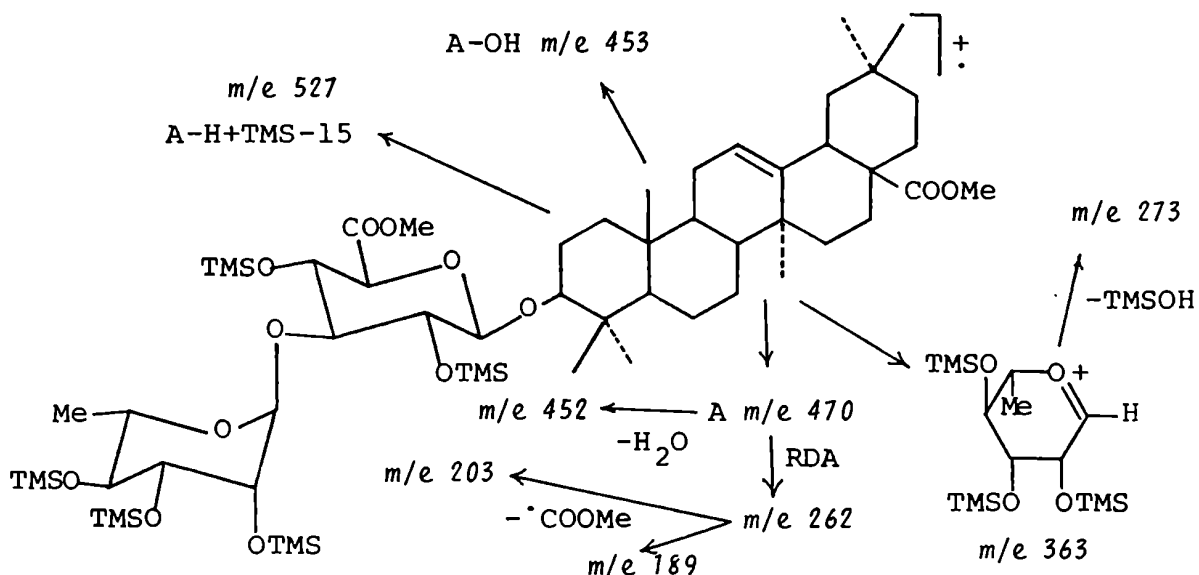


Figura 61: Fragmentaciones de 89a TMS.

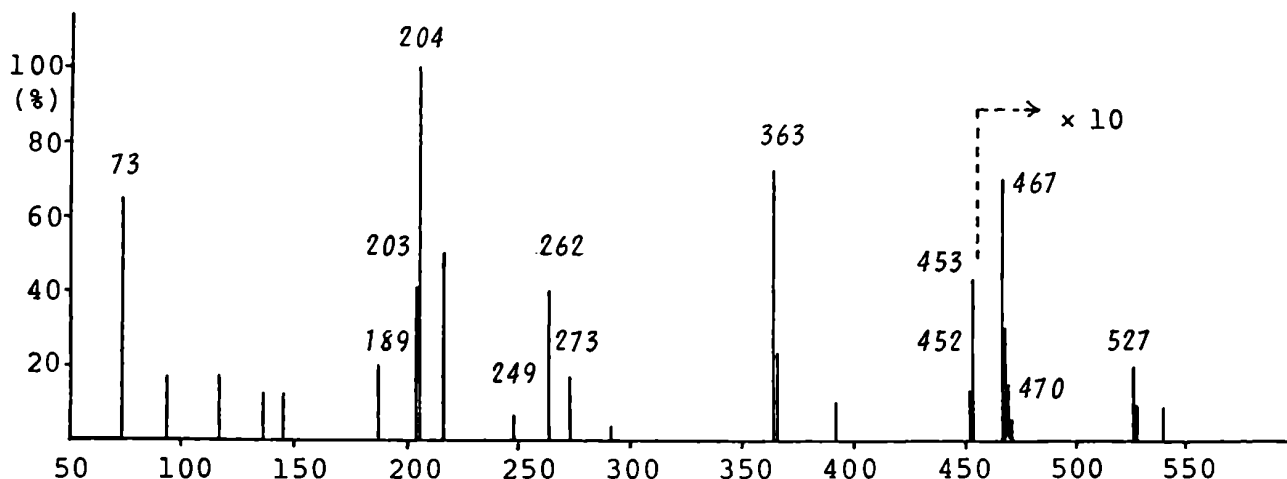


Figura 61 (continuación): Espectro de masas de 89a TMS.

Estudio de 89a y 90a por espectroscopía de ^{13}C -RMN

La determinación de la posición de unión de la ramnosa terminal al ácido glucurónico y la configuración del carbono anomérico se realizó mediante el análisis de los espectros de ^{13}C -RMN de 89a, 90a y 92, usando en los tres casos piridina deuterada como solvente.

En la figura 62 se esquematizan las señales de los carbonos de los glicósidos 89a, 90a y 92 en la zona de 50 a 110 ppm.

En la tabla 18 se encuentran los valores de los desplazamientos químicos para sus agliconas, comparados con los del oleato de metilo 49a y con el eritrodio 93. En la tabla 19 se dan los valores para los carbonos de los azúcares de los glicósidos 89a, 90a y 92.

En el espectro de 89a (Fig. 62) se observaban dos señales a 106,7 y 102,6 ppm que correspondían a los carbonos anoméricos del ácido glucurónico y de la ramnosa respectivamente. A 89,3 ppm aparecía la señal del C-3 de la aglicona, desplazada de su posición original de 78,6 ppm por la glicosidación, mientras que en 82,0 ppm se encontraba la del carbono

Tabla 18: Desplazamiento químico de los carbonos de las agliconas de los glicósidos 89a, 90a y 92 y de los compuestos 49a y 93 (en ppm).

	<u>93</u> ²¹⁸	<u>92</u>	<u>89a</u>	<u>90a</u>	<u>49a</u> ⁹²
1	38,6	39,3	39,3	39,1	39,3
2	27,2	26,4	26,3	25,9	28,2
3	79,0	89,0	89,3	89,3	78,6
4	38,8*	38,7*	38,4	38,5	39,3
5	55,2	55,6	55,6	55,6	56,2
6	18,4	18,5	18,3	18,1	19,0
7	32,6	32,8	33,0	32,9	33,0
8	39,8*	40,0*	39,5	39,6	40,1
9	47,6	47,8	47,7	47,7	48,4
10	36,9	36,7	36,8	36,6	37,7
11	23,6	23,8	23,5	23,4	23,9
12	122,3	-	-	-	123,0
13	144,2	145,0	144,0	143,8	144,4
14	41,7	41,9	41,8	41,8*	42,2
15	25,6	26,1	27,9	27,9	28,4
16	22,0	22,6	23,5	23,4	23,9
17	36,9	37,5	46,8	46,7	47,3
18	42,3	42,7	41,8	41,5*	42,2
19	46,5	47,0	46,0	46,7	46,5
20	31,0	31,1	30,6	30,5	30,9
21	34,1	34,5	33,8	32,9	34,4
22	31,0	31,7	33,0	31,9	33,0
23	28,1	28,0	27,9	27,9	28,8
24	15,5	16,3	16,7	16,6	16,3
25	15,5	15,6	15,3	15,3	15,6
26	16,7	16,3	17,0	17,2	17,3
27	25,9	26,1	26,0	25,9	26,1
28	69,7	68,6	178,0	176,4	177,8
29	33,2	33,3	33,0	32,9	33,5
30	23,6	23,8	23,5	23,4	23,9

* Las asignaciones pueden intercambiarse.

- No se observó la señal por interferencia de las señales del solvente(piridina deuterada en todos los casos, excepto para 93, cuyos datos son en cloroformo deuterado).

Tabla 19: Desplazamiento químico de los carbonos de los azúcares de los glicósidos 89a, 90a y 92 (en ppm).

	<u>92</u>	<u>89a</u>	<u>90a</u>
1'	106,4	106,7	106,5
2'	75,8	75,4	75,2
3'	83,8	82,0	81,9
4'	69,8	71,2	71,0
5'	77,9	76,8	76,6
6'	62,6	170,5	170,3
1"	102,8	102,6	102,3
2"	72,4	72,1	72,0
3"	72,4	72,4	72,0
4"	73,9	73,8	73,5
5"	69,8	69,6	69,5
6"	18,2	18,3	18,1
1'''			95,4
2'''			73,5
3'''			78,2*
4'''			70,7
5'''			78,6*
6'''			61,8
Me (aglic.)		51,6	
Me (gluU)		52,1	52,1

' Acido glucurónico, glucosa (unidos al HO-3 de la aglicona).

" Ramnosa

''' Glucosa (unida al COOH-28 de la aglicona).

* Las asignaciones pueden intercambiarse.

gluU: Acido glucurónico.

del ácido glucurónico directamente unido a la ramnosa, también desplazado por la misma causa. A campos más altos (55,6 ppm) se observaba la señal del C-5 de la aglicona; el grupo carboximetilo de la unidad de ácido glucurónico daba dos señales a 170,5 (-COOMe) y 52,1 ppm (-COOMe), mientras que el de la aglicona lo hacía a 178,0 y 51,6 ppm. En el oleanolato de metilo 49a este grupo origina dos señales a 177,8 y 51,3 ppm,

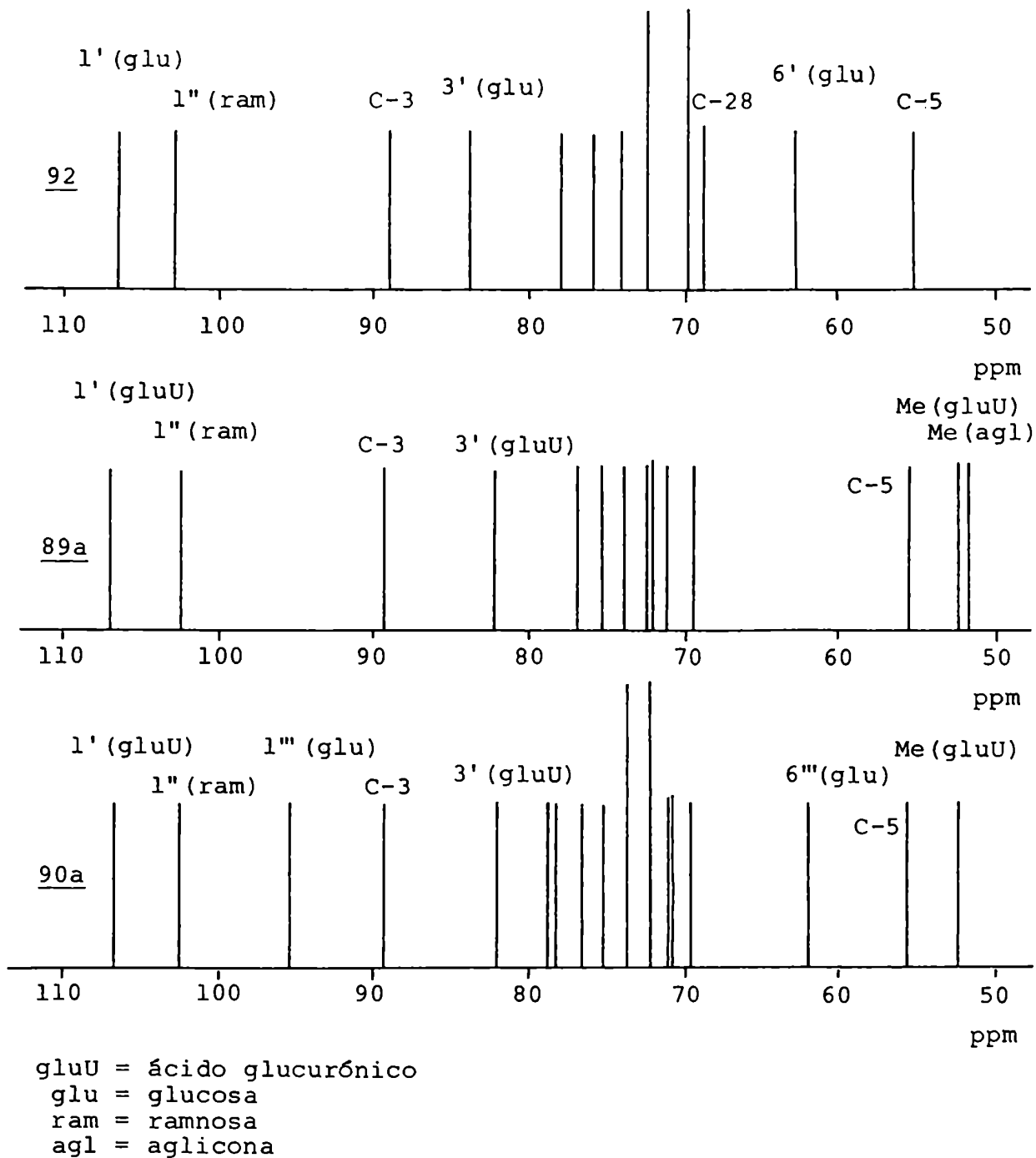


Figura 62: Esquema de las señales de los carbonos de los glicósidos 92, 89a y 90a en la zona de 50 a 110 ppm.

lo que permitió distinguir fácilmente ambos pares de señales en 89a.

En el espectro de 90a (Fig. 62) no se encontraba la señal a 51,6 ppm proveniente del metilo del éster de la aglicona, por estar ahora reemplazado por una unidad de glucosa. Consecuentemente se originaban dos nuevas señales a 95,4 y 61,8 ppm debidas a C-1 y C-6 de este azúcar; a la vez que se apreciaba un aumento del número de señales en la zona de 70 a 80 ppm, correspondientes a los carbonos 2, 3, 4 y 5 de los azúcares.

En el espectro de 92 (Fig. 62) desaparecían las señales de los carbonilos y de los metilos de los grupos carboximetilo, apareciendo en cambio una señal a 68,6 ppm debida al C-28 de la aglicona (eritrodiool 93), ahora un alcohol primario. Se observaban también cambios con respecto a 89a, por la reducción de la unidad de glucuronato de metilo a glucosa: mientras el carbono anomérico permanecía inalterado a 106,4 ppm, el carbono unido a la ramnosa se desplazaba a 83,8 ppm y el C-6 de esta nueva unidad de glucosa aparecía a 62,6 ppm.

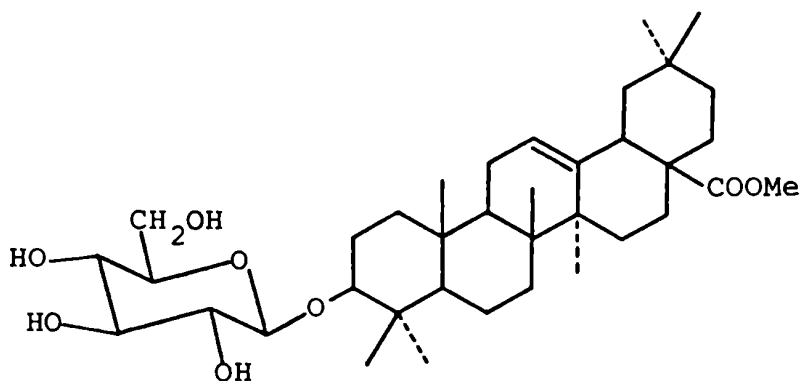
En conjunto, estos datos confirmaban la presencia de una unidad de glucosa, una de ácido glucurónico y una de ramnosa en 90a, como se había deducido de la integración de las señales del espectro de ^1H -RMN. También se comprobó en forma concluyente la pureza química y estereoquímica de estos compuestos, ya que no se observó duplicación de señales ni disminución relativa de sus intensidades.

La comparación de los valores de desplazamientos químicos de 92 en el espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 19) con los de azúcares piranósicos y furanósicos condujo a determinar que tanto la unidad de glucosa como la de ramnosa eran piranosas, ya que en los metilfuranósidos de estos azúcares estas señales aparecen a campos mucho más bajos (Tabla 20). Como modelo de la ramnosa se ha tomado la manosa, teniendo en cuenta que habrá cambios en los carbonos 4 y 5^{98,99}.

Tabla 20: Desplazamiento químico de los carbonos de metilglicósidos de azúcares piranósicos y furanósicos, en D_2O (en ppm).

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Me- β -D-glucopiranosido	104,3	74,2	76,9	70,8	76,9	61,9
Me- α -D-glucopiranosido	100,3	72,5	74,2	70,6	72,7	61,7
Me- β -D-glucofuranosido	110,0	80,6	75,8	82,3	70,7	64,7
Me- α -D-glucofuranosido	104,0	77,7	76,6	78,8	70,7	64,2
Me- β -L-ramnopiranosido	102,6	72,1	75,3	73,7	73,4	18,5
Me- α -L-ramnopiranosido	101,9	71,0	71,3	73,1	69,4	17,7
Me- α -D-manopiranosido	101,9	71,2	71,8	68,0	73,7	62,1
Me- β -D-manofuranosido	103,6	73,1	71,2	80,7	71,0	64,4
Me- α -D-manofuranosido	109,7	77,9	72,5	80,5	70,6	64,5

A fin de determinar la posición de unión de la ramnosa a la glucosa en 92 se comparó el espectro de ^{13}C -RMN de éste con el del oleanolato de metilo-3-O- β -D-glucofuranosido 95, ya que, como se puede observar en la tabla 21, se producen modificaciones de importancia en las señales de la glucosa (fundamentalmente en los carbonos 1' y 2') al cambiar el grupo metilo por oleanolato de metilo⁹².



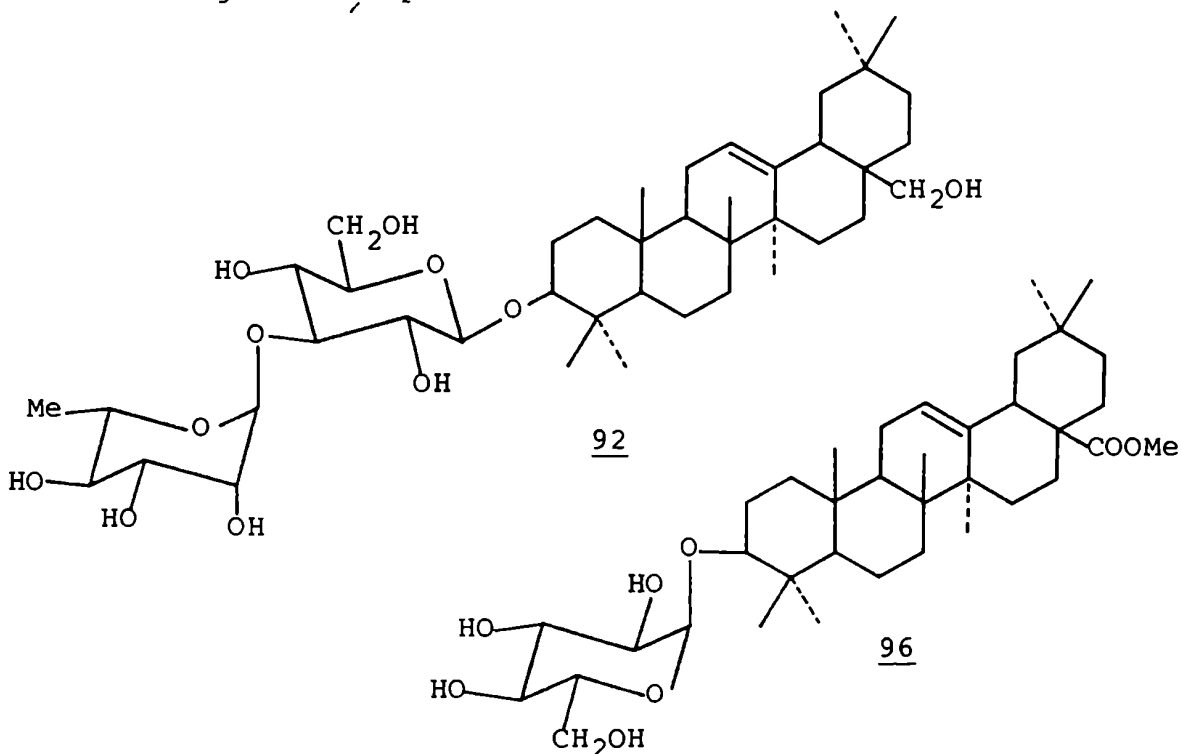
95

Tabla 21: Desplazamiento químico de los carbonos de los azúcares de los glicósidos 92, 95 y 96 comparados con los metilglicósidos correspondientes, en piridina deuterada (en ppm).

	Me-β-D-gluco- ⁹² piranósido	<u>95</u> ⁹²	<u>92</u>	<u>96</u> ⁹²
1'	105,4	106,3	106,4	97,4
2'	74,8	75,6	75,8	73,8
3'	78,1	78,5	83,8	75,6
4'	71,4	72,1	69,8	72,7
5'	78,1	77,6	77,9	74,3
6'	62,5	63,3	62,6	63,4

	Me-α-L-ramno- ⁸⁹ piranósido	Me-β-L-ramno- ⁸⁹ piranósido
1"	102,6	102,6
2"	72,7*	72,1
3"	72,1*	75,3
4"	73,8	73,7*
5"	69,5	73,4*
6"	18,6	18,5

* Las asignaciones pueden intercambiarse.



La única diferencia entre la aglicona de 92 y la de los compuestos modelo 95 y 96 (oleanolato de metilo-3-O- α -D-glucopiranosido) reside en el C-28, muy alejado para afectar a la glucosa. Al comparar (Tabla 21) el desplazamiento químico del C-1' de 92 con 95 y 96 se confirmó que la glucopiranososa unida al C-3 de la aglicona era efectivamente β . Como era de esperar, siendo idéntico el entorno del C-3 de la aglicona en 92 y en 95, no hay diferencias de conformación alrededor del enlace oxígeno glicosídico/C-3, y por lo tanto, las señales de los carbonos anoméricos son muy similares en ambos compuestos⁹⁶.

La asignación de los carbonos de la ramnosa (Tabla 21) de 92 se pudo hacer por comparación directa con los metilramnopiranosidos. Si bien las señales de los carbonos anoméricos de los α y β -L-metilramnósidos son coincidentes, las de los carbonos 3 y 5 permiten distinguirlos con facilidad⁸⁹.

De esta manera se confirmó la configuración α para la unidad de ramnosa de 92.

La glicosidación de un hidroxilo de un azúcar produce un desplazamiento a campos bajos en el carbono afectado (C- α) que puede variar entre límites amplios (3 a 11 ppm), dependiendo del azúcar glicosidante y de la posición de unión.

Cuando este último es glucosa, los desplazamientos son del orden de 8 ppm; en algunos compuestos con ramnosa unida a C-6 de glucosa es de 5 ppm y de ~ 3 ppm cuando lo está a C-2¹⁰⁴.

Por otra parte, la unión de ramnosa a C-4 de ácido glucurónico produce un desplazamiento de 11 ppm¹⁰⁷. No se encontró un ejemplo de un espectro de ¹³C-RMN de ramnosa unida a C-3 de glucosa que permita evaluar el desplazamiento producido. Los carbonos β al afectado suelen sufrir un efecto de protección que puede llegar a 2 ppm, aunque son numerosos los casos donde no se observa^{104,105,101}.

Teniendo en cuenta estos datos se efectuó la asignación de las señales de los carbonos de la glucosa en 92 (Tabla 21). La señal del C-6' fue fácilmente distinguible

pues se encontraba a campos más altos que las restantes (62,6 ppm); la señal a 69,8 ppm pudo asignarse únicamente a C-4' que de esta manera mostraba un efecto de protección de 2,3 ppm debido a glicosidación en uno de los carbonos vecinos, que debía ser evidentemente el C-3'. Este se encontraba a 83,8 ppm, habiendo sufrido una desprotección de 5,3 ppm respecto a 95.

El C-5' aparecía entonces a 77,9 ppm, sin variaciones con respecto al modelo, mientras que C-2' permanecía inalterado en 75,8 ppm.

Se puede descartar la glicosidación en C-2', puesto que en tal caso debería haberse observado una protección del C-1' y C-3', no siendo posible, al cambiar las asignaciones, justificar la señal a 69,8 ppm; lo que también ocurriría con una glicosidación en C-4', con protección de C-3' y C-5'.

Kasai y col. estudiaron los efectos producidos por la glicosidación de diversos sustratos con α -L-ramnosa, encontrando, en general, valores de desplazamiento del carbono afectado del orden de +5 ppm⁸⁹. La protección en los carbonos vecinos (C- β) a éste depende del sustrato y de la cantidad de sustituyentes que éstos tengan. Sin embargo, sus resultados no son directamente aplicables pues el estudio se hizo con sustituyentes alquilo y no hidroxilo. Un resultado de importancia de estos autores es que no existen diferencias apreciables entre los efectos producidos por la α -L-ramnosa, β -D-glucosa o β -D-manosa, ya que las tres tienen configuración R en el carbono anomérico y el sustituyente de C-2' no influye.

En el espectro de ^{13}C -RMN de la β -laminaribiosa¹⁰⁵, 3-O- β -(β -D-glucopiranosil)-D-glucosa, se observa que al glicosidar el C-3 de la glucosa con otra β -D-glucosa, éste se desplaza en +9,4 ppm, valor característico de la β -glucosidación, mientras el C-4 se protege en 1,0 ppm y el C-2 permanece inalterado, comportamiento similar al del compuesto 92. En la figura 63 se indican las variaciones de los valores de desplazamiento químico resultantes de comparar la β -laminaribiosa con la β -D-glucopiranososa.

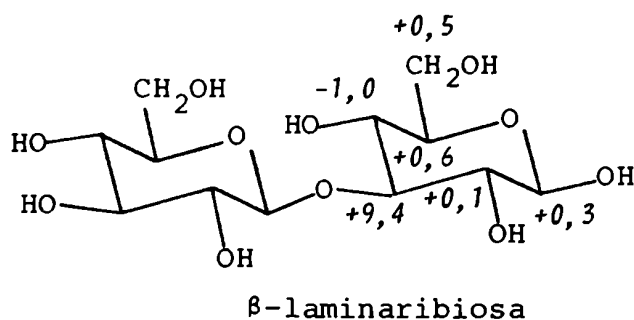


Figura 63: Variación en los valores de desplazamiento químico de los carbonos de la β-D-glucopiranososa por glicosidación en posición 3 (en ppm)

El compuesto 92 es entonces: eritrodíol-3-O-β-(3'-O-α-L-ramnopiranosil)-D-glucopiranosido. Por lo tanto, el compuesto 89 es: ácido oleanólico-3-O-β-(3'-O-α-L-ramnopiranosil)-D-glucuronopiranosido.

La asignación de las señales de la ramnosa de 89a surge directamente (Tabla 19) de la comparación con 92.

De la misma manera se pueden asignar los carbonos del ácido glucurónico, aunque existen algunos cambios que, sin embargo, son similares a los que ocurren al considerar los datos de la glucosa y del ácido glucurónico (Tabla 22)⁹⁸.

Tabla 22: Diferencias en el valor del desplazamiento químico del azúcar unido al HO-3 de 89a y 92, comparadas con las correspondientes de los monosacáridos, en ppm.

	<u>92</u>	<u>89a</u>	<u>dif.</u>	<u>MG</u>	<u>MMGU</u>	<u>dif.</u>
1'	106,4	106,7	+0,3	104,3	104,6	+0,3
2'	75,8	-75,4	-0,4	74,2	73,7	-0,5
3'	83,8	82,0	-1,8	76,9	76,3	-0,6
4'	69,8	71,2	+1,4	70,8	72,4	+1,6
5'	77,9	76,8	-1,1	76,9	75,7	-1,2
6'	62,6	170,5	-	61,9	-	-

MG = metil-β-D-glucopiranosido

MMGU = éster metílico del metil-β-D-glucuronopiranosido

En 89a, el C-3' sufre una modificación respecto al C-3' de 92 en el mismo sentido que en los monosacáridos, pero de distinta magnitud, por ser el portador de la unidad de ramnosa.

Las señales de la ramnosa y del ácido glucurónico de 90a eran idénticas a las de 89a. Como 90a no es reductor y dado que el hidrógeno anomérico de la glucosa está muy desprotegido en el espectro de $^1\text{H-RMN}$, se dedujo que ésta se encuentra unida al grupo carboxilo de la aglicona por el C-1''.

El espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ confirmó este resultado, ya que aparecía una única señal del carbono anomérico a 95,4 ppm. Si el HO-1 hubiera estado libre se hubieran observado dos señales correspondientes a los dos anómeros (β y α) en equilibrio en una relación de $\sim 2:1$ ¹⁷⁶.

Es sabido que la acilación produce pequeñas modificaciones del carbono afectado. En el caso de la acetilación el carbono α se desprotege en ~ 2 ppm, mientras los β se protegen entre 1 y 3 ppm. Cuando el ácido es más complicado ocurren cambios en todos los carbonos del anillo piranósico¹⁰⁴.

Comparando el espectro de 90a con las señales de la β -glucopiranososa (Tabla 23), se observó una discrepancia con respecto al efecto esperado para el C-1'' de una β -D-glucopiranososa acilada, ya que éste aparecía a campos más altos en 90a, efecto contrario al de la acetilación. Los carbonos 2'' y 4'' sufrían también un efecto de protección de 3,3 y 1,3 ppm respectivamente. En principio, la posición del C-1'' podría ser compatible con una α -D-glucopiranososa acilada en C-1, pero las señales del C-3'' y especialmente de C-5'' no corresponden a este modelo, que tampoco se ajusta a los datos del $^1\text{H-RMN}$ y del poder rotatorio (Tabla 24).

Se encontraron en literatura ejemplos de ésteres derivados del ácido oleanólico con el HO-1 de la β -D-glucopiranososa, coincidiendo sus datos de $^{13}\text{C-RMN}$ con los de 90a, pero sin haber realizado un análisis de los mismos. En el 3,28-bis-O-glucósido del ácido 19- α -hidroxiarjunólico 94 la

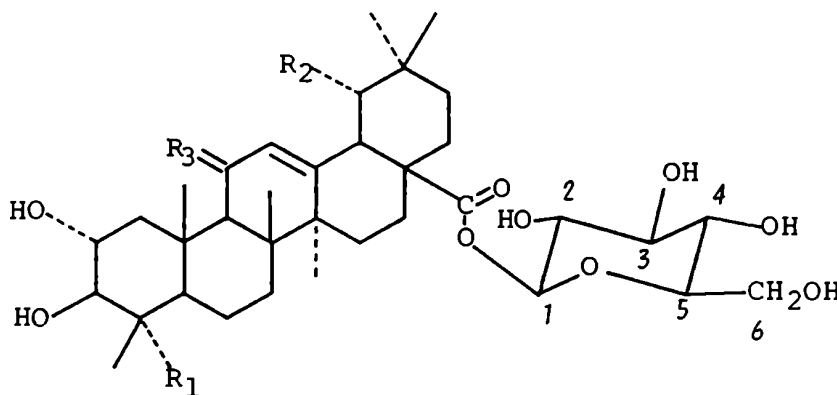
señal del C-1 de la glucosa esterificada aparece a 95,5 ppm⁶⁴; valores similares se informan para la arjunetina 97 y los arjunglucósidos II y III (98 y 99)⁹⁰ (Tabla 23).

