

## Tesis de Posgrado

# Sobre la biotransformación de 24-metilencolesterol a withanólidos en *Acnistus breviflorus* : Nuevos withanólidos de *Jaborosa bergii*, *Jaborosa leucotricha* y *Jaborosa odonelliana*

Monteagudo, Edith Sandra

1989

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Monteagudo, Edith Sandra. (1989). Sobre la biotransformación de 24-metilencolesterol a withanólidos en *Acnistus breviflorus* : Nuevos withanólidos de *Jaborosa bergii*, *Jaborosa leucotricha* y *Jaborosa odonelliana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2255\\_Monteagudo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2255_Monteagudo.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Monteagudo, Edith Sandra. "Sobre la biotransformación de 24-metilencolesterol a withanólidos en *Acnistus breviflorus* : Nuevos withanólidos de *Jaborosa bergii*, *Jaborosa leucotricha* y *Jaborosa odonelliana*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2255\\_Monteagudo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2255_Monteagudo.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"Sobre la biotransformación de 24-metilencolesterol  
a withanólidos en *Acnistus breviflorus*. Nuevos  
withanólidos de *Jaborosa bergii*, *Jaborosa leucotricha*  
y *Jaborosa odonelliana*."

Director de tesis

Dr. Gerardo Burton

Lugar de trabajo

Departamento de Química Orgánica

EDITH SANDRA MONTEAGUDO

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Ciencias Químicas

1989

- 2.255 -  
Ej: 2.

A Daniel por todo el amor y la  
confianza que me brinda día a día.  
A mis padres por haberme dado con  
tanto cariño, todo lo necesario para  
formar los cimientos de lo que soy.

Agradezco al Dr. Gerardo Burton,  
director de esta tesis, por su de-  
dicación y esfuerzo en mi formación  
científica y por su permanente afecto.

Deseo expresar mi gratitud al Dr. E. G. Gros por su constante y entusiasta colaboración y por la calidez humana que siempre me brindó.

## Agradecimientos

A todos los miembros de UMYMFOR (CONICET-FCEN), por la ayuda humana y de equipamiento recibida:

Sr. C. G. Arabehty por los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Lic. J. B. Rodriguez por el asesoramiento en la utilización de los cromatógrafos líquidos de alta resolución.

Sr. J. Aznárez por los espectros de masa y cgl-masa.

Lic. M. Rivero y Lic. M. M. de Moglia por la realización de cromatografías gas líquido.

A los Dr. E. G. Gros, A. M. Seldes y G. Burton, por todo el esfuerzo que realizan para que el trabajo pueda llevarse a cabo.

Al CONICET, por las becas de Iniciación, Perfeccionamiento y Formación Superior otorgadas.

A la Dra. Alicia M. Seldes por su constante ayuda profesional y humana.

Al Dr. C. P. Lantos por el apoyo y afecto que me brindó todos estos años.

Al Dr. J. C. Oberti por facilitarme las tres especies del género *Jaborosa* estudiadas, por todo el trabajo compartido y por su permanente cordialidad.

A los Dres. A. I. Scott y M. D. Gonzalez por el espectro COSY-45  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

Al Dr. J. Reibenspies por el espectro de difracción de rayos X.

Al Dr. A. Hunziker por la búsqueda y clasificación de las especies del género *Jaborosa* estudiadas.

Al Dr. S. Krolik por el espectro de masa y el EM FAB de jaborosa-

lactona P.

Al Dr. L. Díaz (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA) por los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y masa realizados.

Al personal de la biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) por su amplia colaboración.

A mis amigas Lydia Galagovsky y Adriana Brachet-Cota por todos los momentos compartidos y por el constante apoyo recibido.

A Elizabeth Jares, Carlos Lima, Darío Doller, Cecile Du-Mortier, Marta Romero, Carla Marino, Lucio Jeroncic, Hugo Caro, Gerardo Caballero, Juan Bautista Rodríguez, Mónica Deluca y Rodolfo Biekovsky por la amistad compartida.

A los Dres. Daniel Palleros y Oscar Varela por los enriquecedores y desinteresados consejos.

A mis compañeros de laboratorio Lydia Galagovsky, Adriana Brachet-Cota, Alberto Ghini, Violeta Benedetti, Hugo Caro, Pablo Mazzuchelli, Fernando Soriano, Mario Gonzalez, Adriana Veleiro y Osvaldo Teme Centurión por haber creado un ambiente de trabajo extremadamente agradable.

Al personal no docente del departamento de Química Orgánica (FCEN-UBA) y muy especialmente a Don Eduardo López y Doña Rosa Ricarte.

A todo el personal del departamento de Química Orgánica, profesores y compañeros por su constante cordialidad.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

Ac	acetilo
acac	acetilacetato
BuLi	n-butillitio
(c)	concentrado
ccd	cromatografía en capa delgada
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución
EM	espectrometría de masa
Et	etilo
FAB	bombardeo con átomos rápidos (fast atom bombardment)
fig.	figura
IR	infrarrojo
lit.	literatura
Me	metilo
m.s.m.	metros sobre el nivel del mar
pág.	página
PF	punto de fusión
Ph	fenilo
<i>i</i> -Pr	isopropilo
Pi	piridina
RMN	resonancia magnética nuclear
THF	tetrahidrofurano



## NOMENCLATURA TRIVIAL UTILIZADA

### Nombre trivial

ácido colénico: ácido 3 $\beta$ -hidroxicol-5-en-24-oico

Campesterol: (24R)-metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol

24-Cetocolesterol: 3 $\beta$ -hidroxicolest-5-en-24-ona

Colesterol: colest-5-en-3 $\beta$ -ol

Ergosterol: (22E,24R)-metilcolesta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol

Stigmasterol: (22E,24S)-etilcolesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol

Fucoesterol: (24E)-etilcolesta-5,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol

Isofucoesterol: (24Z)-etilcolesta-5,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol

24-Metilenolesterol: 24-metilcolesta-5,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol

Pregnenolona: 3 $\beta$ -hidroxipregn-5-en-20-ona

Sitosterol: (24R)-etilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol

## INDICE

### CAPITULO I: INTRODUCCION

Generalidades	1
Withanólidos en el género <i>Jaborosa</i>	10
Propiedades biológicas de los withanólidos	14
Withanólidos en la quimiotaxonomía	16
Antecedentes biosintéticos	18
Objetivos	28

### CAPITULO II: WITHANOLIDOS DE *JABOROSA BERGII*, *JABOROSA LEUCOTRICHIA* Y *JABOROSA ODONELLIANA*

Métodos de aislamiento y purificación de withanólidos	29
Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de <i>Jaborosa bergii</i> .	32
Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de <i>Jaborosa leucotricha</i> .	59
Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de <i>Jaborosa odonelliana</i> .	68

**CAPITULO III: SINTESIS DE 24-METILENCOLESTEROL ISOTOPICAMENTE  
MARCADO**

Generalidades	80
Síntesis del ácido 3 $\beta$ -acetoxicolénico	89
Síntesis de 3 $\beta$ -acetoxicolest-5-en-24-ona	94
Síntesis de 24-metilencolesterol	106
Síntesis de 24-metilencolesterol [24- <sup>14</sup> C]	107
Síntesis de 24-metilencolesterol [7- <sup>3</sup> H]	107

**CAPITULO IV: ESTUDIOS DE BIOSINTESIS DE WITHANOLIDOS**

Degradación de withanólidos radioactivos aislados de <i>Acanthopanax breviflorus</i>	117
Experiencias de inoculación de 24-metilencolesterol [24- <sup>14</sup> C]	123
Inoculación de 24-metilencolesterol [24- <sup>14</sup> C, 7- <sup>3</sup> H]	126

**CAPITULO V: PARTE EXPERIMENTAL**

Generalidades	130
Síntesis del ácido 3 $\beta$ -acetoxicol-5-en-24-oico	136
Síntesis de 3 $\beta$ -acetoxicolest-5-en-24-ona	141
Síntesis de 24-metilencolesterol	149
Ensayos conducentes a la síntesis de 24-metilen-	

colesterol [7- <sup>3</sup> H]	151
Síntesis de 24-metilencolesterol [24- <sup>14</sup> C]	156
Síntesis de 24-metilencolesterol [7- <sup>3</sup> H]	158
Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de <i>Jaborosa bergii</i>	160
Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de <i>Jaborosa leucotricha</i>	164
Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de <i>Jaborosa odonelliana</i>	166
Degradación química de jaborosalactona A [ <sup>14</sup> C]	168
Experiencias de incorporación de 24-metilencolesterol isotópicamente marcado	171
Métodos computacionales	173
RESUMEN	180
BIBLIOGRAFIA	185

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## Generalidades

Los withanólidos son un grupo de esteroides naturales contruidos sobre un esqueleto de tipo ergostano. Se caracterizan por poseer una cadena lateral de nueve átomos de carbono, en la cual los carbonos 22 y 26 se encuentran oxidados apropiadamente de manera de formar una  $\delta$ -lactona. En la figura 1 se representa la estructura básica denominada "esqueleto withanólido" [1].

Deben su nombre a la planta *Withania somnifera* donde fueron descubiertos los primeros constituyentes de este grupo [2,3]. También fueron aislados de otras plantas del género *Withania* y de plantas de los géneros *Acnistus (Dunalia)*, *Jaborosa*, *Nicandra*, *Physalis*, *Datura* y *Lycium*, todas ellas pertenecientes a la familia de las Solanáceas encontrándose principalmente en las hojas de los vegetales mencionados.

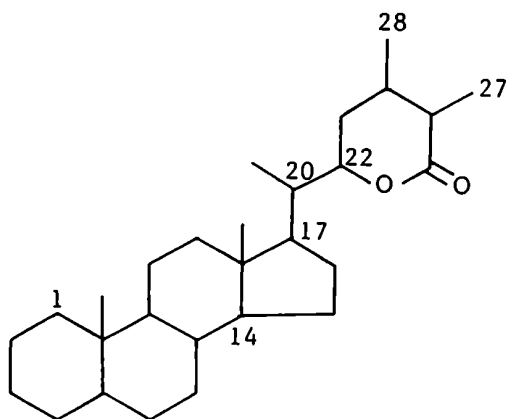


Figura 1. Esqueleto withanólido.

Las estructuras y distribución de los withanólidos en la naturaleza han sido objeto de diversos trabajos de revisión bibliográfica [4,5,7]. Se agrupa también bajo el nombre genérico de withanólidos a otros compuestos cuyas características comunes son un esqueleto básico, modificado o no, del tipo ergostano y distintos grados de oxidación en los carbonos 1, 22 y 26, tales como 22,26- $\delta$ -lactoles, 23,26 y 28,26- $\gamma$ -lactonas, fisalinas, acnistinas y análogos con el anillo D de seis miembros aromatizado [4-6], todos ellos biogénicamente relacionados a los withanólidos. En la figura 2 se presentan algunas estructuras representativas de estos compuestos.

Las fisalinas (fisalina B (4)) fueron aisladas de varias especies de *Physalis*, siendo los rasgos estructurales comunes de estos compuestos la ruptura oxidativa del enlace entre los carbonos 13 y 14 y el cierre de un nuevo anillo de seis miembros por formación de un enlace entre los carbonos 16 y 24. Se designa como withafisalinas al grupo de compuestos que representan estados intermedios en la conversión biosintética de withanólidos a fisalinas, por ejemplo withafisalina C (5). Las acnistinas (acnistina A (6)) presentan un tipo distinto de cadena lateral, la cual contiene un ciclopentano formado por unión de los carbonos 21 y 24. Los compuestos del tipo Nic 1 (nicandrenona (7)), son los primeros esteroides naturales que poseen un anillo D de seis miembros aromatizado.

Los withanólidos con esqueleto esteroideal no modificado se pueden subdividir de acuerdo a las siguientes características estructurales:

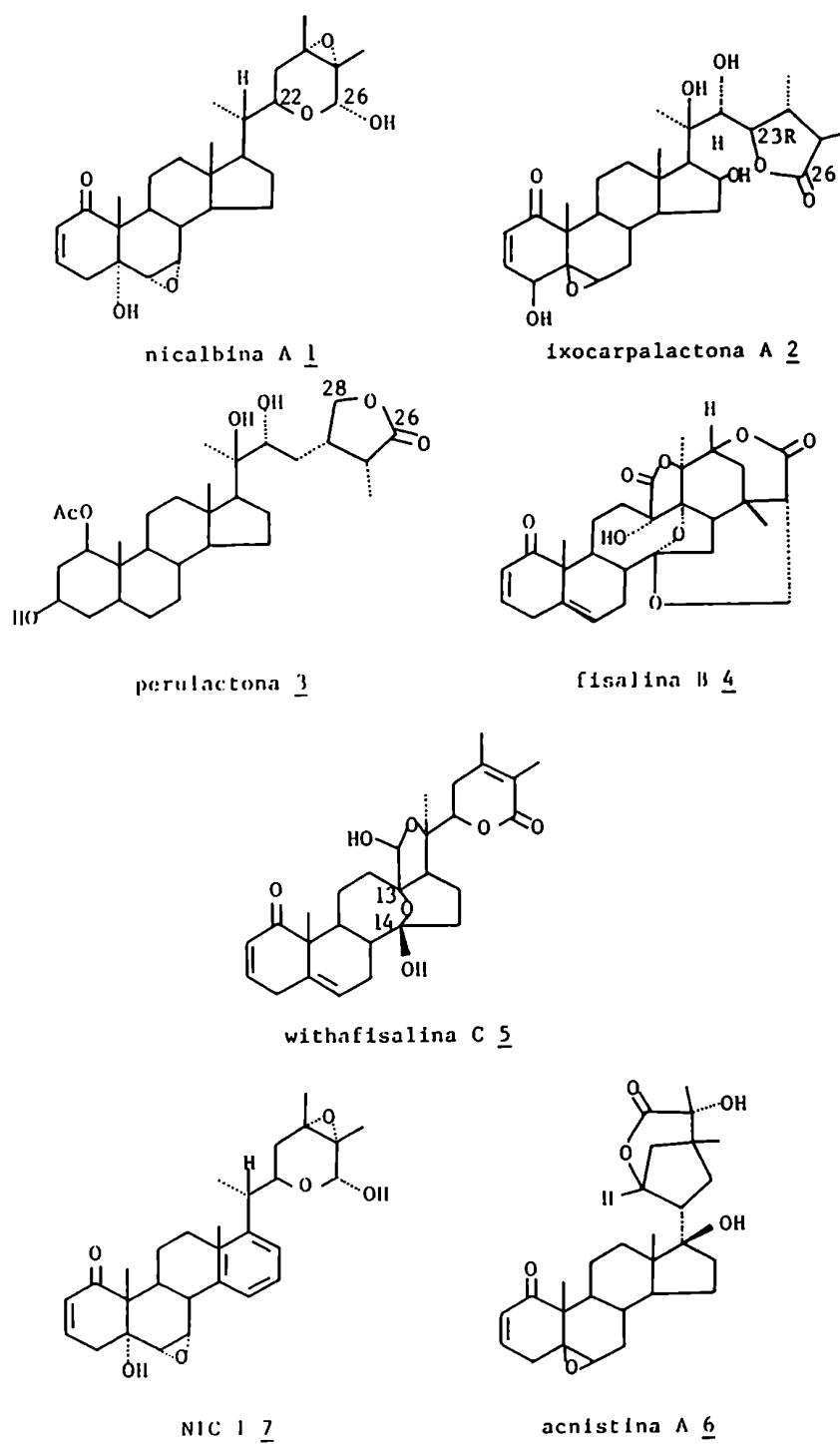


Figura 2. Estructuras de algunos compuestos biogenéticamente relacionados a los withanólidos.



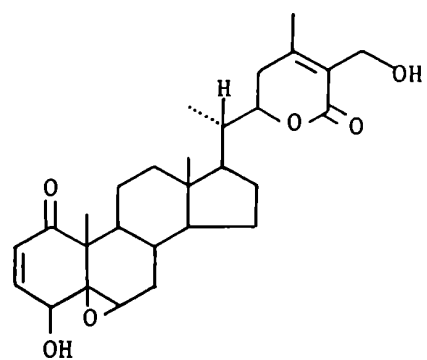
- a) compuestos no sustituidos en carbono 20 [4,5,8-11] (figura 3, 8, 11).
- b) compuestos que poseen un grupo hidroxilo en carbono 20 (20 $\alpha$ ) [4,5,12-16] (figura 3, 9, 12).
- c) compuestos con la cadena lateral orientada 17 $\alpha$  [4,5,9], todos los cuales poseen un hidroxilo en posición 17 $\beta$  (figura 3, 10, 13).

Estas subdivisiones son importantes desde el punto de vista biogenético pues, con muy pocas excepciones, las plantas que sintetizan 20-H-withanólidos no producen 20-hidroxicompuestos y viceversa [4]. Por otra parte, los 17 $\beta$ -hidroxi withanólidos son el único grupo de esteroides naturales que poseen una cadena lateral de más de dos carbonos orientada en  $\alpha$ .

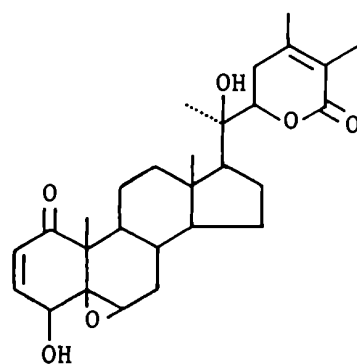
Los compuestos presentes en estos subgrupos se diferencian por la posición y número de grupos hidroxilo (17, 19) y la presencia o ausencia de átomos de cloro (13), dobles enlaces y/o anillos epóxido (14, 15, 18).

Se han aislado también distintos glicósidos a partir de especies como *Withania aristata* Pauq. [17], *Physalis peruviana* [18] y *Acnistus australis* (ex *Dunalia australis*) [19].