Tabla 23: Desplazamiento químico de los carbonos de glucosa esterificada por el HO-1 con derivados del ácido oleanólico y de la β-D-glucosa en piridina y agua.

	<u>98</u> [#]	<u>99</u> [#]	<u>97</u> [#]	<u>90a</u> [#]	β-D-glup (piridina)	β-D-glup (D ₂ O)
1	95,6	95,9	95,7	95,4	98,9	96,5
2	74,0	74,0	74,0	73,5	76,8	74,8
3	79,0	79,2	79,1	78,2*	78,4*	76,4
4	71,1	71,0	71,0	70,7	72,0	70,3
5	78,7	78,7	78,7	78,6*	78,6*	76,5
6	62,2	62,1	62,1	61,8	63,0	61,8

* Las asignaciones pueden intercambiarse.

En piridina deuterada.



<u>97</u>	R ₁ = H	R ₂ = HO	R ₃ = H ₂
<u>98</u>	R ₁ = OH	R ₂ = H	R ₃ = H ₂
<u>99</u>	R ₁ = H	R ₂ = OH	R ₃ = O

Tabla 24: Desplazamiento químico de los carbonos de la glucosa esterificada de 90a comparados con los de la α -D-glucopiranososa, en piridina deuterada, en ppm.

	<u>90a</u>	<u>α-D-glup.</u>
1 ^{'''}	95,4	94,1
2 ^{'''}	73,5	74,4
3 ^{'''}	78,2*	75,3
4 ^{'''}	70,7	72,5
5 ^{'''}	78,6*	73,5
6 ^{'''}	61,8	63,2

* Las asignaciones pueden intercambiarse.

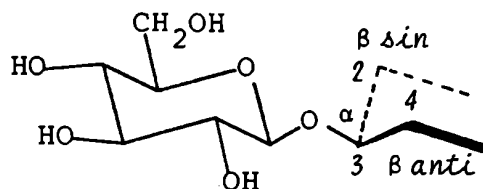
Es posible que la diferencia existente entre el valor del desplazamiento químico esperado para el C-1 de una β -D-glucopiranososa acilada y el C-1^{'''} de 90a se deba a un efecto de solvente. Así puede apreciarse que en el espectro de 90a en piridina deuterada, las señales de la glucosa son semejantes a las de la glucosa en agua deuterada, a excepción de C-3 y C-5 (Tabla 23). Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que, un grupo como el ácido oleanólico que, además de ser voluminoso, posee un carbonilo cerca de la glucosa, tendría que modificar sustancialmente la interacción sustrato-solvente y provocar efectos anómalos¹⁷⁷.

El glicósido 90 es el ácido oleanólico-3-O- β -(3'-O- α -L-ramnopiranosil)-D-glucuronopiranosido con un grupo β -D-glucopiranosilo esterificando el COOH-28.

Los efectos que sobre la aglicona produce la glicosidación con ácido glucurónico resultaron similares a los de glucosidación estudiados por Seo y Tomita⁹², quienes encontraron que la β -glucosidación de agliconas con dos sustituyentes metilo en el carbono *anti* al oxígeno piranósico, en la conformación más estable de Koto y Lemieux⁹⁶, produce los siguientes

desplazamientos en los carbonos de la aglicona:

C- α : +10,4 ppm
 C- β *sin*: -1,7 ppm
 C- β *anti*: 0 ppm



En la tabla 25 se muestran los cambios producidos al pasar del oleanolato de metilo al compuesto 89a (los resultados son similares para 90a):

Tabla 25: Variación en le desplazamiento químico de los carbonos del anillo A del oleanolato de metilo por glicosidación con ácido glucurónico en HO-3, en ppm.

	<u>49a</u>	<u>89a</u>	<u>dif.</u>
1	39,3	39,3	0
2	28,2	26,3	-1,9
3	78,6	89,3	+10,7
4	39,3	38,4	-0,9
5	56,2	55,6	-0,6

se observa que los desplazamientos encontrados corresponden a los esperados, puesto que C-2 (*sin*) aparece más protegido que C-4 (*anti*). En la tabla 18 se comprueba que no hay diferencias significativas entre 89a y 49a aparte de éstas.

El glicósido 90a presentó cambios mínimos respecto a 89a ($\sim \pm 1$ ppm) en los carbonos vecinos al grupo carboxilo esterificado con glucosa (C-28) (Tabla 18), evidenciando así que la nueva unidad de glucosa es relativamente independiente y no introduce mayores modificaciones conformacionales en el esqueleto de la aglicona.

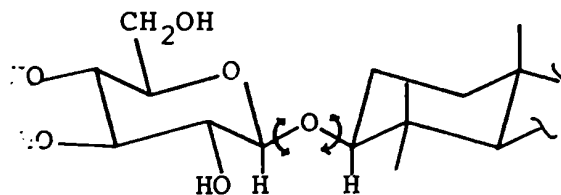
Las señales de los carbonos de los anillos A, B y C de la aglicona de 92 fueron asignadas por comparación con 89a y 90a, mientras que las de los anillos D y E por comparación

con eritrodíol 93 (Tabla 18).

Estudio de 89a y 90a utilizando el poder rotatorio

Una confirmación adicional de las configuraciones de los carbonos anoméricos de los azúcares se obtuvo por aplicación de la regla de Klyne⁷⁸, que establece que la rotación molecular de un compuesto es la suma de las rotaciones moleculares de sus constituyentes. Se ha aplicado con éxito en numerosos casos, aunque debe tenerse en cuenta que este tratamiento ignora los cambios de conformación producidos al pasar de un metilglicósido a un glicósido con otro azúcar o aglicona más complicada.

Estos cambios conformacionales provienen de variaciones en los ángulos diedros definidos por el carbono anomérico y el oxígeno glicosídico y, por este último y el carbono α de la aglicona¹⁷⁸:



La rotación molecular se define:

$$M_D = \frac{\alpha_D \cdot PM}{100}$$

Aplicando este método y teniendo en cuenta las rotaciones moleculares de la tabla 26, se calcularon las distintas

Tabla 26: Rotaciones moleculares de los componentes de los glicósidos 89a, 90a y 92.

	M_D	<u>Ref.</u>
Me- β -D-glucopiranósido	-62°	179
Me- α -D-glucopiranósido	+300°	179
Me- β -L-ramnopiranósido	+170°	179
Me- α -L-ramnopiranósido	-111°	179
Acido oleanólico	+378°	180
Oleanolato de metilo	+352°	180
Acido oleanólico-3-O- β -D-glucuronopiranósido (éster dimetílico)	+99°	59
Eritrodiol-3-O- β -D-glucopiranósido	+190°	59
<u>89a</u>	-81°	
<u>90a</u>	-162°	
<u>92</u>	+30°	
Eritrodiol	+345°	179

No se pudo encontrar el dato del éster metílico del metil- β -D-glucuronopiranósido.

combinaciones de ramnoglicósidos del eritrodiol:

$$\text{Me-}\beta\text{-D-glup} + \text{Me-}\alpha\text{-L-ramp} + \text{eritrodiol} = +172^\circ$$

$$\text{Me-}\alpha\text{-D-glup} + \text{Me-}\alpha\text{-L-ramp} + \text{eritrodiol} = +534^\circ$$

$$\text{Me-}\beta\text{-D-glup} + \text{Me-}\beta\text{-L-ramp} + \text{eritrodiol} = +453^\circ$$

$$\text{Me-}\alpha\text{-D-glup} + \text{Me-}\beta\text{-L-ramp} + \text{eritrodiol} = +815^\circ$$

El valor experimental de +30° para 92 correspondería a una glucosa β y ramnosa α . Un mejor resultado se obtiene tomando como base el eritrodiol-3-O- β -D-glucopiranósido pues así se elimina el error asociado a la unión glucosa-eritrodiol:

$$\text{Eritrodiol-3-O-}\beta\text{-D-glup} + \text{Me-}\alpha\text{-L-ramp} = +79^\circ$$

$$\text{Eritrodiol-3-O-}\beta\text{-D-glup} + \text{Me-}\beta\text{-L-ramp} = +360^\circ$$

De esta manera se confirma que la configuración de la ramnosa es efectivamente α .

En forma similar se calculan, para el compuesto 89a, las dos combinaciones de ramnosa unida al éster dimetílico del ácido oleanólico-3-O- β -D-glucuronopiranosido:

Acido oleanólico-3-O- β -D-gluUp + Me- α -L-ramp = -12°
(éster dimetílico)

Acido oleanólico-3-O- β -D-gluUp + Me- β -L-ramp = $+269^\circ$
(éster dimetílico)

El valor experimental de -81° para 89a confirma la unión α de la ramnosa.

Finalmente, tomando como base el compuesto 89a se pueden calcular los valores de los dos ésteres posibles de la glucosa en 90a, resultando una unión β por comparación con el valor experimental de -162° :

89a + Me- β -D-glup = -143°

89a + Me- α -D-glup = $+219^\circ$

Rigurosamente, en este caso, se debería haber tomado como base 89 y no 89a, pero se ve en la tabla 26 que la diferencia de rotación molecular entre el ácido oleanólico y su éster metílico no es significativa, considerando el error del método.

Si bien la regla de Klyne fue formulada originalmente para uniones glucosídicas, se ha aplicado también para ésteres de azúcares con idénticos resultados¹⁷⁰, como se comprueba también en este caso.

Comprobación química de las estructuras de 89a y 90a

Para verificar por un procedimiento químico la posición de unión de la ramnosa al ácido glucurónico en 89 y 90, se procedió a analizar los productos de metilación e hidrólisis del glicósido 92.

Se eligió el método de metilación de Hakomori⁷⁴ por su efectividad y por ser apropiado en este caso, ya que la molécula no posee grupos funcionales sensibles a las bases.

El producto metilado fue hidrolizado (parte experimental, pág, 231) y la solución obtenida tratada con una resina de intercambio iónico básica débil (forma amino) en metanol, para obtener los azúcares metilados (Fig. 64).

El análisis de los azúcares metilados por CGL de los alditoles acetilados no resultó de utilidad ya que los tiempos de retención de 3,4,6- y 2,4,6-tri-O-metilglucitol acetilados son prácticamente iguales (Tabla 27)^{76,77}.

Tabla 27: Tiempos de retención de alditoles parcialmente metilados acetilados relativos al 2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol acetilado.

<u>Derivado acetilado de:</u>	<u>Columna</u>	
	<u>OV 225</u> (155-170°)	<u>ECNSS-M</u> (160-200°)
3,4-di-O-Me-glucitol	4,26	5,27
2,4-di-O-Me-glucitol	4,21	5,10
2,3-di-O-Me-glucitol	4,50	5,39
3,4,6-tri-O-Me-glucitol	1,83	1,98
2,4,6-tri-O-Me-glucitol	1,82	1,95
2,3,6-tri-O-Me-glucitol	2,32	2,50
2,3,4-tri-O-Me-ramnitol		0,46

Ambas columnas al 3% de fase líquida.

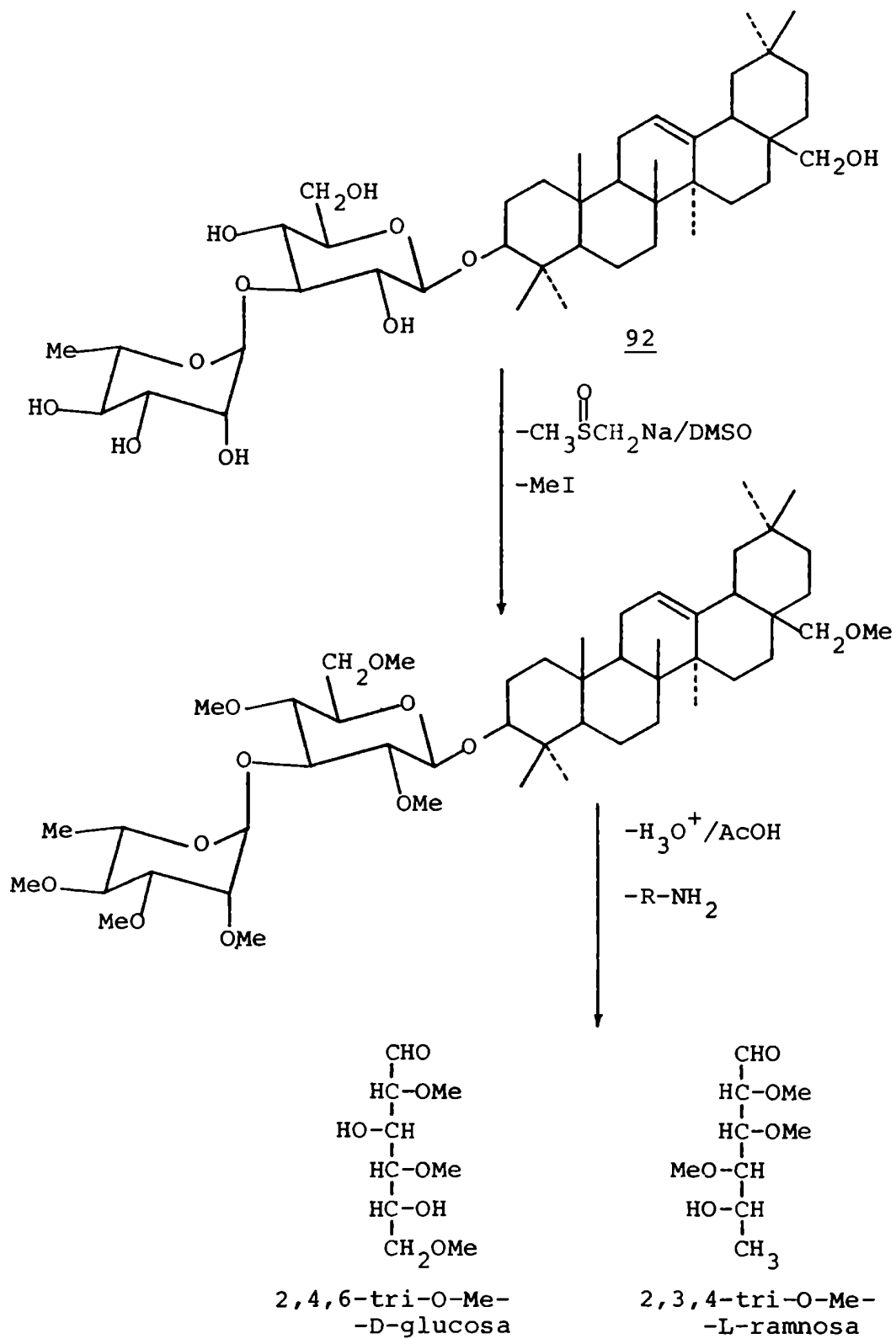


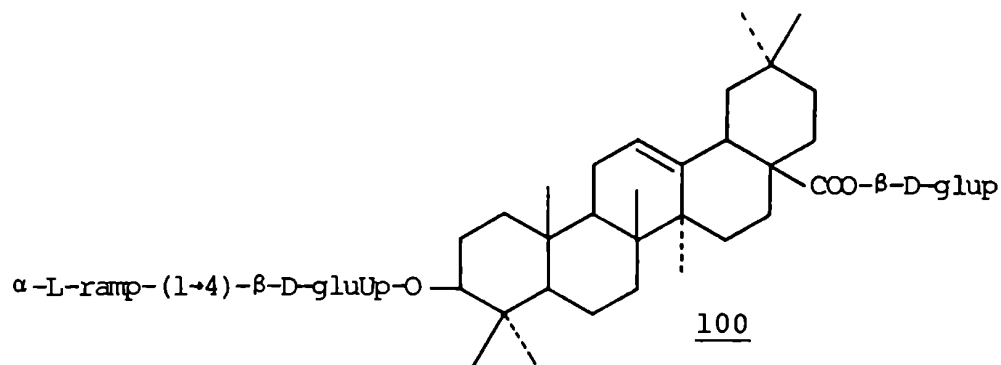
Figura 64: Metilación e hidrólisis de 92.

Si bien se había informado que por CCD de silicagel de los azúcares metilados era posible distinguirlos ^{181,182}, los sistemas de solventes indicados en la literatura no dieron buenos resultados. Se logró en cambio, una buena separación utilizando tolueno-EtOH, 20:7, visualizando las manchas con nitrato de plata alcalino. Analizando la mezcla proveniente de la metilación e hidrólisis de 92 se encontró 2,4,6-tri-O-metilglucosa y 2,3,4-tri-O-metilramnosa, por comparación con testigos auténticos (Tabla 28).

Tabla 28: R_f en silicagel, tolueno-EtOH, 20:7, de los testigos y productos de metilación e hidrólisis de 92.

	R_f
2,4,6-tri-O-Me-glucosa	0,35
3,4,6-tri-O-Me-glucosa	0,40
2,3,4-tri-O-Me-ramnosa	0,74
Metilación e hidrólisis de <u>92</u>	0,35 y 0,74

No se utilizó el testigo de 2,3,6-tri-O-metilglucosa ya que la glicosidación en C-4 del ácido glucurónico no era compatible con los datos espectroscópicos. Por otra parte, durante el transcurso de este trabajo se informó el aislamiento del compuesto con la unión antes mencionada, llamado Olaxósido 100, y sus propiedades físicas y espectroscópicas resultaron diferentes de las de 90¹⁰⁷.

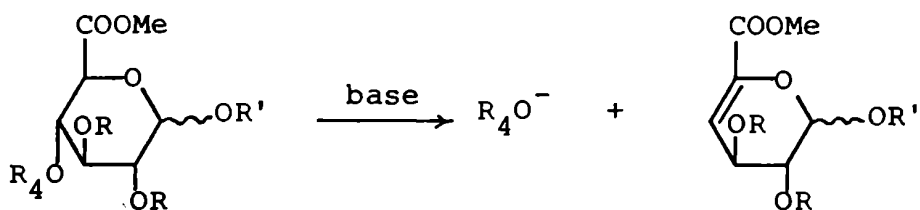


Se confirma de esta manera que la posición de unión es la 3, y que la ramnosa es el azúcar terminal.

Se realizó también la metilación del glicósido 89a por el método de Hakomori, para luego reducir el grupo carboximeto del ácido glucurónico con H_4LiAl . Por posterior hidrólisis se obtendría 2,4- o 3,4-di-O-metilglucosa, de acuerdo al esquema de la figura 65.

Es conocido que durante la metilación de Hakomori de polisacáridos que contienen ácidos urónicos, se produce no sólo la metilación completa de los hidroxilos de los azúcares, sino también la de los grupos carboxilos. El tratamiento en medio básico anhidro de un polímero que contiene ácidos urónicos esterificados y con un buen grupo saliente sobre C-4, como un residuo de carbohidrato o un grupo metoxilo, provoca una β -eliminación de este último.

Durante la primera metilación de un polisacárido, pese a estar expuesto a la base, no ocurre eliminación por no estar esterificados los grupos carboxilo. Al agregar MeI, tanto las reacciones de metilación y esterificación como la del exceso de base con el MeI son más rápidas que la β -eliminación y ésta por lo tanto no ocurre^{77,183,184}.



En el caso de la metilación de 89a, si bien se partió del compuesto con el carboxilo esterificado, la β -eliminación no ocurrió ya que no existía un buen grupo saliente en C-4', pues la ramnosa estaba unida a C-3', encontrándose en C-4' solamente un grupo hidroxilo.

Otro posible inconveniente de efectuar esta metilación es la reacción del metilo del éster con el carbanión para dar

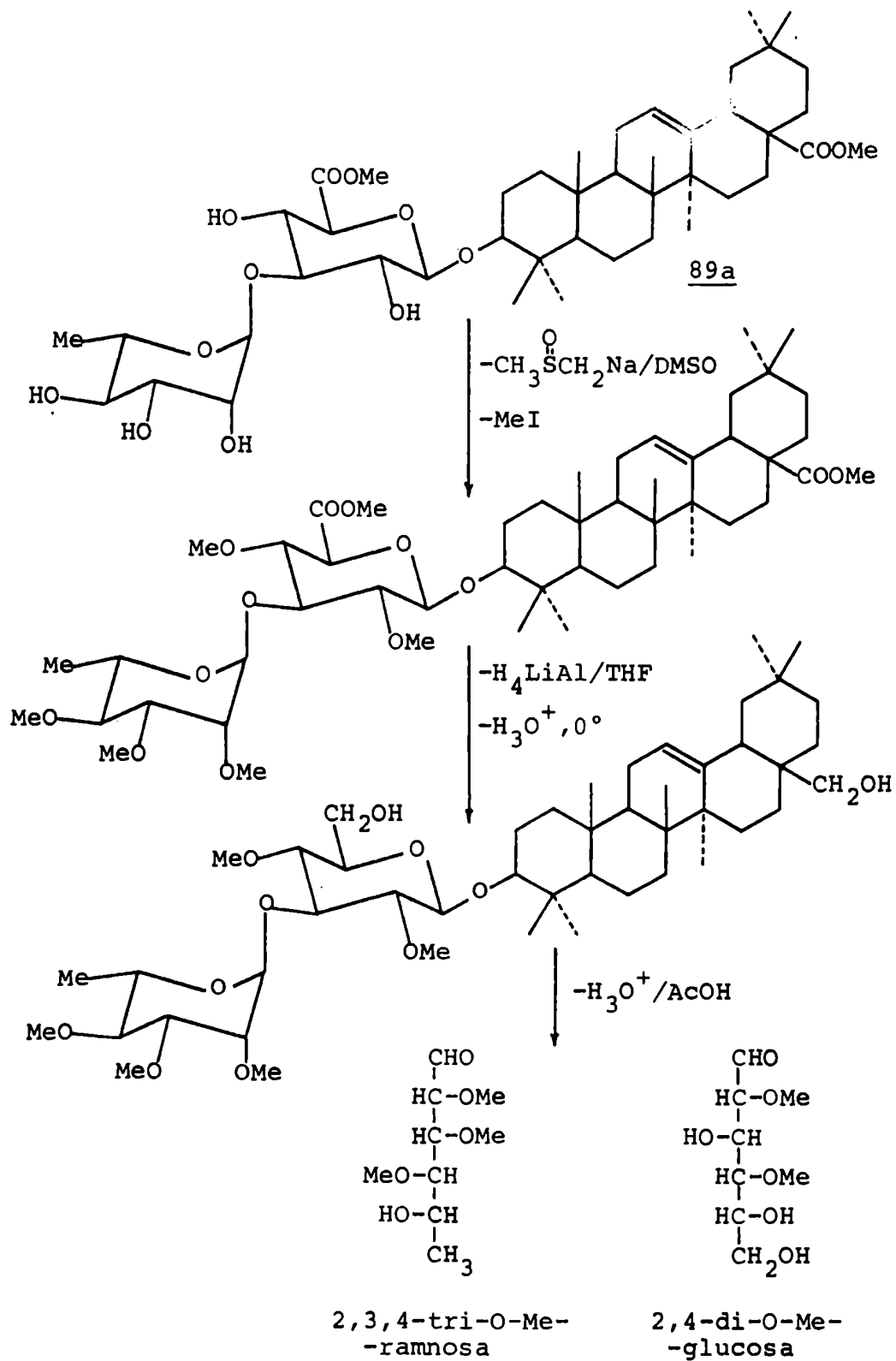
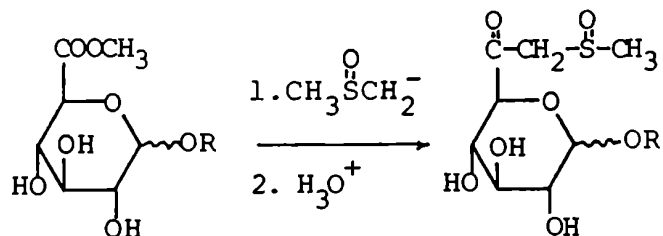


Figura 65: Metilación, reducción e hidrólisis de 89a.

una metilsulfinilcetona, pero en la práctica no se ha informado la formación de productos derivados de esta reacción^{77,185,186}.



En la metilación de 89a, la mezcla de azúcares parcialmente metilados fue analizada por CCD de alta resolución (HPTLC, silicagel, tolueno-EtOH, 20:13) encontrándose 2,3,4-trimetilramnosa, 2,4-di-O-metilglucosa y una pequeña cantidad de productos de polaridad intermedia que no se identificaron.

La 2,4-di-O-metilglucosa fue purificada por una columna de silicagel, reducida y acetilada, hallándose por CGL coincidencia con el alditol acetilado obtenido de un testigo auténtico. Los R_f de los testigos y productos obtenidos son:

	R_f
2,4-di-O-Me-glucosa	0,45
3,4-di-O-Me-glucosa	0,50
<u>89a</u>	0,45

Con esto se confirmó la unión 3 de la ramnosa al ácido glucurónico y las estructuras propuestas en base a los datos espectroscópicos.

ESTUDIO QUIMICO DE WEDELIA GLAUCA (Ort.) Hoffmann ex Hicken

Oberti y col.²¹ estudiaron el extracto no polar de *Wedelia glauca* aislando e identificando ácido kaurénico 9, ácido 15- α -cinamoiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico 15 y una mezcla de estigmasterol 86 y sitosterol 87. Continuando este trabajo se reexaminó el extracto de éter de petróleo, fundamentalmente en cuanto a diterpenos ácidos, y se estudió el extracto metanólico.

Un estudio preliminar realizado por el Lic. Tomás López (INTA Balcarce) y la Dra. Alicia B. Pomilio, empleando ratones, había demostrado que la toxicidad se encontraba en la fracción acuosa, cuando el extracto metanólico se distribuía diferencialmente entre butanol y agua, indicando que los compuestos responsables de la actividad eran muy polares.

Extracción del material vegetal

La planta molida y seca fue extraída en Soxhlet, sucesivamente con éter de petróleo y metanol. Los compuestos aislados e identificados de esta planta provienen de la separación cromatográfica de estos extractos.

ESTUDIO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO DE WEDELIA GLAUCA

El extracto fue cromatografiado en una columna de silicagel con un gradiente creciente de AcOEt en éter de petróleo hasta AcOEt puro. Las sucesivas fracciones, libres o metiladas con diazometano, fueron analizadas por CCD con el objeto de distinguir los distintos ácidos eluidos. Se obtuvieron las

siguientes fracciones, cuya composición se resume a continuación:

- 1 Hidrocarburos
- 2 Acetato de β -amirina 78, ácido kaurénico 9.
- 3 Diterpenos acilados 84 y 85.
- 4 Diterpeno acilado 13
- 5 Componentes polares (esta fracción no fue analizada)

Hidrocarburos

La fracción 1 fue analizada por cromatografía gaseosa en condiciones isotérmicas, encontrándose, por comparación con testigos, hidrocarburos lineales de $C_{22}H_{46}$ a $C_{31}H_{64}$, siendo los más importantes los de 27, 29 y 31 átomos de carbono (parte experimental, pág. 235). La representación gráfica de los logaritmos naturales de los tiempos de retención en función del número de átomos de carbono dio una recta con coeficiente de correlación: 0,9997.

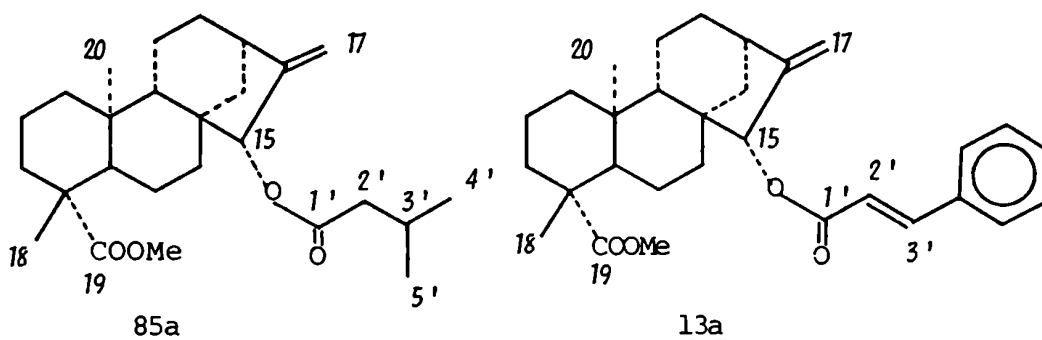
Compuestos terpénicos

De una porción de la fracción 2 pudo aislarse por medio de otra columna de silicagel el acetato de β -amirina 78, identificado por CGL con un testigo auténtico. De la misma fracción se obtuvo ácido kaurénico 9, por recristalización de etanol, el cual fue identificado por CCD y CGL de su éster metílico (9a) contra un testigo auténtico.

La fracción 3 fue metilada con diazometano y los ésteres así producidos purificados por una columna de silicagel.

La mezcla se estudió por CGL comparando con los compuestos

aislados de *W. buphthalmiflora*. Se identificaron los siguientes compuestos: 15- α -isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 84a y 15- α -isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 85a. Como en esta mezcla predominaba el compuesto 85a (95%), se realizó el espectro de ^1H -RMN de la misma (Fig. 66), observándose exclusivamente por su mayor abundancia las señales de este derivado. Los Me-18 y -20 aparecían a 1,16 y 0,83 ppm, mientras el metilo del éster lo hacía a 3,64 ppm y el H-13 a 2,76 ppm, en coincidencia con los otros ésteres ya estudiados. A 0,96 ppm aparecía un doblete que integraba para seis hidrógenos, con $J \sim 7$ Hz, correspondiente a los metilos del grupo isovaleroilo acoplados con el H-3'. Dicho doblete estaba desfigurado parcialmente por ser cada metilo parte de un sistema AB_3 ; la porción B de este sistema es muy sensible a la relación $J/\Delta\nu$, y se deforma cuando ésta vale tan poco como 0,1¹⁵⁰. A 2,20 ppm se encontraba una señal, ausente en el espectro del 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42, que fue asignada a los hidrógenos α al carbonilo del ácido isovalérico. Las señales de los dos H-17 aparecían a 5,07 ppm y el H-15B lo hacía a 5,25 ppm. Estos datos coinciden con los de literatura para este éster¹⁶⁶.



La fracción 4 estaba constituida, entre otros compuestos menores, por el ácido 15- α -cinamoiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico 13, que se identificó como el éster metílico (13a), previa purificación por CC, comparando su espectro de

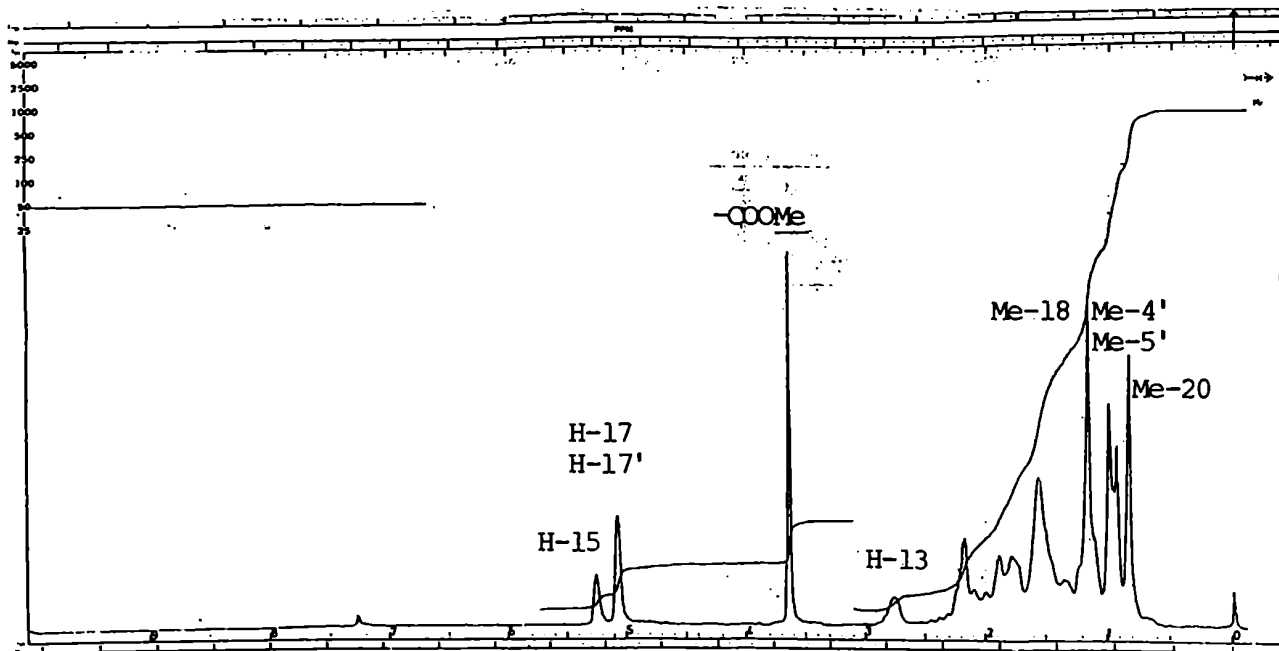


Figura 66: Espectro de ^1H -RMN de 85a en DCCl_3 (100 MHz).

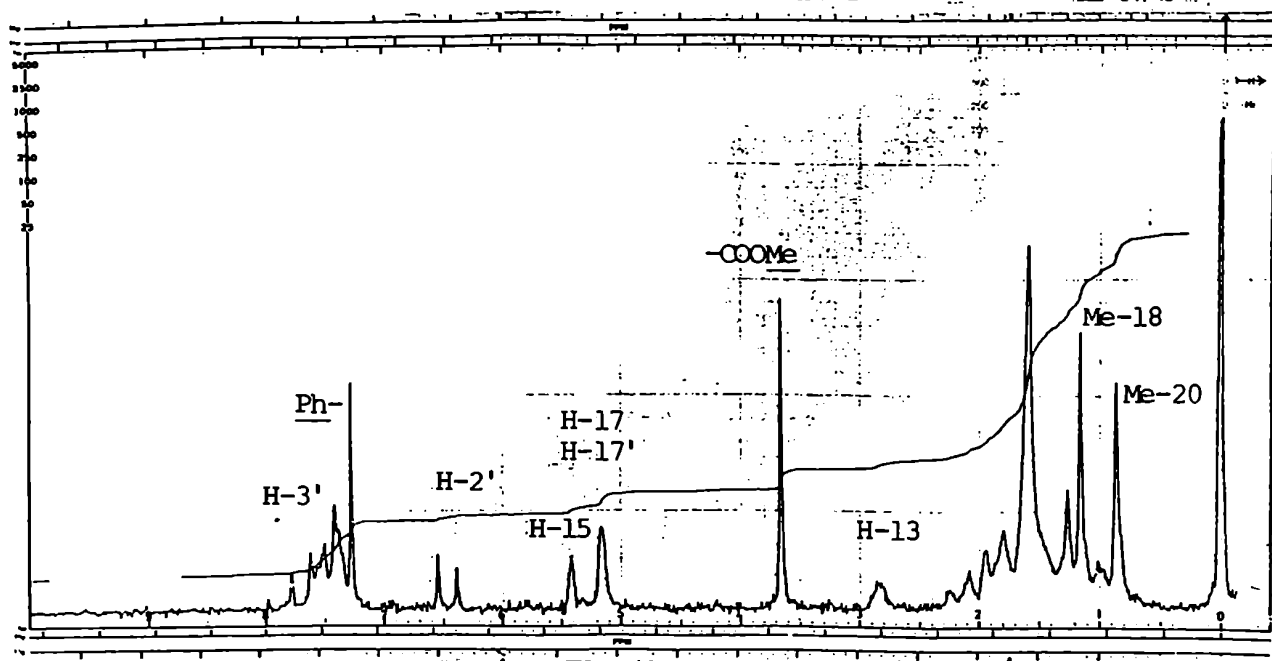


Figura 67: Espectro de ^1H -RMN de 13a en DCCl_3 (100 MHz).

^1H -RMN con el descrito en literatura²¹. Este presentaba las señales del esqueleto del kaurenato de metilo: Me-20 a 0,87 ppm, Me-18 a 1,18 ppm, H-13 a 2,84 ppm, metilo de éster a 3,67 ppm y los hidrógenos del metileno exocíclico a 5,16 ppm como un singulete ancho. A 5,42 ppm aparecía el H-15 β como un singulete ancho por partición alílica con los anteriores. Entre 7,2 y 7,6 ppm se encontraba una señal compleja que integraba para cinco hidrógenos, correspondientes al anillo aromático del ácido cinámico, cuyos hidrógenos olefínicos forman un sistema AB con $J = 15,2$ Hz (dobletes a 6,48 y 7,70 ppm, debidos a los H-2' y 3' respectivamente, el último superpuesto en parte con las señales del núcleo aromático). El valor de esta constante de acoplamiento confirma que los hidrógenos son *trans*, ya que en general el J_{cis} es de ~ 10 Hz.

ESTUDIO DEL EXTRACTO METANOLICO DE W. GLAUCA

Este extracto fue cromatografiado en una columna de silicagel usando un gradiente de cloroformo en metanol desde una relación $\text{HCCl}_3:\text{MeOH}$ 4:1 hasta metanol puro, obteniéndose cinco fracciones. La primera, formada por productos no polares, no se estudió.

La segunda fracción se cromatografió nuevamente, observándose que estaba compuesta por una gran cantidad de sustancias diferentes en pequeña proporción. Sin embargo, en una de las subfracciones, existía un producto muy difícilmente soluble en los diferentes solventes orgánicos ensayados, que, gracias a esta propiedad, pudo ser aislado del resto y al ser recristalizado de etanol, dio una mezcla de sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido 101 y estigmasterol-3-O- β -D-glucopiranosido 102.

La tercera fracción contenía KCl, azúcares, pequeñas cantidades de compuestos terpénicos y fenólicos, todos muy polares.

La cuarta fracción era similar a la anterior, pero además contenía un compuesto terpénico muy polar. Para aislarlo, se pasó esta fracción por una columna de Sephadex LH-20 con metanol como solvente de elución; se eluyeron: azúcares, terpenos menores, compuestos fenólicos acompañados de KCl y finalmente el terpeno polar. Este fue purificado mediante una columna de silicagel, realizando con el eluido una reprecipitación por agregado de KCl en medio acuoso. La sal contaminante se eliminó por pasaje por una columna de Sephadex LH-20 en metanol y finalmente se recristalizó de $\text{EtOH-H}_2\text{O}$, 1:1, para dar atractilósido 59. Los compuestos fenólicos de esta fracción estaban en muy pequeña cantidad, por lo que no pudieron ser estudiados.

La quinta fracción estaba constituida por KCl.

Glucósidos esteroideos

La porción insoluble de la fracción 2 revelaba de color violeta con anisaldehído/ H_2SO_4 , indicando que estaba constituida por terpenos, que por su comportamiento cromatográfico debían ser polares: R_f 0,38 (silicagel, $HCCl_3$ -EtOH-AcOH, 30:3:0,5, dos desarrollos).

Una parte de esta mezcla fue hidrolizada con H_2SO_4 7%, extrayéndose las agliconas a continuación y aislándose los azúcares como se indicara anteriormente (pág. 133). Por CCD de celulosa se encontró únicamente glucosa. Las agliconas fueron analizadas por CGL encontrándose sitosterol 87 y estigmasterol 86 en una relación 1,2:1.

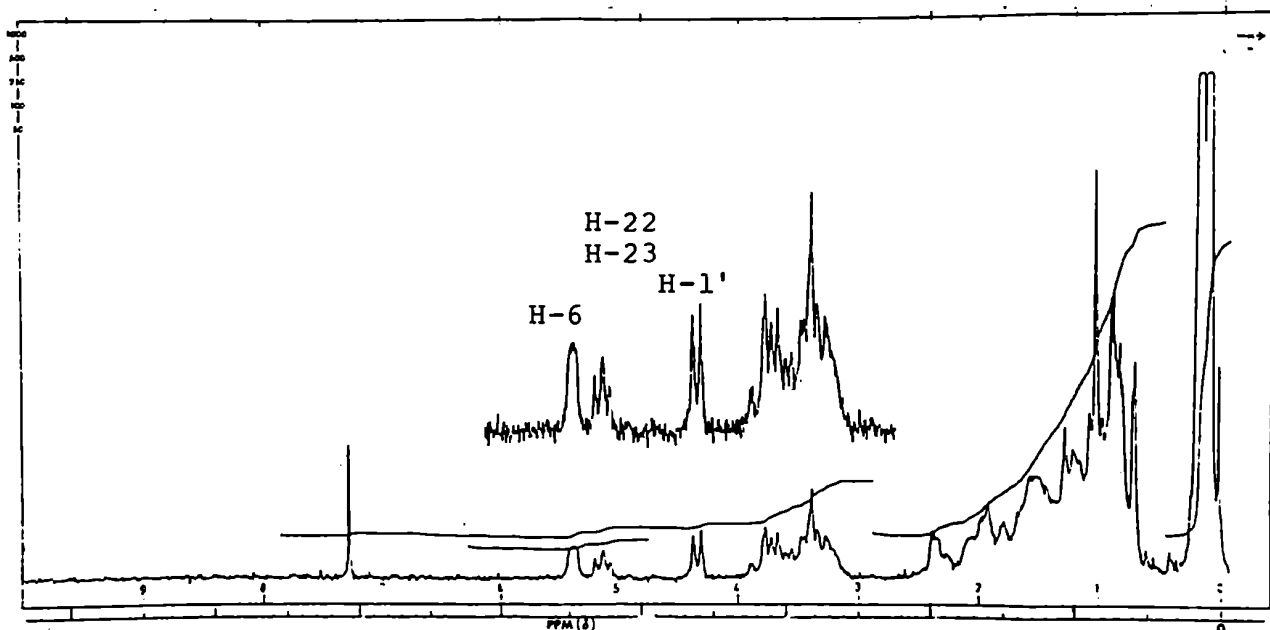


Figura 68: Espectro de 1H -RMN de la mezcla de 101 y 102 trimetilsililados en $DCCl_3$ (100 MHz).

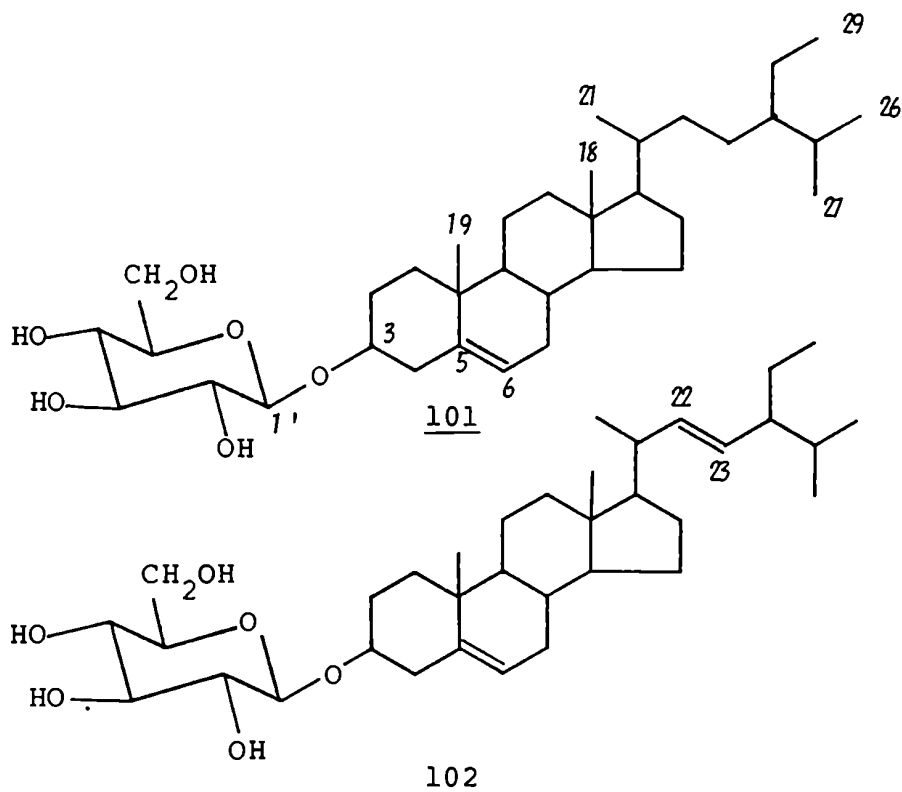
El espectro de ^1H -RMN de la mezcla trimetilsililada (Fig. 68) mostró un doblete que integraba para un hidrógeno con un $J = 7 \text{ Hz}$ a 4,32 ppm, que correspondía al hidrógeno anomérico de la glucopiranososa con configuración β . A 5,3 ppm aparecía un multiplete que integraba para un hidrógeno: el de C-6 de las agliconas. A 5,09 ppm se encontraba un triplete con $J = 7 \text{ Hz}$, correspondiente a los dos hidrógenos del doble enlace 22(23) del estigmasterol¹⁸⁹, que se encuentra en una proporción de $\sim 50\%$ en la mezcla.

La asignación de los metilos resultaba complicada por la superposición de señales, destacándose, sin embargo, los metilos angulares. En la tabla 29 se comparan los espectros de ^1H -RMN a 100 MHz del sitosterol 87, estigmasterol 86 y la mezcla de 101 y 102¹⁸⁸.

Tabla 29: Desplazamientos químicos de los metilos de los esteroides 86 y 87 y de la mezcla de 101 y 102, en ppm (100 MHz).

	<u>87</u>	<u>101+102</u>	<u>86</u>	<u>101+102</u>
18	0,678	0,68	0,704	0,69
19	1,010	1,00	1,021	1,00
21	0,893 0,952	0,78-0,88 0,94	0,997 1,063	1,00 1,05
26 y 27	0,800 0,869	0,78-0,88	0,820 0,885	0,78-0,88
29	0,779 0,846 0,913		0,770 0,835 0,885	

Finalmente se comparó por CCD de silicagel esta mezcla con un testigo auténtico de sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido encontrándose coincidencia de R_f .



La mezcla está formada entonces por sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido 101 y estigmasterol-3-O- β -D-glucopiranosido 102.

Estudio estructural del diterpeno 59

El terpeno polar de la fracción 4 mostró un comportamiento cromatográfico muy distinto al de los glicósidos de *W. buphthalmiflora*. En CCD de silicagel era necesario usar como solvente de elución BuOH-AcOH-H₂O, 30:10:8, (R_F 0,52) o HCCl₃-MeOH-AcOH, 15:10:3 (R_F 0,90), ya que con mezclas de cloroformo y metanol menos polares el compuesto permanecía en el punto de siembra. El hecho de quedar retenido en las columnas de Sephadex LH-20 también indicaba que no era un glicósido simple, pues estos se eluyen prácticamente con el frente

del solvente. Es conocido que en este gel se retienen, por adsorción y/o partición, ácidos, compuestos aromáticos, aminas y conjugados esteroidales sulfatados^{190,191}.

El espectro de masas de 59 (Fig. 69) mostró un ión molecular aparente a m/e 302 con pérdidas de agua, metilo y ácido fórmico, indicando que la aglicona era posiblemente un ácido diterpénico hidroxilado.

La hidrólisis ácida, realizada con H_2SO_4 7% a 100° en tubo cerrado, dio una serie de productos de descomposición y no una aglicona única. El análisis de los azúcares produjo solamente glucosa (CCD de celulosa), no encontrándose azúcares ácidos ni aminoazúcares. Finalizada la hidrólisis, se percibió un fuerte olor a ácido graso de bajo peso molecular, que se extrajo con cloroformo junto con los productos de descomposición de la aglicona y se identificó como ácido isovalérico por comparación con testigos por CGL en una columna de Porapak Q¹⁹², que no requiere derivatización previa. Coincidentemente, en el espectro de masas de 59 se observaban, además de los iones provenientes de la aglicona, dos picos a m/e 85 y 57 correspondientes al ion acilo producido por el ácido isovalérico y a la subsiguiente pérdida de monóxido de carbono respectivamente (Fig. 69).

Como las propiedades de la aglicona y del azúcar no permitían justificar el comportamiento cromatográfico de 59, era evidente que éste se debía a algún grupo que no se había detectado entre los productos de hidrólisis.

Otra porción de 59 fue hidrolizada con HCl 5% a 100° durante 3 hs en tubo cerrado, extrayéndose la aglicona y el ácido isovalérico con cloroformo. En la solución acuosa remanente se determinó la presencia de iones sulfato por precipitación con $BaCl_2$. Paralelamente, en un experimento similar, esta última solución acuosa fue tratada con una resina de intercambio iónico ácida fuerte en forma H^+ para eliminar el potasio.

Por titulación de los grupos sulfato con $BaClO_4$ con torina como indicador¹⁹³, se obtuvo un valor de $10 \pm 1\%$ de S sobre la

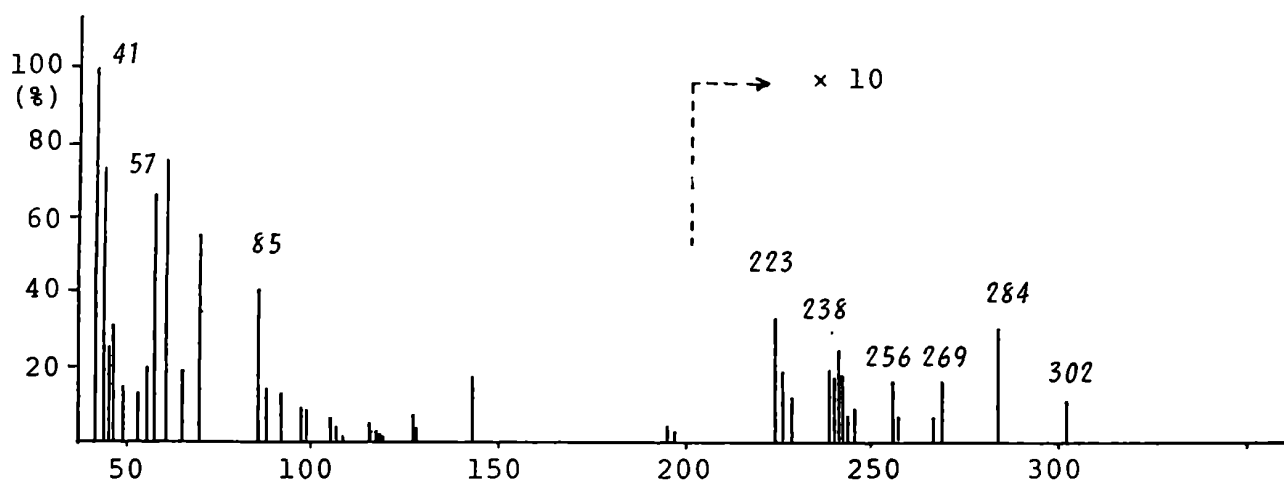


Figura 69: Espectro de masas de 59.

muestra inicial, lo que indicaba la presencia de más de un grupo sulfato por molécula de monoglucósido y explicaba las propiedades cromatográficas de 59. El contraión de los grupos sulfato de la muestra debía ser el potasio ya que ésta se purificó por precipitación con KCl.

El espectro I.R. de 59 (Fig. 70) mostró una banda ancha a 3350 cm^{-1} debida a hidroxilos libres, una absorción a 1710 cm^{-1} , típica de carbonilo de ácido, bandas a 1640 y 910 cm^{-1} , de doble enlace, tensión C-O a 1050 y 1000 cm^{-1} , una banda a 1250 cm^{-1} adjudicable a la tensión S=O y otra muy fuerte a 810 cm^{-1} correspondiente a la tensión C-O-S¹⁹⁵.

La hidrólisis de 59 en medio fuertemente alcalino (KOH 20%) liberó una aglicona única que fue extraída con acetato de etilo, previa acidificación en frío. El espectro de masas de la aglicona (Fig. 72) dio un M^+ 320 acompañado por iones correspondientes a las pérdidas de una y dos moléculas de agua y también de ácido fórmico, lo que indicaba que poseía dos grupos hidroxilo y un grupo ácido. La fórmula molecular más probable que se ajusta a estos datos es $C_{19}H_{28}O_4$ que posee seis insaturaciones.

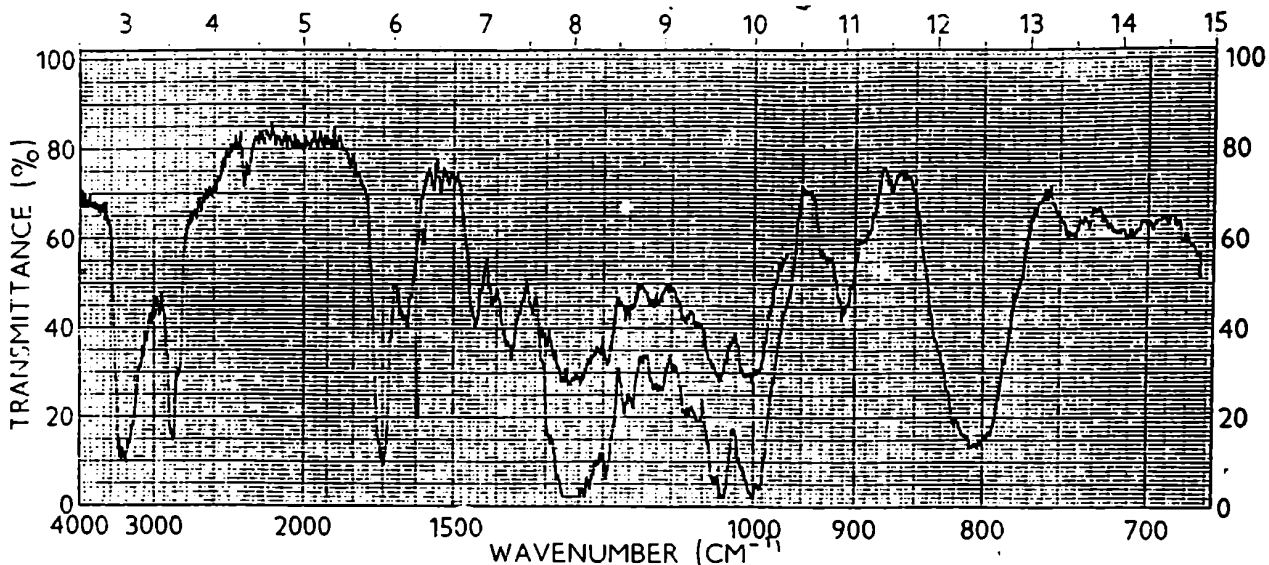
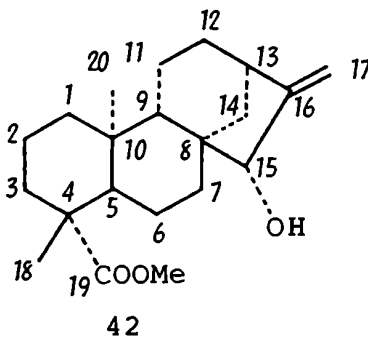


Figura 70: Espectro infrarrojo de 59, en pastilla de KBr.

El espectro de $^1\text{H-RMN}$ de 59 en DMSO-d_6 (Fig. 71), mostró dos singuletes anchos a 4,90 y 5,10 ppm correspondientes a los hidrógenos de un grupo metileno exocíclico, muy parecidas en su desplazamiento químico y en su forma a los producidos por los hidrógenos de C-17 del 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42.



En 0,90 ppm se encontraba un doblete ($J = 6 \text{ Hz}$) originado por un grupo isopropilo de una unidad de ácido isovalérico, junto con el cual aparecía un singulete a 0,93 ppm

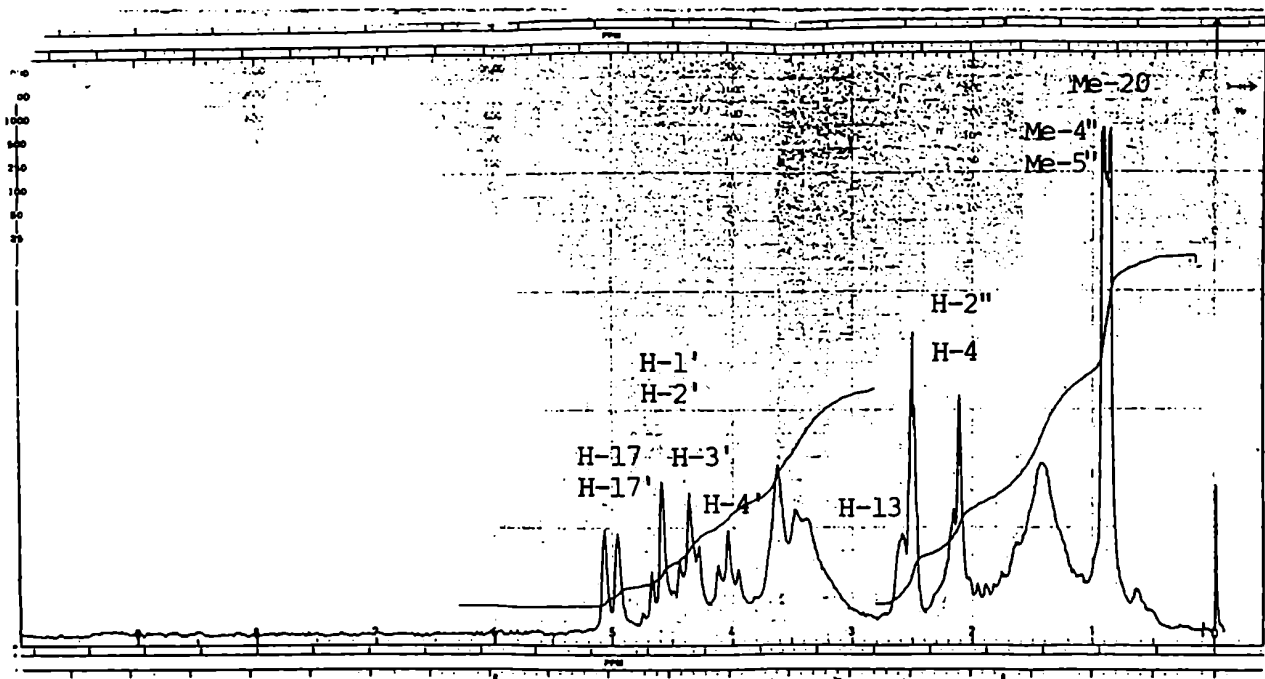


Figura 71: Espectro de ^1H -RMN de 59 en DMSO-d_6 (100 MHz).

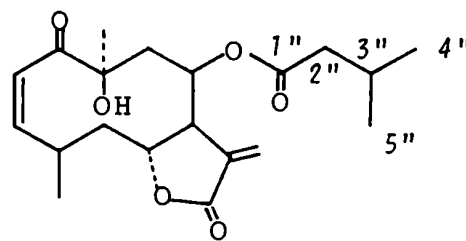
correspondiente a un grupo metilo. Se observaba también un multiplete adosado al pico del solvente a 2,58 ppm, característico del H-13 del esqueleto del kaureno, el cual, junto con la presencia de un ión a m/e 262 (M-58) en el espectro de masas de la aglicona, similar al intenso M-58 de 42, sugería que el compuesto 59 podía ser un glicósido acilado y sulfatado de un derivado del kaureno hidroxilado en C-15 y en alguna otra posición.

Sin embargo, el hecho de que la fórmula molecular de la aglicona contuviera 19 carbonos, y que en el espectro de ^1H -RMN de 59 no se observara la señal de uno de los metilos de este esqueleto indicaba que podría tratarse de un derivado de un norkaureno. La señal ausente en el espectro de ^1H -RMN correspondía al Me-18, generalmente a 1,20 ppm; hecho confirmado porque en el espectro de masas de la aglicona no se encontraba un ion a m/e 87 que aparece en los compuestos con metilo

y carboxilo sobre C-4 de derivados del kaureno⁵⁰. Coincidentemente, en el espectro de ¹H-RMN de 59 aparecía una señal compleja entre 2,1 y 2,3 ppm, que integraba para tres hidrógenos aproximadamente, que correspondía al metileno α al carboxilo del ácido isovalérico y al H-4 de la aglicona. Como la señal del Me-20 se hallaba a 0,93 ppm se dedujo que el grupo carboxilo de C-4 se encontraba en posición axial³⁴.