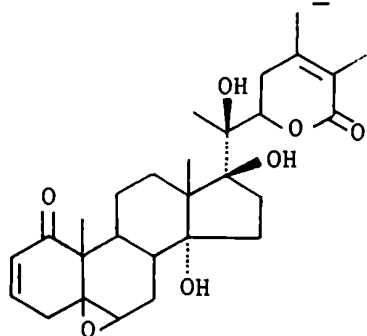
En 1987 se describió el aislamiento y la determinación estructural de un nuevo withanólido aislado de la especie *Trechonaetes laciniata*, actualmente reclasificada como *Jaborosa laciniata*, al cual se denominó trechonólido A (20). La característica inusual de este withanólido es la presencia de un puente hemiacetalico entre un hidroxilo en C-22 y un grupo ceto en carbono 12, formando un anillo de seis miembros con un grupo hidroxilo orientado en  $\beta$  en



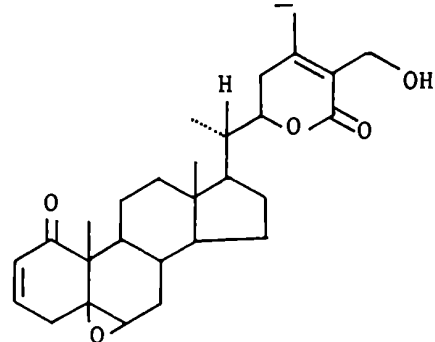
withaferina A 8



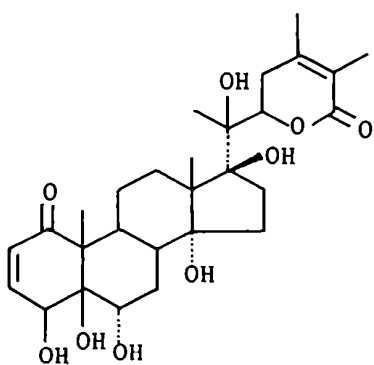
withanolide D 9



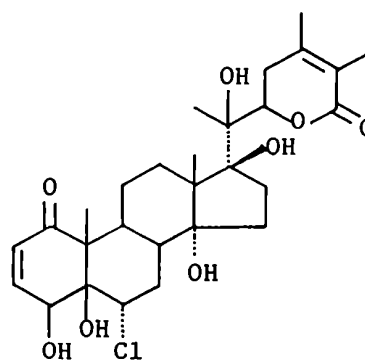
withanolide E 10



jaborosalactona A 11



withaperuvina 12



fisalolactona 13

Figura 3. Estructuras de algunos withanolidos con esqueleto esteroi-  
dal no modificado.

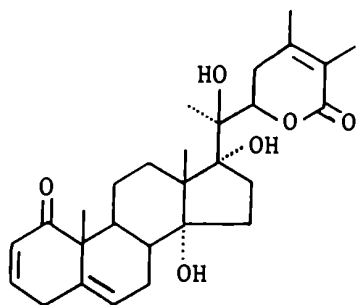
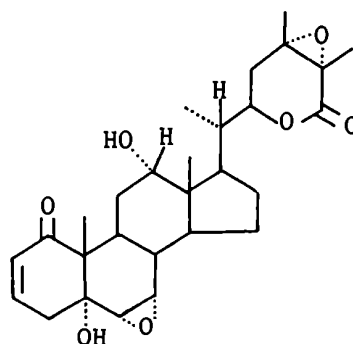
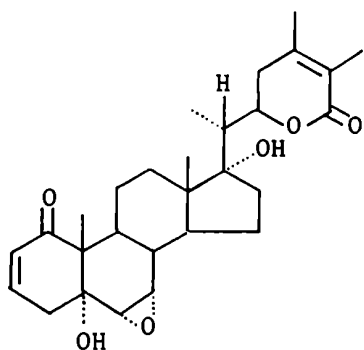
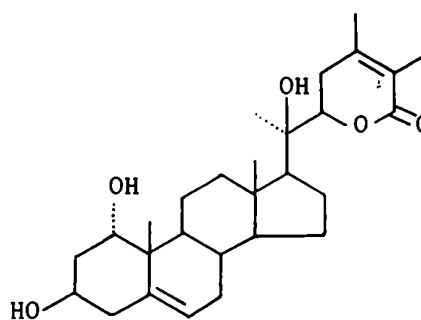
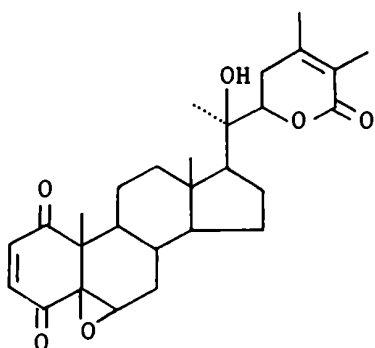
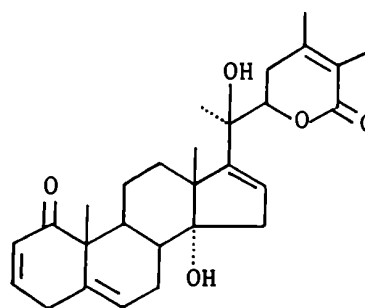
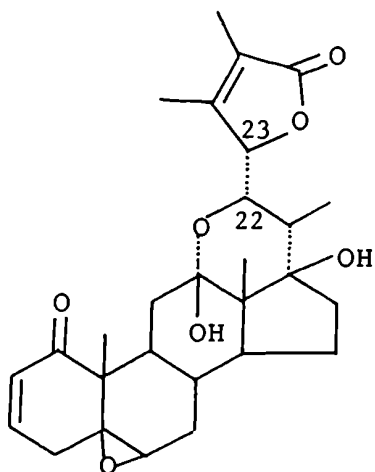
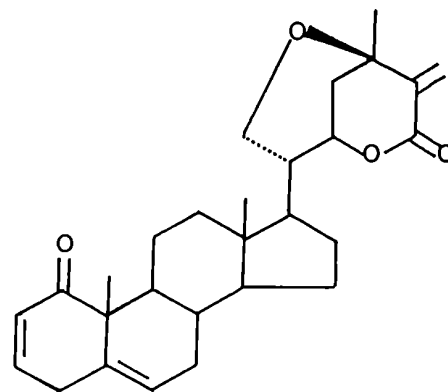
withanolido J 14daturolactona B 15withanona 16 $1\alpha,3\beta,20\alpha$ -trihidroxiwitha-5,14-dienólido 17 $20\alpha$ -hidroxi-1,4-dioxo-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi-20R,22R-witha-2,24-dienólido 18(20R,22R)-14 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-1-oxowitha-2,5,16,24-tetranólido 19

Figura 3. Continuación.



Trechonólido A

20

Withametelina

21

el carbono 12 [20a].

Oshima y col. aislaron de *Datura metel* la withametelina (21), siendo éste el primer withanólido que posee el metilo 21 oxidado [21].

El B-secowithanólido denominado (+)-jaborol (22) fue obtenido a partir de *Jaborosa magellanica* [22]. Su importancia reside en el hecho de que su estructura correspondería a un posible catabolito de withanólidos. Considerando que los withanólidos poseen generalmente un grupo cetónico en carbono 1, se podría plantear a 23 como un precursor biogénico de 22. La oxidación *in vivo* de 23 en carbono 9 conduciría al alcohol 24, el cual por ruptura del enlace C9-C10, seguida de una secuencia de oxidación-reducción y deshidratación daría por resultado el (+)-jaborol (22). (Figura 4).

Finalmente cabe destacar que estos compuestos no son exclusivos

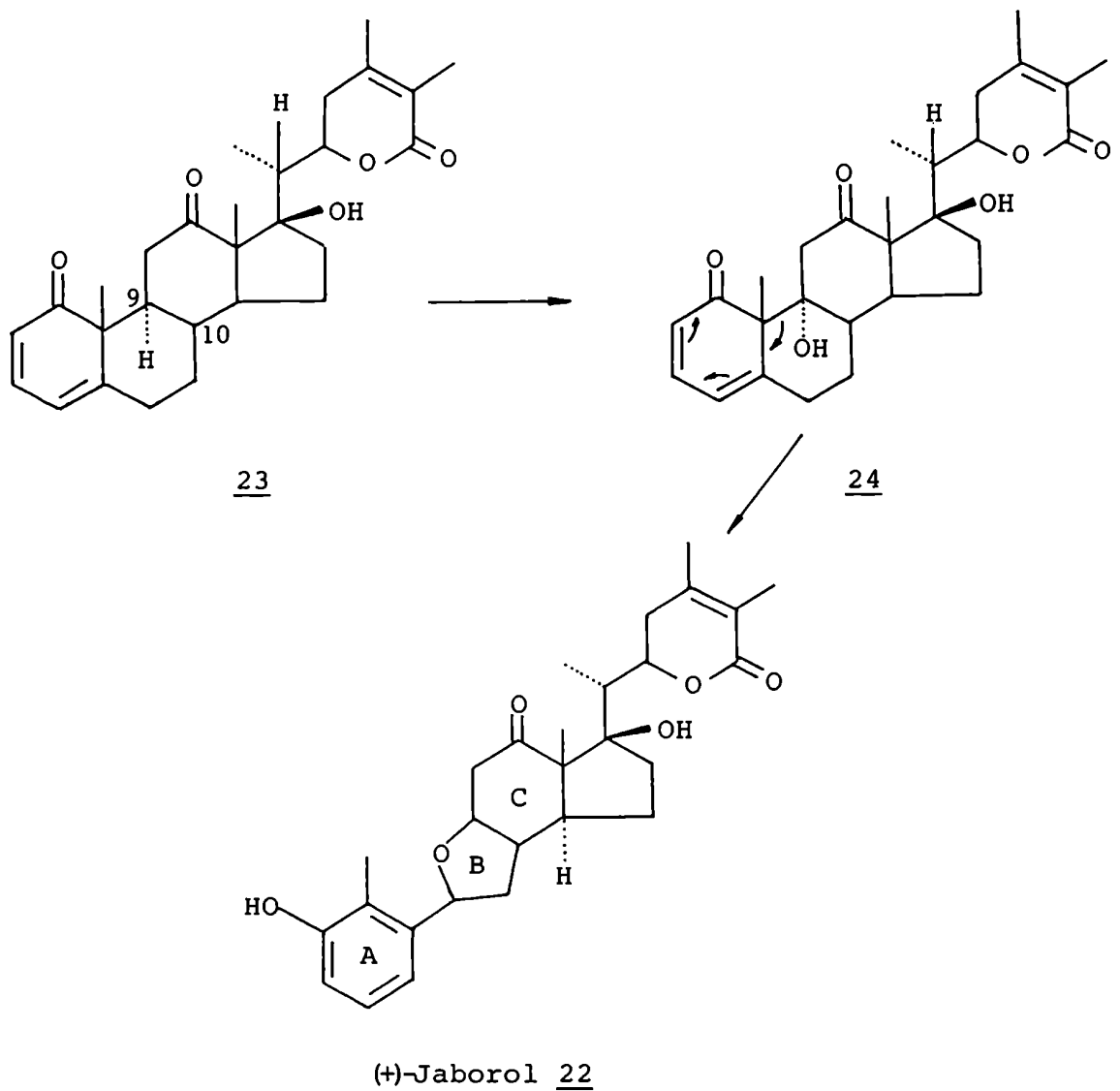
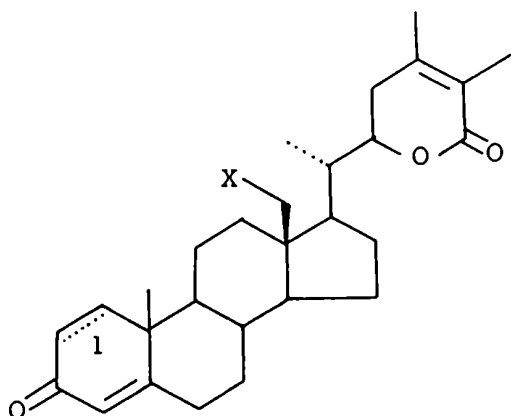


Figura 4. Posible proceso de formación de (+)-jaborol (22) a partir de un precursor hipotético (23).

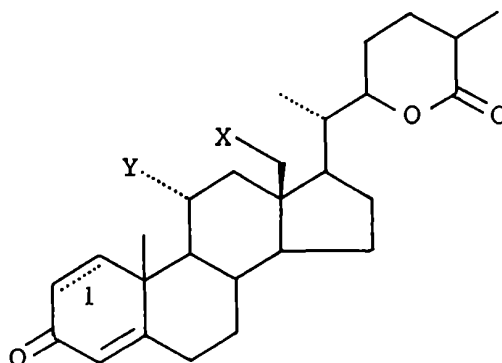
del reino vegetal, ya que recientemente se aislaron ocho lactonas esteroideas (de 28 y 27 átomos de carbono) de la clase de los withanólidos (25a-c, 26a-e) a partir del Coral *Minabea* (*sp*) [23].



**25a:** X=H  $\Delta^1$

**25b:** X=OAc  $\Delta^1$

**25c:** X=H 1,2 dihidro



	X	Y
--	---	---

**26a:** H H,  $\Delta^1$

**26b:** OAc H,  $\Delta^1$

**26c:** H H, 1,2 dihidro

**26d:** OAc H, 1,2 dihidro

**26e:** H OAc, 1,2 dihidro

### Withanólidos en el género *Jaborosa*

*Jaborosa* es el género "tipo" de la tribu *Jaboraseae* Miers, dentro de la subfamilia *Solanoideae* [24]. Las Solanáceas que constituyen el género *Jaborosa* son hierbas sudamericanas de particular interés taxonómico, florístico y fitogeográfico. Este género presenta dos centros de diversificación: uno andino con 21 especies, que desde el sur de Perú y Bolivia se extiende a lo largo de la cordillera de los Andes hasta Tierra del Fuego; el otro oriental, con un par de especies (*J. integrifolia* y *J. runcinata*) que habitan sobre todo en las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay, en lugares frecuentemente inundables de tierras arcillosas.

Argentina es el país con mayor número de especies, pues totaliza 21 del total de 23 del género; de aquéllas, 11 son endémicas de su territorio (*J. oxipetala*, *J. odonelliana*, *J. sativa*, *J. bergii*, *J. ameghinoi*, *J. kurtzii*, *J. riojana*, *J. lanigera*, *J. cabreræ*, *J. chubutensis* y *J. leucotricha*), 5 las comparte con Chile (*J. laciniata*, *J. reflexa*, *J. araucana*, *J. magellanica* y *J. caulescens* var. *caulescens* y var. *bipinnatifida*), una con Uruguay (*J. runcinata*), otra con Brasil, Paraguay y Uruguay (*J. integrifolia*), otra con Bolivia (*J. rotacea*), otra con Chile y Bolivia (*J. parviflora*), y una última con Perú, Bolivia y Chile (*J. squarrosa*). Por otro lado Chile tiene 2 endemismos (*J. pinnata* y *J. volkamannii*). Las especies con área geográfica más extensa son dos endemismos argentinos: *J. bergii* y *J. leucotricha*, que habitan principalmente en la Provincia del Monte. La

especie más austral es *J. magellanica*, y la más boreal es *J. squarrosa*.

A menudo las especies de *Jaborosa* viven en suelos pedregosos de altas montañas, entre los 2500 y 4500 m.s.m, alcanzando *J. taginera* los 5050 m.s.m; unas 8 especies crecen en lugares áridos desde los 100 m.s.m hasta los 2200 m.s.m aproximadamente; otras son propias de zonas más húmedas como *J. odonelliana*, *J. oxipetala*, *J. sativa* [24].

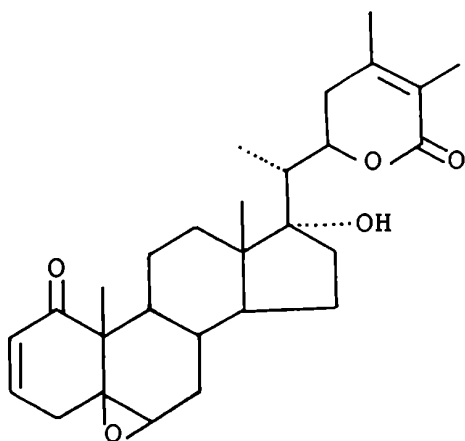
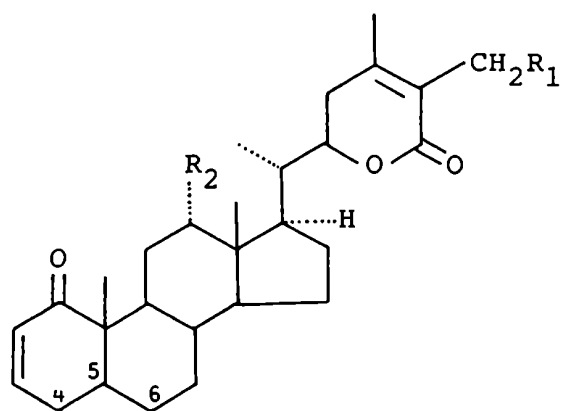
Se han aislado withanólidos de las 4 especies de este género estudiadas hasta el presente trabajo. Los mismos se indican en la tabla 1. El withanólido aislado de *J. magellanica* cuya estructura corresponde al trechonólido A fue publicado con el nombre de jaborosalactona M [20b].

En este trabajo de tesis se comenzó el estudio de los withanólidos presentes en *Jaborosa bergii* y *Jaborosa odonelliana*, y se estudió también *Jaborosa leucotricha* analizada anteriormente por Giordano, Lavie y col. [30]. En la figura 4<sup>1</sup> se representa la distribución geográfica de las tres especies mencionadas.



TABLA 1. Withanólidos aislados del género *Jaborosa*.

<i>J. integrifolia</i>	jaborosalactona A ( <u>11</u> ); B ( <u>27a</u> ); C ( <u>27b</u> ); D ( <u>27c</u> ); E ( <u>27d</u> ); F ( <u>27e</u> ) [25-29].
<i>J. leucotricha</i>	jaborosalactona L ( <u>28</u> ) [30].
<i>J. taciniata</i>	trechonólido A ( <u>20</u> ) [20a].
<i>J. magellanica</i>	(+)-jaborol ( <u>22</u> ) [22]; trechonólido A ( <u>20</u> ) [20b].

2827a.  $\Delta^4$ ;  $6\beta$ -OH;  $R_1=OH$ ;  $R_2=H$ .27b.  $5\beta$ -OH;  $6\alpha$ -Cl;  $R_1=OH$ ;  $R_2=H$ .27c.  $5\alpha$ -OH;  $6\beta$ -OH;  $R_1=OH$ ;  $R_2=H$ .27d.  $5\alpha$ -Cl;  $6\beta$ -OH;  $R_1=OH$ ;  $R_2=H$ .27e.  $5\alpha$ -OH;  $6\beta$ -OH;  $R_1=R_2=OH$ .