El espectro de ¹³C-RMN de 59 fue realizado en solución acuosa y se muestra en la tabla 30. Mostraba dos señales a 180,4 y 175,6 ppm correspondientes a los grupos carbonilo de la aglicona y de una sola unidad de ácido isovalérico, cuyas restantes señales fueron asignadas por comparación con datos de literatura¹⁶¹ para el sesquiterpeno 103:

	(ppm)	
	<u>103</u>	<u>59</u>
1"	171,3	175,6
2"	43,0	44,0 (o 42,9)
3"	25,4	25,7 (o 26,0)
4"	22,2	22,7
5"	22,2	22,8



103

A 99,4 ppm se encontraba la señal del carbono anomérico de una sola unidad de glucosa, confirmada por la presencia de una única señal a 61,5 ppm debida al C-6'. Descontadas las del ácido y las de la glucosa, quedaban en el espectro 19 señales, que confirmaban la fórmula obtenida de los datos del espectro de masas de la aglicona. La molécula poseía un único doble enlace, cuyas señales eran típicas de un esqueleto de kaureno 21: 159,8 y 109,2 ppm, que, junto a la existencia de un solo grupo carbonilo en la aglicona y la fórmula $C_{19}H_{28}O_4$ con seis insaturaciones, indicó que esta era tetracíclica.

Comparando el espectro de ¹³C-RMN de 59 con el del 15-α-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42, se encontró una muy buena coincidencia para las señales de los carbonos de los anillos C y D, lo que confirmó la estructura parcial que

Tabla 30: Desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos 42, 59, 60, 67 y 68, en ppm.

	<u>60</u> [#]	<u>68</u> [#]	<u>67</u> [#]	<u>59</u> ⁺	<u>42</u> [#]
1	50,6	48,3	48,1	47,3	40,9
2	63,8	72,4	72,8	72,9	19,6
3	39,0	35,4	35,5	34,6*	38,3
4	44,7		-	44,0	44,0
5	49,5		49,6	49,2	57,1
6	26,5		26,4	26,0	21,7
7	35,8		35,9	35,4*	36,6*
8	48,2		48,1	48,1	48,2
9	53,5		53,3	52,9	54,0
10	41,0		40,9	41,1	39,9
11	18,6		18,4	18,7	18,7
12	32,9		32,7	32,9	33,1
13	42,7		42,7	42,9	42,8
14	36,7		36,6	36,6	36,2*
15	82,5		82,5	83,2	82,6
16	160,7		160,6	159,8	161,1
17	107,7		107,7	109,2	107,8
18	-		-	-	28,7
19	177,6		178,4	180,4	177,7
20	17,2		17,0	16,8	15,9
1'		102,9	100,3	99,4	
2'		75,3	76,8	74,9	
3'		78,6	75,0	79,5	
4'		71,7	71,8	75,3	
5'		78,1	78,2	75,3	
6'		62,1	62,3	61,5	
1"			171,8	175,6	
2"			43,7	44,0	
3"			25,6	25,7	
4"			22,8	22,7**	
5"			22,8	22,8**	

*,** Las asignaciones pueden intercambiarse.

en piridina deuterada.

+ en agua deuterada.

se evidenciaba en el espectro de ^1H -RMN (Tabla 31).

Tabla 31: Desplazamiento químico de los carbonos de los anillos C y D de 59 y 42 (en ppm).

	<u>42</u>	<u>59</u>
8	48,1	48,2 (o 47,3)
9	54,0	52,9
11	18,7	18,7
12	33,1	32,9
13	42,8	42,9 (o 44,0)
14	36,2	36,6
15	82,6	83,2
16	161,1	159,8
17	107,8	109,2

Además, se pudo deducir que el hidroxilo 15 no estaba ni glicosidado ni sulfatado, ya que en estos casos debería aparecer a ~ 8 ppm a campos más bajos¹⁹⁵. Tampoco estaba acilado, ya que de ser así, la señal del H-15 debería encontrarse en el espectro de ^1H -RMN a $\sim 5,30$ ppm, como en el 15- α -isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 85a ya estudiado.

Estos grupos sulfato y acilo debían entonces estar unidos a los hidroxilos de la glucosa que a su vez estaba unida por un enlace glicosídico al otro hidroxilo de la aglicona.

Para un compuesto de estas características, la presencia de dos grupos sulfato (de potasio) daba un valor de 7,89% de S, valor bastante cercano al experimental ($10 \pm 1\%$); aunque no podía descartarse la presencia de tres de ellos. Como en el espectro de ^{13}C -RMN de 59 la señal del C-6' de la glucosa se encontraba a 61,5 ppm, prácticamente como en el metil- β -D-glucopiranosido, se dedujo que esta posición estaba libre y que entonces debían hallarse dos grupos sulfato y un isovaleroilo esterificando los hidroxilos 2', 3' y 4' de la glucosa.

Con el fin de determinar su posición, se tomó como base el espectro del metil- β -D-glucopiranosido, y se calcularon los valores de desplazamiento químico para las tres posiciones posibles aplicando los corrimientos por acilación ($\nu +2$ ppm en C- α y $\nu -2$ ppm en C- β) y los de sulfatación en distintas posiciones estudiados por Archbald y Fenn¹⁹⁵ (Tablas 32 y 33).

Tabla 32: Variación en el desplazamiento químico de los carbonos de la β -D-glucosa por sulfatación, en D₂O (en ppm).

	$(\delta_C)_{\text{sulf}} - (\delta_C)_{\text{az}}$					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-glucosa-2-sulfato	-1,44	+7,24	-1,31	-0,14	-0,06	-0,16
β -D-glucosa-3-sulfato	-0,28	-1,29	+8,52	-1,34	-0,54	-0,11
β -D-glucosa-4-sulfato	-0,12	-0,20	-1,51	+7,08	-1,60	-0,22
β -D-glucosa-6-sulfato	+0,09	-0,13	-0,19	-0,38	-2,7	+6,36

Tabla 33: Desplazamiento químico de los carbonos de las tres combinaciones posibles de dos grupos sulfato y un acilo unidos al metil- β -D-glucopiranosido (en ppm).

	Me- β -D-glup. #	3,4-sulfato 2-acilo	2,3-sulfato 4-acilo	2,4-sulfato 3-acilo
1'	104,3	102,3	102,9	102,9
2'	74,2	74,9	80,1	79,4
3'	76,9	81,9	82,1	76,1
4'	70,8	76,6	71,5	75,9
5'	76,9	75,3	74,9	75,3
6'	61,9	61,9	61,9	61,9

Señales de 59 a asignar: 99,4, 79,5, 75,3, 75,3, 74,9, 72,9, 61,5

En D₂O

Una α -glucopiranososa es muy poco probable en los compuestos naturales, y los valores de desplazamiento químico que se podrían obtener por sulfatación y acilación serían demasiado bajos, como se expondrá después.

Se pudo asignar fácilmente el C-6' que en ningún caso sufre modificaciones, y el carbono anomérico que aparece a campos más altos que los calculados por la influencia de la aglicona. La combinación que lleva sulfatos en C-2' y 3' se pudo descartar ya que posee dos señales a campos bajos (80,1 y 82,1 ppm) que no se encuentran en el espectro de 59. Las otras dos eran en principio compatibles con los datos experimentales, dentro del error de las aproximaciones realizadas, pero en ninguna de ellas se encontraba una señal a campos tan altos como 72,9 ppm, lo que indicó que era ésta la señal del carbono de la aglicona que llevaba el segundo grupo hidroxilo.

Las señales de la aglicona sin asignar eran entonces:

	<u>42</u>	<u>59</u> (sin asignar)
1	40,9	180,4
2	19,6	72,9
3	38,3	49,2
4	44,0	47,3
5	57,1	44,0
		41,1
6	21,7	35,4
7	36,6	34,6
		26,0
10	39,9	16,8
18	28,7	
19	177,7	
20	15,9	

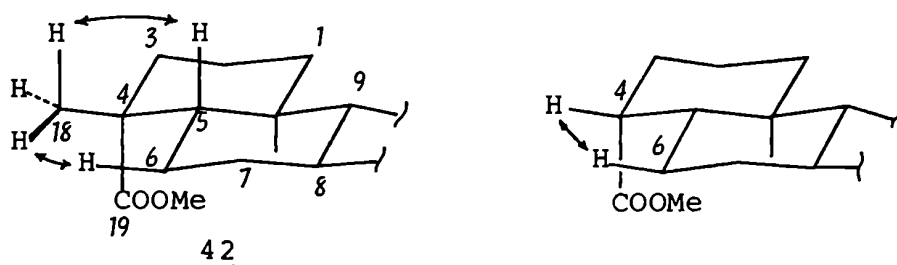
Se asignaron fácilmente las señales a 180,4 ppm al C-19 y la señal a 16,8 ppm al C-20, ya que, como se ha visto, éste último estaba presente en la molécula porque se observaba su señal en el espectro de ^1H -RMN. Llamó poderosamente la atención que no se encontraba ninguna señal que pudiera corresponder al C-2 de 42 y, como éste no podía ser modificado por

la desaparición del metilo de C-4, se llegó a la conclusión que la glucosa se encontraba unida a él o a uno de sus carbonos vecinos.

Se pudieron asignar entonces con facilidad los carbonos del anillo B, teniendo en cuenta los efectos producidos por la desaparición del Me-18:

	<u>42</u>	<u>59</u> (calc.)	<u>59</u>
5	57,1	50,2	49,2
6	21,7	26,7	26,0
7	36,6	36,6	35,4

La eliminación del Me-18 hace desaparecer una interacción HC (pág. 23) entre sus hidrógenos y el H-5, protegiéndose el C-5 en ~ 5 ppm; desaparece también una interacción del tipo CC (pág. 24) entre C-18 y C-6, con protección adicional del C-5 de $\sim 1,85$ ppm. La aparición del H-4 ecuatorial introduce una nueva interacción HC con el H-6 ecuatorial y por lo tanto el C-6 se desprotege en ~ 5 ppm respecto al modelo. El C-7 no sufre cambios apreciables.



La asignación de las señales de los carbonos del anillo A se pudo realizar teniendo en cuenta los efectos de la hidroxilación⁴⁴ y de la glicosidación⁹² (págs. 32 y 62), tablas 9 y 11, que se presentan nuevamente en forma resumida:

Tabla 9: Desplazamientos producidos por la hidroxilación en anillos de seis miembros, en ppm.

	HO-ecuatorial	HO-axial
C- α	+43	+38
C- β	+8	+5
C- γ	-1,1	-6 a -7

Tabla 11: Desplazamientos producidos por la glucosidación de un alcohol secundario, en ppm.

Aglicona sustituida en:	C- α	C- β <i>sin</i>	C- β <i>anti</i>
C- β <i>sin</i>	+5,5	-2,2 (CH) -0,5 (C)	-5,1
sin sust. en C- β	+7,2	-2,2	-4,0
C- β <i>anti</i>	+10,4	-1,7	-1,3 (CH) 0 (C)

La glicosidación del C-1 de la aglicona, tanto en posición ecuatorial como axial se descartó inmediatamente ya que su desplazamiento químico se elevaría a 94,3 o 84,4 ppm por aplicación de las modificaciones correspondientes, lo que se alejaba mucho del valor de 72,9 ppm para 59. Se asignó entonces directamente la señal de 41,1 ppm al C-10 ya que la glicosidación en C-2 no lo afectaría mayormente.

Restaban por asignar (pág. 184) solamente los carbonos 1, 2, 3 y 4 del anillo A. Para ello se tomaron como base los valores de 42, se consideró el efecto de la eliminación del Me-18 sobre C-3 y C-4 y se calcularon los desplazamientos químicos que corresponderían a las glucosidaciones en C-2 y C-3, en posiciones ecuatorial y axial (Tabla 34).

La eliminación del Me-18 trae como consecuencia la

desaparición de dos interacciones HC con los dos hidrógenos de C-3, protegiéndose éste en $\sim 8,9$ ppm¹⁷⁷. El C-4 cambia de cuaternario a terciario (variación del desplazamiento químico: $\sim -2,3$ ppm, pág. 24), tiene una nueva interacción HC entre el H-4 e H-6 (desprotegiéndose en $\sim +5$ ppm) y se protege en $\sim 1,85$ ppm por eliminación de la interacción CC entre C-18 y C-6 ya descripta.

Tabla 34: Desplazamientos químicos calculados para la glucosidación en C-2 y C-3 del 15- α -hidroxi-18-norkaurenato de metilo (en ppm).

	<u>42</u> ⁴⁵	18-nor- <u>42</u>	<u>2 ec.</u>	<u>2 ax.</u>	<u>3 ec.</u>	<u>3 ax.</u>	<u>59</u>
1	40,9	40,9	46,7	41,9	39,6	35,9	47,3
2	19,6	19,6	69,8	64,8	22,5	22,9	72,9
3	38,3	29,4	33,4	32,2	77,9	77,8	34,6
4	44,0	44,8	43,5	44,8	52,3	49,8	44,0
5	57,1	50,2	50,2	50,2	48,9	45,0	49,2

Las posiciones de glucosidación 3 ecuatorial y 3 axial se descartaron porque en este caso el desplazamiento químico del C-2 sería muy bajo, el de C-3 demasiado alto y, además, la glucosidación en posición 3 axial da un valor de 45,0 ppm para el C-5 al eliminar una interacción HC entre H-3 β e H-5.

La posición 2 ecuatorial se ajusta con notable precisión a los valores experimentales, mientras que en 2 axial difieren tanto el valor de C-2 como el de C-1, que son demasiado pequeños.

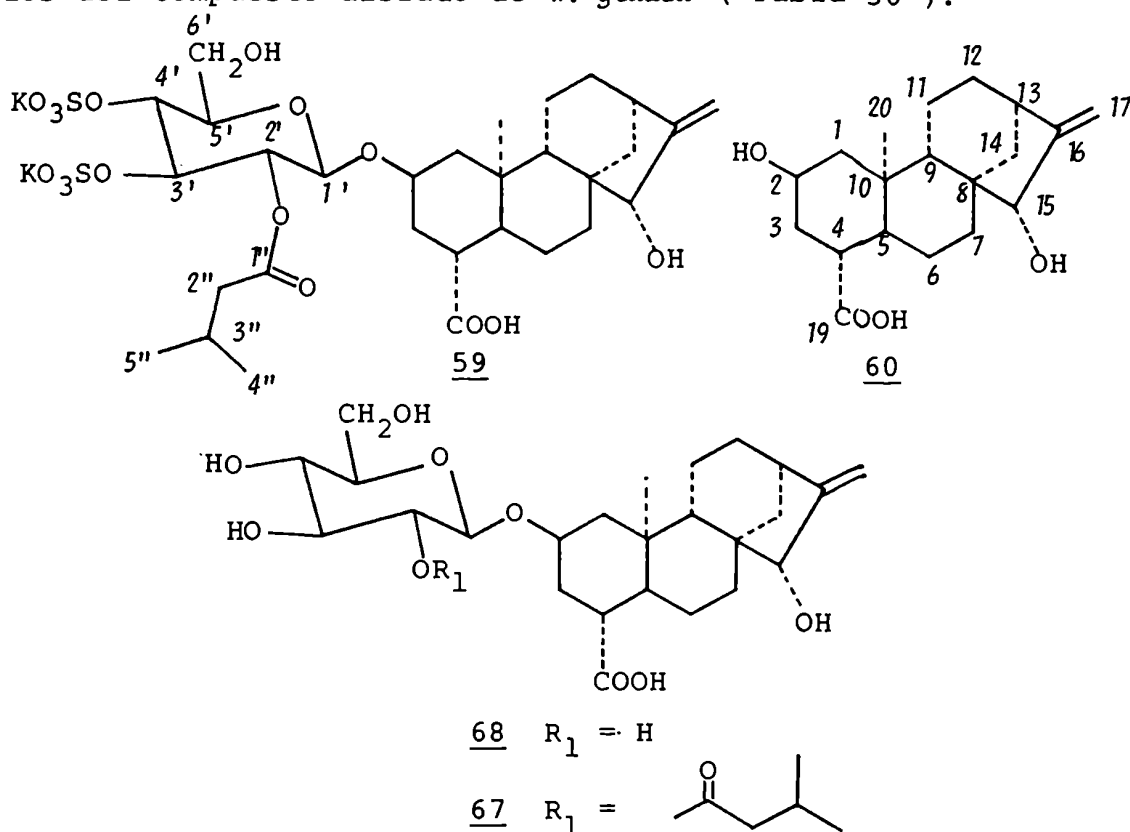
La posición 2 se ve confirmada por el desplazamiento químico del carbono anomérico de la glucosa: Seo y Tomita predicen que si éste está unido a una aglicona sin sustituyentes sobre los C- β , el carbono anomérico se protegerá en 2,6 ppm respecto al metilglicósido (Tabla 11 de la pág. 62), lo que

lleva el valor calculado anteriormente en la tabla 33 a 99,7-100,3 ppm, muy cercano al valor experimental de 99,4 ppm.

Puede descartarse la configuración α para el carbono anomérico pues su señal debería aparecer a 95,7 ppm.

La búsqueda bibliográfica reveló que un compuesto con la estructura propuesta para la aglicona de 59 era conocido con el nombre de atractiligenina 60¹¹⁹, y que era la aglicona del glicósido sulfatado y acilado llamado atractilósido 59^{120,121}.

Sin embargo, no se encuentra en literatura el análisis por métodos espectroscópicos ($^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$), puesto que la estructura de 59 fue determinada fundamentalmente por métodos químicos (pág. 71). Se habían determinado, en cambio, los espectros de $^{13}\text{C-RMN}$ de la aglicona 60 y el del derivado 67, coincidiendo los valores para los carbonos de la aglicona con los del compuesto aislado de *W. glauca* (Tabla 30).



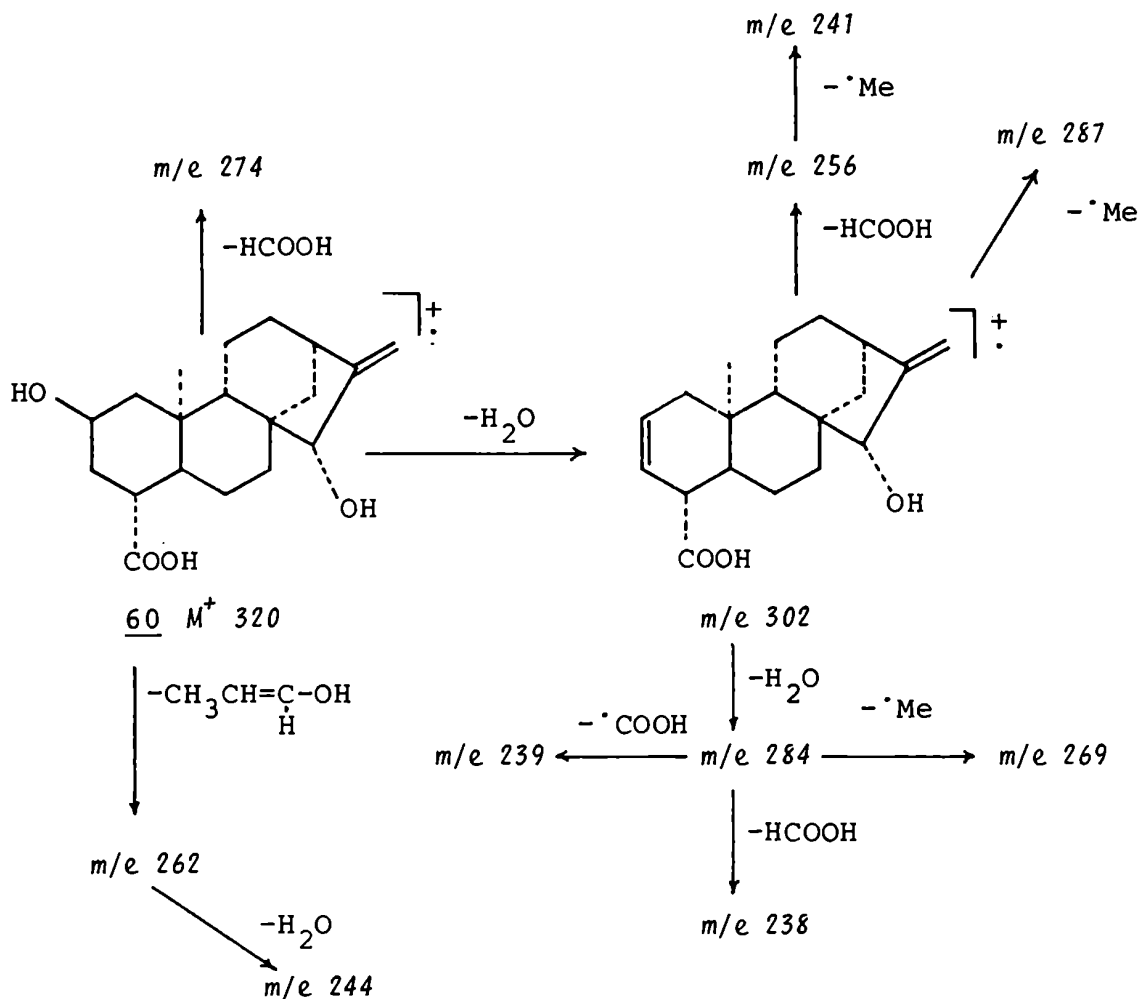
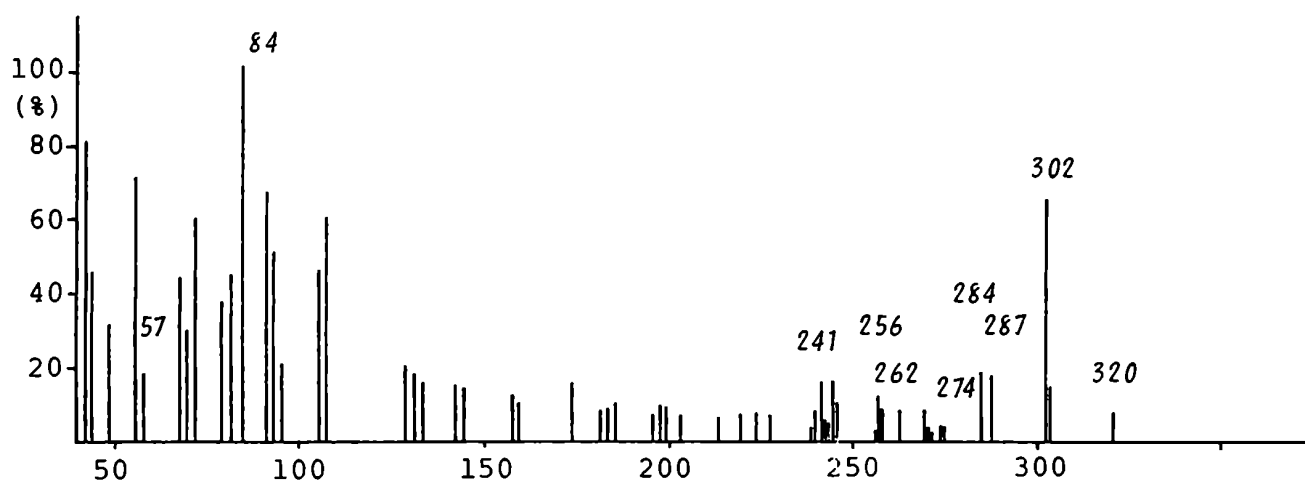


Figura 72: Espectro de masas y fragmentaciones de 60.

La aglicona resultó idéntica a un testigo auténtico de 60 por CCD del ácido, CCD y CGL en columnas OV-101 y OV-17 de los derivados metilados y metilados y acetilados. El espectro de masas de los ácidos libres fue también coincidente; las fragmentaciones probables se esquematizan en la figura 72.

El esquema de fragmentaciones se propone en base a las ya vistas para los ácidos diterpénicos; la estructura del ión a m/e 302 es similar a la indicada por Defaye¹³² para el derivado metilado y acetilado.

La aparición en el E.M. de 59 (Fig. 69) de un ión molecular aparente a m/e 302 se explica como una ruptura del enlace oxígeno glicosídico/C-2 con transferencia de hidrógeno hacia el azúcar.

Para determinar las posiciones de sulfatación y acilación en la glucosa se comparó 59 con un testigo auténtico de atractilósido, encontrándose coincidencia por CCD de sílica-gel, I.R., ¹H-RMN y ¹³C-RMN.

Es de destacar que la banda de tensión C-O-S en el I.R. aparece en distintas posiciones de acuerdo a la sustitución en el azúcar, pero no siempre es posible usar este criterio para determinarla¹⁹⁴. En el caso de 59, la posición exacta de la banda (810 cm⁻¹) está de acuerdo con los compuestos modelo de la tabla 35¹⁹⁵.

Tabla 35: Absorción en el I.R. de la vibración C-O-S de sulfatos de glucosa.

	cm ⁻¹
D-glucosa-2-sulfato	822
D-glucosa-3-sulfato	814
D-glucosa-4-sulfato	817
D-glucosa-6-sulfato	823 (hombro a 800 cm ⁻¹)

El espectro de ¹H-RMN de 59 no fue descrito en literatura y presenta gran complejidad en la zona correspondiente

a los hidrógenos base de alcoholes; sin embargo pueden distinguirse cuatro zonas que aparecen a campos ligeramente más altos que en los compuestos originales posiblemente por la influencia del solvente (DMSO). A 3,60 ppm se encuentra una señal ancha, parcialmente superpuesta con el agua, que está constituida por el H-15 β de la aglicona (originalmente a 3,86 ppm) y las señales de los hidrógenos 5' y 6' de la glucosa que se encuentran a 3,87 y 3,83 ppm en el espectro de la sacarosa a 400 MHz¹⁹⁷. En 4,05 aparece un triplete ($J \sim 8$ Hz) que correspondería a la señal del H-4', geminal a uno de los grupos sulfato, que oculta a la del H-2 de la aglicona, que en 60 se halla como un triplete de tripletes a 4,25 ppm con $J = 4$ y 10 Hz^{118,119}.

Harris y Turvey estudiaron el efecto de un grupo sulfato sobre la señal del hidrógeno geminal y vecinal¹⁹⁶, encontrando además que la conformación del anillo piranósico no cambia por esta sustitución, generalmente C1 para los azúcares comunes (Tabla 36).

Tabla 36: Efecto de los grupos sulfato sobre la señal de un protón (en ppm).

	<u>por:</u>	<u>sumar:</u>
<u>Sobre H axial:</u>		
	sulfato geminal (ec)	+0,60
	sulfato geminal (ec)	
	^y sulfato vecinal	+0,75
	sulfato vecinal (ec)	+0,18
<u>Sobre H ecuatorial:</u>		
	sulfato geminal (ax)	+0,60-0,70
	sulfato vecinal (ec)	+0,20
	sulfato vecinal (ec)	
	^y sulfato vecinal en 3	+0,30

Tomando como base un valor de 3,5 ppm para el H-4' de la glucosa¹⁹⁷ y aplicando los desplazamientos de la tabla 36 se calculó el valor del desplazamiento químico de este hidrógeno resultando ser 4,25 ppm.

A 4,42 ppm se encuentra otra señal con forma de triplete ($J \sim 8$ Hz) que podría corresponder al H-3', originalmente a 3,8 ppm en la glucosa¹⁹⁷ desplazado a 4,55 ppm por los grupos sulfato de C-3' y C-4'.

La señal del hidrógeno anomérico, que se encuentra como un doblete con $J = 8$ Hz a 4,68 ppm en isovaleroilatractilina acetilada (derivado acetilado de 67) (220 MHz)¹²¹, y la del H-2', en el mismo compuesto a 4,99 ppm (triplete, $J = 8$ y 9,6 Hz) ligeramente desplazado a campos bajos por el sulfato vecino de C-3', constituyen el último grupo de señales a 4,5-4,7 ppm.

El espectro de ¹³C-RMN de 59 tampoco fue publicado, pero su asignación pudo hacerse como ya se describió en base a 42 y se confirmó con los espectros de atractiligenina 60, atractilina 68 e isovaleroilatractilina 67^{130,211} (Tabla 30).

La asignación final de las señales de los carbonos de la glucosa no se hizo por aplicación de los corrimientos por sulfatación de la tabla 32 al compuesto 67, porque el espectro de este último se realizó en piridina deuterada y el de 59 en agua; ya se mencionó anteriormente que este cambio de solvente produce considerables variaciones en el espectro del metil- β -D-glucopiranosido. Se tomó como base entonces el espectro de este último en D₂O y se le aplicaron los desplazamientos por sulfatación y los corrimientos producidos por acilación al comparar 67 con 68 (Tabla 30) y se agregó el efecto por el cambio del metilo por atractiligenina 60, calculado por diferencia entre la señal del carbono anomérico en 68 y en el metil- β -D-glucopiranosido (ambos en piridina). En la tabla 37 se comparan los desplazamientos químicos calculados con los observados; las mayores diferencias ocurren en los carbonos que

llevan los grupos sulfatos, que son los que tienen las variaciones más grandes.

Tabla 37: Desplazamientos químicos calculados para los carbonos de la glucosa de 59, en ppm.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Me- β -D-glup	104,3	74,2	76,9	70,8	76,9	61,9
Cambio de Me por <u>60</u>	-2,5					
Acilación en 2	-2,6	+1,5	-3,6			
Sulfato en 3		-1,3	+8,5	-1,3		
Sulfato en 4			-1,5	+7,1	-1,6	
Valor calculado	99,2	74,4	80,3	76,6	75,3	61,9
<u>59</u>	99,4	74,9*	79,5	75,3	75,3*	61,5

* Las asignaciones pueden intercambiarse.

La identidad de 59 se confirmó comparando los productos de desulfatación obtenidos a partir del glicósido de *W. glauca* y de una muestra auténtica de atractilósido. La reacción se llevó a cabo con HCl 1% en metanol durante 24 hs a temperatura ambiente, se diluyó con agua y se extrajo el producto con acetato de etilo, resultando ambos productos idénticos por CCD (silicagel, HCCl_3 -MeOH, 10:1, dos desarrollos, R_f 0,28)¹²⁰ (Fig. 73).

Para determinar el contenido de atractilósido 59 en *W. glauca* se realizó su aislamiento directo, sin recurrir a columnas de silicagel, que podrían ocasionar pérdidas dada la polaridad del compuesto. Se hizo uso de las dos propiedades mencionadas hasta ahora: la solubilidad en agua y el hecho de quedar retenido en las columnas de Sephadex LH-20, empleándose el esquema separativo de la figura 74.

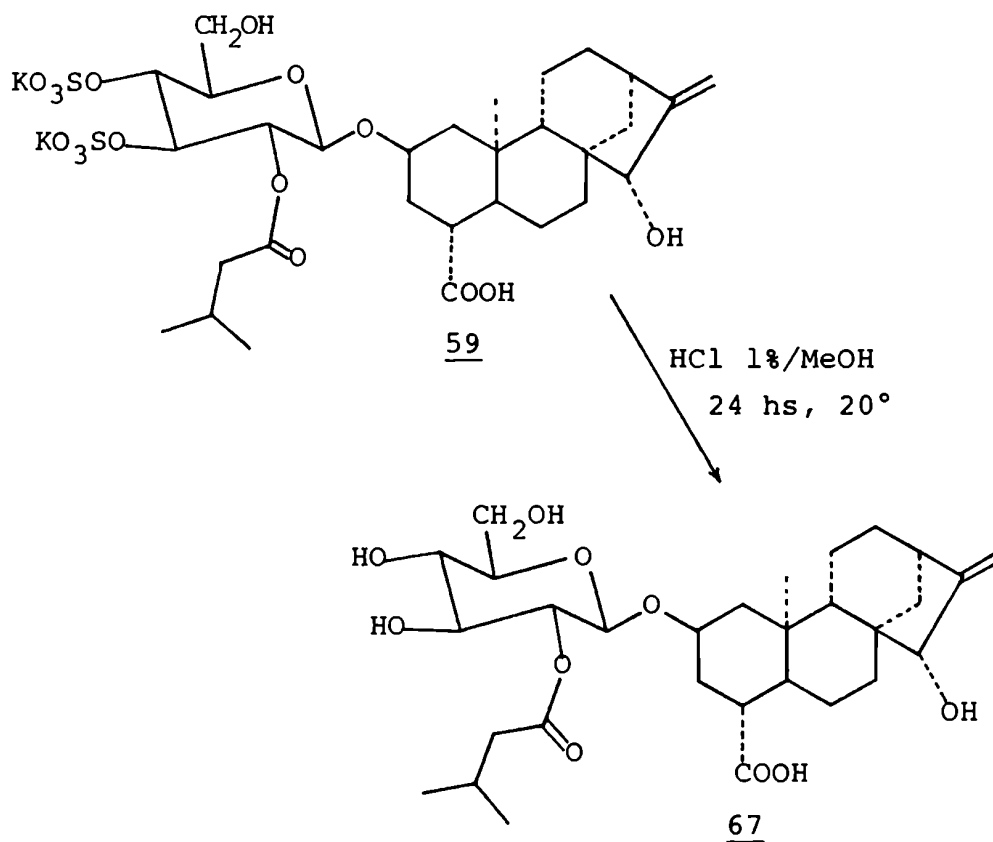


Figura 73: Desulfatación de 59

El extracto metanólico de *W. glauca* fue distribuido diferencialmente entre butanol y agua, la fase orgánica fue extraída nuevamente con agua y el líquido de lavado reunido con la primera fase acuosa. Esta fue evaporada con butanol a presión reducida y el residuo tomado con metanol dos veces para separar el atractilósido del KCl. La solución metanólica fue pasada por una columna de Sephadex LH-20 utilizando metanol como eluyente; las últimas fracciones eluidas contienen todo el atractilósido de la muestra. Se determinó así que el contenido de 59 en *W. glauca* era 1,3 g/kg de planta seca.

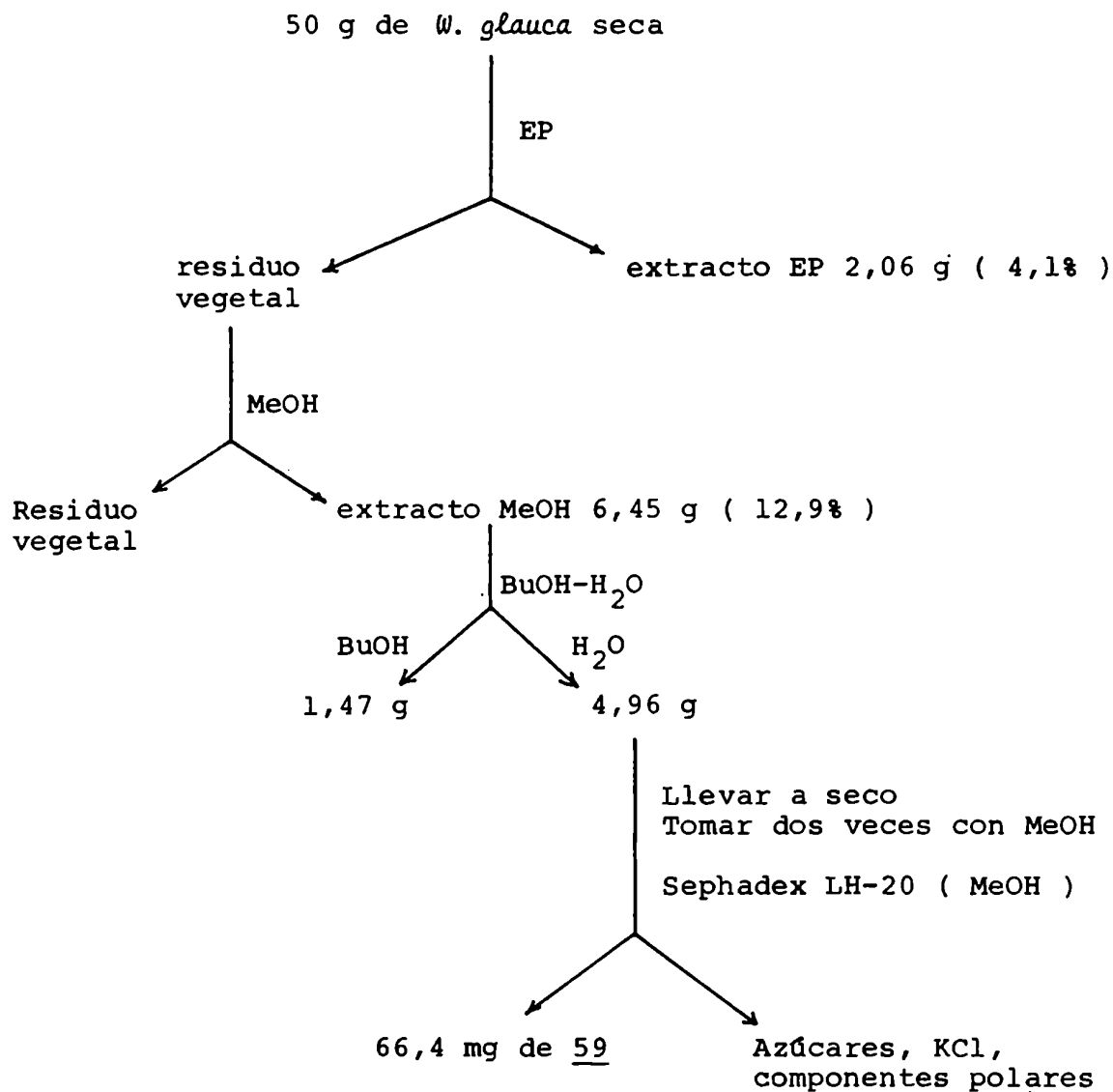


Figura 74: Aislamiento directo de 59.

IMPORTANCIA QUIMIOTAXONÓMICA DE LOS COMPONENTES DE
WEDELIA BUPHTHALMIFLORA Y W. GLAUCA

El ácido kaurénico 9 ha sido aislado de fuentes muy diferentes, como la familia *Euphorbiaceae*, el hongo *Gibberella fujikuroi*²⁷ y fundamentalmente la familia *Compositae*, donde está difundido. El ácido grandiflorénico 10 se encuentra también en las Compuestas, generalmente acompañando al ácido kaurénico, habiendo sido aislado por primera vez de dos especies del género *Espeletia* (*Compositae*, tribu *Heliantheae*, subtribu *Melampodiinae*)^{36,154}. Los ésteres del ácido 15- α -hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oico se encuentran en las Compuestas exclusivamente. Se hallan en la tribu *Heliantheae*, en las subtribus *Melampodiinae*¹⁹⁹, *Ecliptinae*^{13, 166}, *Verbesininae*⁴¹ y *Helianthinae*²⁰⁰, pero no en las otras subtribus estudiadas. Sin embargo no se circunscriben a la tribu *Heliantheae*, sino que han aparecido en la tribu *Eupatorieae*: el éster con el ácido isobutírico fue aislado de *Campovassouria bupleurifolia*²⁰¹ y de *Mikania cordata*²⁰² y el éster con el ácido angélico se encontró en *Goyazianthus tetrastichus*²⁰³.

Dado que hasta el momento sólo se han informado estos tres casos, es necesario estudiar más especies de ambas tribus para determinar su parentesco, insinuado también por otra clase de compuestos aislados de especies incluidas en las mismas²⁰⁴.

Es destacable la ausencia de ácido grandiflorénico en *Wedelia glauca*, abundante en *W. buphthalmiflora* (Tabla 38), y que mientras esta última posee los ésteres 8 y 14 con los ácidos tíglico y angélico, *W. glauca* tiene el éster con el ácido cinámico 13, siendo comunes a ambos los ésteres con los ácidos saturados 84 y 85.

Con respecto a la reclasificación de *Wedelia buphthalmiflora*, que involucra un cambio de género (pág. 8), es interesante indicar que en este estudio se encontraron fundamentalmente compuestos diterpénicos, característicos del género *Wedelia*, mientras que *Zexmenia* posee lactonas sesquiterpénicas²⁰⁵⁻²⁰⁸,

Tabla 38: Cuadro comparativo de los compuestos de mayor significado quimiotaxonómico de *Wedelia glauca* y *W. buphthalmiflora*.

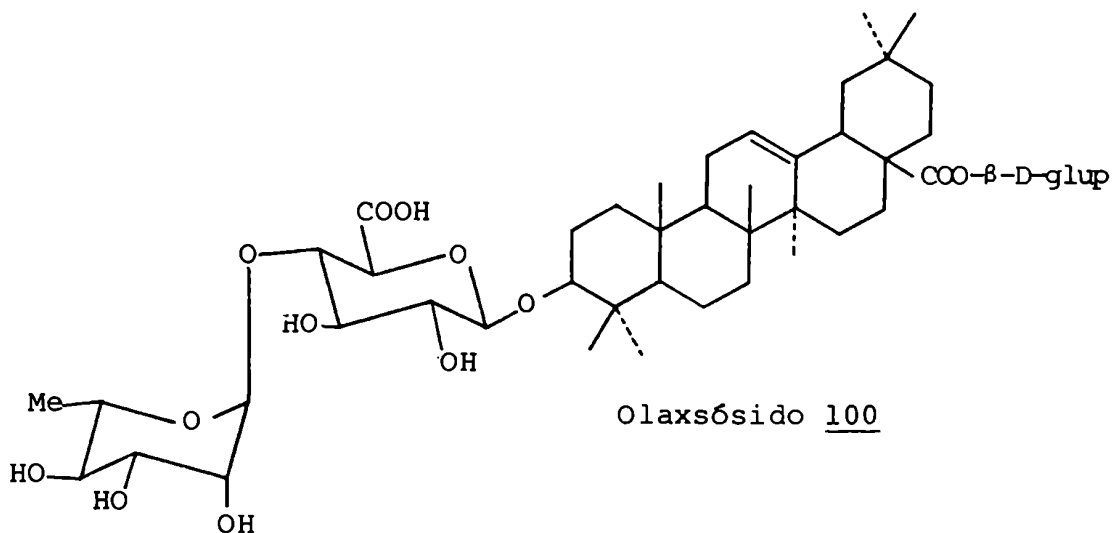
	<i>W. buphthalmiflora</i>	<i>W. glauca</i>
Ac. kaurénico <u>9</u>	+	+
Ac. grandiflorénico <u>10</u>	+	-
Esteres del ácido 15- α -hidroxikaurénico con:		
Ac. isobutírico <u>84</u>	+	+
Ac. isovalérico <u>85</u>	+	+
Ac. angélico <u>14</u>	+	-
Ac. tíglico <u>8</u>	+	-
Ac. cinámico <u>13</u>	-	+
Saponinas triterpénicas <u>89</u> y <u>90</u>	+	-
Atractilósido <u>59</u>	-	+

sesquiterpenos²⁰⁸, diterpenos tricíclicos²⁰⁷; habiéndose encontrado en *Z. hispida* ácidos kaurénico y grandiflorénico²⁰⁷, pero no ésteres del ácido 15- α -hidroxikaurénico. Para obtener datos concluyentes es necesario un estudio comparativo de otras especies autóctonas de ambos géneros a fin de determinar el grado de parentesco en nuestro país, ya que las *Zexmenia* estudiadas pertenecen a zonas cálidas exclusivamente.

No se han realizado estudios quimiotaxonómicos sistemáticos del extracto polar de especies de la familia de las Compuestas. La búsqueda bibliográfica reveló que dos glicósidos triterpénicos con estructura similar a 89 y 90, encontrados en el extracto etanólico de *W. buphthalmiflora*, habían sido hallados en la especie *Putranjiva roxburghii*, de la familia *Euphorbiaceae*, habiendo sido determinadas sus estructuras por métodos químicos

únicamente^{209,210}. El punto de fusión del éster metílico de uno de ellos, 185-190°, (única constante física informada) denominado Putranósido A, coincidió con el del compuesto correspondiente, 89a, (p.f. 189-192°) de *Wedelia buphthalmiflora*; en cambio, no hubo concordancia entre el punto de fusión del éster metílico del otro, Putranósido C (p.f. 190-194°(?)), con el del glicósido 90a (p.f. 234-237°), si bien ambas estructuras resultaban idénticas. La doble determinación química y el análisis espectroscópico realizados en esta tesis no dejan duda en cuanto a la estructura de 90a.

Un compuesto relacionado con 90, el Olaxósido, fue aislado de *Olax psittacorum*, de la familia *Olacaceae*, su estructura 100 difiere en la unión interglicosídica, puesto que la ramnosa está unida al HO-4 del ácido glucurónico¹⁰⁷.



La presencia de estos y muchos otros glicósidos derivados de la β-amirina (pág. 38) en muy diversas familias de plantas indican que las saponinas triterpénicas no son buenos marcadores taxonómicos, y su distribución generalizada sería un indicio de que poseen funciones comunes en las plantas superiores.

No se hallaron en *W. glauca* ninguno de estos glicósidos, pero de su extracto metanólico se aisló el atractilósido 59, uno de sus principios activos, que está ausente en *W. buphthalmiflora*. Los ensayos de toxicidad realizados hasta el momento con extractos de *W. glauca* revelaron que la fracción letal es la fase acuosa que se obtiene por partición del extracto metanólico entre butanol y agua. La presencia de atractilósido en esta fase (Fig. 74), acompañado por gran cantidad de azúcares libres y compuestos fenólicos y terpénicos polares en pequeña cantidad, explica su toxicidad, aunque no debe descartarse la posibilidad de que existan otras sustancias que contribuyan a la misma, pero que sin duda no pueden ser terpenos sulfatados, ya que el atractilósido es el único componente de la planta que es retenido en Sephadex LH-20.

El atractilósido se encuentra en *Atractilis gummifera* (familia *Compositae*, tribu *Cynareae*) que crece en las zonas adyacentes al Mar Mediterráneo y en *Callilepis laureola* (*Compositae*, tribu *Inuleae*) del sur de Africa. Si se agrega a esto que el carboxiatractilósido 70, de estructura similar a 59, se encontró en *Xanthium strumarium* y que el wedelósido 16 se aisló de *Wedelia asperrima*, se llega a la conclusión que (hasta el momento) los compuestos tóxicos con estructura de glicósidos de diterpenos tetracíclicos derivados del kaureno, se hallan prácticamente restringidos a la familia de las Compuestas.

ACCION ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE W. BUPHTHALMIFLORA

En colaboración con la Lic. Alicia S. Lorenti y el Dr. Alberto A. Viale (Cátedra de Microbiología e Inmunología del Departamento de Química Biológica de esta Facultad), se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana con los extractos de éter de petróleo y etanol de *W. bupthalmiflora* utilizando levaduras, hongos y bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En la tabla 39 se especifican los microorganismos empleados y la actividad de cada extracto frente a ellos, expresada como la concentración inhibitoria mínima en $\mu\text{g/ml}$; un guión indica falta de actividad.

Tabla 39: Concentración inhibitoria mínima de los extractos de *W. bupthalmiflora* frente a los microorganismos indicados (en $\mu\text{g/ml}$).

<u>Microorganismo</u>	<u>tipo</u>	<u>EP</u>	<u>EtOH</u>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	1000-2000	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	Gram +	1000-2000	-
<i>Salmonella newport</i>	Gram -	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	-	-
<i>Mycobacterium phlei</i>	micobacteria	1000	4000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	levadura	2000	2000
<i>Candida albicans</i>	levadura	2000	2000
<i>Aspergillus niger</i>	hongo	4000	4000

Se observa que ninguno de los dos extractos presenta actividad bacteriostática o fungistática alguna, puesto que sus valores de concentración inhibitoria mínima superan los 250 $\mu\text{g/ml}$.

CAPITULO VI

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentos y métodos empleados

Los puntos de fusión (p.f.) fueron determinados en un aparato Fisher-Johns o en un aparato marca Büchi, modelo Tottoli, y no están corregidos.

Los poderes rotatorios fueron medidos en un polarímetro digital Perkin-Elmer modelo 141 en tubos de 1 dm de longitud a temperatura ambiente, utilizando el solvente y la concentración que se indican en cada caso.

Los espectros de absorción infrarroja (I.R.) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 137-B Infracord en pastilla de KBr o en film.

Los espectros de resonancia magnética protónica (^1H -RMN) se efectuaron: a 60 MHz, con un espectrómetro Varian A-60 o con un Varian EM-360, y a 100 MHz con un Varian XL-100, según se indica en cada caso.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (^{13}C -RMN) se realizaron: a 25,2 MHz, en un espectrómetro Varian XL-100, y a 20,15 MHz, en un Varian FT-80.

En todos los espectros de resonancia magnética nuclear se usó tetrametilsilano como referencia interna, y el solvente que se indica en cada caso. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento en Hz.

Las abreviaturas usadas en la descripción de los espectros son: s: singulete, d: doblete, t: triplete, c: cuarteto, m: multiplete y a: ancho.

Los espectros de masas (E.M.) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro Varian Mat CH-7A con inserción directa.

Las cromatografías gas-líquido acopladas con espectrometría de masas (CGL-E.M.) se realizaron con un cromatógrafo Varian 1400, acoplado al espectrómetro de masas antes mencionado, y

los datos fueron procesados por una computadora Varian Mat Spectro System 166 usando una teletipo Tektronix 4010-1 y un impresor Tektronix 4631. También se realizaron CGL-E.M. con un equipo Hewlett-Packard 5995 A.

Todos los solventes fueron purificados por destilación y evaporados a presión reducida a menos de 45°C. Las mezclas de solventes estan expresadas en relaciones de volúmenes (v/v).

Métodos cromatográficos

Cromatografía en capa delgada (CCD):

Se utilizaron placas preparadas con silicagel G (Merck), de un espesor de 250 micrones, activadas 1 hora a 105°, así como cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck); y Celulosa F (Merck) de 100 micrones de espesor. También se usaron cromatoplasmas de alta resolución de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) para nanocromatografía. En todos los casos se utilizó la técnica ascendente.

Como reveladores universales se usaron: a. H₂SO₄-ácido acético, 1:1. b. Iodo.

Como reveladores específicos se utilizaron: a. Para compuestos fenólicos: FeCl₃ al 2% en etanol b. Para terpenos: anisaldehído al 5% en isopropanol y luego H₂SO₄-AcOH 1:1 c. Para alcaloides: reactivo de Dragendorff según Thies, Reuther, modificación de Vagujfalvi²¹³ d. Para azúcares: AgNO₃ en acetona y luego NaOH 2% en etanol:H₂O, 1:1 e. Para azúcares y ácidos urónicos: naftoresorcinol al 0,2% en etanol y luego H₂SO₄ al 20%. En todos los casos se calentó el cromatograma a 105° durante 10 min.

Cromatografía en columna (CC):

Los rellenos utilizados fueron: silicagel grado 923, malla 200-300 (Davidson Chemical); silicagel H (Merck) y Sephadex LH-20 (Sigma).

Las columnas de silicagel H (tamaño de partícula: 10-40 micrones) fueron eluidas bajo presión usando una bomba impulsora de solventes marca Prominent-Electronic 1001 SCJ provista de un amortiguador de pulsos; o, con aire comprimido.

Los solventes de elución se indican en cada caso.

Cromatografía gas-líquido:

Se realizaron con detector de ionización de llama en los siguientes equipos: HP 5750, HP 5830 A y HP 5840 A (Hewlett-Packard) usando N_2 como gas portador. El soporte de las fases líquidas de las columnas era Chromosorb W-AW-DMCS, malla 60-80. Las columnas SE-30 y OV-17 son al 3%, mientras la OV-101 está preparada al 2% de fase líquida (todas las columnas tienen 1,8 m de longitud).

Resinas de intercambio:

Se utilizaron las siguientes resinas:

- Aniónica débil: AG 3-X4A (Bio Rad)
- Catiónica fuerte: AG 50W-X8 (Bio Rad)

Reacciones generales

1. Acetilación:

Las acetilaciones fueron llevadas a cabo con anhídrido acético y piridina (0,9:1) a temperatura ambiente durante 12-15 hs y los productos fueron aislados por evaporación de la mezcla acetilante.

2. Trimetilsililación:

Se disolvió la muestra en piridina anhidra y se agregaron cantidades iguales de trimetilclorosilano y hexametildisilazano. Se agitó durante 5 min y se evaporó hasta sequedad.

El residuo se tomó con cloroformo anhidro y se filtró a través de una placa de vidrio sinterizado para eliminar las sales formadas, llevándose nuevamente a sequedad.

3. Metilación con diazometano:

La solución etérea de diazometano fue preparada a partir de nitrosometilurea según Vogel²¹⁴ y se conservó sobre KOH a -4°C .

La muestra se disolvió en éter etílico anhidro, o en metanol anhidro, y se agregó solución etérea de diazometano en exceso, a 0°C , en pequeñas porciones cada media hora, hasta completar la reacción, que fue seguida por CCD. Los productos fueron aislados por evaporación del exceso de reactivo a presión reducida y purificados, cuando fue necesario, por columnas de silicagel H.

4. Preparación de alditoles acetilados:

Para estudiar por CGL los azúcares provenientes de la hidrólisis de glicósidos, se prepararon sus alditoles acetilados⁷⁷. Para ello los monosacáridos se disolvieron en agua o etanol y se redujeron con NaBH_4 durante 10 hs a temperatura ambiente. Se evaporó el solvente, se destruyó el exceso de NaBH_4 con ácido acético y luego se eliminó el ácido bórico formado mediante repetidos tratamientos con metanol y posterior evaporación. Los alditoles así obtenidos fueron acetilados de la manera antes descripta, o, en caliente, con anhídrido acético usando como catalizador el acetato de sodio que acompaña al alditol, a 120°C , 1 hora.

Material vegetal

Wedelia buphthalmiflora Lorentz: Se empleó parte aérea del material vegetal recolectado en el Dpto. de Utracán, a 5 km al sur de la localidad de Padre Buodo, provincia de La Pampa.

Es abundante en médanos, cerca de la ruta 35, formando manchones. La identificación del material vegetal fue efectuada por el Ing. Agr. P.E. Steibel de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa.

Ejemplar de herbario N° 6105 Recolectado el 15-III-1979

Wedelia glauca (Ort.) Hoffmann ex Hicken: Se utilizó parte aérea de plantas recolectadas en los alrededores de la ciudad de Córdoba. La recolección fue realizada por el Dr. J.C. Oberti, y la identificación la efectuó el Dr. Luis Ariza Espinar, ambos de la Universidad Nacional de Córdoba. Ejemplares de herbario se encuentran depositados en el herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Ejemplar de herbario N° BAFC 1297 Recolectado el 8-III-1981

Las plantas enteras fueron secadas a 45°C en estufa con circulación de aire, y luego molidas en un molino Wiley, modelo ED-5, hasta pasar por una malla de 2 mm. El material dividido así obtenido fue extraído con los solventes que se indican, en un extractor Soxhlet de capacidad adecuada. Los extractos obtenidos fueron evaporados a presión reducida a menos de 45°C.

ESTUDIO QUIMICO DE WEDELIA BUPHTHALMIFLORA

2,85 kg de parte aérea molida y seca fueron extraídos con éter de petróleo (60-80°), obteniéndose 69 g de un extracto verde oscuro (2,4% del peso seco), que por concentración originó un precipitado blanco (3,15 g) constituido por hidrocarburos y ceras, que no fueron estudiadas. El remanente vegetal fue extraído a continuación con etanol 96%, recuperándose por evaporación 150,7 g (5,2%), precipitando al concentrar este último extracto 13,2 g de KCl.

ESTUDIO DEL EXTRACTO DE ETER DE PETROLEO DE WEDELIA BUPHTHALMIFLORA

20,71 g del extracto de éter de petróleo de esta planta fueron sembrados en una columna de silicagel (1200g) malla 200-300, eluyéndose sucesivamente con éter de petróleo, un gradiente de concentración creciente de cloroformo en éter de petróleo y con un gradiente de etanol en cloroformo hasta llegar a HCCl_3 -EtOH 1:1. Se obtuvieron las siguientes fracciones:

N°	mg	
1	820	Hidrocarburos
2	1861	Ceras
3	510	Acetato de β -amirina <u>78</u>
4	762	Alcoholes
5	2900	Acidos kaurénico <u>9</u> y grandiflorénico <u>10</u> , β -amirina <u>48</u> , lupeol <u>82</u> y alcoholes.
6	6800	Esteres del ácido 15- α -hidroxikaurénico <u>14</u> , <u>8</u> , <u>84</u> , <u>85</u> , esteroides <u>86</u> y <u>87</u> y ácido oleanólico <u>49</u> .
7	5700	Producto oscuro

La fracción 1 fue evaporada obteniéndose hidrocarburos.

La fracción 2 fue recristalizada de acetona-cloroformo, dando ceras que no fueron estudiadas.

I.R. de la mezcla: (KBr) cm^{-1} 2870 (tens. C-H), 1740 (tens. C=O), 1470 (def. C-H), 1385 (def. C-H), 1180 (tens. C-O), 735 y 725 (def. C-H) fuerte.

La fracción 3 fue recristalizada cuatro veces de acetona-metanol 1:1, y se obtuvieron 40 mg de acetato de β -amirina 78 puro.

La fracción 4 fue evaporada, realizándose el espectro I.R. de la mezcla que resultó ser de alcoholes y que no fue analizada.

I.R. (KBr): cm^{-1} 3200 (tens. O-H), 2830 (tens. C-H), 1460 (def. C-H), 1060 (tens. C-O), 765 y 745 (def. C-H).

La fracción 5 fue nuevamente cromatografiada en una columna de silicagel H usando como solvente de elución EP-AcOEt-AcOH, 50:3,7:2, obteniéndose 4 subfracciones principales.

La segunda (600 mg) fue metilada con diazometano etéreo y recromatografiada en silicagel con EP-benceno, 50:3, aislándose 68 mg de *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oato de metilo 10a (éster metílico del ácido grandiflorénico) y 94 mg de *ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 9a (éster metílico del ácido kaurénico). La tercera subfracción fue purificada por CC de silicagel H usando como solvente un gradiente de acetato de etilo en éter de petróleo hasta un 15% de acetato de etilo.

La fracción principal, analizada por CGL y CGL-E.M. condujo a la identificación de β -amirina 48, lupeol 82 y alcoholes lineales de $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{O}$ a $\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{O}$.

La fracción 6 fue cromatografiada en columna de silicagel H con un gradiente de acetato de etilo en éter de petróleo comenzando con una relación EP-AcOEt 50:3 y terminando con acetato de etilo puro. Se eluyeron:

- a. Una mezcla de ácido kaurénico 9 y ácido grandiflorénico 10.
- b. Un ácido terpénico 14 que fue metilado de la manera usual

y repurificado en CC de silicagel H con EP-benceno, 30:8, dando 18 mg de 15- α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 14a.

c. Una mezcla de ácidos que por metilación y separación en CC de silicagel H con EP-benceno, 2:1, dio: kaurenato y grandiflorenato de metilo (mezcla de 9a y 10a) 35 mg, 15- α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo: 14a, (106 mg), una mezcla de 15- α -isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 84a, 15- α -isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 85a y 15- α -tigloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 8a (88 mg de la mezcla) y por último 8a puro (70 mg).

d. Una fracción compleja que fue purificada por CC de silicagel H usando cloroformo como solvente de elución, dando esteroides.

e. Una mezcla de ácidos terpénicos que por metilación y sucesivas cromatografías dio oleanolato de metilo 49a (15 mg) y los ésteres metílicos de dos ácidos diterpénicos hidroxilados cuya estructura no pudo esclarecerse por falta de material.

La fracción 7 era un producto oscuro, de mal olor, que por cromatografía en placa delgada presentó manchas difusas por lo que fue desechado.

Datos de los compuestos aislados del extracto de éter de petróleo de *W. buphthalmiflora*

Hidrocarburos

Se analizaron por CGL-E.M. con una columna SE-30, a 220°C, en condiciones isotérmicas.

T_r (fórmula, %) min : 1,09 (n-C₂₁H₄₄, 1,08), 1,66 (n-C₂₂H₄₆, 0,81), 2,13 (n-C₂₃H₄₈, 1,84), 2,75 (n-C₂₄H₅₀, 1,68), 3,61 (n-C₂₅H₅₂, 2,72), 4,80 (n-C₂₆H₅₄, 1,60), 6,43 (n-C₂₇H₅₆, 4,47), 8,65 (n-C₂₈H₅₈, 11,06), 11,71

($n\text{-C}_{29}\text{H}_{60}$, 31,0), 15,87 ($n\text{-C}_{30}\text{H}_{62}$, 6,42), 21,58
 ($n\text{-C}_{31}\text{H}_{64}$, 29,50), 29,26 ($n\text{-C}_{32}\text{H}_{66}$, 5,0).

Luego de la aparición del hidrocarburo de 32 átomos de carbono se elevó la temperatura de la columna hasta 280° y no se observó la aparición de nuevos picos.

Acetato de β -amirina 78

p.f.: 243-244° (acetona-MeOH, 1:1) (Lit.: 241°)²¹⁵

$[\alpha]_D^{20} = +77,5^\circ$ (c 0,36, HCCl_3) (Lit.: $+81,4^\circ$ ²¹⁵, $+76^\circ$ ²¹⁶)

I.R. (KBr) cm^{-1} : 1730 (tens. $\text{C}=\text{C}$), 1250 (tens. $\text{C}-\text{O}$),
 815 (def. $\text{C}-\text{H}$).

$^1\text{H-RMN}$ (60 MHz, DCCl_3) ppm: 0,84 (s, 3H, Me-28), 0,88
 (s, 12H, Me-23,24,29,30), 0,98 (s, 6H, Me-25,26),
 1,14 (s, 3H, Me-27), 2,05 (s, 3H, MeCO-), 4,4
 (m, 1H, H-3), 5,2 (m, 1H, H-12).