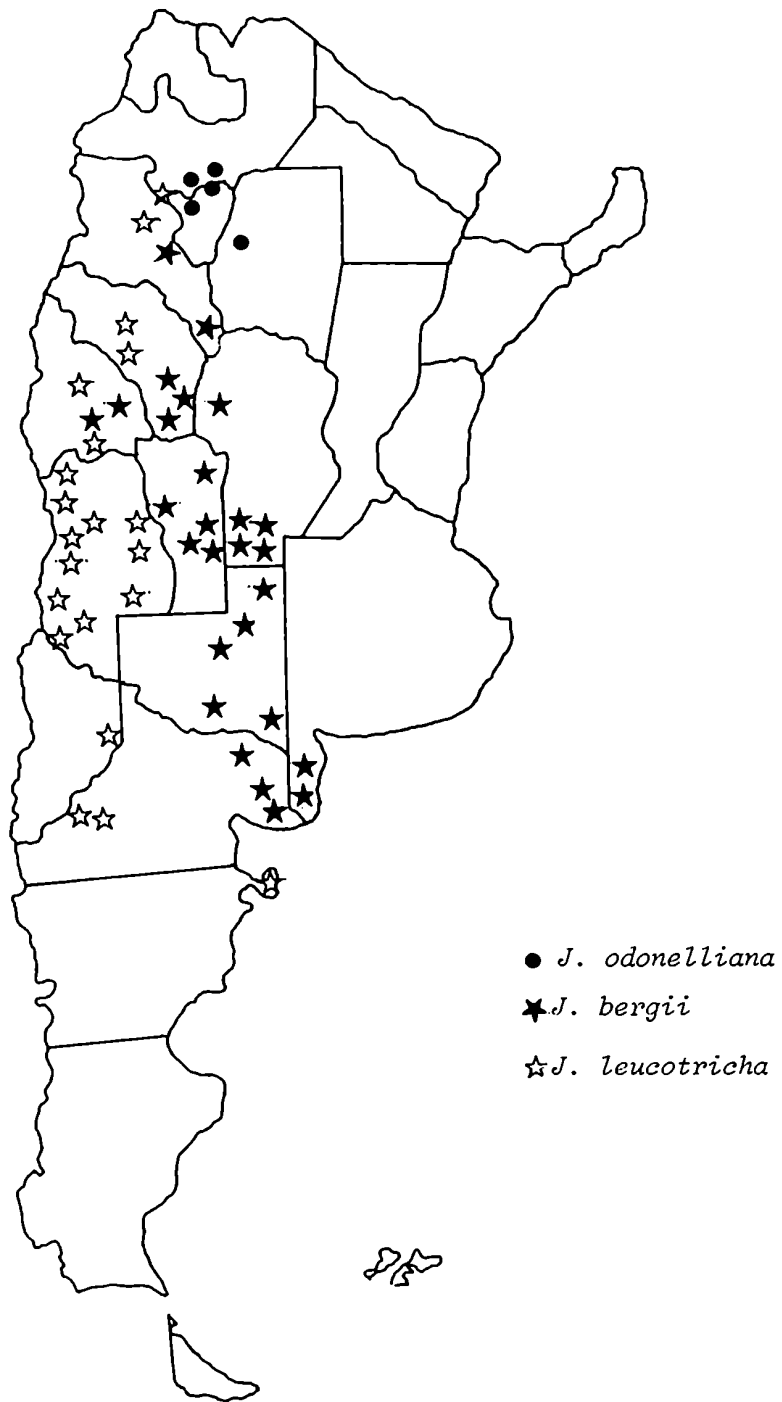


Figura 4. Distribución geográfica de las especies *J. bergii*, *J. leucotricha* y *J. odonelliana*.

## Propiedades biológicas de los Withanólidos

Durante muchos años se atribuyeron diversas propiedades terapéuticas a las plantas de *Withania somnifera*. Algunas tribus sudafricanas usaron sus raíces y hojas con distintos propósitos medicinales, atrayendo la atención de los pobladores europeos quienes utilizaron la pasta de hojas en el tratamiento de la erisipela. En la India esta planta era utilizada por sus propiedades sedativas, hipnóticas y antisépticas [4]; sin embargo la mayoría de los estudios realizados a comienzos de este siglo no confirmaron las propiedades mencionadas [31].

Al aislarse los primeros withanólidos en forma pura y cristalina, se realizó un mejor estudio de los mismos, encontrándose que la withaferina A (8) no sólo presentaba propiedades anticancerígenas [32-37] sino también una notable actividad bacteriostática [2,38-41], ejerciendo además acción inmunosupresora [42,43].

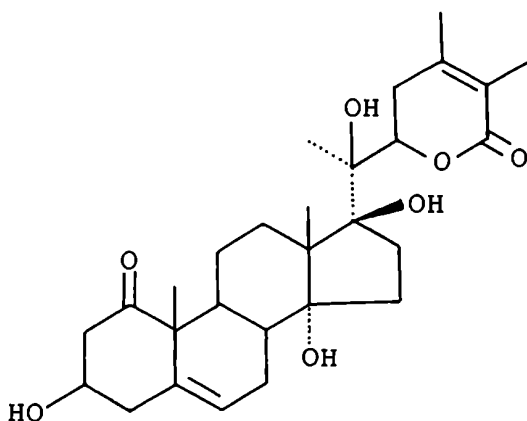
También se encontró que la withaferina A y el withanólido D (9) inhibían la formación de ácido ribonucleico (ARN) en el sarcoma 180 de células cancerosas a una concentración de 40 µg/ml [44]. Por otra parte la withaferina A inhibe la síntesis de proteínas [45] y el desarrollo de hongos [46] e inversamente, nucleófilos biológicos y algunos microorganismos actúan sobre ella [47,48].

La actividad anticancerígena de la withaferina A se ha evaluado en forma más extensa investigando su acción contra el sarcoma 180, el sarcoma negro, el carcinoma ascítico de Ehrlich y el adenocar-

cinoma mamario E0771 en ratas [49].

Se estudió también la actividad de varios withanólidos frente a las larvas de *Spodoptera littoralis* entre ellos el withanólido E (10) [50]. Este compuesto inhibe la alimentación de las larvas, siendo crítica la sustitución en los carbonos 4, 5 y 6 en la actividad desarrollada. Un grupo hidroxilo en posición 4 $\beta$  reduce la actividad en un factor de 10, mientras que la hidrólisis del 5,6-epóxido a 5,6-diol conduce a una inactivación total.

En 1984 se comprobó la actividad antiinflamatoria del 3 $\beta$ -hidroxi-2,3-dihidrowithanólido F (29), el cual fue aislado de frutos de *Withania coagulans* [51]. Se determinó que su actividad en peso, es 5 veces mayor que la de fenilbutazona y aproximadamente igual a la de la hidrocortisona. Por otra parte se comprobó que este withanólido no afecta el sistema nervioso central.



## Withanólidos en la Quimiotaxonomía

Mediante estudios realizados en la planta *Withania somnifera*, se comprobó que la misma existe como distintas poblaciones morfológicamente indistinguibles unas de otras, que difieren químicamente de acuerdo al tipo de withanólidos que contienen.

Tales poblaciones de plantas se designaron como quimiotipos, identificándose en Israel tres quimiotipos distintos (I-III). El principal constituyente del quimiotipo I [52] fue withaferina A (8), la cual estaba acompañada por pequeñas cantidades de otros withanólidos. No se encontró en el quimiotipo I ningún compuesto con un sustituyente hidroxilo en carbono 20, siendo los principales componentes 4 $\beta$ -hidroxi-5,6-epoxiwithanólidos.

El quimiotipo II contenía sólo 20-hidroxiwithanólidos [52]. El principal withanólido constituyente resultó ser el withanólido D (9), el cual se encontraba acompañado de otros withanólidos con grupos hidroxilo adicionales.

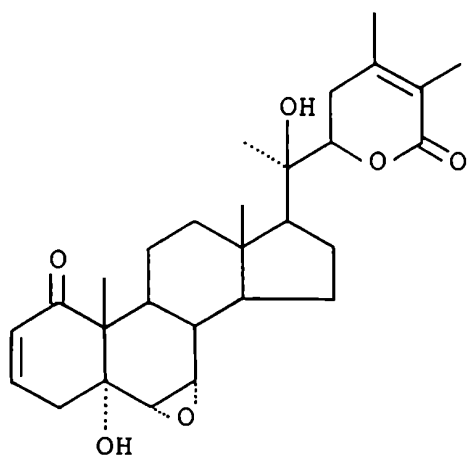
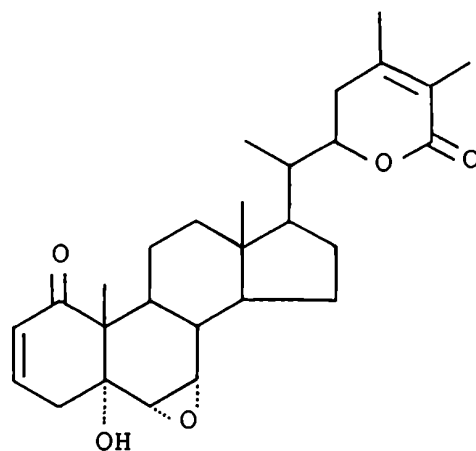
El quimiotipo III [53] también contenía sólo 20-hidroxi-withanólidos los cuales podían dividirse en dos grupos, uno con cadena lateral orientada en  $\beta$  y otro con cadena lateral orientada en  $\alpha$ . Ninguno de los withanólidos aislados en este quimiotipo poseían hidroxilo en carbono 4. Con excepción del withanólido E (10), el cual poseía el sistema 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epóxido, todos los componentes del grupo tenían un doble enlace en esta posición.

Se supuso que la formación de los distintos componentes en plantas pertenecientes a un mismo género tenía carácter genético lo

cual se confirmó realizando cruzas recíprocas por polinización entre distintos quimiotipos de *Withania somnifera* [4]. La cruza de los quimiotipos I y III produjo al withanólido D (9), como producto predominante, el cual no se detectó en los quimiotipos padres, mientras que withaferina A (8), el principal componente del quimiotipo I, se encontraba ausente y el withanólido E (10) permanecía presente en la descendencia como una herencia del tipo padre III.

Como observación general se puede decir que las plantas que producen 20-hidroxiwithanólidos no producen 20-desoxiwithanólidos, siendo una excepción la presencia conjunta de withaferina A y withanólido D en el tipo africano de *Withania somnifera* [4] y de 17-desoxi-20-hidroxiwithanona (30) junto con 17-desoxiwithanona (31) en *Lycium chinese* [54].

Los resultados obtenidos por cruzas de distintos quimiotipos señalan la posibilidad de lograr un control genético, pudiendo

3031

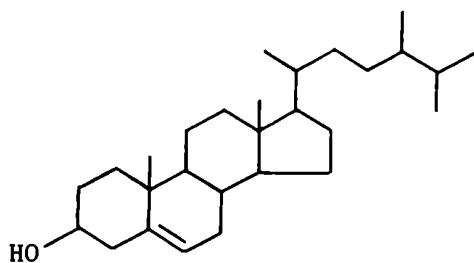
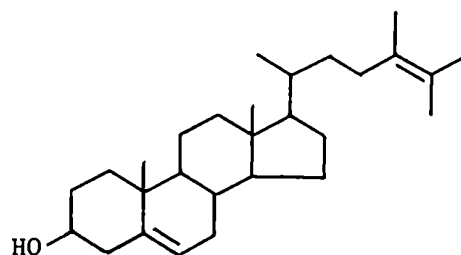
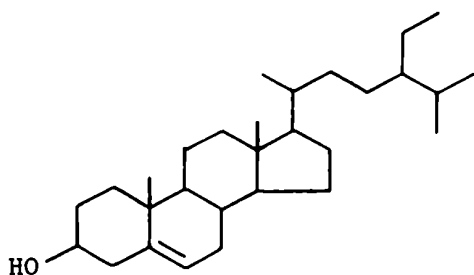
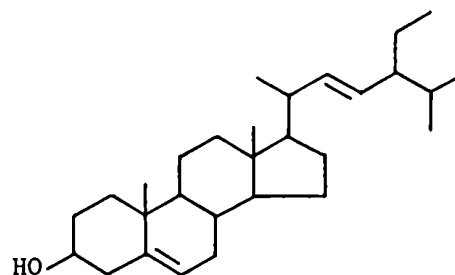
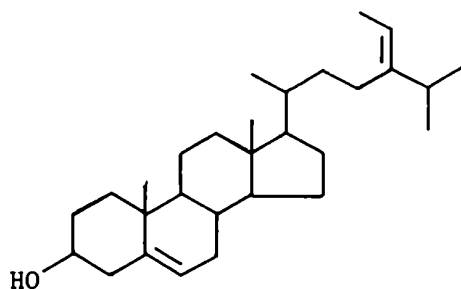
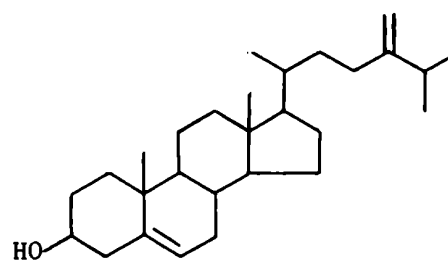
acumular withanólidos no encontrados en poblaciones naturales, o transformar componentes menores en mayoritarios. Posteriormente se encontró otro quimiotipo de *Withania somnifera* en la zona noroeste de India al cual se denominó quimiotipo Indio I. Este quimiotipo contenía sólo 20-desoxiwithanólidos, todos con cadena lateral orientada en  $\beta$  y presentaba una gran diversidad estructural; de él se aislaron ocho withanólidos no descriptos anteriormente [55].

### Antecedentes biosintéticos

En un estudio biosintético preliminar con la planta *Withania somnifera*, Lockley y col. identificaron como esteroides principales de esa planta a campesterol (32), 24-metilcolesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol (33), sitosterol (34), estigmasterol (35) y 28-isofucosterol (36a); también se identificaron cantidades menores y variables de 24-metilencolesterol (37a) (generalmente menos del 2% del total de esteroides) [56] (Figura 5).

Por otra parte en cultivos *in vitro* de yemas de *Withania somnifera* no se encontraron withanólidos en cantidad detectable; sin embargo se aislaron de dichos cultivos cantidades comparativamente grandes de 24-metilencolesterol [57]. En base a estos resultados se consideraron posibles precursores de withanólidos al campesterol, 24-metilcolesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol y 24-metilencolesterol todos ellos fitoesteroides de 28 carbonos.

Posteriormente Lockley y col. estudiaron la incorporación de 24(R,S)-metil-(28- $^3$ H)-colesterol (o sea una mezcla de campesterol (28- $^3$ H) (32) y dehidrobrasicasterol (28- $^3$ H) (24R-32)) y

campesterol 3224-metilcolesta-5,24-dien-3β-ol 33sitosterol 34estigmasterol 3528-isofucoesterol 36a24-metilencolesterol 37aFigura 5. Esteroles aislados de *Withania somnifera* [56].



24-metilencolesterol (28-<sup>3</sup>H) (37a), observándose marcación con tritio en los withanólidos aislados sólo en las experiencias realizadas con 24-metilencolesterol [58].

Se hicieron también experiencias para determinar si otros 4-desmetilesteroles estaban involucrados en la biosíntesis de withanólidos [58], pero los trabajos efectuados para investigar la intermediación del 24-metilcolesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol (33) arrojaron resultados confusos. No se encontró marcación de tritio en withanólidos aislados de *Withania somnifera* a la que se administró 24-metilcolesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol (28-<sup>3</sup>H) pero sin embargo se observó una gran pérdida de tritio del esterol administrado luego de su reaislamiento de la planta. Por lo tanto no pudo descartarse este esterol como posible precursor de withanólidos. En la figura 6 se encuentra resumido el resultado de estos estudios biosintéticos.

En un mismo experimento y con fines de comparación los autores administraron a plantas de *Withania somnifera* una mezcla de 24-metilencolesterol (28-<sup>3</sup>H) y 3(R,S)-mevalonolactona [2-<sup>14</sup>C]. La relación de radioactividad <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C obtenida que sería una medida de la incorporación relativa del esterol a la mevalonolactona fue significativamente mayor para el withanólido D (9) que para la withaferina A (8) [58]. Este resultado puede admitir variadas interpretaciones, como por ejemplo la existencia de compartimentalización de los sitios de biosíntesis o bien de las reservas de precursores de los dos withanólidos; también podría deberse a diferentes efectos isotópicos en las rutas que conducen

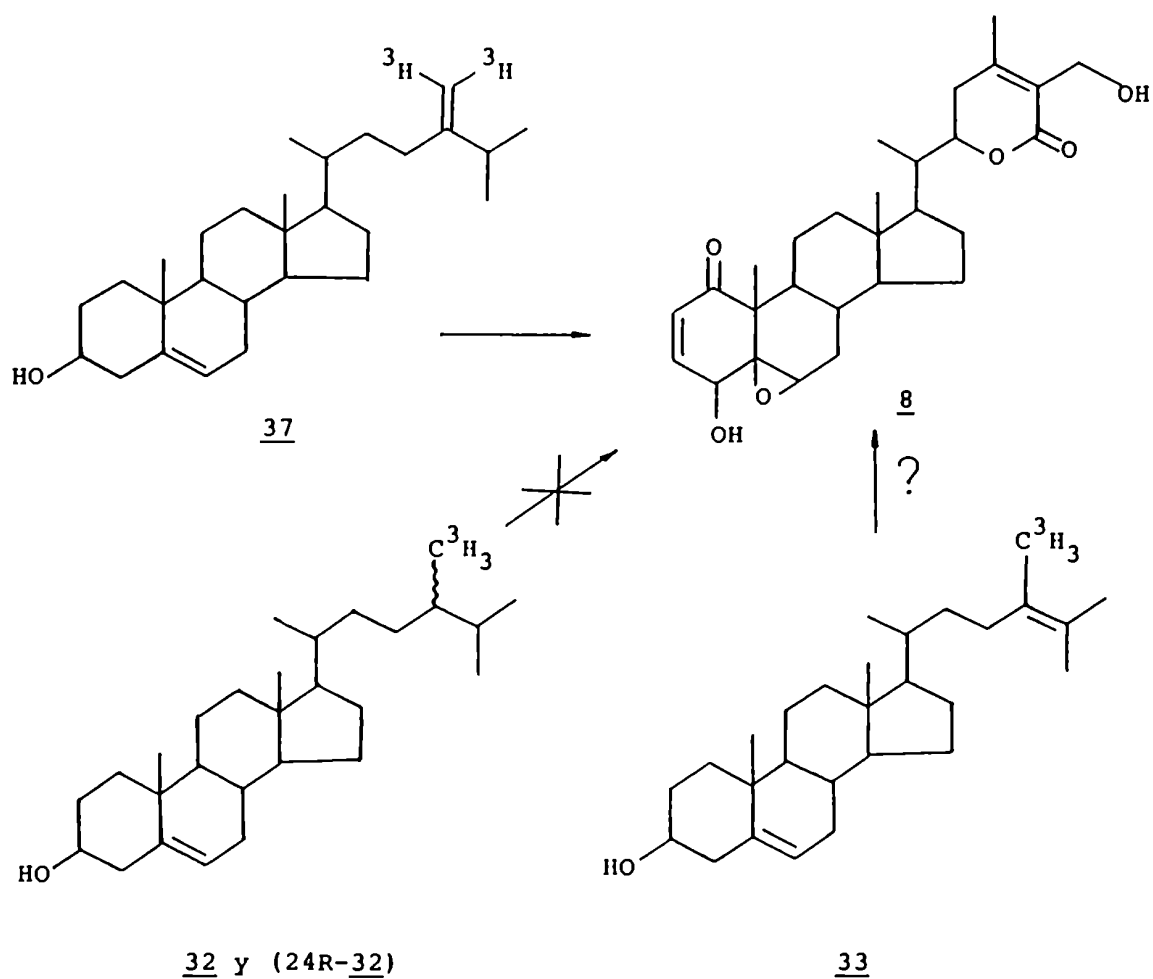


Figura 6. Posibles precursores de los withanólidos.

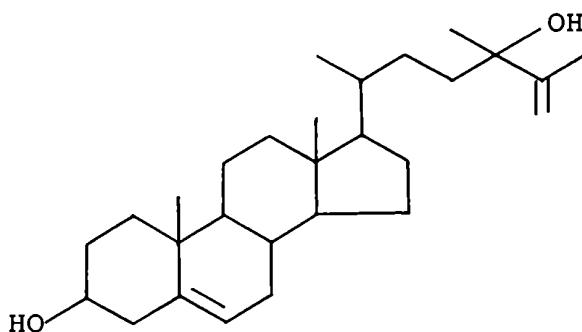
a la withaferina A y al withanólido D.

Por otra parte Vande Velde y col. [12] aislaron tres compuestos de *Withania coagulans* (Dunal) identificados como  $\beta$ -sitosterol, 3 $\beta$ -hidroxi-2,3-dihidrowithanólido F (29) y ergosta-5,25-dien-3 $\beta$ , -24(R,S)-diol (38) y consideraron a los dos últimos como posibles

precursores de los withanólidos. En base a esta suposición y considerando al 24-metilencolesterol como precursor de withanólidos, propusieron un camino biosintético que daría lugar a la formación de la cadena lateral de estos compuestos (Figura 7). I representa al 24-metilencolesterol; el fitosterol aislado II llevaría a III por hidroxilación en carbono 22, una reacción bien conocida en la biosíntesis de esteroides en la naturaleza. A partir de este punto son posibles dos hipótesis:

- a) ciclación de III para dar IV, el que luego se oxida a V.
- b) oxidación del isómero alílico VI para dar VII cuya posterior ciclación conduce a V.

La estructura de un lactol del tipo V se encontró en varios withanólidos [59-62] (ver página 2); la oxidación del mismo conduciría a la lactona VIII, característica en la estructura de estos compuestos.



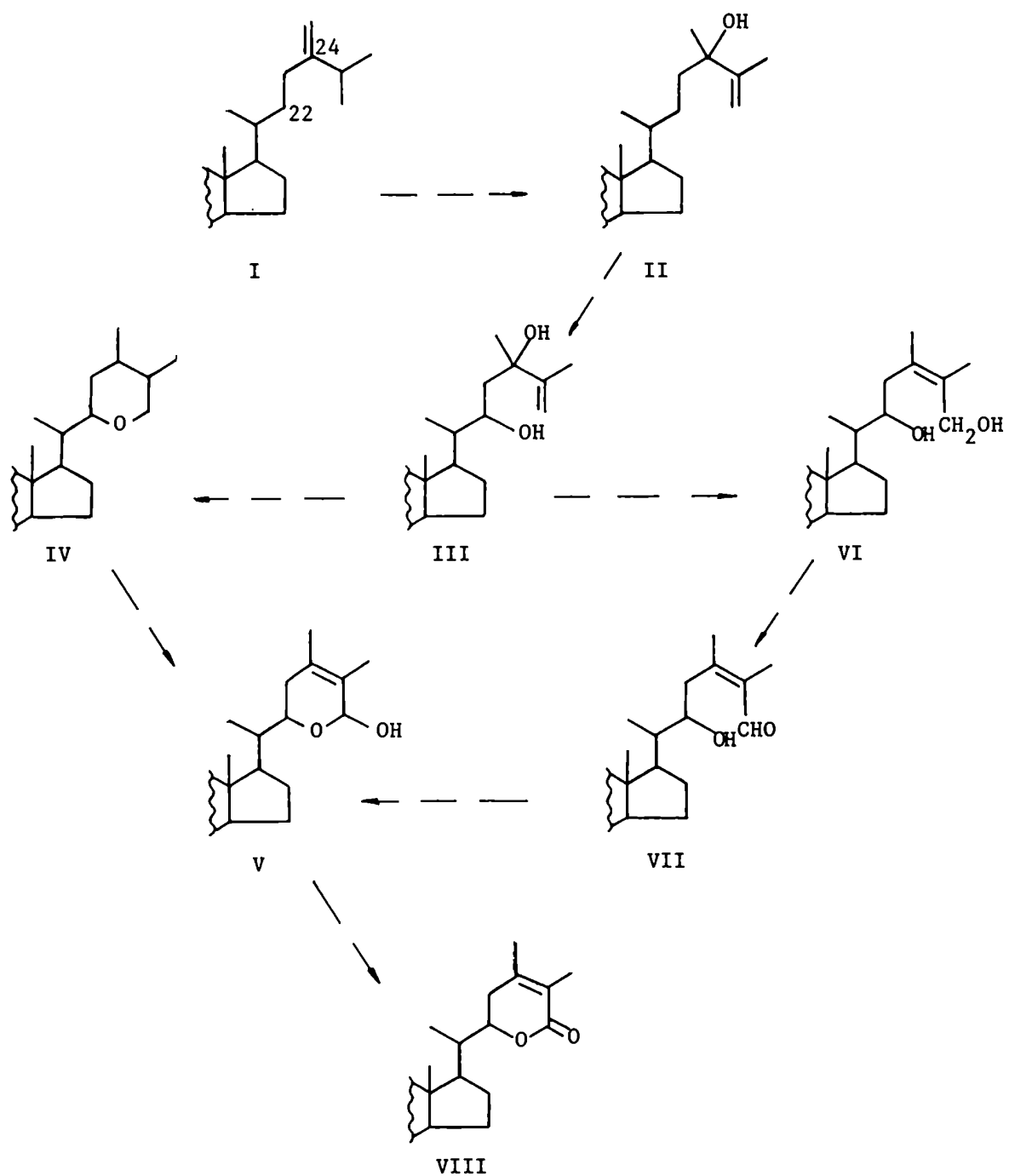


Figura 7. Posible camino biogénético que conduce a la formación de la cadena lateral de los withanólidos [12].

La intervención de 38 o la de 24-metilencolesterol en la biosíntesis de withanólidos no fue confirmada. Sin embargo, si alguno de éstos u otro esteroil alquilado en C-24 estuviera presente en el camino que conduce a withanólidos, el último paso sería la oxidación de uno de los metilos proquirales (26 ó 27) a carboxilo, dando el anillo lactónico característico de estos compuestos. Los carbonos 26 y 27 deberían provenir de los carbonos 2 y 3' de la mevalonolactona dependiendo de cual de los metilos proquirales del esteroil precursor se oxide a carboxilo. En *Physalis peruviana* se ha establecido que el metilo pro-R de varios 24 alquil esteroides proviene del carbono 2 de la mevalonolactona [63]. En la figura 8 se indican los carbonos involucrados tomando como ejemplo de esteroil precursor al 24-metilencolesterol y como withanólido biosintetizado a la withaferina A (8).

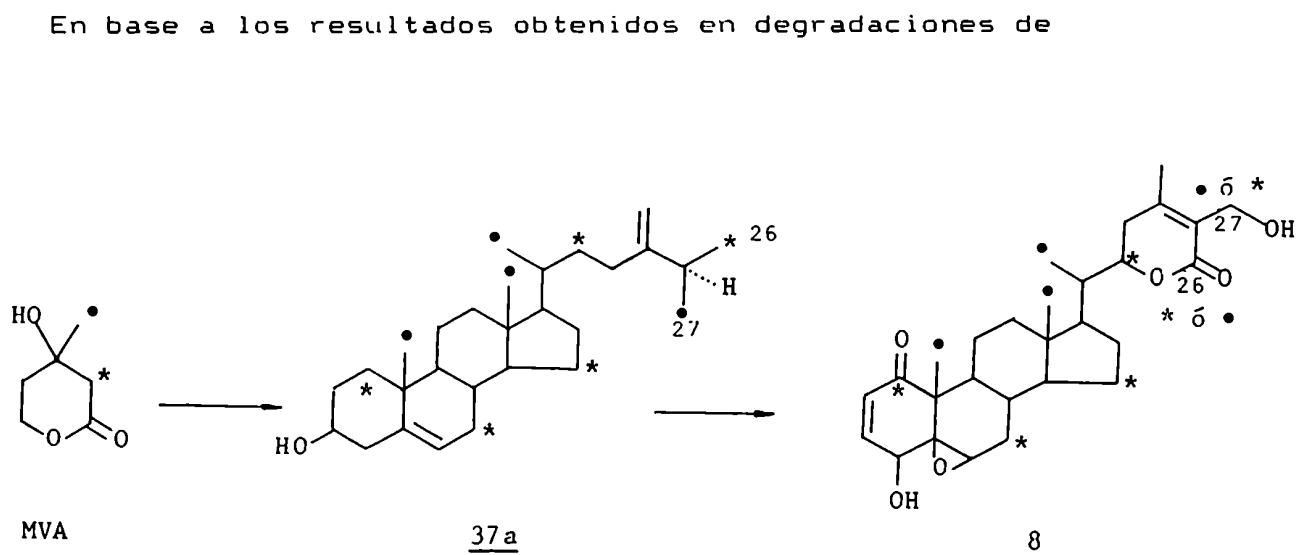


Figura 8. Posible origen biogénico de los carbonos 26 y 27 de los withanólidos.

withaferina A (8) [64] biosintetizada a partir de mevalonolactona-2- $^{14}\text{C}$  en *Acnistus breviflorus*, se pudo determinar por aislamiento de los carbonos 26 y 27 que el C-26 deriva del carbono 2 de la mevalonolactona y dado que este carbono es estereoespecíficamente incorporado en el metilo pro-R (C-26) de varios esteroides [63] sería este metilo el que se oxida a carboxilo (C-26) en los withanólidos.

Por otra parte en las mismas experiencias se determinó que la actividad presente en el C-26 de withaferina A era muy inferior a la esperada considerando que los withanólidos derivan de la mevalonolactona-2- $^{14}\text{C}$  a través del 24-metilencolesterol y deberían tener marcados por igual los carbonos 1,7,15,22 y 26. En este caso se esperaría que el C-26 tuviera un 20% de la actividad presente en withaferina A. El valor muy inferior encontrado (1,6%) sugiere que existiría una ruta alternativa en la biosíntesis de withanólidos en *Acnistus breviflorus*, en la cual se rompería la cadena lateral de un esteroide precursor con pérdida del carbono 26, si bien estos resultados no permiten establecer en qué enlace de la cadena se produjo la ruptura.

Como ya se mencionó, Lockley y col. [58] incorporaron 24-metilencolesterol-(28- $^3\text{H}$ ) en withanólidos, sugiriendo que los compuestos aislados habían retenido el carbono 28 del precursor. Estos resultados podrían justificarse si hubiera ruptura de la cadena lateral de un esteroide precursor entre los carbonos 24 y 25, lo cual implicaría un camino biosintético sin pérdida del carbono 28 del esteroide precursor. Este tipo de ruptura justificaría además la baja actividad específica para el C-26 encontrada en las degra-

daciones antes mencionadas. Sin embargo hay que considerar que la incorporación observada de 24-metilcolesterol [28- $^3\text{H}$ ] podría haber tenido lugar por el camino minoritario en el que no ocurre ruptura de la cadena o bien puede ser explicada por migración del tritio, ya que no se realizó ninguna degradación para confirmar que el tritio estaba aún en carbono 28. Este último argumento cobra fuerza por los resultados obtenidos por estos mismos autores con 24-metilcolesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol [28- $^3\text{H}$ ] [58] en el cual se observó pérdida de tritio al ser reaislado de la planta.

En años más recientes H.Gill y col. [65] estudiaron la incorporación a withanólidos de varios trazadores isotópicamente marcados en *Nicandra physaloides*. Los resultados obtenidos con 24-metilcolesterol [28- $^3\text{H}$ ] (37), 24-metilcolesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol [28- $^{14}\text{C}$ ] (33), la lactona [23,28- $^3\text{H}_2$ ] 39 y el diol [23,28- $^3\text{H}_2$ ] 40 se muestran en la tabla 2 e indicarían, según los autores, que los mismos son precursores de withanólidos en *Nicandra Physaloides*.

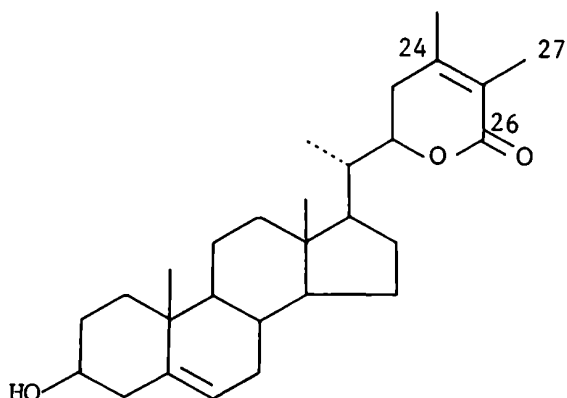
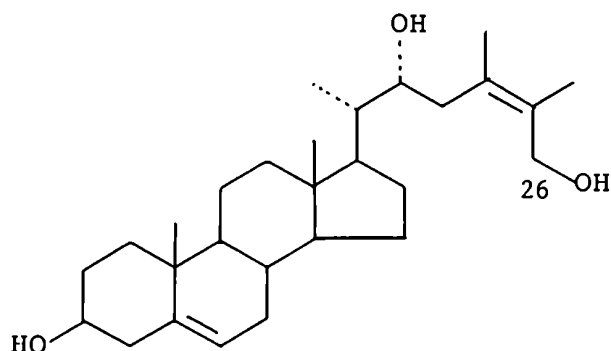
3940

TABLA 2. Incorporaciones de trazadores en Nic 1 [60]

Precursor	IA%	IE%
<u>37</u>	0,23	0,056
<u>33</u>	0,16	0,068
<u>39</u>	0,17	0,015
<u>40</u>	0,50	0,057

IA%:incorporación absoluta; IE%:incorporación específica.

Finalmente en una experiencia paralela los autores suministraron mevalonolactona [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ] y en base al espectro de RMN  $^1\text{H}$  del withanólido resultante, Nic 1 (7) concluyen que el carbono 26 del withanólido se originaría en el C-3' de la mevalonolactona. El espectro RMN  $^1\text{H}$  de Nic 1 (7) obtenido en esas condiciones presentaba señales debidas a los metilos 19 y 21, y al H-18 [60] provenientes del C-3' de la mevalonolactona (figura 9) y una señal a  $\delta=4,9$  que fue asignada al H-26. Sin embargo el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de Nic-1 descrito en la literatura presentaba dicha resonancia en  $\delta=5,0$  [60] y debe tenerse en cuenta que el HDO (que suele observarse en los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ) presenta una señal a aproximadamente 4,9 ppm. En tal caso, los resultados anteriores implicarían que no se observan en el espectro señales provenientes de los carbonos 26 ó 27. Considerando como se mencionara en la página 25 que la cadena lateral de un esteroi precursor de withanólidos se rompería con pérdida de los carbonos 26 y 27, la ausencia de la señal en RMN  $^1\text{H}$  correspondiente al metilo 27 (el cual proviene del C-3' de mevalonolactona) [64] no haría sino confirmar dichos resultados.



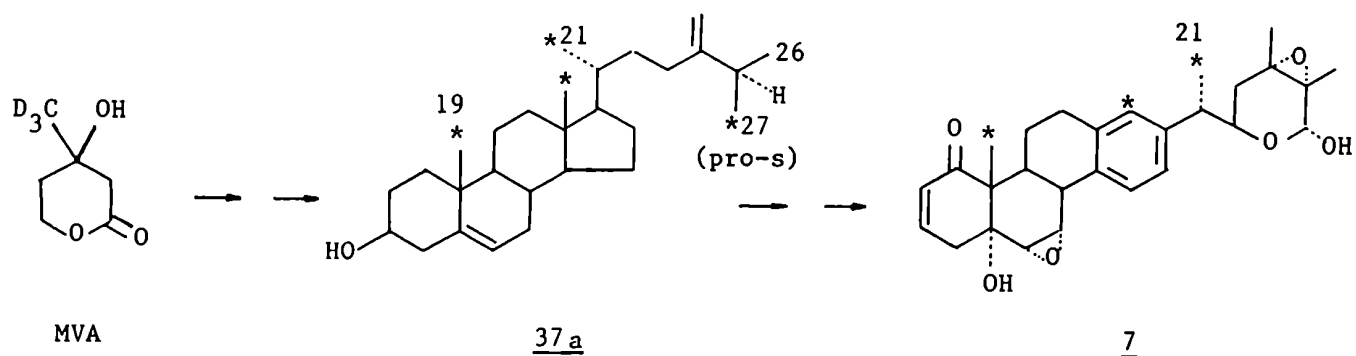


Figura 9. Experiencias de H. Gill y col [65].

En este trabajo de tesis se persiguieron dos objetivos principales. Por un lado comprobar la intervención de 24-metilcolesterol como precursor de withanólidos en *Achistus breviflorus* y mediante experimentos de doble marcación con este trazador isotópicamente marcado con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  determinar si la cadena lateral del mismo hasta C-24 se conservaba en su camino a withanólidos. Para llevar a cabo este estudio se requería sintetizar al mencionado esteroide marcado con  $^{14}\text{C}$  en C-24 y con  $^3\text{H}$  en alguna posición del núcleo esteroide no modificable en su conversión a withanólidos.

Un segundo objetivo fue el aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de tres especies del género *Jaborosa* dado que el aporte de nuevas estructuras permite en muchos casos la postulación de rutas biosintéticas que involucran a esos compuestos como posibles intermediarios [56,12]. Por otra parte estos estudios contribuyen a la taxonomía del género.

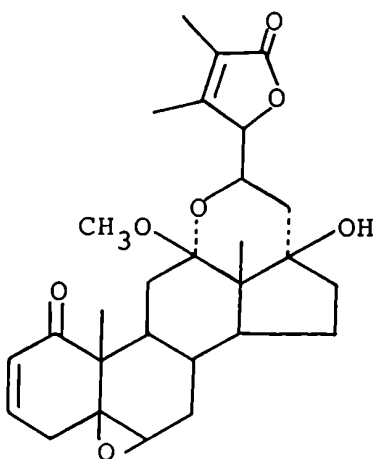
CAPITULO II  
WITHANOLIDOS DE *JABOROSA BERGII*, *JABOROSA*  
*LEUCOTRICA* Y *JABOROSA ODONELLIANA*.

## MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE WITHANOLIDOS

### Generalidades

Si bien el aislamiento de withanólidos suele llevarse a cabo a partir del extracto metanólico o etanólico de las hojas secadas al aire [3,66,33] en muchos casos este tratamiento da lugar a la formación de artefactos (por ejemplo: 12-metoxitrechonólido A (41)) que complican la posterior separación. Esto puede evitarse realizando las extracciones de la planta fresca con éter etílico en frío [7] o bien con metanol frío.

Los withanólidos aislados se han separado tradicionalmente por cromatografía en columna de silicagel [3,66] o alúmina [33] seguida de purificaciones por cromatografía en capa delgada preparativa o por cristalizaciones sucesivas de las mezclas [8]. Más recientemente, se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en la separación de withanólidos. Gustafson y col. [67]



utilizaron este método para separar withaferina A (8) de varios derivados químicos y microbianos de la misma obteniendo los mejores resultados con columnas de  $\mu$ Porasil (30x0,4 cm de diámetro interno), mezclas de acetato de etilo y hexano como solventes de elución y un detector de índice de refracción. Kirson y col [68] separaron por CLAR varios withanólidos que diferían entre sí principalmente por el número y posición de sustituyentes hidroxilo en columnas de Porasil A utilizando mezclas de hexano e isopropanol como eluyentes. Utilizaron un detector ultravioleta pudiendo alcanzar una sensibilidad 1000 veces mayor que la lograda por Gustafson, llegando a detectar 5 ngr de withanólido. Sin embargo los tiempos de retención eran largos y ocasionaban picos anchos y asimétricos. El desarrollo de nuevas fases cromatográficas amplió el campo de aplicación del método y su utilidad; así la separación de componentes de *Physalis peruviana* y *Nicandra physaloides* (c) Gaerth var. *albiflora* [69] se logró en una columna de Lichrosorb Si-100 (5  $\mu$ m) utilizando como eluyentes mezclas de isopropanol, diclorometano y acetonitrilo. Años más tarde A. Veleiro y G. Burton realizaron separaciones de mezclas de withanólidos provenientes de *Acnistus breviflorus* utilizando columnas Lichrosorb Si-100 (10  $\mu$ m) y acetato de etilo:hexano:isopropanol como eluyente. Se empleó un detector ultravioleta operando a 260 nm, longitud de onda en la cual los withanólidos presentaban la mayor absorbancia sin interferencia del solvente. Este sistema permitió realizar análisis cuantitativos de estos compuestos utilizando el método del standard externo [70]. Estos autores también realizaron con éxito las primeras separaciones de withanólidos por CLAR en fase reversa [71]

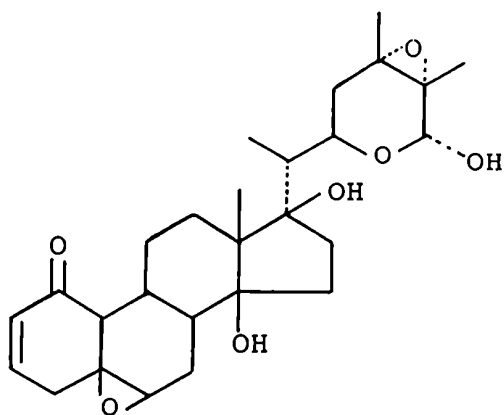
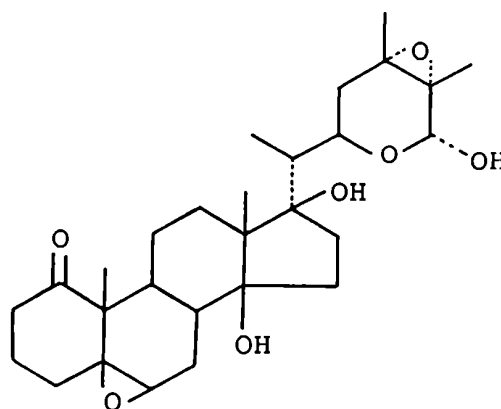
eluyendo con metanol:agua (65:35). Se utilizaron columnas rellenas con fase R-Sil 1B HL 10  $\mu\text{m}$ , la cual contiene un alto porcentaje de grupos ODS (detector UV a 225 nm), en escala analítica y preparativa la cual fue aplicada al aislamiento de withanólidos a partir de extractos parcialmente purificados. Esto último se utilizó en este trabajo de tesis para el aislamiento de withanólidos isotópicamente marcados en las experiencias de biosíntesis.

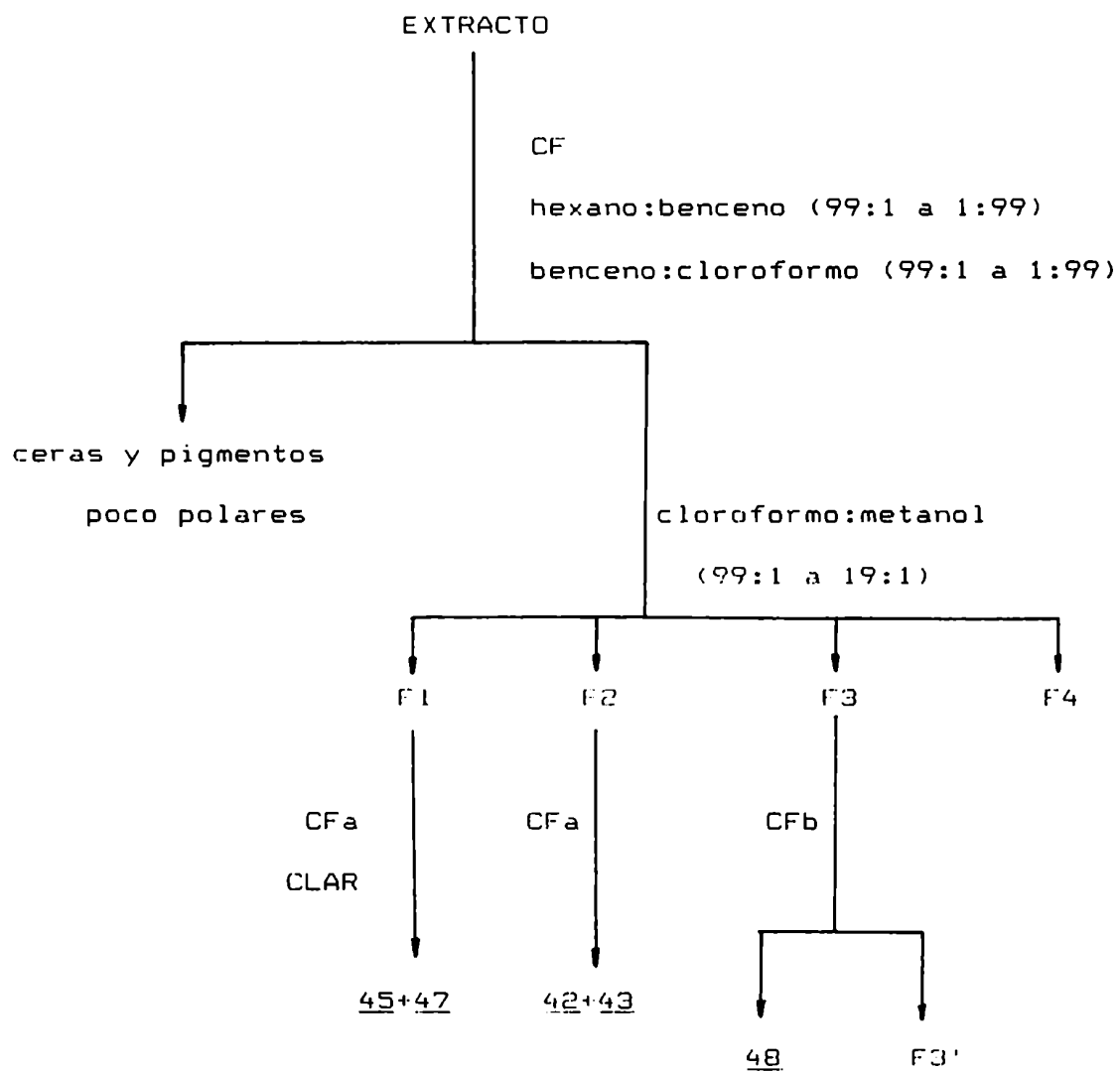
**AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE WITHANOLIDOS DE *JABOROSA BERGII***

La especie *Jaborosa bergii* es una hierba anual o bienal que ocupa una extensa área a lo largo de la Provincia del Monte, habiéndose preferentemente en suelos arenosos [24]. En este trabajo de tesis se estudiaron los withanólidos presentes en las hojas de plantas recolectadas en Liborio Luna, departamento de general Pederneira, provincia de San Luis.

Las hojas secas y pulverizadas se extrajeron con éter etílico a temperatura ambiente y el extracto así obtenido se sometió al esquema separativo de la figura 10.

Por cromatografía "flash" de la fracción 2 eluyendo con diclorometano:metanol (14:0.5) se obtuvieron dos compuestos principales, los cuales no pudieron separarse por ccd o CLAR en fase reversa. A estos compuestos se les asignaron las estructuras correspondientes

4243



CF: "cromatografía flash". Silicagel H o Merck 9385 eluida bajo presión de nitrógeno. a: diclorometano:metanol (14:0.5); b: acetato de etilo:hexano (9:1).

CLAR: Altex Ultrasphere ODS (250x10), eluyente: metanol:agua (70:30), flujo: 3 ml/min, detector de índice de refracción.

Figura 10. Separación de withanólidos de un extracto etéreo de *Jaborosa bergii*.

al epoxilactol 43 (al que se denominó jaborosalactol M) y su dehidroderivado 42, según la información espectroscópica y química que se detalla a continuación.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla de 42+43 (figura 11a) indicaba que ésta consistía de un 1-oxo-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxiwithanólido (43) y su 2,3 dehidroderivado (42) en relación 2:1 (tabla 5 pág. 45). El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la mezcla confirmó dicha presunción y permitió la asignación de las resonancias individuales correspondientes a 42 y 43 (tabla 6 pág. 46).

Por hidrogenación de la mezcla utilizando paladio-carbón 10% como catalizador se obtuvo como único producto 43, cuyo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (tabla 5) (figura 11b) presentaba un doblete a 4,99 ppm ( $J=11\text{Hz}$ ) el cual se asignó al H-26 de una cadena lateral de tipo epoxilactol. El acoplamiento observado para esta señal desaparecía por intercambio con agua deuterada, junto con el doblete a  $\delta$  3,56 ( $J=11$ ) el cual correspondía al grupo hidroxilo del lactol. Los grupos metilo de C-24 y C-25 resonaban a  $\delta$  1,40 y 1,41 de acuerdo con un estructura de epoxilactol del tipo de la presente en Nic-2 (44) [60]. El H-22 se observó como un doble triplete a  $\delta$  4,04 y el H-21 como un doblete a 0,97 ppm indicando la ausencia de un grupo hidroxilo en carbono 20. El singulete del metilo 19 a 1,21 ppm y el doblete del H-6 a  $\delta$  3,22 correspondía a un 1-oxo-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxiwithanólido. El singulete del metilo 18 a  $\delta$  1,10 indicó la presencia de grupos hidroxilo en los carbonos 17 y/o 14 [72].

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 43 (tabla 6) y la fase relativa de las señales en el espectro APT [73] (fig. 12) presentó concordancia con los datos anteriores; la configuración  $\alpha$  para el hidroxilo



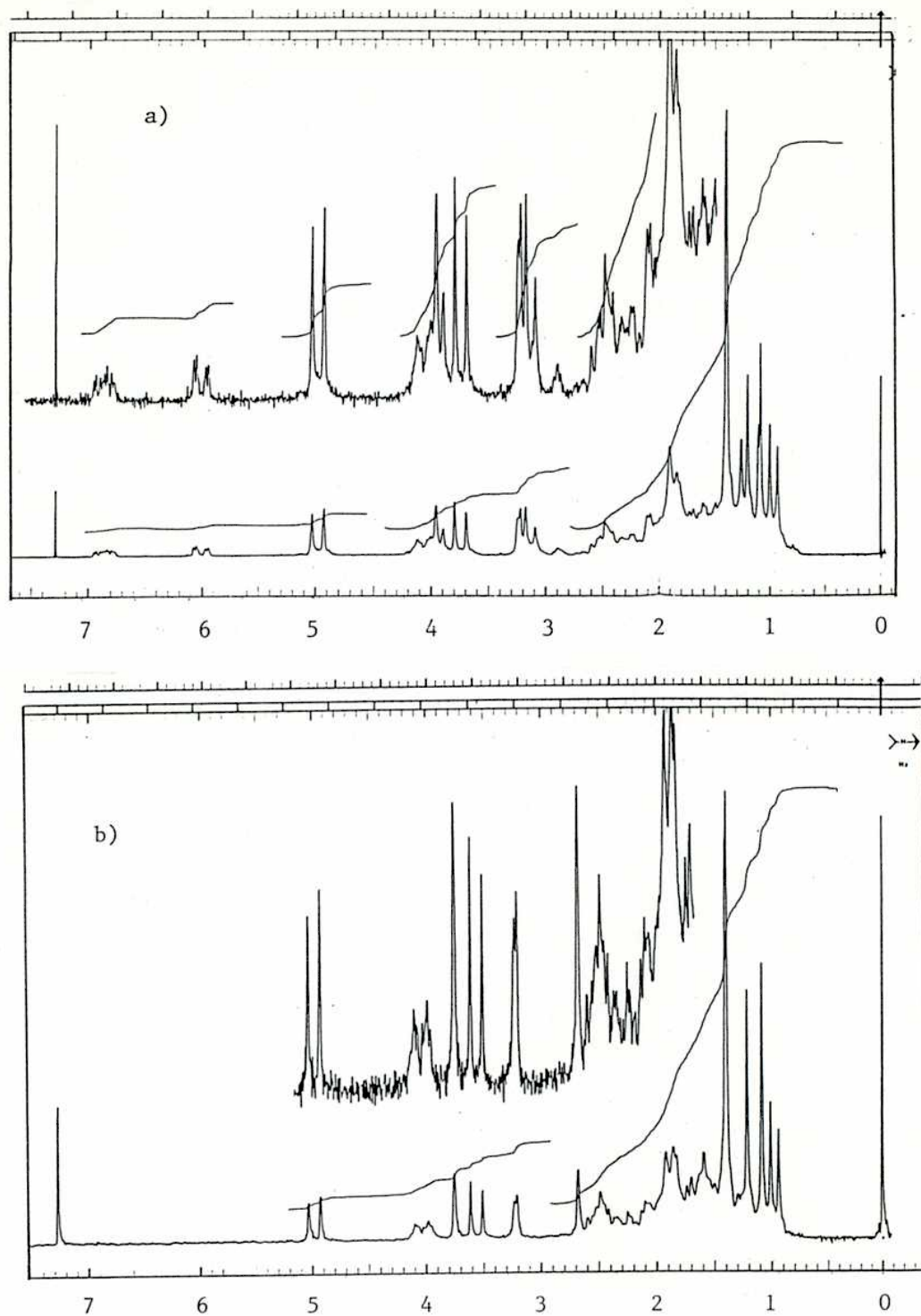
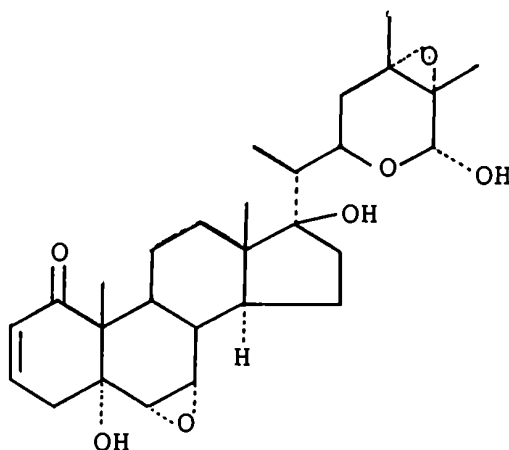


Figura 11. Espectro RMN  $^1\text{H}$  a 100 MHz en deuterocloroformo de a) 42+43 y b) del producto de hidrogenación 43.

44

de C-26 y el epóxido 24,25 de 43 (y 42) quedó determinada por comparación de las señales de los carbonos 22 a 28 con las correspondientes en Nic-2 (44) [74]. La presencia de grupos hidroxilo terciarios en C-14 y C-17 se evidenció por las señales a  $\delta$  87,5 y 88,5 respectivamente. El alto valor de desplazamiento químico encontrado para estos carbonos sugirió que probablemente ambos grupos hidroxilo se encontraban orientados hacia el mismo lado del esqueleto esteroideal [74,75]. La comparación de los valores de desplazamiento químico para los carbonos del anillo D y para los carbonos 18, 20 y 21 con los de withanólidos relacionados que tuvieran configuraciones  $14\alpha, 17\beta$  [72],  $14\alpha, 17\alpha$  y  $14\beta, 17\alpha$  [75] no resultó satisfactoria. Esto sugirió una posible orientación  $14\beta, 17\beta$  para los grupos hidroxilo terciarios de la cual no existían antecedentes en la literatura. Los desplazamientos químicos inducidos por piridina y observados en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  para los hidrógenos de C-18 y C-21 (tabla 5 pág. 45) fueron significativos;

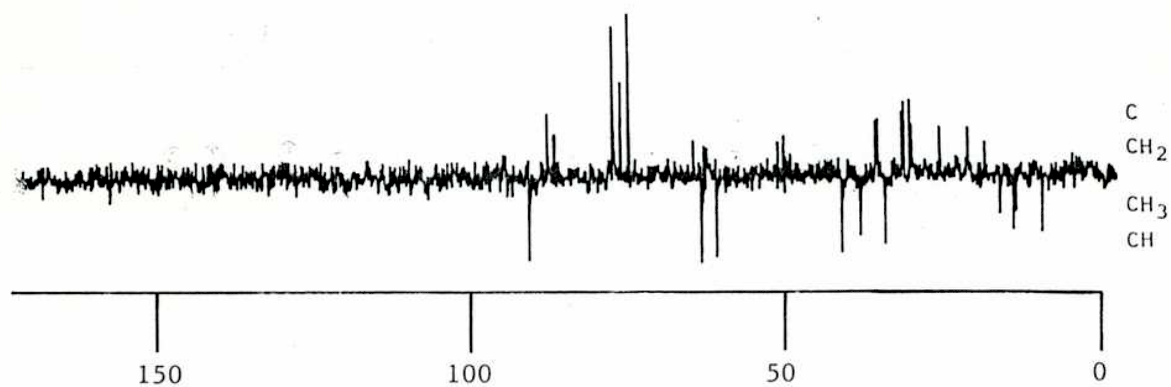


Figura 12. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 43 (APT: determinación de  $^1\text{H}$  vecinos).