E.M. m/e (%): 468 (M^+ , 3,6), 453 (M-15, 1,9), 393 (M-60-
 -15, 1,98), 249 (anillos A y B, 2), 218 (RDA ani-
 llos D y E, 100), 205 (218-13, 4,5), 203 (218-15,
 41,8), 189 (249-AcOH y 218-29, 16,4), 175 (7,5),
 161 (6,0), 149 (4,5), 147 (7,5), 135 (11,9),
 133 (203-70, 8,2), 121 (8,9), 119 (9,0), 109
 (11,9), 107 (10,4), 105 (8,6), 95 (16,4), 81
 (14,6), 69 (23,1), 55 (12,7), 43 (13,4).

CGL (t_r , min):	SE-30 270°isot.	QF-1 235°isot.
Acetato de β -amirina	14,90	12,05
Acetato de α -amirina	16,11	13,76

Ent-kaur-16-en-19-oato de metilo 9a (kaurenato de metilo)

Aceite incoloro, adquiere color amarillo con el tiempo.

$$[\alpha]_D^{20} = -97^\circ \text{ (c 0,2, HCCl}_3 \text{)} \quad \text{(Lit.: } -107^\circ \text{)}^{21,34}$$

I.R. (film) cm^{-1} : 2880 (tens. C-H), 1725 (tens. C=O),
1655 (tens. C=C), 1460 y 1370 (def. C-H), 1150
(tens. C-O), 880 (def. =CH₂).

¹H-RMN (60 MHz, DCCl₃) ppm: 0,85 (s, 3H, Me-20), 1,17
(s, 3H, Me-18), 2,63 (m, 1H, H-13), 3,65 (s,
3H, -COOMe), 4,77 (m, 2H, H-17 y 17').

E.M. m/e (%): 317 (M+1, 18), 316 (M⁺, 82), 302 (9), 301
(M -15, 44), 274 (17), 273 (M-C₃H₇, 90), 269
(M-MeOH-Me, 4), 258 (18), 257 (M-COOMe, 100),
256 (M-HCOOMe, 44), 242 (18), 241 (M-HCOOMe-Me,
89), 214 (9), 213 (46), 201 (13), 199 (15),
188 (7), 187 (27), 185 (13), 175 (10), 173
(12), 161 (16), 159 (20), 157 (7), 149 (20),
148 (23), 147 (24), 145 (19), 143 (10), 135
(26), 134 (23), 133 (36), 131 (49), 129 (10),
123 (64), 121 (78), 119 (48), 117 (22), 109
(66), 108 (22), 107 (69), 106 (34), 105 (71),

101 (23), 97 (16), 95 (44), 93 (76), 91
 (94), 81 (80), 79 (82), 77 (40), 69 (26),
 67 (59), 56 (64), 53 (21), 41 (54).

CGL (t_r , min):

QF-1, 165°, isot.: 12,45
 OV-101, 205°, isot.: 7,87

CCD:

(Silicagel, EP-benceno, 2:1) R_f : 0,70
 Revela marrón con anisaldehído/ H_2SO_4 -AcOH

Ent-kaur-9(11),16-dien-19-oato de metilo 10a (grandiflorenato
 de metilo)

Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{20} = +36^\circ$ (c 0,24, $HCCl_3$) (Lit.: $+38^\circ$ (EtOH))³⁶

I.R. (film) cm^{-1} : 2860 (tens. C-H), 1725 (tens. C=O),
 1660 (tens. C=C), 1460 y 1380 (def. C-H), 1220
 y 1150 (tens. C-O), 880 (def. =CH₂), 820
 (def. -CH=).

¹H-RMN (60 MHz, $DCCl_3$) ppm: 0,95 (s, 3H, Me-20), 1,19
 (s, 3H, Me-18), 2,78 (m, 1H, H-13), 3,65 (s, 3H,
 COOMe), 4,87 (m, 2H, H-17 y 17'), 5,25 (m, 1H,
 H-11).

E.M. m/e (%): 315 (M+1, 4), 314 (M⁺, 20), 300 (14), 299 (M-15, 64), 267 (M-15-MeOH, 5), 255 (M-59, 22), 254 (M-HCOOMe, 13), 239 (M-HCOOMe-15, 100), 211 (14), 197 (19), 183 (23), 173 (14), 155 (31), 147 (18), 146 (8), 141 (26), 131 (27), 129 (28), 117 (29), 104 (46), 101 (5), 94 (16), 92 (27), 89 (64), 81 (25), 79 (37), 77 (22), 69 (9), 67 (19), 55 (34), 53 (11), 41 (28).

CGL (t_r, min):

QF-1, 150°, isot.: 9,80

OV-101, 230°, isot.: 5,98

CCD:

(Silicagel, EP-benceno, 2:1) R_f: 0,75

Revela violeta con anisaldehído/H₂SO₄-AcOH.

Alcoholes lineales, β-amirina 48 y lupeol 82

El análisis de la tercera subfracción de la fracción 5 se realizó por CGL-E.M. (OV-17, 180° → 280°, 10°/min)

n-hexacosanol (C₂₆H₅₄O):

E.M. m/e (%): 336 (M-18-28, 2,6), 223 (1,9), 209 (2), 208 (2), 196 (2), 195 (3), 181 (5), 168 (2), 167 (4), 153 (5), 139 (9), 125 (17), 111 (32), 97 (60), 85 (28), 83 (63), 82 (30), 71 (43), 69 (65), 57 (100), 55 (72), 43 (83), 41 (35).

CGL (t_r, min):

OV-17, 265°, isot.: 1,45

Alcoholes lineales:

Por CGL (OV-17, 260°, isot.) de esta fracción acetilada, usando como testigos los acetatos de alcoholes de 26 y 28 átomos de carbono, se determinó una serie homóloga de alcoholes lineales:

T_r (fórmula, %) min: 1,11 ($n-C_{21}H_{44}O$, 0,26), 1,35
 ($n-C_{22}H_{46}O$, 2,23), 1,66 ($n-C_{23}H_{48}O$, 0,49), 2,09
 ($n-C_{24}H_{50}O$, 6,04), 2,64 ($n-C_{25}H_{52}O$, 5,82), 3,37
 ($n-C_{26}H_{54}O$, 70,48), 4,24 ($n-C_{27}H_{56}O$, 3,69),
 5,43 ($n-C_{28}H_{58}O$, 10,97).

Coefficiente de correlación ($\ln t_r$ vs. N°de C): 0,9997

 β -amirina:

E.M. m/e (%): 426 (M^+ , 7,5), 219 (25), 218 (RDA, anillos D y E, 100), 207 (anillos A y B, 10), 205 (218-13, 9,5), 204 (17,9), 203 (218-15, 51), 190 (8), 189 (218-29 y 207- H_2O , 21), 175 (11), 163 (8), 161 (8), 149 (8), 147 (12), 135 (18), 133 (12), 121 (10), 119 (23), 109 (20), 107 (17), 105 (18), 95 (27), 81 (28), 69 (40), 67 (18), 57 (10), 55 (23), 43 (20).

CGL (t_r , min):

OV-17, 265°, isot.: 5,82

CCD:

(Silicagel, EP-AcOEt, 10:1) R_f : 0,45

Acetato de β -amirina:

CGL (t_r , min): OV-17, 260° isot.: 8,28

Lupeol:

E.M. m/e (%): 426 (M^+ , 15), 408 ($M-H_2O$, 7), 315 (10),
 300 (10), 257 (13), 220 (anillos A y B, 18),
 219 (25), 218 (anillos D y E, 38), 217 (13),
 216 (25), 215 (10), 208 (18), 207 (anillos
 A y B, 45), 206 (18), 205 (25), 204 (30),
 203 (31), 201 (11), 190 (38), 189 (anillos
 D y E, y A y B $-H_2O$, 68), 187 (18), 177 (15),
 175 (30), 173 (10), 163 (18), 161 (37), 159
 (13), 157 (42), 135 (82), 133 (40), 123 (55),
 121 (80), 119 (45), 109 (81), 107 (73), 105
 (50), 95 (100), 93 (72), 91 (42), 81 (90),
 79 (45), 77 (20), 69 (98), 67 (72), 55 (80),
 53 (25), 43 (60), 41 (65).

CGL (t_r , min):

OV-17, 265°, isot.: 6,78

Acetato de lupeol:

CGL (t_r , min): OV-17, 260°, isot.: 14,66

15- α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 14a

p.f.: 138-140° (éter de petróleo) (Lit.: 135-137°)²⁹

$[\alpha]_D^{20} = -68^\circ$ (c 0,2, CCl_3)

I.R. (KBr) cm^{-1} : 2880 (tens. C-H), 1710 (tens. C=O),
 1648 (tens. C=C), 1460 y 1380 (def. C-H), 1235
 y 1160 (tens. C-O), 920 (def. $=CH_2$), 850 y 815
 (def. =C-H, angelato).

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, DCCl_3) ppm: 0,84 (s, 3H, Me-20), 1,15 (s, 3H, Me-18), 1,87 (sa, 3H, Me-5'), 1,95 (da, $J=7$ Hz, 3H, Me-4'), 2,78 (sa, 1H, H-13), 3,60 (s, 3H, COOMe), 5,03 y 5,08 (dos sa, 2H, H-17 y 17'), 5,31 (sa, 1H, H-15), 5,97 (cc, $J=1$ y 7 Hz, 1H, H-3').

$^{13}\text{C-RMN}$ (25,2 MHz, DCCl_3) ppm: 15,6 y 15,7 (C-4' y C-20), 18,4 (C-11), 19,1 (C-2), 20,6 (C-5'), 20,9 (C-6), 28,6 (C-18), 32,6 (C-12), 35,0 (C-7), 37,3 (C-14), 37,9 (C-3), 39,6 (C-10), 40,6 (C-1), 42,5 (C-13), 43,7 (C-4), 47,5 (C-8), 51,0 (COOMe), 52,9 (C-9), 56,5 (C-5), 82,4 (C-15), 109,7 (C-17), 128,1 (C-2'), 137,0 (C-3'), 155,4 (C-16), 167,7 (C-1'), 177,7 (C-19).

E.M. m/e (%): 415 (M+1, 2), 414 (M^+ , 7), 399 (M-15, 0,7), 355 (M-COOMe, 0,6), 354 (M-HCOOMe, 0,5), 332 (M-C₄H₆CO, 2), 315 (5), 314 (M-C₄H₇COOH, 20), 300 (2), 299 (M-C₄H₇COOH-15, 12), 286 (2), 273 (332- COOMe, 1,4), 272 (332- HCOOMe, 1,8), 271 (4), 256 (2), 255 (314-COOMe, 12), 254 (314-HCOOMe, 8), 253 (5), 239 (299-HCOOMe, 7), 211 (5), 199 (2), 185 (2), 173 (3), 171 (3), 159 (3), 147 (6), 145 (5), 133 (4), 131 (5), 121 (10), 109 (6), 107 (9), 105 (3), 101 (2), 95 (5), 93 (9), 91 (6), 83 (C₄H₇CO⁺, 100), 69 (4), 55 (C₄H₇⁺, 25).

15- α -tigloiloxi-ent-kaur-16-en-19-oato de metilo 8a

p.f.: 113-115° (MeOH-H₂O, 1:1) (Lit.: 111-113° (EP))¹²

$$[\alpha]_D^{20} = -77^\circ \quad (c\ 0,1, \text{HCCl}_3)$$

I.R. (KBr) cm^{-1} : 2880 (tens. C-H), 1700 (tens. C=O),
1648 (tens. C=C), 1450 y 1375 (def, C-H), 1265
y 1125 (tens. C-O), 925 (def. =CH₂), 770 (def.
=CH, tiglato).

¹H-RMN (60 MHz, DCCl₃) ppm: 0,83 (s, 3H, Me-20), 1,14 (s,
3H, Me-18), 1,74 (da, J=4 Hz, 3H, Me-4'), 1,83
(sa, 3H, Me-5'), 2,75 (m, 1H, H-13), 3,61 (s,
3H, COOMe), 5,03 (sa, 2H, H-17 y 17'), 5,26 (sa,
1H, H-15), 6,77 (m, 1H, H-3').

¹³C-RMN (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: 12,2 (C-5'), 14,3 (C-4'),
15,6 (C-20), 18,4 (C-11), 19,1 (C-2), 20,9
(C-6), 28,6 (C-18), 32,6 (C-12), 34,9 (C-7),
37,3 (C-14), 37,9 (C-3), 39,9 (C-10), 40,6
(C-1), 42,5 (C-13), 43,7 (C-4), 47,7 (C-8),
51,0 (COOMe), 52,9 (C-9), 56,6 (C-5), 82,7
(C-15), 109,7 (C-17), 128,8 (C-2'), 136,7
(C-3'), 155,3 (C-16), 166,4 (C-1'), 177,7
(C-19).

E.M. m/e (%): 415 (M+1, 1,1), 414 (M⁺, 2,2), 354 (M-
-HCOOMe, 0,5), 332 (M-C₄H₆CO, 1,7), 315 (3),
314 (M-C₄H₇COOH, 10), 300 (2), 299 (M-C₄H₇COOH-
-Me, 10), 286 (1), 273 (332-COOMe, 1,0), 272
(332-HCOOMe, 0,9), 271 (3), 256 (2), 255
(314-COOMe, 5,5), 254 (314-HCOOMe, 6,4), 253 (2),
240 (1,5), 239 (299-HCOOMe, 8), 234 (1), 211
(5), 201 (4), 199 (2), 185 (7), 173 (6),
171 (4), 159 (9), 157 (6), 147 (14), 146
(14), 133 (10), 131 (13), 121 (22), 119 (14),
109 (15), 107 (21), 105 (15), 101 (2), 95
(14), 93 (16), 91 (16), 83 (C₄H₇CO⁺, 100),

71 (16), 69 (7), 55 ($C_4H_7^+$, 35).

Hidrólisis alcalina de 15- α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 14a

Se reflujaaron 40 mg de 14a con 2 ml de KOH 3N en 4 ml de EtOH 96% durante 4 hs. Luego se agregó H_2O (8 ml) y se extrajo 3 veces con éter etílico (20 ml cada vez), se secó la fase etérea con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó. El producto crudo fue purificado por una columna de silicagel H (3 g) usando una mezcla de EP-AcOEt, 30:1, como solvente de elución, obteniéndose 25,8 mg de 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42, un aceite puro por CCD y CGL, que cristalizó lentamente (rendimiento: 80,5%).

15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42

p.f.: 101-102° (MeOH- H_2O , 1:1) (Lit.: 101°)¹⁶⁶

I.R. (KBr) cm^{-1} : 3460 (tens. O-H no asociado), 3320 (tens. O-H asociado), 2880 (tens. C-H), 1720 (tens. C=O), 1660 (tens. C=C), 1460 y 1380 (def. C-H), 1120 (tens. C-O), 750-940 (def. =CH₂).

¹H-RMN (60 MHz, $DCCl_3$) ppm: 0,84 (s, 3H, Me-20), 1,17 (s, 3H, Me-18), 2,77 (m, 1H, H-13), 3,62 (s, 3H, COOMe), 3,77 (sa, 1H, H-15), 5,06 y 5,21 (dos sa, 2H, H-17 y 17').

E.M. m/e (%): 332 (M^+ , 33), 317 (M-15, 28), 314 (M- H_2O , 25), 300 (12), 299 (M- H_2O -15, 34), 286 (3), 285 (4), 275 (16), 274 (M-58, 71), 273 (M-COOMe, 46), 272 (M-HCOOMe, 38), 259 (16), 258 (13), 257 (272-15, 67), 256 (15), 255

(273-H₂O, 64), 254 (272-H₂O, 14), 249 (32),
 239 (M-HCOOMe-H₂O-15, 40), 199 (22), 189 (44),
 164 (37), 159 (33), 150 (46), 147 (38), 135
 (46), 133 (45), 131 (40), 132 (78), 121
 (100), 109 (97), 107 (82), 101 (30), 95 (61),
 93 (72), 91 (74), 84 (65), 81 (90), 79
 (75), 67 (68), 59 (15), 55 (80), 41 (83).

CGL (t_r, min):

SE-30, .220°, isot.: 4,23

CCD:

(Silicagel, EP-AcOEt-AcOH, 30:1,5:1) R_f: 0,50
 Revela rojo con anisaldehído/H₂SO₄-AcOH

Síntesis de 15- α -isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato
 de metilo 84a

Se hicieron reaccionar 4 ml (43 mmol) de ácido isobutírico con 4 ml (55 mmol) de Cl₂SO a 100° durante 30 min a reflujo. El producto obtenido se destiló dos veces, recogién-dose la fracción entre 90,5 y 92° (p.eb. del cloruro de isobutiroilo:92°). Se reflujaaron 5,6 mg de 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42 con 0,2 ml de piridina y 0,2 ml del cloruro de isobutiroilo obtenido anteriormente, en 5 ml de Cl₂CH₂ durante 3 hs. La solución de Cl₂CH₂ fue extraída dos veces con solución diluida de H₂SO₄, luego tres veces con solución diluida de KOH, con agua, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó, obteniéndose 4,9 mg de 15- α -isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 84a, homogéneo por CCD y CGL (Rendimiento: 70%).

15- α -isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 84a

E.M. m/e (%): 402 (M^+ , 13), 387 (M-15, 5), 343 (M-COOME, 2), 342 (M-HCOOME, 1,5), 332 (M-C₃H₆CO, 15), 327 (M-HCOOME-15, 1), 315 (12), 314 (M-C₃H₇COOH, 40), 299 (M-C₃H₇COOH-15, 25), 286 (3), 274 (4), 273 (332-COOME, 5), 272 (332-HCOOME, 5), 271 (5), 255 (M-C₃H₇COOH-COOME, 25), 254 (M-C₃H₇COOH-HCOOME, 15), 247 (2), 239 (M-C₃H₇COOH-HCOOME-15, 12), 234 (6), 147 (13), 133 (8), 131 (8), 121 (18), 109 (12), 107 (17), 105 (13), 101 (5), 93 (14), 91 (16), 81 (15), 79 (12), 71 (C₃H₇CO⁺, 73), 55 (14), 43 (C₃H₇⁺, 100).

Síntesis de 15- α -isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 85a

Se disolvieron 3,4 mg de 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42 en 0,4 ml de piridina anhidra, se agregaron 0,3 ml de anhídrido isovalérico (Baker, grado práctico, p.eb. 210-215°) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 hs. Se volcó el producto de reacción sobre 15 ml de solución de KOH 0,2 M fría y se agitó durante 15 min para destruir el exceso de anhídrido isovalérico. La fase acuosa se extrajo con HCCl₃ y se lavó nuevamente 3 veces con la solución de KOH, luego H₂SO₄ diluido, agua, se secó, filtró y evaporó, obteniéndose 3,7 mg de 15- α -isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 85a, homogéneo por CCD y CGL (Rendimiento: 84%).

15- α -isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 85a

E.M. m/e (%): 416 (M^+ , 13), 332 (M-C₄H₈CO, 22), 315 (13), 314 (M-C₄H₉COOH, 45), 299 (M-C₄H₉COOH-15, 25),

273 (332-COOMe, 6), 272 (332-HCOOMe, 6), 271 (5),
 257 (5), 256 (6), 255 (M-C₄H₉COOH-COOMe, 28),
 254 (M-C₄H₉COOH-HCOOMe, 14), 253 (5), 239 (M-
 -C₄H₉COOH-HCOOMe-15, 14), 211 (6), 207 (5), 185
 (5), 173 (6), 164 (6), 161 (5), 159 (6),
 147 (15), 133 (8), 131 (10), 121 (20), 109
 (18), 107 (18), 105 (14), 101 (7), 93 (19),
 91 (16), 85 (C₄H₉CO⁺, 71), 81 (17), 79 (13),
 67 (13), 57 (C₄H₉⁺, 100), 55 (20), 41 (20).

Estudio de la mezcla de ésteres del 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-
 -16-en-19-oato de metilo 84a, 85a y 8a

La mezcla obtenida de la fracción 6 de la columna ma-
 dre del extracto de éter de petróleo de *W. buphthalmiflora* fue hi-
 drolizada en las mismas condiciones que se describieron para
 el éster angélico 14a (pág. 217) dando únicamente 15- α -hidro-
 xi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 42.

El análisis por CGL-E.M. se realizó con una columna
 SE-30, 200+280°, 8°/min.

CGL (t _r , min):	(condiciones isotérmicas)		
	SE-30 240°	SE-30 230°	QF-1 240°
<u>14a</u>	5,15		
<u>84a</u>	3,73	4,86	4,06 (11,7%)
<u>85a</u>	4,81	6,47	4,94 (12,6%)
<u>8a</u>	5,96	8,17	6,27 (75,5%)

CCD:

(Silicagel, EP-benceno, 1:1, 4 desarrollos)

14a R_f 0,57 84a R_f 0,45 85a R_f 0,45 8a R_f 0,45

Manchas rojas con anisaldehído/H₂SO₄-AcOH

Esteroles 86 y 87

CGL (t_r , min): OV-17, 260°, isot.

estigmasterol 86: 11,23 (86,8%)

sitosterol 87: 12,60 (13,0%)

CCD:

(Silicagel, HCCl_3 , dos desarrollos) R_f 0,39

Revela violeta con anisaldehído/ H_2SO_4 -AcOH

Cleanolato de metilo 49a

E.M. m/e (%): 470 (M^+ , 5), 455 (M-15, 0,6), 452 (M- H_2O , 1,2), 438 (M-MeOH, 1), 411 (M-COOMe, 4), 410 (M-HCOOMe, 4), 395 (M-HCOOMe-15, 1,1), 378 (M-COOMe-15- H_2O , 0,4), 377 (M-HCOOMe- H_2O , 0,3), 262 (RDA, anillos D y E, 66), 249 (anillos D y E, 8), 248 (5), 247 (262-15, 9), 243 (3), 241 (4), 234 (3), 233 (4), 220 (5), 215 (5), 207 (anillos A y B, 12), 204 (21), 203 (262-COOMe, 100), 190 (22), 189 (203-14 y 207- H_2O , 28), 175 (10), 133 (anillo D, 21), 119 (16), 105 (14), 95 (17), 93 (10), 91 (6), 81 (10), 79 (7), 69 (18), 67 (8), 55 (10), 43 (7).

Derivado acetilado de 49a:

p.f.: 221-224° (MeOH- H_2O) (Lit.: 223°)¹⁸⁰

^1H -RMN (100 MHz, DCCl_3) ppm: 0,72 (s, 3H, Me-26), 0,86 (s, 6H, Me-23 y 24), 0,89 y 0,93 (s, 3H y 6H, Me-25,29 y 30), 1,12 (s, 3H, Me-27), 2,05 (s, 3H, MeCOO-), 3,63 (s, 3H, -COOMe), 4,45 (m, 1H, H-3), 5,28 (m, 1H, H-12).

CGL(t_r , min)	(condiciones isotérmicas)	
	QF-1 290°	OV-17 280°
<u>49a</u>	6,00	9,32
<u>49a</u> acetilado	6,88	10,55

CCD:

49a R_f : 0,35 (silicagel, EP-AcOEt, 30:4)

49a acetilado R_f : 0,44 (silicagel, EP-AcOEt, 30:1,5)
Revelan violeta con anisaldehído/ H_2SO_4 -AcOH

ESTUDIO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE WEDELIA BUPHTHALMIFLORA

11,2 g de este extracto se sembraron en una columna de silicagel H (88 g) que se eluyó con $HCCl_3$, $HCCl_3$ -MeOH, $HCCl_3$ -MeOH- H_2O y MeOH sucesivamente, obteniéndose las siguientes fracciones:

N°	masa (mg)	
1	2300	Compuestos terpénicos
2	1970	Glicósido <u>89</u>
3	2790	Glicósidos <u>89</u> y <u>90</u>
4	3180	Glicósido <u>90</u> y productos polares, KCl
5	230	Productos polares KCl

Fracción 1: Contenia gran variedad de compuestos, en parte los ya encontrados en el extracto de éter de petróleo y otros en muy pequeña cantidad que no fueron analizados.

Fracción 2: Una porción fue cromatografiada en una columna de silicagel H eluyendo con $HCCl_3$ -MeOH-AcOH- H_2O , 180:27:4,5:3, y la fracción principal metilada con diazometano en éter, usando metanol como cosolvente. Este producto fue purificado por CC con solvente de elución $HCCl_3$ -MeOH, 30:2,

obteniéndose 30 mg de glicósido 89 metilado (89a), como un aceite que cristaliza en agujas con el tiempo.

Fracción 3: Contenía el glicósido 89 y otra sustancia en mayor proporción que se llamó glicósido 90.

Fracción 4: Una porción de esta mezcla fue metilada con diazometano en éter-metanol; el producto principal fue purificado por dos columnas sucesivas de silicagel H usando primero como solvente de elución HCCl_3 -MeOH (gradiente desde 30:3 hasta 30:7), y luego HCCl_3 -MeOH- H_2O desde 150:16:1,5 hasta 150:30:2, aislándose 194 mg de glicósido 90 metilado (90a), como un aceite incoloro.

Fracción 5: Contenía KCl, azúcares libres, aminoácidos y otros productos polares que no fueron estudiados.

Datos de los compuestos aislados del extracto etanólico de
W. buphthalmiflora

Ester dimetílico del ácido oleanólico-3-O- β -(3'-O- α -L-ramno-
piranosil)-D-glucuronopiranosido 89a

p.f.: 189-192° (MeOH- H_2O) (Lit.: 185-190°)²⁰⁹

$[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ (c 0,2, MeOH)

I.R. (KBr) cm^{-1} : 3370 (tens. O-H), 2870 (tens. C-H), 1740 (tens. C=O), 1630 (tens. C=C), 1440 y 1370 (def. C-H), 1000 (tens. C-O), 860 y 760 (def. =CH).

^1H -RMN (100 MHz, derivado trimetilsililado, DCCl_3) ppm:
0,75 (s, 3H, Me-26), 0,82 (s, 3H, Me-24), 0,94 y 0,92 (dos sa, 12H, Me-23,25,29,30), 1,15 (s, 3H, Me-27), 3,64 (s, 3H, COOMe, ác. oleanólico), 3,80 (s, 3H, COOMe, ác. glucurónico), 3,5-4,1

($\underline{\text{CH}}\text{-OH}$ de los azúcares), 4,52 (m, 1H, H-1'),
5,11 (d, J=2 Hz, 1H, H-1"), 5,30 (ma, 1H, H-12).

^{13}C -RMN (20,15 MHz, piridina- d_5) ppm: 15,3 (C-25), 16,7
(C-24), 17,0 (C-26), 18,3 (C-6 y 6"), 23,5
(C-11,16 y 30), 26,0 (C-27), 26,3 (C-2), 27,9
(C-15 y 23), 30,6 (C-20), 33,0 (C-7,22 y 29),
33,8 (C-21), 36,8 (C-10), 38,4 (C-4), 39,3
(C-1), 39,5 (C-8), 41,8 (C-14 y 18), 46,0
(C-19), 46,8 (C-17), 47,7 (C-9), 51,6
(COOMe , aglicona), 52,1 (COOMe , ác. glucurónico),
55,6 (C-5), 69,6 (C-5"), 71,2 (C-4'), 72,1
(C-2"), 72,4 (C-3"), 73,8 (C-4"), 75,4
(C-2'), 76,8 (C-5'), 82,0 (C-3'), 89,3
(C-3), 102,6 (C-1"), 106,7 (C-1'), 144,0
(C-13), 170,5 (C-6'), 178,0 (C-28).

E.M. m/e (%): 470 (A^+ , 6), 468 (5), 453 (A-OH, 7), 452
(A- H_2O , 9), 410 (A-HCOOMe, 5), 409 (5), 393
(453-HCOOMe, 6), 319 (6), 283 (5), 281 (6),
263 (18), 262 (RDA, anillos D y E, 70), 257 (6),
249 (262-13, 11), 248 (7), 247 (262-15, 8),
233 (6), 231 (8), 219 (5), 215 (8), 213 (5),
208 (10), 207 (anillos A y B, 9), 203 (262-
-COOMe, 100), 189 (203-14 y 207- H_2O), 175 (12),
173 (13), 133 (anillo D, 27), 131 (26), 119
(31), 105 (32), 95 (36), 93 (30), 91 (28),
81 (34), 79 (15), 69 (68), 57 (30), 55 (44),
43 (75).

E.M. m/e (%), derivado trimetilsililado: 540 (0,9), 528
(0,8), 527 (A-H+TMS-15, 1,8), 470 (A^+ , 0,4),
469 (A-H, 1,2), 468 (2,6), 467 (7), 453 (A-
-OH, 42,8), 452 (A- H_2O , 13), 393 (10), 364
(24), 363 (ramnosa terminal TMS, 73,5), 291

(4), 273 (363-TMSOH, 15), 262 (RDA, anillos D y E, 40), 249 (262-13, 7), 217 (51), 204 (100), 203 (262-COOMe, 44), 189 (203-14, 20), 147 (16), 137 (14), 117 (17), 95 (16), 73 (64).

Ester metílico del 28-β-D-glucopiranosil éster de ácido oleanólico-3-O-β-(3'-O-α-L-ranopiranosil)-D-glucuronopiranosido 90a

p.f.: 234-237° (MeOH-H₂O) (Lit.: 190-194° (?))²⁰⁹

$[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ (c 0,25, MeOH)

¹H-RMN (100 MHz, DCCl₃): 0,78 (s, 3H, Me-26), 0,82 (s, 3H, Me-24), 0,92 (sa, 12H, Me-23,25,29 y 30), 1,12 (sa, 3H, Me-27), 3,4-4,1 (CH-OH de los azúcares), 3,80 (s, 3H, COOMe del ác. glucurónico), 4,48 (m, 1H, H-1'), 5,14 (sa, 1H, H-1"), 5,33 (m, 1H, H-12), 5,60 (da, J=6 Hz, 1H, H-1''').

¹³C-RMN (20,15 MHz, piridina-d₅) ppm: 15,3 (C-25), 16,6 (C-24), 17,2 (C-26), 18,1 (C-6 y 6"), 23,4 (C-11,16 y 30), 25,9 (C-2 y 27), 27,9 (C-15 y 23), 30,5 (C-20), 31,9 (C-22), 32,9 (C-7, 21 y 29), 36,6 (C-10), 38,5 (C-4), 39,1 (C-1), 39,6 (C-8), 41,5* (C-18), 41,8* (C-14), 46,7 (C-17 y 19), 47,7 (C-9), 52,1 (COOMe, ác. glucurónico), 55,6 (C-5), 61,8 (C-6'''), 69,5 (C-5"), 70,7 (C-4'''), 71,0 (C-4'), 72,0 (C-2" y 3"), 73,5 (C-2''' y 4"), 75,2 (C-2'), 76,5 (C-5'), 78,2 y 78,6 (C-3''' y 5'''), 81,9 (C-3'), 89,3 (C-3), 95,4 (C-1'''), 102,3 (C-1"), 106,5 (C-1'), 143,8 (C-13), 170,3 (C-6'), 176,4 (C-28).