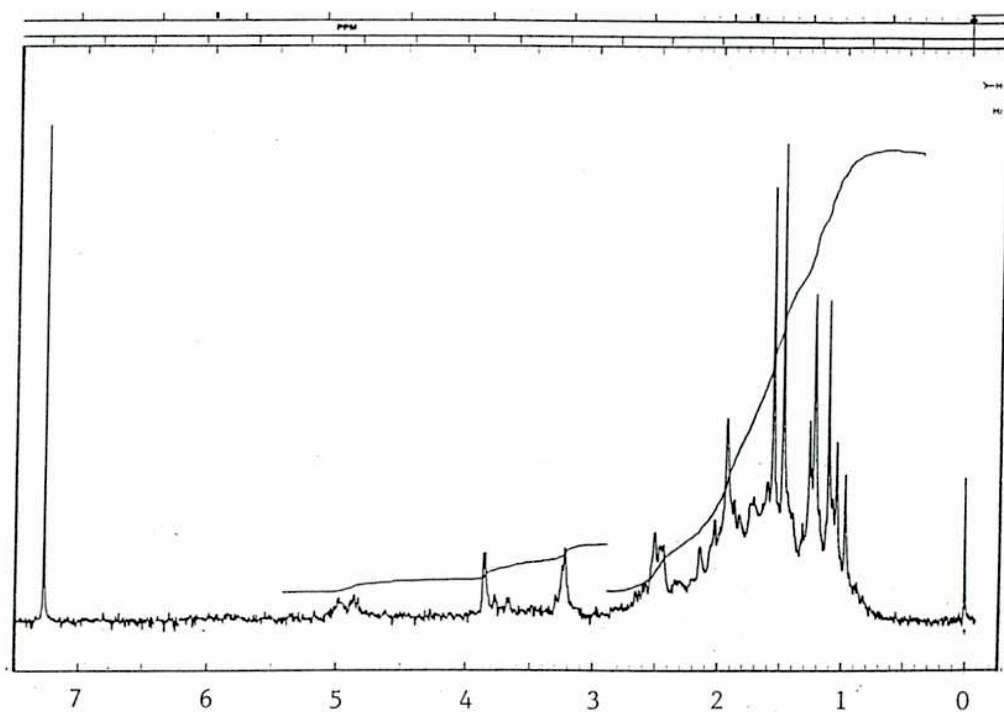
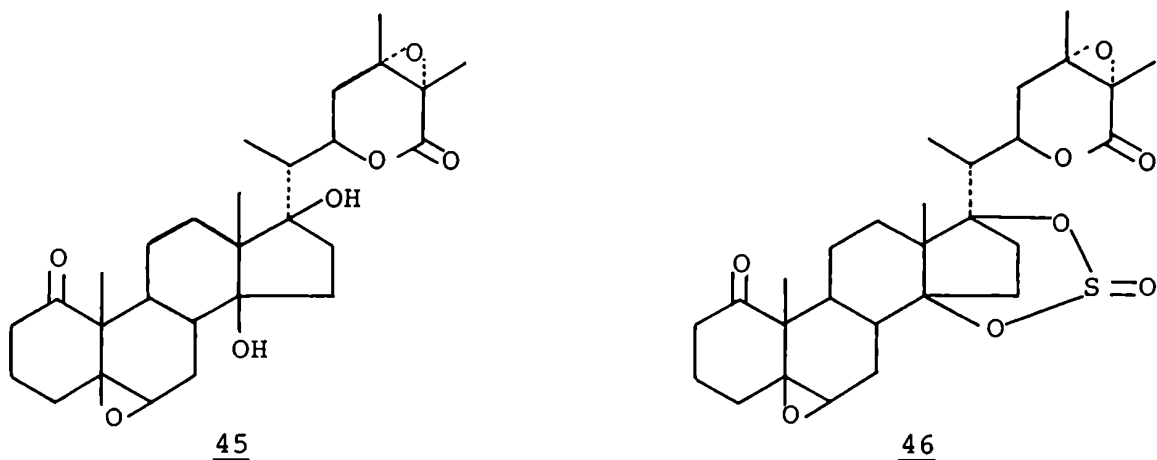


Figura 13. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 100 MHz en deuterocloroformo de la lactona 45.



el desplazamiento de 0,24 a campos bajos de la señal correspondiente a H-18 indicó que por lo menos uno de los grupos hidroxilo terciarios (ya sea el de C-14 o el de C-17) debía estar orientado en  $\beta$  [72,76]. La prueba final de la postulada configuración  $14\beta$ ,  $17\beta$  se obtuvo de la siguiente manera. El lactol 43 se oxidó con reactivo de Jones a la correspondiente epoxilactona 45 [77], cuyos espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (tablas 5 y 6 pág. 45 y 46) estaban muy relacionados con los de 43. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 13) mostró la desaparición de la señal correspondiente al H-26 y la señal del H-22 se desplazó a campos más bajos a  $\delta$  4,92.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observó el carbono 26 a  $\delta$  170,0 mientras que el C-22 sufrió un desplazamiento a 74,8 ppm. Por tratamiento de la lactona 45 con cloruro de tionilo en piridina a  $-12$  °C durante dos minutos se obtuvo el sulfito cíclico 46. Considerando que los desplazamientos químicos inducidos por piri-

dina habían establecido que por lo menos uno de los grupos hidroxilo presentes en C-14 y C-17 debía estar orientado en  $\beta$ , la formación del éster cíclico 46 indicó que ambos grupos tenían dicha orientación. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 46 presentaba al H-18 desplazado 0,28 ppm a campos más bajos que en la lactona 45. Esto puede ser explicado considerando que los hidrógenos del grupo metilo se encuentran ubicados en la zona de desprotección del doble enlace azufre-oxígeno. No se observó desprotección alguna de los hidrógenos del metilo 18 del sulfito cíclico de un  $14\alpha,17\alpha$ -dihidroxiesteroide descrito en la literatura [78]. En la figura 14 se muestra la conformación de mínima energía obtenida mediante el

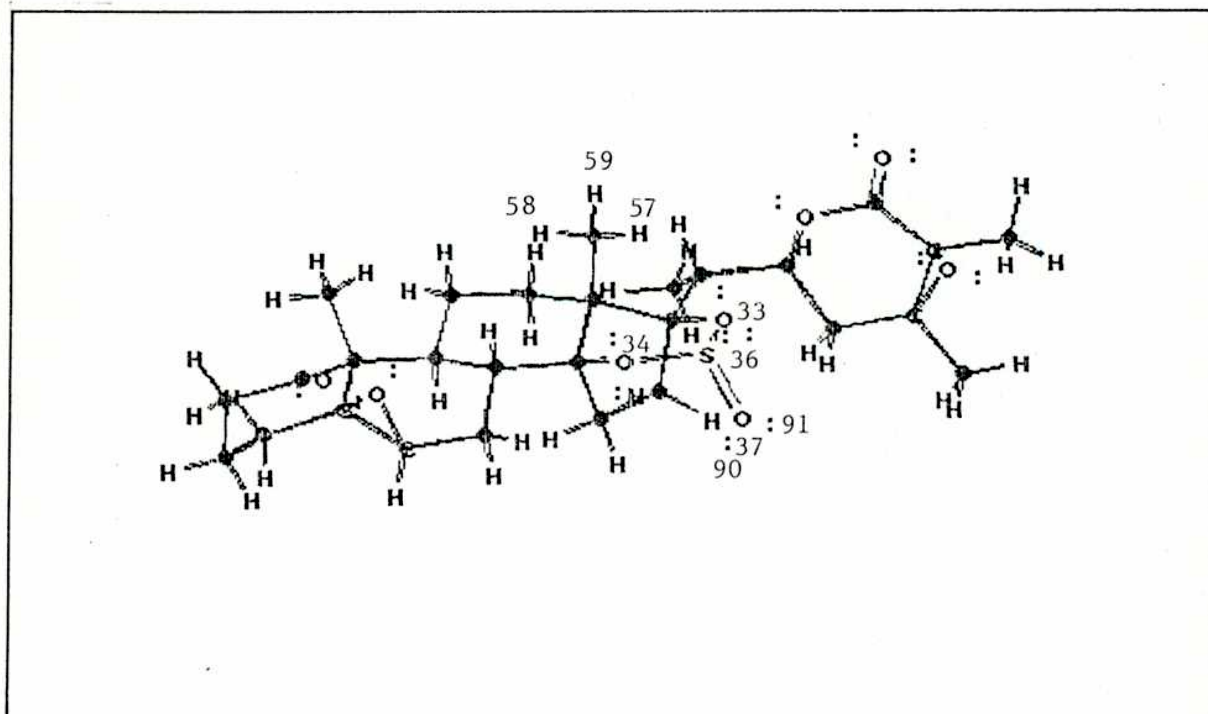


Figura 14. Conformación de mínima energía del sulfito cíclico 46.

programa PCMODEL (al cual se hará referencia en mayor detalle en la página 54) del sulfito cíclico 46 en la cual se visualiza que el metilo 18 se encuentra en la zona de desprotección del grupo S=O. Esto último se comprobó calculando las desviaciones de los hidrógenos del metilo 18 con respecto al plano definido por los átomos S(36), O(37), y los pares electrónicos 90 y 91. En la tabla 3 se muestran los valores calculados. Puede observarse que el H (57) se encuentra sólo a 0,3 Å bajo dicho plano.

Se realizó también el espectro 2D-COSY-45 de 43. En la figura 15 se representa una zona del mismo entre 4,1 y 0,8 ppm pudiendo

TABLA 3. Desviaciones del plano medio definido por los "átomos" 36, 37, 90 y 91.

Atomo	Desviación (Å)
37	-0,00155
90	+0,00065
91	+0,00063
36	+0,00026
33	-0,66843
34	-0,67906
14	-2,07933
17	-2,06982
18	-1,35920
57	-0,29459
58	-1,34986
59	-1,65240

asignarse en base a él los desplazamientos químicos de todos los hidrógenos del esteroide (tabla 4).

La fracción menos polar que contenía withanólidos (F1, fig. 10) se sometió a un segundo fraccionamiento por cromatografía "flash"

TABLA 4. Desplazamientos químicos de los protones de 43.

H	$\delta$ (ppm)	H	$\delta$ (ppm)
2	2,53	12 $\beta$	1,46
2'	2,42	15	1,62-1,90
3	1,73	16	1,62-1,90
3'	1,94	18	1,10
4 $\alpha$	1,31	19	1,21
4 $\beta$	2,10	20	1,86
6	3,22	21	0,97
7 $\alpha$	1,51	22	4,04
7 $\beta$	2,38	23 $\alpha$	2,13
8	1,61	23 $\beta$	1,71
9	1,38	26	4,99
11 $\alpha$	1,21	27	(1,41)
11 $\beta$	1,43	28	(1,40)
12 $\alpha$	1,3		

Los desplazamientos químicos en ppm medidos en deuterocloroformo.

Los valores entre paréntesis pueden ser intercambiados.

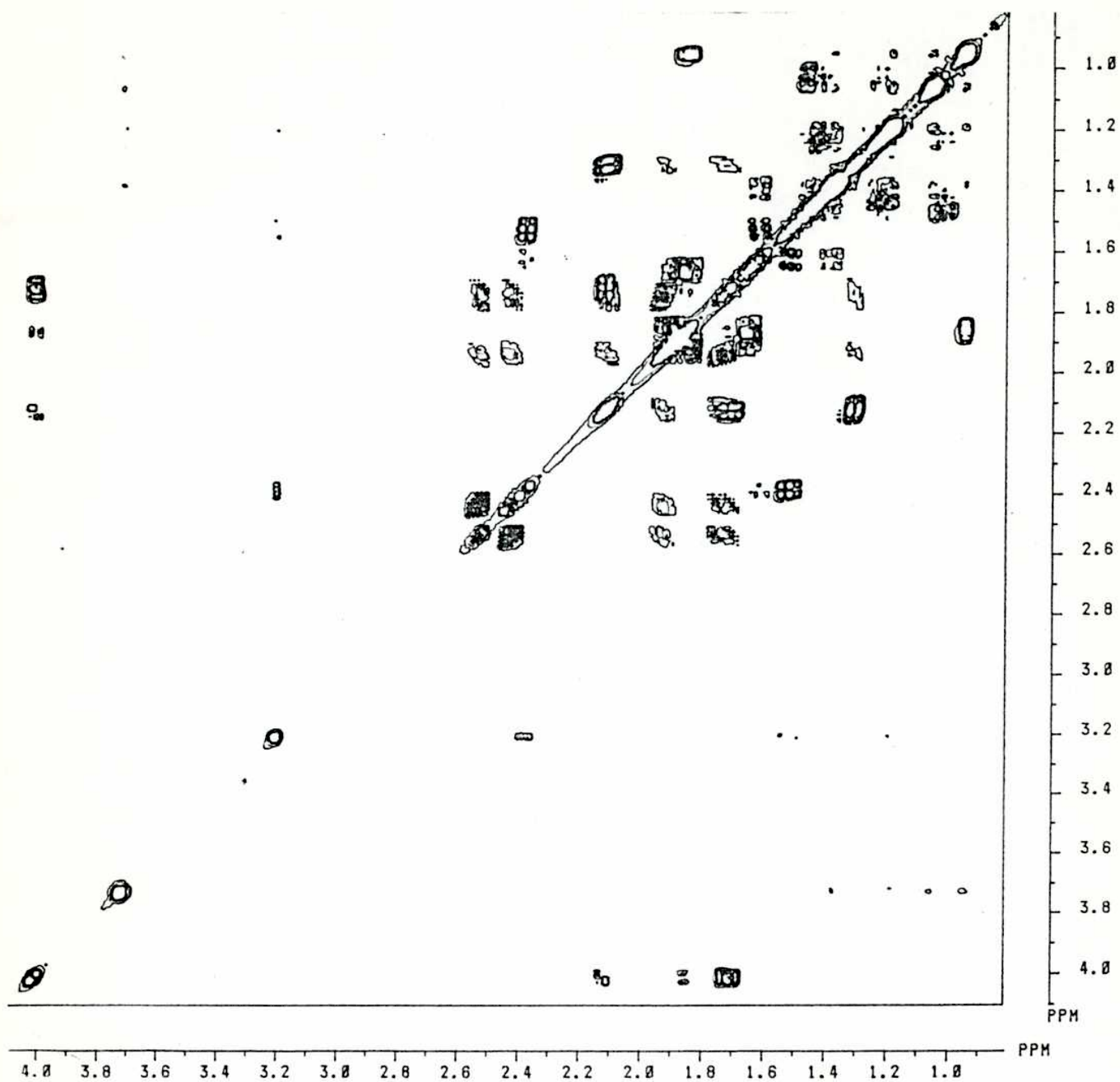


Figura 15. Espectro COSY-45  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de 43 (zona comprendida entre 0,8 y 4,1 ppm).



eluyendo con diclorometano:metanol (14:0.5). La fracción principal se purificó por CLAR en fase reversa eluyendo con metanol:agua (70:30), obteniéndose una mezcla de dos withanólidos, los cuales no pudieron ser separados. El cromatograma correspondiente se representa en la figura 16.

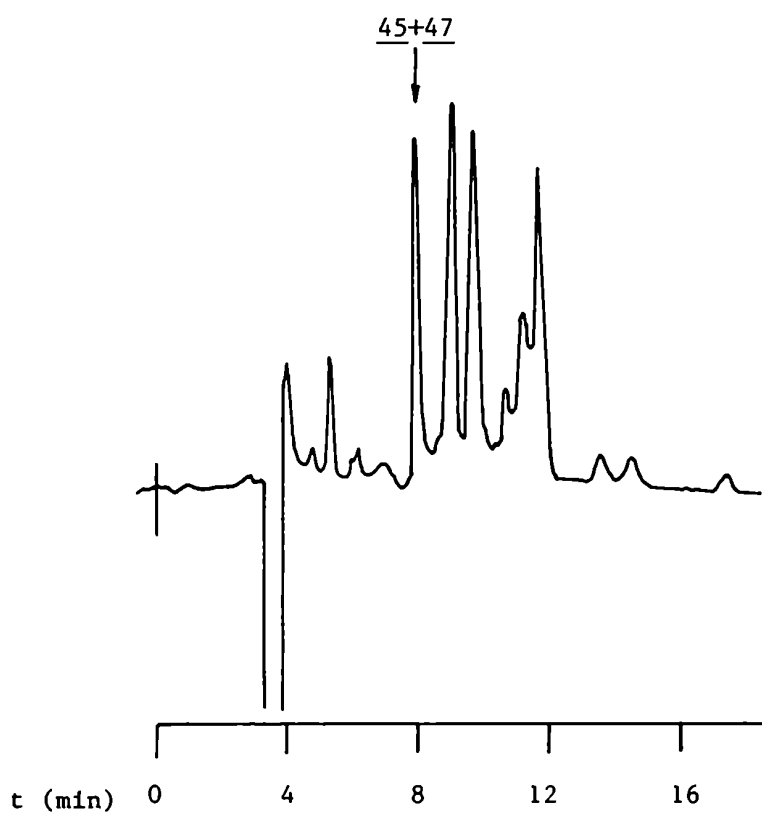


Figura 16. Separación por CLAR de la fracción que contenía a 45+47. Columna: Altex Ultrasphere ODS (250x10), eluyente: metanol:agua (70:30), flujo: 3 ml/min, detector: índice de refracción, 45+47 Tr:7,8 min.

Por análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla se pudo comprobar que ésta estaba compuesta por la lactona 45 (denominada jaborosalactona M) y su dehidroderivado 47 (tabla 5).

Por hidrogenación de la mezcla con paladio-carbón 10% en etanol se obtuvo la lactona 45 pura, idéntica (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) a la obtenida por oxidación con reactivo de Jones del lactol 43.

Por último por cromatografía "flash" de la fracción 3 (F3, figura 10) eluyendo con acetato de etilo:hexano (9:1) se obtuvieron dos withanólidos. El más polar, al cual se denominó jaborosalactol N, fue caracterizado como el 1-oxo-2,4-dien withanólido 48 en base a los datos espectroscópicos que se discuten a continuación. El menos polar, indicado en la figura 10 como F3' se encuentra en estudio pero aún no ha sido totalmente caracterizado.

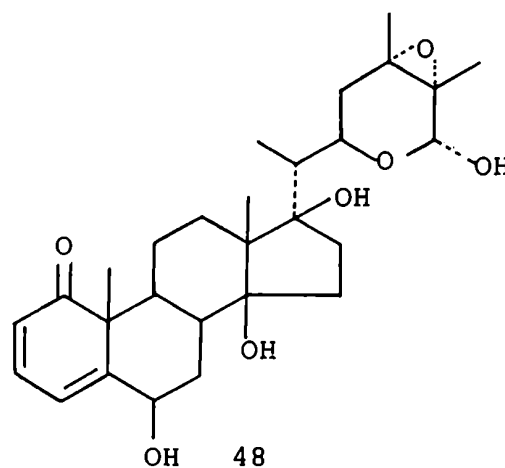
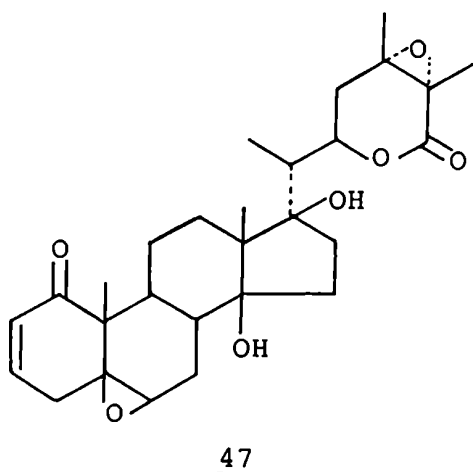


TABLA 5. Desplazamientos químicos de los protones relevantes de los compuestos 42-48

H	<u>42</u>	<u>43</u>	<u>45</u>	<u>46</u>	<u>47</u>	<u>48</u>
2	6,10 dd J=10; 4				6,10 dd J=10; 4	6,01 dd J=9,5; 1
3	6,85 m				6,85 m	6,92 dd J=9,5; 6
4						6,14 dd J=6; 1
6	3,22 d J=3	3,22 d J=3	3,23 d J=3	3,21 d J=3	3,23 d J=3	4,62 sa
18	1,11 s [1,34]	1,10 s [1,34]	1,12 s [1,33]	1,40 s	1,14 s	1,18 s
19	1,26 s	1,21 s	1,23 s	1,23 s	1,27 s	1,49 s
21	0,97 d [1,39] J=7	0,97 d [1,39] J=7	1,01 d [1,19] J=7	1,05 d J=7	1,01 d J=7	0,96 d J=7
22	4,04 dt [4,88] J=12; 4	4,04 dt [4,84] J=12; 4	4,92 dt [5,22] J=12; 4	4,98 m	4,92 dt [5,22] J=12; 4	4,07 ddd J=11; 8; 4
26	4,99 d [5,52] J=11	4,99 d [5,48] J=11				5,00 d J=11
27	(1,41) s	(1,41) s	1,57 s	1,55 s	1,57 s	(1,42) s
28	(1,40) s	(1,40) s	1,48 s	1,49 s	1,48 s	(1,40) s
26-OH	3,56 d J=11	3,56 d J=11				3,65 d J=11

Desplazamientos químicos en ppm medidos en deuterocloroformo; los datos entre corchetes corresponden a soluciones en piridina-d<sub>5</sub>.

Los valores entre paréntesis pueden ser intercambiados.

TABLA 6. Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 42-45 y 48 en deuterocloroformo.

Carbono	<u>42</u>	<u>43</u>	<u>45</u>	<u>48</u>
1	203,3	212,4	212,2	191,7
2	128,8	(30,7)	30,8	126,3
3	144,5	(30,5)	30,8	140,0
4	32,9	35,9	36,0	118,3
5	61,5	65,3	65,3	148,1
6	64,0	61,7	61,6	73,4
7	25,6	26,0	25,9	29,7
8	35,2	34,7	40,0	34,9
9	40,3	38,6	38,7	44,8
10	48,2	51,8	51,7	53,2
11	18,9	18,9	19,0	19,0
12	21,4	21,6	21,4	21,1
13	50,6	50,6	50,3	51,0
14	87,4	87,5	87,4	87,5
15	(31,6)	(31,6)	(31,6)	(30,2)
16	36,0	36,3	37,1	35,7
17	88,6	88,5	88,4	88,8
18	14,4	14,4	14,6	14,4
19	14,1	14,1	14,3	20,2
20	41,8	41,7	41,5	41,5
21	9,8	9,8	9,0	9,9
22	64,0	64,0	74,8	64,4
23	(31,9)	(31,9)	(30,0)	(32,5)
24	(63,9)	(63,7)	61,2	(63,6)
25	(63,2)	(63,5)	63,0	(63,4)
26	91,5	91,4	170,0	91,6
27	16,5	16,5	13,6	16,6
28	18,8	18,9	17,8	18,9,

Los valores entre paréntesis pueden ser intercambiados.  
Asignaciones por técnica APT.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 48 (tabla 5) (figura 17) presentó señales entre  $\delta$  6,01 y 6,92 y a  $\delta$  4,62 las cuales correspondían a un 1-oxo-2,4-dien-6 $\beta$ -hidroxiwithanólido [25,26]. Las señales de los hidrógenos de C-18 y de la cadena lateral eran muy cercanas a las de 43 indicando la presencia de una cadena lateral de tipo epoxilactol y grupos hidroxilo en las posiciones 14 $\beta$  y 17 $\beta$ . El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  presentaba también una total semejanza con los de 43 y 45 para los carbonos del anillo D y la cadena lateral. Las cuatro resonancias a  $\delta$  126,3, 140,0, 118,3 y 148,1 se asignaron a los carbonos olefínicos 2, 3, 4 y 5 respectivamente; el C-1 apareció a  $\delta$  191,7 y el C-6 a 73,4. Resulta interesante destacar que el único otro withanólido descrito que presentaba el patrón de sustitución de 48 en los anillos A/B era jaborosalactona B (27a), la cual había sido aislada a partir de *Jaborosa integrifolia* [25,26].

#### Espectros de masa de los withanólidos aislados

La fragmentación del esqueleto carbonado puede ser considerada en dos partes: a) la del anillo D y la cadena lateral por un lado y b) la del anillo B y en menor medida el anillo C por el otro. En las figuras 18 y 19 se esquematizan estas rupturas para el jaborosalactol M (43).

Dentro del primer grupo la ruptura más importante es la pérdida del anillo E dando lugar, por ejemplo en jaborosalactol M (43) al ión de  $m/z$  143 (fig. 18). Este fragmento común a todos los lactoles pierde una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  para dar el ión de  $m/z$  125 el cual por pérdida de oxígeno genera el ión de  $m/z$  109 (pico base) (fig.19).

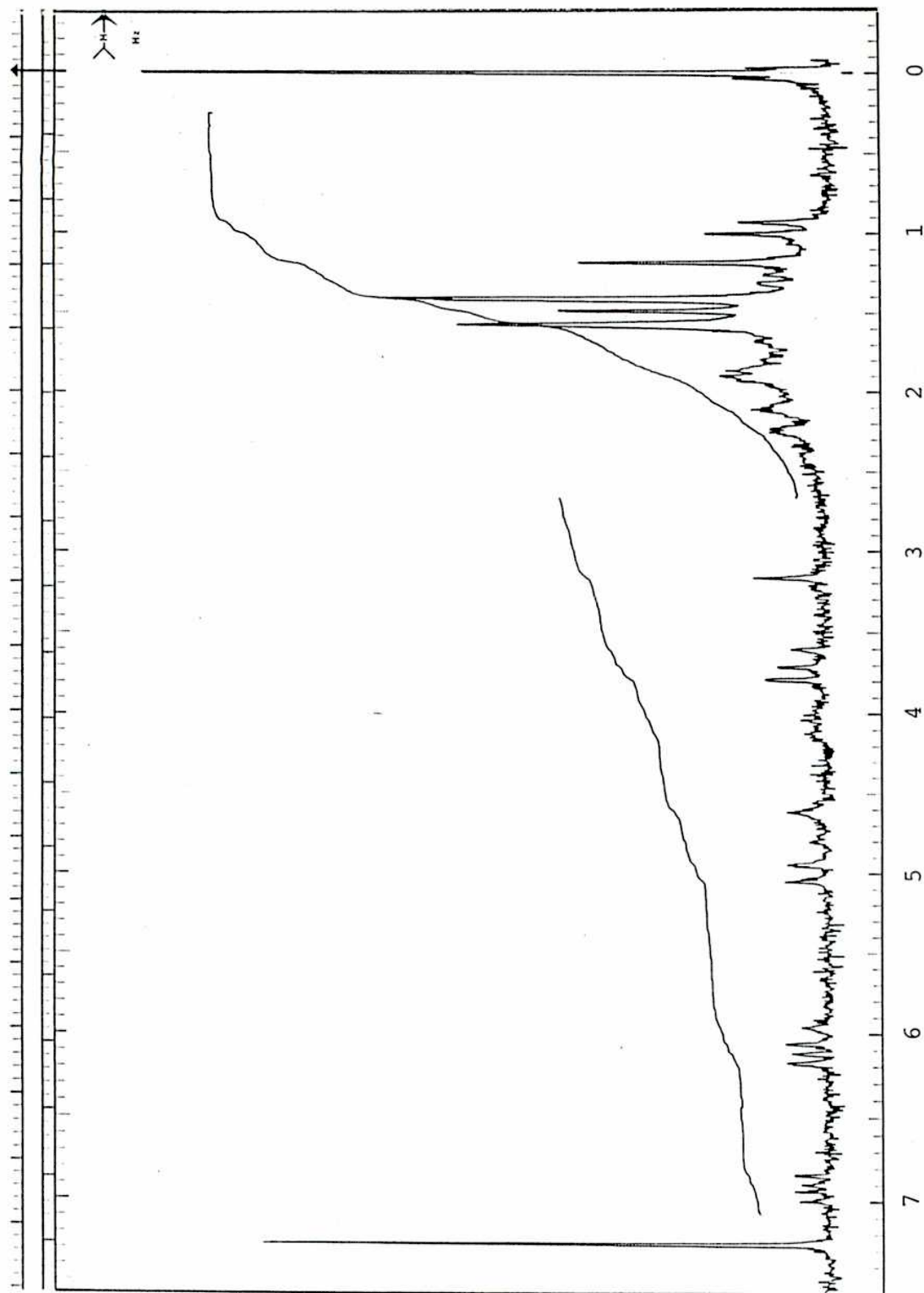


Figura 17. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 100 MHz en deuterocloroformo de jaborosalactol N.

Resulta también importante el ión de  $m/z$  127 generado por pérdida de oxígeno a partir del 143; el mismo puede perder  $H_2O$  generando el ión a  $m/z$  109 [79]. La pérdida de la cadena lateral favorecida por la presencia del hidroxilo en la posición 17 ocurre con transferencia de H para dar el ión a  $m/z$  318, la ruptura complementaria da origen al fragmento a  $m/z$  171 (C20-C28) el cual puede sufrir pérdidas de  $H_2O$  y oxígeno para dar los iones a  $m/z$  153, 155 y 137. La fragmentación del anillo D a través de los enlaces (C13-C17) y (C14-C15) ocurre con transferencia de hidrógeno para dar el ión a  $m/z$  227.

La fisión del anillo B puede ser considerada como promovida por un reordenamiento de Mc Lafferty [26]. Producido este reordenamiento caben luego dos posibilidades: a) la ruptura del enlace C6-C7 con transferencia de hidrógeno para dar el ión a, el cual puede reordenarse y b) la fisión del enlace C7-C8 con reordenamiento del epóxido para dar el ión b, el que puede ulteriormente perder acetileno para dar el ión c. La ruptura del anillo C a través de los enlaces C11-C12 y C8-C14 para dar los iones a  $m/z$  192 y 298 resulta de menor importancia.

Para el jaborosalactol N (48) se podría plantear que la fragmentación del anillo B ocurriría por fisión del enlace C6-C7 luego de un reordenamiento de Mc Lafferty como el descrito para los  $5\beta,6\beta$ -epoxiwithanólidos (figura 20). Sin embargo con los datos obtenidos hasta el presente no resulta posible asegurar esto último ni racionalizar los restantes fragmentos presentes en el espectro.

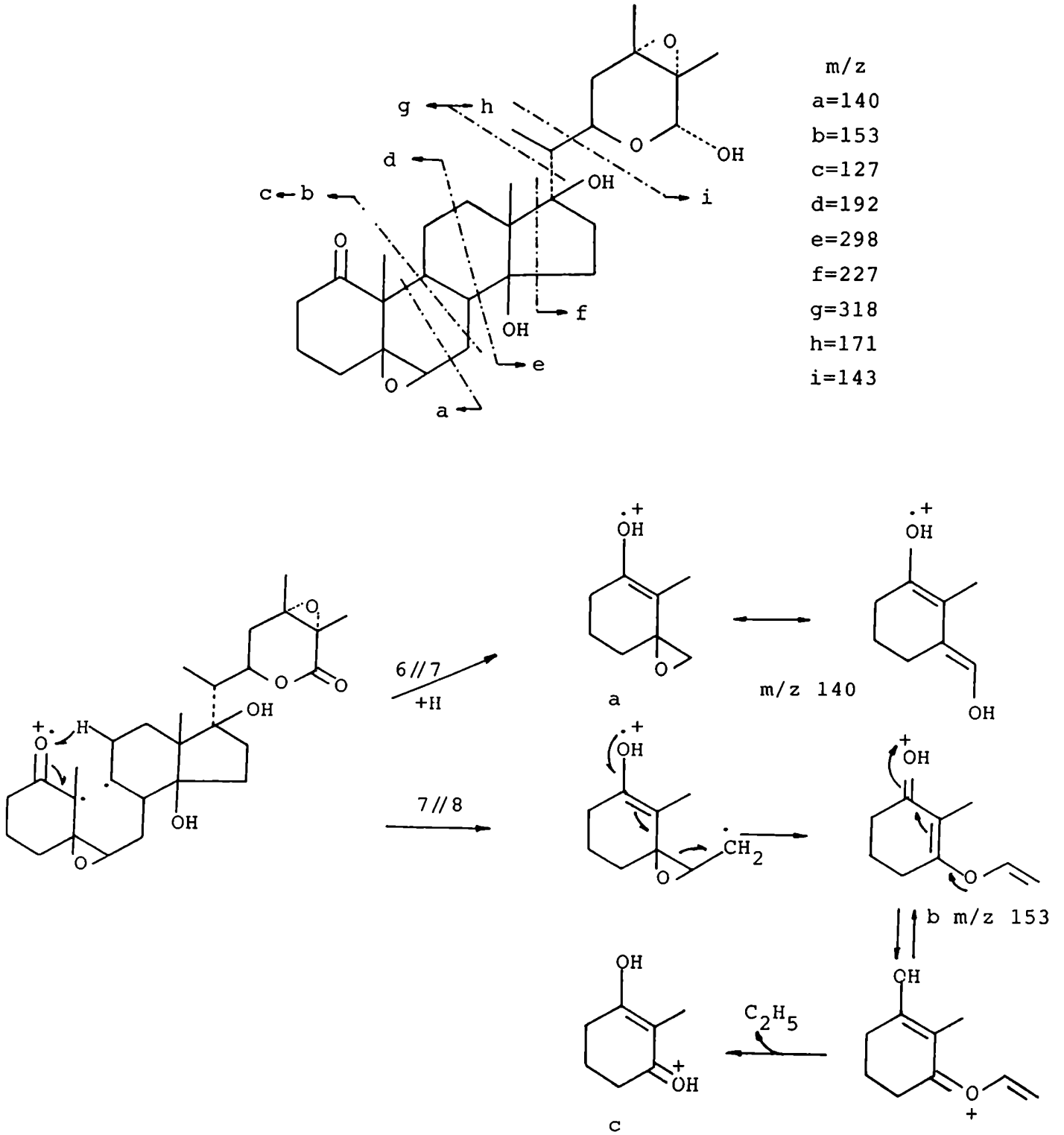


Figura 18. Principales fragmentos en el espectro de masa a 70 eV de jaborosalactol M.



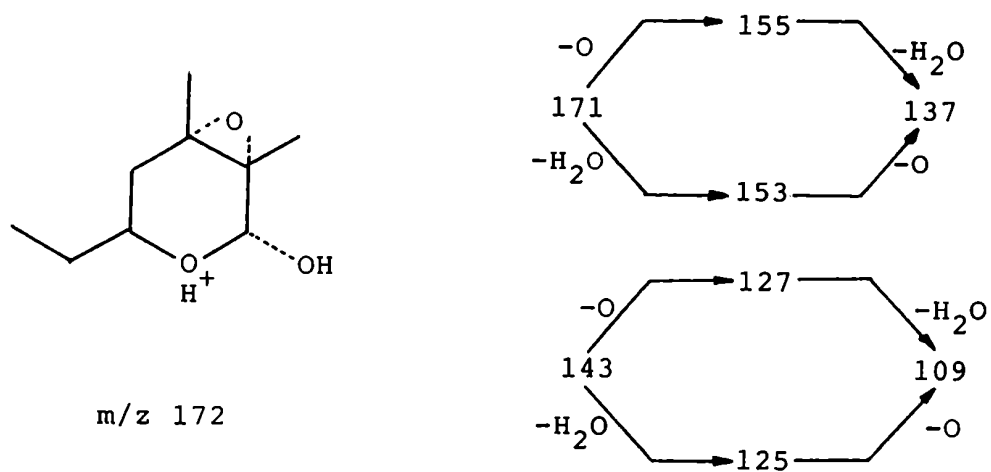


Figura 19. Fragmentación característica de la cadena lateral de los epoxilactoles.

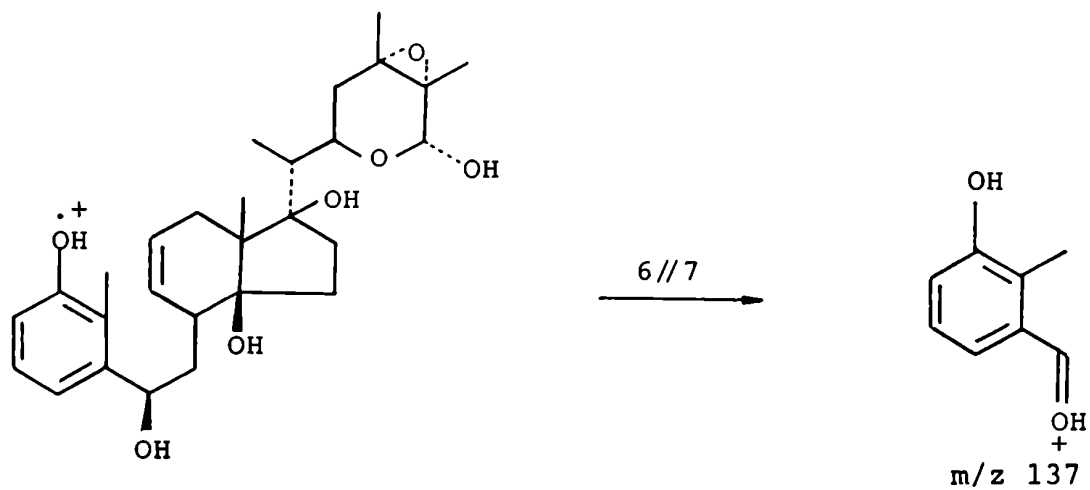


Figura 20. Ruptura postulada para el anillo B de jaborosalactol N.