* Las asignaciones pueden intercambiarse.

E.M. m/e (%): 456 (A⁺, 3,6), 439 (A-OH, 4), 438 (A-H₂O, 5,4), 423 (A-15-H₂O, 2), 397 (2), 395 (A-HCOOH-15, 2), 393 (A-HCOOH-18, 1,4), 302 (4), 301 (5), 262 (11), 249 (53), 248 (RDA, anillos D y E, 100), 235 (anillos D y E, 7), 234 (8), 233 (248-15, 17), 220 (6), 219 (12), 207 (anillos A y B, 48), 204 (40), 203 (248-COOH, 85), 190 (50), 189 (203-14 y 207-H₂O, 42), 175 (20), 163 (17), 147 (22), 135 (20), 133 (35), 128 (45), 119 (25), 109 (18), 107 (21), 105 (22), 95 (33), 93 (20), 85 (22), 81 (34), 74 (30), 60 (49), 57 (45), 55 (35), 44 (57), 43 (63).

Hidrólisis alcalina de 90a

180 mg de glicósido 90a fueron tratados con 20 ml de NH₃ (c) durante 2 hs, en tubo cerrado a 100°, eliminándose el exceso de amoníaco por evaporación a presión reducida por arrastre con isopropanol. El residuo se acidificó con H₂SO₄ 1:5, y se extrajo con BuOH 2 veces, lavándose la fase orgánica con agua hasta neutralidad, y se evaporó el solvente. El producto fue metilado con diazometano etéreo en metanol y purificado por una columna de silicagel con tolueno-EtOH, 20:4, como solvente de elución (110 mg, rendimiento: 73%). Se recrystalizó de MeOH-H₂O obteniéndose 88 mg de glicósido 89a (CCD, p.f., p.f.m.).

Reducción de 90a

150 mg de glicósido 90a fueron tratados con H₄LiAl en exceso, en THF a reflujo durante 16 hs, destruyéndose el

exceso de reactivo por tratamiento sucesivo con AcOEt húmedo, EtOH 96% y agua. A continuación se acidificó con H₂SO₄ 1:5, en frío, y se extrajo con BuOH; se lavó la fase orgánica con agua hasta neutralidad y se evaporó el solvente. El producto se purificó por una columna de silicagel H, usando como solvente de elución tolueno-EtOH, 20:4, obteniéndose 71 mg de glicósido 92, eritrodíol-3-O-β-(3'-O-α-L-ramnopiranosil)-D-glucopiranosido (rendimiento: 60%).

Eritrodíol-3-O-β-(3'-O-α-L-ramnopiranosil)-D-glucopiranosido 92

$$[\alpha]_D^{20} = +4^\circ (c\ 0,43, \text{EtOH})$$

¹³C-RMN (20,15 MHz, piridina-d₅) ppm: 15,6 (C-25), 16,3 (C-24,26), 18,2 (C-6"), 18,5 (C-6), 22,6 (C-16), 23,8 (C-11,30), 26,1 (C-15,27), 26,4 (C-2), 28,0 (C-23), 31,1 (C-20), 31,7 (C-22), 32,8 (C-7), 33,3 (C-29), 34,5 (C-21), 36,7 (C-10), 37,5 (C-17), 38,7 (C-4), 39,3 (C-1), 40,0 (C-8), 41,9 (C-14), 42,7 (C-18), 47,0 (C-19), 47,8 (C-9), 55,6 (C-5), 62,6 (C-6'), 68,6 (C-28), 69,8 (C-4',5"), 72,4 (C-2",3"), 73,9 (C-4"), 75,8 (C-2'), 77,9 (C-5'), 83,8 (C-3'), 89,0 (C-3), 102,8 (C-1"), 106,4 (C-1'), 145,0 (C-13).

Propiedades cromatográficas de 89, 90, 92, 89a y 90a

CCD:

(Silicagel, HCCl₃-MeOH-AcOH-H₂O, 30:8:1,5:1):
89 R_f 0,51 90 R_f 0,24

(Silicagel, tolueno-EtOH, 20:7):
89a R_f 0,45 90a R_f 0,15 92 R_f 0,31

Estudio químico de los glicósidos 89a, 90a y 92

Hidrólisis ácida de 90a

a) 30 mg de glicósido 90a fueron hidrolizados con H_2SO_4 7% a 100° durante 3 hs. La aglicona fue extraída con cloroformo e identificada como ácido oleanólico; la solución acuosa resultante fue neutralizada con $BaCO_3$, filtrada y tratada con una resina ácida fuerte en forma H^+ , siendo posteriormente concentrada y analizada por CCD de silicagel con $HCCl_3$ -MeOH-AcOH- H_2O , 35:15:1,5:2, y revelada con naftoresorcinol/ H_2SO_4 ¹⁷¹:

CCD:

ramnosa R_f 0,73 (amarillo)
 hexosa R_f 0,53 (gris-rosado)
 ácido urónico R_f 0,20 (gris-rosado)
 productos de descomposición del ácido urónico $R_f > 0,80$.

Acido oleanólico 49

E.M. m/e (%): 456 (M^+ , 8), 438 ($M-H_2O$, 5), 423 ($M-H_2O-15$, 3), 411 ($M-COOH$, 1,5), 410 ($M-HCOOH$, 2), 396 (1), 395 (410 -15, 2), 393 (411-18, 1), 377 ($M-HCOOH-18-15$, 1), 302 (3), 300 (3), 257 (3), 249 (60), 248 (RDA, anillos D y E, 100), 235 (248-13, 6), 234 (7), 233 (248-15, 23), 220 (8), 219 (12), 207 (anillos A y B, 55), 204 (48), 203 (248-COOH, 85), 190 (33), 189 (203-14 y 207- H_2O , 38), 175 (26), 163 (10), 161 (11), 147 (20), 145 (10), 135 (20), 133 (43), 131 (12), 121 (23), 119 (35), 109 (20), 107 (30), 105 (28), 95 (35), 93 (27), 91 (11), 81 (38), 69 (50), 67 (15), 55 (18).

Derivado metilado 49a:

p.f.: 198-201° (MeOH-H₂O)

$[\alpha]_D^{20} = +70^\circ$ (c 0,5, HCCl₃) (Lit.: +75°)¹⁸⁰

CCD:

(silicagel, EP-AcOEt, 30:1,5) R_f 0,15

Derivado metilado y acetilado:

CGL (t_r, min):

QF-1, 290°, isot.: 4,03

OV-17, 280°, isot.: 9,30

CCD:

(silicagel, EP-AcOEt, 30:1,5) R_f 0,44

- b) Otra porción fue hidrolizada en forma similar, pero tras la neutralización con BaCO₃ se trató con una resina ácida fuerte y luego otra básica débil. La solución resultante fue analizada por CCD de celulosa con BuOH-piridina-H₂O, 6:4:3, (dos desarrollos), dando ramnosa y glucosa. La columna de resina básica fue eluida con ácido sulfúrico al 7%, la solución neutralizada con BaCO₃ y tratada nuevamente con resina ácida fuerte en forma H⁺. El eluido de esta columna dio por CCD en celulosa en las condiciones anteriores ácido glucurónico.

Hidrólisis básica de 90a

15 mg de 90a fueron hidrolizados con 2 ml de NH₃ (c) a 100°, 1 h; el NH₃ fue evaporado, la solución fue acidificada y el glicósido 89 formado fue extraído con BuOH. La solución acuosa fue tratada sucesivamente con resina ácida

fuerte y básica debil, determinándose glucosa por CCD en celulosa (BuOH-piridina-H₂O, 6:4:3, dos desrrollos).

Hidrólisis ácida de 89a

Se efectuó como se indica para el glicósido 90a, técnica b) (pág. 229), obteniéndose únicamente ramnosa entre los azúcares neutros y ácido glucurónico entre los ácidos; y como aglicona el éster metílico del ácido oleanólico 49a.

Oleanolato de metilo 49a

p.f.: 200-202° (MeOH-H₂O)

CCD:

(Silicagel, HCCl₃-MeOH, 30:1) R_f 0,80

Derivado acetilado:

p.f.: 222-223° (MeOH-H₂O)

CGL (t_r, min):

QF-1, 290°, isot.: 4,03

OV-17, 280°, isot.: 9,30

CCD:

(Silicagel, EP-AcOEt, 30:1,5) R_f 0,44

Hidrólisis ácida de 92

El producto de reducción 92 fue hidrolizado como se indica en b) (pág. 229) dando glucosa y ramnosa por CCD de celulosa y por CGL de los alditoles acetilados.

CGL (t_r, min):

	ECNSS-3% 180° isot.
Alditol acetilado de ramnosa	3,03
Alditol acetilado de glucosa	21,80

La aglicona resultó, por CCD y CGL, igual a eritrodiol 93 obtenido por reducción de oleanolato de metilo con $H_4LiAl/éter$.

CGL (t_R , min):

SE-30, 290°, isot.: 4,20

CCD:

(Silicagel, EP-AcOEt, 30:7) R_f 0,60

Revela violeta con anisaldehído/ H_2SO_4 -AcOH

Propiedades cromatográficas de los azúcares

CCD:

(Celulosa, BuOH-piridina- H_2O , 6:4:3, dos desarrollos)

	R_f
ramnosa	0,72
glucosa	0,44
ácido glucurónico	0,25

Revelador: $AgNO_3$ en acetona, luego NaOH 2% en $EtOH-H_2O$, 1:1 y calefacción a 100° durante 10 min.

Metilación de 92 por el método de Hakomori y análisis de los azúcares metilados

15 mg de 92 fueron disueltos en 0,7 ml de DMSO anhidro y tratados con 0,7 ml de metanosulfinilcarbanión en DMSO por 1 h a 60°. Se agregó luego 1 ml de MeI y se dejó a temp.

ambiente durante 12 hs. Al cabo de ese tiempo, se volcó sobre H_2O (5 ml) y se extrajo con cloroformo dos veces. La fase orgánica se lavó con agua 3 veces, se secó con Na_2SO_4 anh. y se evaporó a sequedad a presión reducida para eliminar el I_2 .

Se obtuvo un único producto principal de R_f 0,56 (silicagel, tolueno-EtOH, 20:4), que fue purificado por una columna de silicagel H usando tolueno-AcOEt 4:1 como solvente de elución.

El producto metilado fue hidrolizado a continuación con 0,25 ml de ácido acético y 1 ml de mezcla de Kiliani¹³³ (AcOH-HCl (c)- H_2O , 35:15:50) a 80° durante 16 hs en tubo cerrado. Se añadió metanol para solubilizar los productos formados y se trató con una resina básica débil (forma amino) en MeOH. El eluido fue evaporado y utilizado para analizar los azúcares metilados por CCD de silicagel con testigos auténticos.

CCD:

(Silicagel, tolueno-EtOH, 20:7)

	R_f
2,3,4-tri-O-metilramnosa	0,74
3,4,6-tri-O-metilglucosa	0,40
2,4,6-tri-O-metilglucosa	0,35
azúcares metilados de <u>92</u>	0,74 y 0,35

Los testigos de 2,3,4-tri-O-metilramnosa y 3,4,6-tri-O-metilglucosa fueron obtenidos por metilación e hidrólisis, en las condiciones antes descriptas, de pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido²¹⁷

Metilación de 89a y análisis de los azúcares metilados

10 mg de 89a fueron disueltos en 0,5 ml de DMSO y tratados con 0,5 ml de metanosulfinilcarbanión en DMSO durante 2 hs a temp. ambiente. Se agregó 0,6 ml de MeI y se dejó reaccionar 2 hs. El producto metilado fue aislado como se mencionó anteriormente y reducido durante una noche con H_4LiAl en THF a

reflujo. El producto de reducción fue aislado como se indicó en la obtención de 92 (pág. 226) y se hidrolizó como ya se ha descrito. Los azúcares metilados fueron separados por CC de silicagel H con tolueno-EtOH 20:3 y analizados por CCD de alta resolución de silicagel (HPTLC, Merck), encontrándose 2,3,4 tri-O-metilramnosa y 2,4-di-O-metilglucosa.

CCD:

(Silicagel HPTLC, tolueno-EtOH, 20:13)

	R_f
2,4-di-O-metilglucosa	0,45
3,4-di-O-metilglucosa	0,50
2,3,4-tri-O-metilramnosa	0,90

La 2,4-di-O-metilglucosa fue reducida y acetilada, obteniéndose el correspondiente alditol acetilado que fue caracterizado por CGL con un testigo auténtico.

CGL (t_r , min):

ECNSS-3%, 170°, isot.: 13,36 (t_g 5,26)

(t_g : t_r relativo a la 2,3,4,6-tetrametilglucosa)

Determinación de KCl

La sal que precipitó al concentrar el extracto etanólico dio un precipitado blanco con $AgNO_3$, que se disolvía en NH_3 (c); y daba color violáceo a la llama, indicando que era KCl. Se confirmó por CCD de celulosa, revelando con $AgNO_3$ en acetona y luego NaOH al 2% en etanol-agua.

CCD:

(Celulosa, BuOH-EtOH, 4:1)

	R_f
KCl	0,26
NaCl	0,50

Manchas blancas sobre fondo marrón oscuro.

ESTUDIO QUIMICO DE WEDELIA GLAUCA

970 g de planta molida y seca fueron extraídos sucesivamente en un Soxhlet con éter de petróleo (60-80°) (40,0 g de extracto, 4,1%) y con metanol (125,8 g, 12,9%).

ESTUDIO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO DE W. GLAUCA

1,04 g de este extracto fueron cromatografiados en una columna de silicagel H (20 g), usando un gradiente de acetato de etilo en éter de petróleo hasta acetato de etilo puro. Se obtuvieron las siguientes fracciones:

N°	mg	
1	23	Hidrocarburos
2	465	Acetato de β -amirina <u>78</u> , ácido kaurénico <u>9</u>
3	205	Esteres del ácido 15- α -hidroxikaurénico <u>84</u> y <u>85</u> .
4	157	Ester del ácido 15- α -hidroxikaurénico <u>13</u>
5	162	Productos polares.

Fracción 1: Estaba constituida fundamentalmente por hidrocarburos que fueron analizados por CGL por comparación con los ya obtenidos de *W. buphthalmiflora*.

Fracción 2: Contenia acetato de β -amirina 78 y ácido kaurénico 9, como producto principal. El acetato de β -amirina fue aislado de una porción de esta fracción por medio de una columna de silicagel H con EP-tolueno, 2:1, y comparado con un testigo auténtico. El ácido kaurénico 9 fue recristalizado de etanol, metilado y comparado con el aislado de *W. buphthalmiflora*.

Fracción 3: Fue metilada y purificada por CC de silicagel H con EP-AcOEt, 60:1, obteniéndose 15- α -isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 84a y 15- α -isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 85a como una mezcla inseparable.

Fracción 4: Se metiló y purificó por una columna de silicagel H con EP-AcOEt, 60:1, obteniéndose 15- α -cinamoiloxi-*-ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo 13a.

Fracción 5: Estaba formada por los componentes polares del extracto y no fue estudiada.

Datos de los compuestos aislados del extracto de éter de petróleo de *W. glauca*

Hidrocarburos

Se analizaron por CGL utilizando una columna OV-17 a 220°, en condiciones isotérmicas.

T_r (fórmula, %) min: 1,12 ($n-C_{22}H_{46}$, 1,8), 1,48 ($n-C_{23}H_{48}$, 0,8), 1,92 ($n-C_{24}H_{50}$, 0,7), 2,55 ($n-C_{25}H_{52}$, 9,3), 3,43 ($n-C_{26}H_{54}$, 1,9), 4,54 ($n-C_{27}H_{56}$, 18,2), 6,22 ($n-C_{28}H_{58}$, 6,0), 8,39 ($n-C_{29}H_{60}$, 30,6), 11,37 ($n-C_{30}H_{62}$, 3,3), 15,40 ($n-C_{31}H_{64}$, 20,5).
Coeficiente de correlación ($\ln t_r$ vs. N°de C): 0,9997

Acetato de β -amirina 78

CGL (t_r , min):

OV-101, 260°, isot.: 8,14

CCD:

(Silicagel, EP-tolueno, 1:1) R_f 0,60

Ent-kaur-16-en-19-oato de metilo 9a

CGL (t_r , min):

OV-101, 150°, isot.: 4,96

CCD:

(Silicagel, EP-tolueno, 2:1) R_f 0,75

15- α -isobutiroiloxi-ent-kaur-16-en-19-oato de metilo 84a y
15- α -isovaleroiloxi-ent-kaur-16-en-19-oato de metilo 85a

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, DCCl_3 , las asignaciones corresponden a 85a)
 ppm: 0,83 (s, 3H, Me-20), 0,96 (d, $J=7$ Hz, 6H,
 Me-4' y 5'), 1,16 (s, 3H, Me-18), 2,2 (m, 2H,
 H-2'), 2,76 (m, 1H, H-13), 3,64 (s, 3H, COOMe),
 5,07 (sa, 2H, H-17 y 17'), 5,25 (sa, 1H, H-15).

CGL (t_r , min):

OV-17, 230°, isot.: 84a 7,29 (4,8%)
85a 9,88 (95,2%)

CCD:

(Silicagel, EP-AcOEt, 30:2) R_f 0,65

15- α -cinamoiloxi-ent-kaur-16-en-19-oato de metilo 13a

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, DCCl_3) ppm: 0,87 (s, 3H, Me-20), 1,16
 (s, 3H, Me-18), 2,84 (m, 1H, H-13), 3,67 (s,
 3H, COOMe), 5,16 (sa, 2H, H-17 y 17'), 5,42
 (sa, 1H, H-15), 6,48 (d, 1H, $J=15,2$ Hz, H-2'),
 7,2-7,6 (m, 5H, anillo aromático), 7,70 (d,
 1H, $J=15,2$ Hz, H-3').

ESTUDIO DEL EXTRACTO METANOLICO DE W. GLAUCA

Se sembraron 20,1 g de extracto en una columna de
 100 g de silicagel H y se cromatografiaron usando un gradiente
 de metanol en cloroformo, comenzando con HCCl_3 -MeOH, 80:20,
 hasta llegar a metanol puro. Se obtuvieron las siguientes
 fracciones:

N°	g	
1	0,08	Compuestos no polares
2	3,28	Glicósidos esteroidales <u>101</u> y <u>102</u>

3	4,41	KCl, azúcares, terpenos, comp. fenólicos
4	3,10	KCl, azúcares, terpenos, comp. fenólicos, atractilósido <u>59</u>
5	8,60	KCl

Fracción 1: Estaba formada por compuestos no polares que no fueron analizados.

Fracción 2: Una porción fue cromatografiada en columna de silicagel H con un gradiente de etanol en cloroformo desde HCCl_3 -EtOH, 30:3 hasta 30:15, obteniéndose de la fracción principal un producto muy difícilmente soluble en los distintos solventes orgánicos comunes ensayados, que fue recristalizado de una gran cantidad de etanol dando una mezcla de sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido y estigmasterol-3-O- β -D-glucopiranosido (101 y 102 respectivamente) (24 mg).

Fracción 3: Contenía KCl, azúcares, pequeña cantidad de compuestos terpénicos y fenólicos, todos muy polares.

Fracción 4: Resultó similar en su composición a la fracción 3, pero además poseía un compuesto terpénico muy polar. 1,0 g de esta fracción fue cromatografiado en una columna de Sephadex LH-20 (2 cm de diámetro y 22 cm de longitud, 33 g de relleno), usando metanol como único solvente de elución, recolectándose fracciones de 10 ml como se indica a continuación:

1-6	Azúcares, terpenos menores, otros productos polares	
7-23	Solvente	(660 mg)
24-32	Compuestos fenólicos, KCl	(290 mg)
33-42	Terpeno polar: atractilósido <u>59</u>	(36 mg)

Se repitió el procedimiento utilizando la misma columna hasta agotar la fracción, obteniéndose de esta manera 110 mg del terpeno polar 59, que posteriormente se identificó como atractilósido, en estado parcialmente puro. Se purificó luego por una columna de 10 gr de silicagel H eluyendo con HCCl_3 -MeOH, 10:18, dando 88 mg de 59. Para completar la purificación se

disolvió el atractilósido en agua y se reprecipitó con KCl, se filtró, se disolvió en metanol y se eliminó la sal que contaminaba el precipitado por pasaje por una columna de 10 g de Sephadex LH-20 en metanol; finalmente se recristalizó de EtOH-H₂O, 1:1. Los compuestos fenólicos de esta fracción estaban en muy pequeña proporción y no fueron estudiados.

Fracción 5: Estaba constituida por KCl únicamente.

Datos de los compuestos aislados del extracto metanólico de *W. glauca*

Sitosterol-3-O-β-D-glucopiranosido y estigmasterol-3-O-β-D-glucopiranosido 101 y 102

¹H-RMN (100 MHz, derivados trimetilsililados, DCCl₃) ppm:
 0,68 (s, 3H, Me-18 sitost.), 0,69 (s, 3H, Me-18 estigmast.), 0,78-0,88 (Me-26,27,29 y 21 de sitost. y estigmast.), 0,94 (Me-21, sitost,), 1,00 (Me-19 sitost. y estigmast y Me-21 estigmast.), 1,05 (Me-21, estigmast.), 3,0-3,8 (H-3 sitost. y estigmast., CH-OH de azúcares), 4,32 (1H, d, J=7 Hz, H-1'), 5,09 (2H, t, J=7 Hz, H-22 y 23 estigmast.), 5,3 (m, 1H, H-6 sitost. y estigmast.).

CCD:

R_f 0,38 (Silicagel, HCCl₃-EtOH-AcOH, 30:3:0,5, 2 desarrollos)

Hidrólisis ácida de 101 y 102

7 mg de la mezcla se trataron con H₂SO₄ 7% en etanol-H₂O 1:1, durante 2hs, se extrajeron las agliconas con éter etílico, se neutralizó la solución ácida y se aisló el azúcar como se indicó para 92 (pág. 230). Por CCD de celulosa se detectó glucosa (BuOH-piridina-H₂O, 6:4:3). Las agliconas fueron analizadas por CGL dando sitosterol y estigmasterol

en una relación 1,2:1.

CGL (t_r , min): OV-17, 260°, isot.: 87 sitosterol 13,50
86 estigmasterol 11,96

Atractilósido 59

$[\alpha]_D^{20} = -49^\circ$ (c 0,36, H₂O) (Lit.: -53°)¹²⁰

I.R. (KBr) cm⁻¹: 3350 (tens. O-H), 2850 (tens. C-H),
 1710 (tens. C=O), 1640 (tens. C=C), 1450 y
 1370 (def. C-H), 1250 (tens S=O), 1050 (tens.
 C-O), 1000 (tens. C-O), 910 (def. =CH₂),
 810 (tens. C-O-S).

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) ppm: 0,90 (d, J=6 Hz, 6H, Me-4" y Me-5"), 0,93 (s, 3H, Me-20), 2,1-2,3 (H-2" e H-4), 2,58 (m, 1H, H-13), 3,60 (sa, H-15, H-5' y 6'), 4,05 (t, J=8 Hz, H-4'), 4,42 (t, J=8 Hz, H-3'), 4,5-4,7 (H-1' y 2'), 4,90 y 5,10 (2sa, 2H, H-17 y 17').

¹³C-RMN (25,2 MHz, D₂O) ppm: 16,8 (C-20), 18,7 (C-11), 22,71 y 22,85 (C-4" y 5"), 25,7 (C-3"), 26,0 (C-6), 32,9 (C-12), 34,6* (C-3), 35,4* (C-7), 36,6 (C-14), 41,1 (C-10), 42,9 (C-13), 44,0 (C-4 y 2"), 47,3 (C-1), 48,1 (C-8), 49,2 (C-5), 52,9 (C-9), 61,5 (C-6'), 72,9 (C-2), 74,9** (C-2'), 75,3** (C-4' y 5'), 79,5 (C-3'), 83,2 (C-15), 99,4 (C-1'), 109,2 (C-17), 159,8 (C-16), 175,6 (C-1"), 180,4 (C-19).

*,** Las asignaciones pueden intercambiarse.

E.M. m/e (%): 302 (A-H₂O, 1), 284 (A-2H₂O, 3), 269 (A-2H₂O-15, 1,5), 267 (0,5), 257 (0,5), 256

(A-H₂O-HCOOH, 1,5), 244 (0,7), 242 (0,5);
 241 (A-H₂O-15-HCOOH, 1,6), 240 (A-17-18-COOH,
 2,2), 239 (A-2H₂O-COOH, 1,4), 238 (A- 2H₂O-
 -HCOOH, 2), 228 (1,2), 225 (1,9), 223 (A-
 -2H₂O-15-HCOOH, 3,2), 197 (3), 195 (6), 143
 (18), 127 (5), 126 (8), 119 (3), 118 (4),
 117 (4), 115 (5), 109 (4), 107 (3), 105 (5),
 98 (8), 97 (9), 91 (12), 87 (12), 85 (41),
 69 (55), 64 (20), 60 (73), 57 (68), 55 (20),
 53 (14), 48 (15), 45 (31), 44 (26), 43 (72),
 41 (100).

CCD:

(Silicagel, BuOH-AcOH-H₂O, 30:10:8) R_f 0,52
 Revela violeta con anisaldehído/H₂SO₄-AcOH

Hidrólisis ácida de atractilósido 59

1. Se hidrolizaron 5 mg de 59 con H₂SO₄ 7% durante 3 hs a 100°. La solución ácida resultante fue extraída con cloroformo, concentrada y analizada por CGL, encontrándose ácido isovalérico.

CGL (t_r, min): Porapak Q, 220°, isot.:

ácido:	t _r
isobutírico	5,73
isovalérico	10,25
n-valérico	12,11
propiónico	3,73

La fase acuosa fue analizada por CCD de celulosa como ya se describió para el glicósido 90a (parte b), pág. 229) determinándose solamente la presencia de glucosa.

2. Otra porción de 59 (3 mg) fue hidrolizada durante 3 hs con HCl 5% a 100° en tubo cerrado. Se extrajeron la aglicona y el ácido isovalérico con HCCl₃ y la solución acuosa remanente fue tratada con una resina ácida fuerte en forma H⁺, para

eliminar el potasio. Se titul6 con perclorato de bario, con torina como indicador obteni6ndose un valor de 10±1% de S respecto a la muestra inicial¹⁹³.

Hidrólisis básica de 59

Se hidrolizaron 5 mg de 59 con KOH al 20% durante 8 hs, a 100° en tubo cerrado. Se acidific6 y se extrajo la aglicona con acetato de etilo, se sec6 con Na₂SO₄ anhidro, se filtr6 y evapor6 para obtener la atractiligenina 60.

Atractiligenina 60

E.M. m/e (%): 320 (M⁺, 5,3), 303 (14), 302 (M-H₂O, 64), 287 (M-H₂O-15, 18), 284 (M-2H₂O, 17), 274 (M-HCOOH, 2,8), 273 (4), 271 (2), 270 (2), 269 (M-2H₂O-15, 9), 262 (M-58, 9), 257 (M-H₂O-COOH, 9), 256 (M-H₂O-HCOOH, 11), 255 (3), 245 (10), 244 (262-18, 15), 243 (5), 242 (5), 241 (M-H₂O-HCOOH-15, 15), 239 (M-2H₂O-COOH, 7), 238 (M-2H₂O-HCOOH, 3), 227 (7), 223 (M-2H₂O-HCOOH-15, 7), 219 (7), 213 (6), 203 (7), 199 (7), 197 (9), 195 (7), 185 (11), 183 (10), 181 (9), 173 (15), 159 (11), 157 (12), 145 (15), 143 (14), 133 (14), 131 (16), 129 (20), 107 (60), 105 (45), 95 (23), 93 (50), 91 (68), 84 (100), 81 (45), 79 (36), 71 (59), 69 (27), 67 (43), 57 (18), 55 (68), 49 (31), 43 (45), 41 (81).

Desulfatación de 59

Se hicieron reaccionar durante 24 hs 31 mg de atractil6sido con 5 ml de HCl en metanol al 1%. Se diluy6 con agua, se extrajo cuatro veces con acetato de etilo, se sec6 la fase

orgánica con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó. El producto bruto se purificó por una columna de silicagel H usando una mezcla de HCl_3 -MeOH, 10:1 como eluyente. Se obtuvieron 12,2 mg de isovaleroilatractilina 67.

CCD:

(Silicagel, HCl_3 -MeOH, 10:1, dos desarrollos) R_f 0,28

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido aislar e identificar los componentes de las plantas *Wedelia buphthalmiflora* y *Wedelia glauca* (Familia: *Compositae*), esta última, de reconocida actividad tóxica para el ganado.

En esta tesis se desarrollaron los siguientes temas:

1.- Introducción a la familia *Compositae*, en sus aspectos botánicos y taxonómicos; se describe la tribu *Heliantheae* a la cual pertenece el género *Wedelia*, del que se detallan los estudios químicos realizados y los compuestos aislados de todas las especies estudiadas hasta el momento. Se describen las características de *W. buphthalmiflora* y *W. glauca*, como así también los estudios químicos y farmacológicos realizados con la segunda.

2.- Introducción a los diterpenos tetracíclicos: se describen los esqueletos básicos y se analizan en detalle sus espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN y algunas de las rupturas en espectrometría de masas; datos que resultan de utilidad para la elucidación de las estructuras de los compuestos aislados en esta tesis.

3.- Descripción de las saponinas triterpénicas: se indican sus estructuras, modo de aislamiento y la determinación estructural por métodos químicos y espectroscópicos, que fueron usados para identificar los glicósidos aislados de ambas especies.

4.- Análisis de las características de los glicósidos diterpénicos con actividad biológica, especialmente los tóxicos.

Se detalla la acción farmacológica del atractilósido, principio activo de *W. glauca*.

5.- Discusión de los resultados obtenidos en esta tesis, correspondientes a la caracterización de los compuestos aislados de estas especies vegetales. Se indican los métodos

separativos empleados y los procedimientos de purificación aplicados en cada caso. Se analizan los espectros de I.R., ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y E.M. y los métodos químicos que condujeron a la identificación de los compuestos siguientes:

Wedelia buphthalmiflora

- a) Hidrocarburos lineales de $n\text{-C}_{21}\text{H}_{44}$ a $n\text{-C}_{32}\text{H}_{66}$.
- b) Acetato de β -amirina 78.
- c) Acido *ent*-kaur-16-en-19-oico 9.
- d) Acido *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oico 10.
- e) Alcoholes lineales de $n\text{-C}_{21}\text{H}_{44}\text{O}$ a $n\text{-C}_{28}\text{H}_{58}\text{O}$.
- f) β -amirina 48.
- g) Lupeol 82.
- h) Acido 15- α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico 14.
- i) Acido 15- α -tigloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico 8.
- j) Acido 15- α -isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico 84.
- k) Acido 15- α -isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico 85.
- l) Esteroles: estigmasterol 86 y sitosterol 87.
- m) Acido oleanólico 49.
- n) Acido oleanólico-3-O- β -(3'-O- α -L-ramnopiranosil)-D-glucuronopiranosido 89.
- ñ) 28- β -D-glucopiranosil éster del ácido oleanólico-3-O- β -(3'-O- α -L-ramnopiranosil)-D-glucuronopiranosido 90.

Wedelia glauca

Se aislaron e identificaron los compuestos 78, 9, 84, 85 y

- o) Hidrocarburos lineales de $n\text{-C}_{22}\text{H}_{46}$ a $n\text{-C}_{31}\text{H}_{64}$.
- p) Acido 15- α -cinamoiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico 13.
- q) Sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido 101 y estigmasterol-3-O- β -D-glucopiranosido 102.
- r) Atractilósido 59.

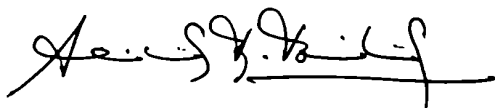
La identificación de los ésteres 84 y 85 requirió

la síntesis parcial de sus ésteres metflicos (84a y 85a) a partir del 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato de metilo obtenido por hidrólisis del compuesto 14a (éster metflico de 14).

La elucidación estructural de 89 y 90 se realizó por estudios espectroscópicos y químicos de sus ésteres metflicos 89a y 90a y del producto de reducción de 90a, 92. La confirmación de las estructuras propuestas para 89 y 90 fue realizada por análisis de los productos de metilación e hidrólisis de 89a y 92, para lo cual fue necesario sintetizar los testigos de 2,3,4-tri-O-metilramnosa y 3,4,6-tri-O-metilglucosa por metilación y posterior hidrólisis de pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido.

Se analiza brevemente en este capítulo, el significado quimiotaxonómico de los compuestos aislados y se comparan ambas especies entre sí. Se discute la toxicidad de *W. glauca* en base a los ensayos farmacológicos preliminares realizados y a la naturaleza de los compuestos aislados. Se indican además los resultados de estudios de acción antimicrobiana realizados con los extractos de éter de petróleo y etanol de *W. buphthalmiflora*.

6.- Parte experimental de la labor realizada, que incluye los datos numéricos de los espectros de los compuestos descriptos en esta tesis.



Parte de este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones:

-Terpenoids from *Wedelia buphthalmiflora*,

C.D. Schteingart y A.B. Pomilio,
Phytochemistry, 20, 2589 (1981).

-Antimicrobial Activity of some Argentine Higher Plants,

A.S. Lorenti, A.A. Viale, C.A. Buschi, M.D. González,
C.D. Schteingart, A.M. Iribarren y A.B. Pomilio,
Fitoterapia, 52, 81 (1981).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cronquist, A.; "Introducción a la botánica", Compañía Editorial Continental S.A., Mexico D.F., segunda edición, 1977.
- 2) Porter, C.L.; "Taxonomy of Flowering Plants", W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1959.
- 3) Cabrera, Angel L.; "Flora de la Provincia de Buenos Aires", Tomo IV, Parte VI, I.N.T.A., Buenos Aires, 1963.
- 4) Hegnauer, R.; "Chemotaxonomie der Pflanzen", Band 3, Birkhäuser Verlag, Basel, 1964.
- 5) Heywood, V.H., Harborne, J.B., Turner B.L.; "The Biology and Chemistry of the Compositae", volumen II, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977.
- 6) Govindachari, T.R., Nagarajan, K., Pai, B.R., Parthasarathy, P.C.; J. Chem. Soc., 545 (1957).
- 7) Bandyuková, V.A.; Rast. Resur., 4(3), 429 (1968), Chem. Abstr., 70, 17567h.
- 8) Bohlmann, F., Zdero, C.; Chem. Ber., 109(2), 791 (1976).
- 9) Aleman, E., Rosado, A., Rodriguez, M., Bertrán, J.F.; Rev. Cub. Farm., 11(1), 47 (1977), Chem. Abstr., 88, 3076g.
- 10) Bohlmann, F., Ziesche, J., King, R.M., Robinson, H.; Phytochemistry, 20, 751 (1981).
- 11) Bohlmann, F., Rosenberg, E., Robinson, H., King, R.M.; Phytochemistry, 19, 2047 (1980).
- 12) Tomassini, T.C.B., Oliveira Matos, M.E.; Phytochemistry, 18, 663 (1979).
- 13) Bohlmann, F., Ngo Le Van; Phytochemistry, 16, 579 (1977).
- 14) Peters, F.E.; Qualitas Plant. et Materiae Vegetabiles, 5, 313-43 (1959), Chem. Abstr., 54, 3769g.
- 15) Eichholzer, J.V., Lewis, I.A.S., MacLeod, J.K., Oelrichs, P.B.; Tetrahedron 37, 1881 (1981).
- 16) Burkart, A., Carera, M.N.; Darwiniana, 10, 113 (1953).
- 17) Ratera, E.L.; "Guía bibliográfica de las plantas tóxicas para el ganado en la República Argentina", Cesarini Hnos., Buenos Aires, 1973.

- 18) Giusti, L.; Revista Argentina de Agronomía, 1(3), 223 (1934).
- 19) Cabrera, A.; "Flora de la Provincia de Jujuy", Parte X, Colección Científica del I.N.T.A., Buenos Aires, 1978.
- 20) Domínguez, J.A.; Contribución a la materia médica Argentina, Primera contribución, Buenos Aires, 1928 (citado en 16)).
- 21) Oberti, J.C., Pomilio, A.B., Gros, E.G.; Phytochemistry, 19, 2051 (1980).
- 22) Ariza Espinar, L.; Boletín de la Soc. Argentina de Botánica, 20(3-4), 267 (1982).
- 23) Index Kewensis Plantarum Phanerogamarum, tomo II y suplementos, ex prelo Clarendoniano, Londres, 1921.
- 24) Burkart, A., "Flora Ilustrada de Entre Ríos", parte VI, Colección Científica del I.N.T.A., Tomo VI, Buenos Aires, 1974.
- 25) Fall, R.R., West, C.A.; J. Biol.Chem., 246, 22 (1971).
- 26) Robinson, D.R., West, C.A.; Biochemistry, 9, 80 (1970).
- 27) Hanson J.R.; "The Tetracyclic Diterpenes", Pergamon Press, Oxford, 1968.
- 28) Mann, J.; "Secondary Metabolism", Oxford University Press, Oxford, 1980.
- 29) Ohno, N., Mabry, T.J., Zabel, V., Watson, W.H.; Phytochemistry, 18, 1687 (1979).
- 30) Manchand, P.S., White, J.D., Wright, H, Clardy, J.; J. Am. Chem. Soc., 95, 2705 (1973).
- 31) Hasan, C.M., Healey, T.M., Waterman, P.G.; Phytochemistry, 21, 177 (1982).
- 32) Mc Crindle, R., Martin, A., Murray, R.D.H.; J. Chem. Soc. (C), 2349 (1968).
- 33) St. Pyrek, J.; Tetrahedron, 26, 5029 (1970).
- 34) Henrick, C.A., Jefferies, P.R.; Aust. J. Chem., 17, 915 (1964).
- 35) Jefferies, P.R., Rosich, R.S., White, D.E.; Tetrahedron Letters, 1793 (1963).
- 36) Piozzi, F., Passannanti, S., Marino, M.L., Sprio, V.;

- Canad. J. Chem., 50, 109 (1972).
- 37) Pinar, M., Rodríguez, B., Alemany, A; Phytochemistry, 17, 1637 (1978).
- 38) Bohlmann, F., Zdero, C., Mahanta, P.; Phytochemistry, 16, 1073 (1977).
- 39) Bjeldanes, L.F., Geissman, T.A.; Phytochemistry, 11, 327 (1972).
- 40) Kapadi, A.H., Sobti, R.R., Dev, S.; Tetrahedron Letters, 2729 (1965).
- 41) Bohlmann, F., Ngo Le Van; Phytochemistry, 17, 1957 (1978).
- 42) Cannon, J.R., Chow, P.W., Jefferies, P.R., Meehan, G.V.; Aust. J. Chem., 19, 861 (1966).
- 43) Von Carstenn-Lichterfelde, C., Pascual, C., Rabanal, R., Rodríguez, B., Valverde, S.; Tetrahedron, 33, 1989 (1977).
- 44) Breitmaier, E., Voelter, W., "¹³C-NMR Spectroscopy", Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1974.
- 45) Yamasaki, K., Kohda, H., Kobayashi, T., Kasai, R., Tanaka, O.; Tetrahedron Letters, 1005 (1976).
- 46) Rodríguez, B., Alemany, A., Pinar, M.; Tetrahedron Letters, 3069 (1978).
- 47) Beierbeck, H., Saunders, J.K.; Canad. J. Chem., 54, 2985 (1976).
- 48) Von Carstenn-Lichterfelde, C., Pascual, C., Pons, J.; Tetrahedron Letters, 3569 (1975).
- 49) Beierbeck, H., Saunders, J.K., ApSimon, J.W.; Canad. J. Chem., 55, 2813 (1977).
- 50) Rodríguez González, B.; Anales de Química (Real Soc. Española de Fís. y Quím.), 67, 74 (1971).
- 51) Danieli, B., Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B.; Phytochemistry, 11, 3501 (1972).
- 52) Lewis, F.A.S., MacLeod, J.K., Oelrichs, P.B.; Tetrahedron, 37, 4305 (1981).
- 53) Obermann, H., Spiteller, G., Hoyer, G.A.; Chem. Ber., 109, 3450 (1976).

- 54) Chandel, R.S., Rastogi, R.P.; *Phytochemistry*, 19, 1889 (1980).
- 55) Agarwal, S.K., Rastogi, R.P.; *Phytochemistry*, 13, 2623 (1974).
- 56) Basu, N., Rastogi, R.P.; *Phytochemistry*, 6, 1249 (1967).
- 57) Lin, T.; *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)*, 26(1), 29 (1979), *Chem. Abstr.*, 91, 154.259g
- 58) Barua, A.K., Chakravarti, S., Basak, A., Ghosh, A., Chakravarti, P.; *Phytochemistry*, 15, 831 (1976).
- 59) Kochetkov, N.K., Khorlin, A.J., Vaskovsky, V.E.; *Tetrahedron Letters*, 713 (1962).
- 60) Ogihara, Y., Inoue, O., Otsuka, H., Kawai, K., Tanimura, T., Shibata, S.; *J. Chromatography*, 128, 218 (1976).
- 61) Hostettmann, K., Hostettmann-Kaldas, M., Nakanishi, K.; *J. Chromatography*, 170, 355 (1979).
- 62) Tanimura, T., Pisano, J., Ito, Y., Bowman, R.; *Science*, 169, 54 (1971).
- 63) Nakanishi, T., Terai, H., Nasu, M., Miura, I., Yoneda, K.; *Phytochemistry*, 21, 1373 (1982).
- 64) Higuchi, R., Kawasaki, T., Biswas, M., Pandey, V., Dasgupta, B.; *Phytochemistry*, 21, 907 (1982).
- 65) Budzikiewicz, H., Wilson, J.M., Djerassi, C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3688 (1963).
- 66) Ogunkoya, L.; *Phytochemistry*, 20, 121 (1981).
- 67) Tursch, B., Savoie, R., Ottinger, R., Chiurdoglu, G.; *Tetrahedron Letters*, 539 (1967).
- 68) Cheung, H.T., Williamson, D.G.; *Tetrahedron*, 25, 119 (1969).
- 69) Wilson, R.G., Williams, D.H.; *Tetrahedron*, 25, 155 (1969).
- 70) Tori, K., Seo, S., Shimaoka, A., Tomita, Y.; *Tetrahedron Letters*, 4227 (1974).
- 71) Tomita, Y., Seo, S., Tori, K.; *Tetrahedron Letters*, 7 (1975).
- 72) Liu, H., Nakanishi, K.; *Tetrahedron*, 38, 513 (1982).

- 73) Kuhn, R., Trischmann, H., Löw, I.; *Angew. Chemie*, 67, 32 (1955).
- 74) Hakomori, S.; *J. Biochem. (Tokio)*, 55, 205 (1964).
- 75) Prehm, P.; *Carbohyd. Res.*, 78, 372 (1980).
- 76) Lönngren, J., Pilotti, Å.; *Acta Chem. Scand.*, 25, 1144 (1971).
- 77) Björndal, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B., Svensson, S.; *Angew. Chemie, Internat. Edit.*, 9, 610 (1970).
- 78) Klyne, W.; *Biochem. J.*, 47, xli (1950).
- 79) Mahato, S.B., Ganguly, A.N., Sahu, N.P.; *Phytochemistry*, 21, 959 (1982).
- 80) Schulten, H., Komori, T., Kawasaki, T.; *Tetrahedron*, 33, 2595 (1977).
- 81) Schulten, H., Komori, T., Nohara, T., Higuchi, R., Kawasaki, T.; *Tetrahedron*, 34, 1003 (1978).
- 82) Higuchi, R., Komori, T., Kawasaki, T.; *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 2610 (1976).
- 83) Schels, H., Zinmeister, H.D., Pflieger, K.; *Phytochemistry*, 16, 1019 (1977).
- 84) Schels, H., Zinmeister, H.D., Pflieger, K.; *Phytochemistry*, 17, 523 (1978).
- 85) Singh, S.B., Thakur, R.S.; *Phytochemistry*, 21, 911 (1982).
- 86) Dzizenko, A.K., Isakov, V.V., Uvarova, N.I., Oshitok, G.I., Elyakov, G.B.; *Carbohyd. Res.* 27, 249 (1973).
- 87) Lemieux, R.U., Kullnig, R.K., Bernstein, H.J., Schneider, W.G.; *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 6098 (1958).
- 88) Capon, B., Thacker, D.; *Proceedings of The Chemical Society (London)*, 369 (1964).
- 89) Kasai, R., Okihara, M., Asakawa, J., Mizutani, K., Tanaka, O.; *Tetrahedron*, 35, 1427 (1979).
- 90) Tsuyuki, T., Hamada, H., Honda, T., Takahashi, T., Matsushita, K.; *Bull. Chem. Soc. Japan*, 52, 3127 (1979).
- 91) Tori, K., Yoshimura, Y., Seo, S., Sakurawi, K., Tomita, Y., Ishii, H.; *Tetrahedron Letters*, 4163 (1976).

- 92) Seo, S., Tomita, Y., Tori, K., Yoshimura, Y.; J. Am. Chem. Soc., 100, 3331 (1978), errata: J. Am. Chem. Soc., 102, 2512 (1980).
- 93) Dorman, D.E., Roberts, J.D.; J. Am. Chem. Soc., 92, 1355 (1970).
- 94) Shashkov, A.S., Chizhov, O.S.; Bioorg. Khim., 2, 437 (1976), versión inglesa: pág 312.
- 95) Larsen, P.O., Sørensen, H., Cochran, D., Hagaman, E.W., Wenkert, E.; Phytochemistry, 12, 1713 (1973).
- 96) Lemieux, R.U., Koto, S.; Tetrahedron 30, 1933 (1974).
- 97) Mizutani, K., Kasai, R., Tanaka, O.; Carbohyd. Res., 87, 19 (1980).
- 98) Gorin, P.A.J., Mazurek, M.; Canad. J. Chem., 53, 1212 (1975).
- 99) Ritchie, R.G.S., Cyr, N., Korsch, B., Koch, H.J., Perlin, A.S.; Canad. J. Chem., 53, 1424 (1975).
- 100) Mahato, S., Sahu, N., Ganguly, A., Kasai, R., Tanaka, O.; Phytochemistry, 19, 2017 (1980).
- 101) Encarnación, R., Kenne, L., Samuelsson, G., Sandberg, F.; Phytochemistry, 20, 1939 (1981).
- 102) Walker, T.E., London, R., Whaley, T., Barker, R., Matwiyoff, N.; J. Am. Chem. Soc., 98, 5807 (1976).
- 103) Tori, K., Seo, S., Yoshimura, Y., Nakamura, M., Tomita, Y.; Tetrahedron Letters, 4167 (1976).
- 104) Markham, K.R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T.J.; Tetrahedron, 34, 1389 (1978).
- 105) Colson, P., Jennings, H.J., Smith, I.C.P.; J. Am. Chem. Soc., 96, 8081 (1974).
- 106) Itano, K., Yamasaki, K., Kihara, C., Tanaka, O.; Carbohyd. Res., 87, 27 (1980).
- 107) Forgacs, P., Provost, J.; Phytochemistry, 20, 1689 (1981).
- 108) Vignon, M.R., Vottero, J.A.; Tetrahedron Letters, 2445 (1976).
- 109) Sze-Cheung, H., Koch, H., Stuart, R.; Carbohyd. Res., 64, 251 (1978).
- 110) Bock, K., Pedersen, C.; J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, 293 (1974).

- 111) Bock, K., Pedersen, C.; Acta Chem. Scand., B29, 258
(1975).
- 112) Schlösser, E., Wulff; G., Z. Naturforsch., B 24, 1284
(1969).
- 113) González, A.G., Fraga, B.M., González, P., Marta, M.,
Delle Monache, F., Marini-Bettolo, G.B., De Mello, J.F.,
Goncalves, D.; Phytochemistry 21, 470 (1982).
- 114) Lefranc, M.; Comptes Rend., 67, 954 (1868).
- 115) Lefranc, M.; Comptes Rend., 76, 438 (1873).
- 116) Ajello, T., Piozzi, F., Quilico, A., Sprio, V.; Rend.
Accad. Lincei., VIII, 28, 545 (1960).
- 117) Ajello, T., Piozzi, F., Quilico, A., Sprio, V.;
Chimica Industria (Milan), 42, 876 (1960).
- 118) Piozzi, F., Quilico, A., Ajello, T., Sprio, V., Melera, A.;
Tetrahedron Letters, 23, 1829 (1965).
- 119) Piozzi, F., Quilico, A., Mondelli, R., Ajello, T., Sprio,
V., Melera, A.; Tetrahedron, Suppl. 8, parte II, 515 (1966).
- 120) Piozzi, F., Quilico, A., Fuganti, C., Ajello, T., Sprio,
V.; Gazz. Chim. Ital.; 97, 935 (1967).
- 121) Defaye, G., Horton, D., Wander, J.D.; Bull. Soc. Chim.
France, 615 (1973).
- 122) Foresti, E., Riva di Sanseverino, L., Piozzi, F.;
Tetrahedron, 26, 2717 (1970).
- 123) Defaye, G., Vignais, P.V., Vignais, P.M.; Comptes Rend.,
Serie D, 273, 2671 (1971).
- 124) Candy, H.A., Pegel, K.H., Brookes, B., Rodwell, M.;
Phytochemistry, 16, 1308 (1977).
- 125) Chem. Abstr., 84, 184.884e
- 126) Craig, J.C., Mole, M.L., Billets, S., El-Ferally, F.;
Phytochemistry, 15, 1178 (1976).
- 127) Pin, P.; C. R. Soc. Biol., 163 (11), 2288 (1969),
Chem. Abstr., 73, 106.281q
- 128) Obermann, H., Spiteller, G., Hoyer, G.A.; Chem. Ber.,
106, 3506 (1973).
- 129) Ludwig, H., Obermann, H., Spiteller, G.; Chem. Ber.,
107, 2409 (1974).

- 130) Richter, H., Spitteller, G., Chem. Ber., 111, 3506 (1978).
- 131) Oelrichs, P.B., Muller, W.A., Toxicon, 10, 63 (1972).
- 132) Defaye, G., Ulrich, J., Org. Mass Spectrom., 8, 89 (1974).
- 133) Killiani, H.; Ber. Dtsch. Chem. Ges., 63, 2866 (1930).
- 134) Chardon, G., Viala, A., Vignais, P., Stanislas, E.;
Thérapie, XIX, 1323 (1964)
- 135) Santi, R.; Nature, 182, 257 (1958).
- 136) Vignais, P.V., Vignais, P.M., Lauquin, G., Morel, F.;
Biochimie, 55, 763 (1973).
- 137) Stanislas, E., Vignais, P.; C. R. Acad. Sc. Paris 259,
4872 (1964).
- 138) Luciani, S., Martini, N., Santi, R.; Life Sciences,
10 (II), 961 (1971).
- 139) Carpenedo, F., Luciani, S., Scaravilli, F., Palatini, P.,
Santi, R.; Arch. Toxicol., 32, 169 (1974), Chem. Abstr.,
81, 164.398j
- 140) Luciani, S., Carpenedo, F., Tarjan, E.M.; en "Atractyloside:
Chemistry, Biochemistry and Toxicology, ed. R. Santi y
S. Luciani, Piccin Medical Books, Padova, 1978; Chem.
Abstr., 91, 187.294t.
- 141) Oelrichs, P.B., Vallely, P.J.; J. Nat. Products, 43, 414
(1980).
- 142) Bruni, A., Contessa, A.R., Luciani, S.; Biochim.
Biophys. Acta, 60, 301 (1962).
- 143) Bombardelli, E., Gabetta, B., Bonati, A; (Inverni Della
Beffa SpA) Brit: 1.382.576., Chem. Abstr., 83, 43.695m.
- 144) Vignais, P.V.; Biochim. Biophys. Acta 456, 1 (1976).
- 145) Vignais, P.V., Vignais, P.M., Defaye, G.; Biochemistry,
12, 1508 (1973).
- 146) Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K.,
Tanaka, O.; Phytochemistry, 15, 981 (1976).
- 147) Seibl, J.; "Espectrometría de masas", Ed. Alhambra, 1973.
- 148) Kolattukudy, P.E.; Phytochemistry, 6, 963 (1967).
- 149) Yamaguchi, K.; "Spectral Data of Natural Products", volumen
1, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Londres, 1970.

- 150) Bovey, F.A.; "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Academic Press, New York, London, 1969.
- 151) King, F.E., Godson, D.H.; J. Chem. Soc., 1117 (1955).
- 152) Gopinath, K.W., Govindachari, T.R., Parthasarathy, P.C., Viswanathan, N.; Helv. Chim. Acta, 44, 1040 (1961).
- 153) Hugel, G., Lods, L., Mellor, J.M., Theobald, D.W., Ourisson, G.; Bull. Soc. Chim. France, 2882 (1965).
- 154) Brieskorn, C.H., Pöhlmann, E.; Tetrahedron Letters, 5661 (1968).
- 155) Bible, R.H.; "Guide to the NMR Empirical Method", Plenum Press, New York, 1967.
- 156) Piozzi, F., Sprio, V., Passannanti, S., Mondelli, R.; Gazz. Chim. Ital., 98, 907 (1968).
- 157) Fraser, R.R.; Canad. J. Chem., 38, 549 (1960).
- 158) Collin, P.J., Sternhell, S.; Aust. J. Chem., 19, 317 (1966).
- 159) Lindley, M.R., Gray, N.A.B., Smith, D.H., Djerassi, C.; J. Org. Chem., 47, 1027 (1982).
- 160) Barruah, R.N., Sharma, R.P., Godalakrishna, T., Herz, W., Govindan, S.V., Blount, J.F.; J. Org. Chem., 45, 4838 (1980).
- 161) Herz, W., Kumar, N.; Phytochemistry, 19, 593 (1980).
- 162) Rustaiyan, A., Nazarians, L., Bohlmann, F.; Phytochemistry, 19, 1230 (1980).
- 163) Herz, W., de Groote, R.; J. Org. Chem., 44, 2784 (1979).
- 164) Mabry, T.J., Ohno, N.; Phytochemistry, 18, 1003 (1979).
- 165) Mabry, T.J., Ohno, N.; Phytochemistry, 19, 609 (1980).
- 166) Pakrashi, S.C., Ghosh Dastidar, P.P., Ali, E.; Indian J. Chem., 9, 84 (1971).
- 167) Benz, W., Biemann, K.; J. Am. Chem. Soc., 86, 2375 (1964).
- 168) Breitmaier, E., Haas, G., Voelter, W.; "Atlas of Carbon 13 NMR Data", Heyden, Londres, Filadelfia, Rheine, 1979.
- 169) Hardegger, E., Leemann, H.J., Robinet, F.J.; Helv. Chim. Acta., 35, 824 (1952).
- 170) Hariharan, V., Rangaswami, S.; Phytochemistry, 9, 409 (1970).

- 171) Stahl, E.; "Thin Layer Chromatography, a Laboratory Handbook", Springer-Verlag, New York, 1969.
- 172) Popoff, T., Theander, O.; Chem. Comm., 1576 (1970).
- 173) Feather, M.S., Harris, J.F.; J. Org. Chem., 31, 4018 (1966).
- 174) Lemieux, R.U., Stevens, J.D.; Canad. J. Chem, 43, 2059 (1965).
- 175) Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B.; "The Sistematic Identification of Flavonoids", Springer-Verlag, New York, 1970.
- 176) Lemieux, R.U., Stevens, J.D.; Canad. J. Chem, 44, 249 (1966).
- 177) Stothers, J.B.; "Carbon-13 NMR Spectroscopy", Academic Press, New York, San Francisco, London, 1972.
- 178) Rees, D.A.; J. Chem. Soc. (B), 877 (1970).
- 179) Landolt-Börnstein; Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik, Sechste Auflage, II Band, 8. Teil, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962.
- 180) "The Merck Index", Sixth Edition, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., U.S.A., 1952.
- 181) Tschesche, R., Wulff, G.; Tetrahedron, 19, 621 (1963).
- 182) Tschesche, R., Balle, G.; Tetrahedron, 19, 2323 (1963).
- 183) Lindberg, B., Lönngren, J., Thompson, J.L., Carbohyd. Res., 28, 351 (1973).
- 184) Shimizu, K.; Carbohyd. Res., 92, 65 (1981).
- 185) Anderson, D.M.W., Dea, I.C.M., Maggs, P.A., Munro, A.C.; Carbohyd. Res., 5, 489 (1967).
- 186) Corey, E.J., Chaykovsky, M.; J. Am. Chem. Soc., 86, 1639 (1964).
- 187) Schneider, J.J., Bhacca, N.S.; J. Org. Chem., 34, 1990 (1969).
- 188) Thompson, M.J., Dutky, S.R., Patterson, G.W., Gooden, E.L.; Phytochemistry, 11, 1781 (1972).
- 189) Sadtler Standard Spectra, Sadtler Research Laboratories, Inc., 1976, espectro N° 9942 M.
- 190) "Sephadex LH-20, Chromatography in Organic Solvents", Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1979.

- 191) Sjovall, J., Vihko, R.; *Acta Chem. Scand.*, 20, 1419 (1966).
- 192) Applied Science Laboratories, Catálogo 21, "Chromatography Products", 1978.
- 193) Fritz, J.S., Yamamura, S.; *Analytical Chemistry*, 27, 1461 (1955).
- 194) Harris, M.J., Turvey, J.R.; *Carbohydr. Res.*, 15, 51 (1970).
- 195) Archbald, P.J., Fenn, M.D., Roy, A.B.; *Carbohydr. Res.*, 93, 177 (1981).
- 196) Harris, M.J., Turvey, J.R.; *Carbohydr. Res.*, 15, 57 (1970).
- 197) "Two Dimensional NMR, Aspect 2000", W.E. Hull, Bruker Analytische Messtechnik, Karlsruhe, 1982.
- 198) Ekong, D.E.U., Ogan, A.U.; *J. Chem. Soc. (C)*, 311 (1968).
- 199) Bohlmann, F., Jakupovic, J., Zdero, C., King, R.M., Robinson, H.; *Phytochemistry*, 18, 625 (1979).
- 200) Bohlmann, F., Jakupovic, J., King, R.M., Robinson, H.; *Phytochemistry*, 19, 863 (1980).
- 201) Bohlmann, F., Suwita, A., King, R.M., Robinson, H., *Phytochemistry*, 19, 111 (1980).
- 202) Bohlmann, F., Natu, A.A., Mahanta, P.K.; *Phytochemistry*, 17, 843 (1978).
- 203) Bohlmann, F., Bapuji, M., King, R.M., Robinson, H.; *Phytochemistry*, 21, 939 (1982).
- 204) Bohlmann, F., *Naturwissenschaften* 67, 588 (1980).
- 205) Romo de Vivar, A., Romo, J.; *Rev. Latinoamericana de Quím.*, 2(1), 38 (1971).
- 206) Ortega, A., Vargas, C., Guerrero, C., Romo de Vivar, A.; *Rev. Latinoamericana de Quím.*, 4(1), 1 (1973).
- 207) Bohlmann, F., Lonitz, M.; *Chem. Ber.*, 111, 843 (1978).
- 208) Bohlmann, F., Lonitz, M.; *Chem. Ber.*, 113, 2410 (1980).
- 209) Hariharan, V.; *Indian J. Chem.*, 11, 830 (1973).
- 210) Hariharan, V.; *Indian J. Chem.*, 12, 447 (1974).
- 211) Hanson, J.R., Sivers, M., Piozzi, F., Savona, G.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 114 (1976).
- 212) Pasto, D.J., Johnson, C.R.; "Determinación de estructuras orgánicas", Ed. Reverté, S.A., Barcelona, 1974.

- 213) "Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel", E. Merck, Darmstadt, R.F.A.
- 214) Vogel, A.I.; "A Text-book of Practical Organic Chemistry", Longman, London, 1972.
- 215) Elsevier's Encyclopaedia of Organic Chemistry, Vol. 14, 526; Elsevier, New York, Amsterdam, 1940 y 1952; y Reichstein, P., Kaufmann, H., Stöcklin, W., Reichstein, T.; Helv. Chim. Acta, 50, 2114 (1967).
- 216) Domínguez, X.A., Torres, M.V.; Phytochemistry, 11, 848 (1972)
- 217) Pomilio, A.B., Gros, E.G.; Phytochemistry, 18, 1410 (1979).
- 218) Nes, W.D., Benson, M., Heftmann, E.; Phytochemistry, 20, 2299 (1981).