### **Comportamiento cromatográfico de los withanólidos aislados en CLAR analítica y en capa delgada en fase reversa**

Según se describe en la parte general de este capítulo resulta conveniente desarrollar métodos eficientes y sencillos para el aislamiento de los withanólidos presentes en una planta a partir de extractos parcialmente purificados. Los mismos son necesarios por ejemplo para llevar a cabo experiencias de biosíntesis.

Con este objetivo se estudió el comportamiento por CLAR de mezclas de los withanólidos mayoritarios aislados de *Jaborosa bergii*. Si bien en una primera etapa las separaciones en fase reversa (C-18) se llevaron a cabo con mezclas de metanol:agua, este sistema no permitió un análisis directo de los extractos. Se ensayaron entonces otros sistemas de solventes utilizando cromatografía en capa delgada Rp-18 con mezclas acetona:agua, acetonitrilo:agua, tetrahidrofurano:agua y acetonitrilo:tetrahidrofurano:agua. Debido al elevado porcentaje de agua requerido en el sistema acetonitrilo:agua para lograr una retención adecuada de los compuestos, el mismo no resultó aplicable en CLAR preparativa por problemas de solubilidad. Dichos problemas no se presentaron al usar acetona o tetrahidrofurano. El uso de columnas de fase C-8 no mejoró las separaciones. En la tabla 7 se resumen los resultados obtenidos, pudiéndose apreciar que resultan adecuadas las mezclas de acetona:agua y tetrahidrofurano:agua (50:50). La primera de estas mezclas tiene la ventaja de permitir una mejor disolución de los withanólidos.

TABLA 7. Comportamiento cromatográfico de los withanólidos mayoritarios aislados de *Jaborosa bergii*

	<u>43+42</u>		<u>48</u>		<u>F3'</u>	
	Rf	Tr	Rf	Tr	Rf	Tr
Acetona:H <sub>2</sub> O 50:50	0,60	13,9	0,67	12,1	0,72	11,5
CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O 50:50	0,50	7,5*			0,60	
THF:H <sub>2</sub> O 70-30	0,80	7,2			0,82	
THF:H <sub>2</sub> O 50-50	0,4	10,1	0,50	9,0	0,65	8,6

Columna: Alltech RSil 18 HL (10 $\mu$ ), (10x500 mm), flujo:4 ml/min. \*:

Altex ultrasphere (5 $\mu$ ), (10x250 mm), flujo: 3 ml/min.

Rf: en Rp-HPTLC Aldrich.

#### Estudios conformacionales sobre los withanólidos aislados

El protón de carbono 22 de withanólidos con esqueleto esteroidal no modificado sin hidroxilo en posición 20, da lugar a un doble doble doblete. Sin embargo la forma exacta de la señal dependerá de la conformación adoptada por la cadena lateral ya que ésta alteraría el acoplamiento entre los H-20 y 22. La señal

correspondiente al hidrógeno 22 de los withanólidos aislados de *Jaborosa bergii* presentaba un doble triplete de  $J=12$  Hz y  $J=4$  Hz para 42, 43, 45 y 47, mientras que 48 daba lugar a un doble doblete con constantes de acoplamiento de 11, 8 y 4 Hz. Si se compara la similitud estructural de 43 y 48 no resulta evidente esta diferencia de multiplicidades para el hidrógeno 22 salvo que ésta se origine en un efecto de transmisión conformacional por la diferencia estructural de los anillos A y B. Para tratar de aclarar esto último se estudiaron mediante cálculos computacionales de mecánica molecular las conformaciones de mínima energía. Los programas utilizados fueron PCMODEL (2.0) Y MMX (SERENA Software) basados en los programas de Allinger MM2 y MMP2 [80].

PCMODEL es un programa de modelado molecular interactivo que se complementa con MMX, el cual incluye cálculos  $\pi$  VESCF. Ambos son una adaptación para IBM PC del programa MODEL de C. Still. Los rangos de confianza para los valores de energía de los cálculos efectuados por estos programas pueden estimarse del trabajo realizado por Freeman [81]. Este autor probó al PCMODEL con las siguientes estructuras: octano, 3,3-dietilpentano, trans-decalina, [2.2.2] biciclooctano, adamantano, diamantano, cubano, isopropil ter-butiléter, 3,3-dimetil-2-pentanona y [3.2.1] biciclo-octan-3-ona. Los calores de formación calculados presentaron muy buena correlación con la literatura (desviación standard 2,55 kcal/mol). La forma silla del tiaciclohexano fue calculada como 5,25 kcal/mol más estable que la forma bote correspondiente, lo cual puede compararse con la estimación experimental de 4,02

kcal/mol. En consecuencia es de esperar que para estructuras más complejas como los withanólidos donde incluyendo hidrógenos y pares electrónicos se alcanza a 80-90 "átomos", el error en el cálculo de energías sea de 1,5-2 kcal/mol, lo cual no permite realizar análisis de poblaciones de conformeros en equilibrio. Los errores pueden ser algo mayores en estructuras con anillos epóxido, ya que el juego de constantes no incluye algunas de las constantes de flexión y torsión que involucran a carbonos en anillos de 3 miembros.

De los 9 rotámeros posibles producidos por rotación de la cadena lateral alrededor de los enlaces C17-C20 y C20-C22 para 43 y 48, 3 fueron descartados ya que presentaban interacciones de gran energía entre el anillo lactólico y el esqueleto esteroideal. De esta forma el análisis se circunscribió a 6 rotámeros (figura 21). Cada uno de ellos fue minimizado y los valores de energía hallados, así como las constantes de acoplamiento del H-22 con H-20, H-23 $\alpha$  y H-23 $\beta$  calculadas mediante la ecuación de Altona [82], se muestran en las tablas 8 y 9. Dichos valores no permiten una explicación satisfactoria del fenómeno conformacional en estudio, por cuanto la mayoría de las conformaciones de cada compuesto se encuentra en un rango estrecho de valores de energía, no siendo posible una predicción acertada de la proporción de rotámeros en el equilibrio, si bien los valores indicarían que los compuestos 48 y 43 presentan una distribución similar de conformeros. La tabla 8 predice al rotámero a3 como el de menor energía para los compuestos 48 y 43 lo cual está de acuerdo con el  $J_{20-22}$  observado para el acoplamiento entre el H-20 y el H-22 del primero

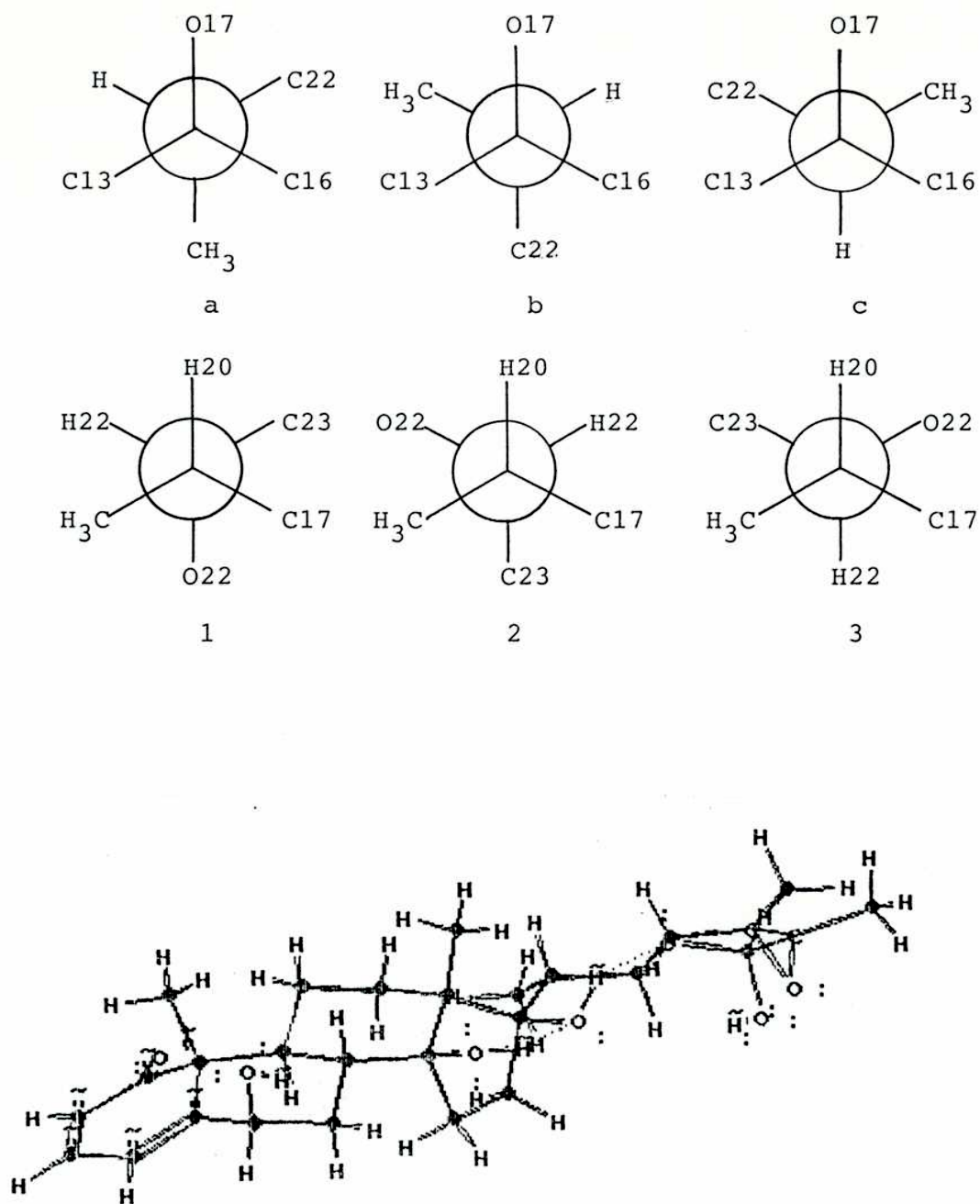


Figura 21. Proyecciones de Newman de los 6 rotámeros considerados y conformación de mínima energía (a3) obtenida para 48.

TABLA 8. Conformación del anillo D y energías relativas (kcal/mol) de 43 y 48 obtenidas mediante el programa MMX.

Conf	<u>48</u>		<u>43</u>	
	Energía	Conf. anillo D	Energía	Conf. anillo D
a1	5,38	ssd 13 $\alpha$ -17 $\beta$	5,56	s 13 $\alpha$
a2	3,53	ssd 13 $\alpha$ -17 $\beta$	3,61	s 13 $\alpha$
a3	0	ssd 13 $\alpha$ -17 $\beta$	0	s 13 $\alpha$
c1	1,19	s 13 $\alpha$	1,09	s 13 $\alpha$
c2	2,04	s 13 $\alpha$	2,04	s 13 $\alpha$
c3	3,07	s 13 $\alpha$	3,2	s 13 $\alpha$

s: sobre ssd: semisilla distorsionada

TABLA 9. Constantes de acoplamiento del H-22 de 43 y 48 calculadas según la ecuación de Altona y observadas (obs) (Hz).

Conf	<u>48</u>			<u>43</u>		
	J <sub>aa,aa</sub>	J <sub>aa,aa<math>\alpha</math></sub>	J <sub>aa,aa<math>\beta</math></sub>	J <sub>aa,a</sub>	J <sub>aa,aa<math>\alpha</math></sub>	J <sub>aa,aa<math>\beta</math></sub>
a1	-0,54	4,22	11,31	0,25	4,80	10,91
a2	4,55	4,67	11,11	4,31	4,70	11,06
a3	10,70	5,02	10,93	10,61	5,11	10,86
c1	1,02	4,69	10,95	1,61	4,57	11,06
c2	3,82	4,52	11,22	3,56	4,86	11,02
c3	10,60	5,10	10,89	10,66	5,30	10,74
obs.	8,0	4,0	11,0	4,0	4,0	12,0

pero no del segundo.

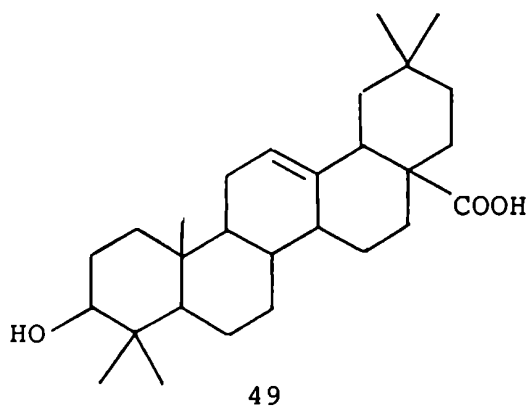
En el caso del compuesto 43, el  $J_{a_2, e_2}$  observado (4Hz) permitiría suponer o bien que los distintos rotámeros poseen energías muy semejantes, ya que dicho valor es un promedio de los J calculados para cada uno de ellos, o que los rotámeros  $a_2$  y  $e_2$  serían energéticamente más favorables.

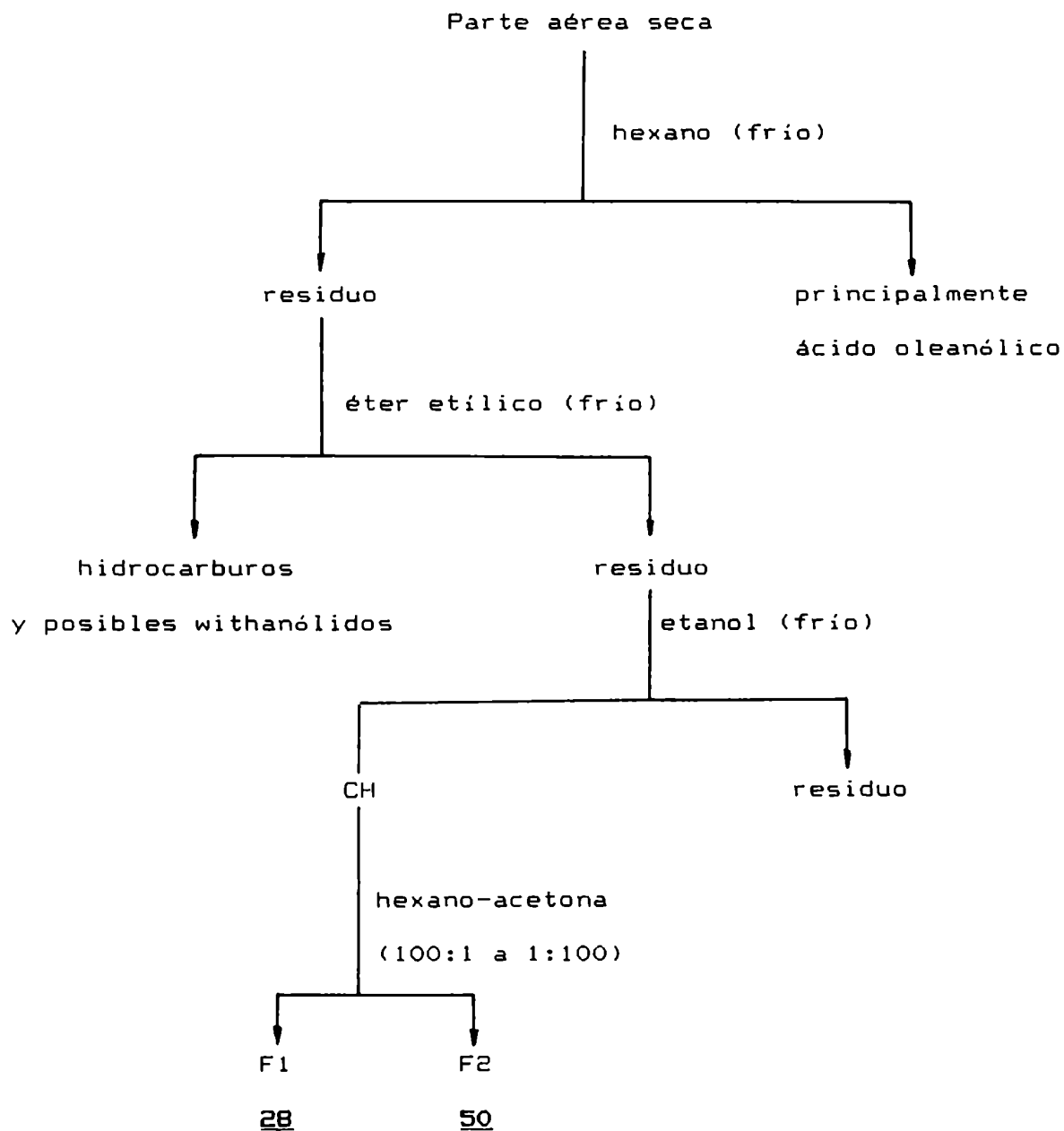
El presente análisis permite visualizar que existe una cierta distorsión del anillo D al pasar de un compuesto a otro (tabla B). La misma se manifiesta también en las diferencias de desplazamiento químico de los carbonos 15 y 16 de 43 y 48 (ver tabla 6, pág. 46). Esta distorsión, quizá leve, influye sobre una zona de la molécula con libre rotación como es la cadena lateral. Es de esperar que dicha zona sea más sensible a los cambios conformacionales que pueden alterar las interacciones de tipo Van der Waals entre átomos de la cadena lateral e hidrógenos de los carbonos 12, 16 y 18 respectivamente ya que, bastan diferencias de energías menores a 1 Kcal/mol para que las proporciones de los distintos rotámeros se modifiquen en forma pronunciada. Otro factor a tener en cuenta para explicar esta diferencia observada es analizar la interacción entre el anillo C y el D. De allí se desprende que al pasar de 43 a 48 se evitan interacciones de alta energía desviando la posición de los carbonos 15 y 16 y tendiendo a una semisilla distorsionada  $13\alpha, 17\beta$ .



## AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE WITHANOLIDOS DE *JABOROSA LEUCOTRICHIA*

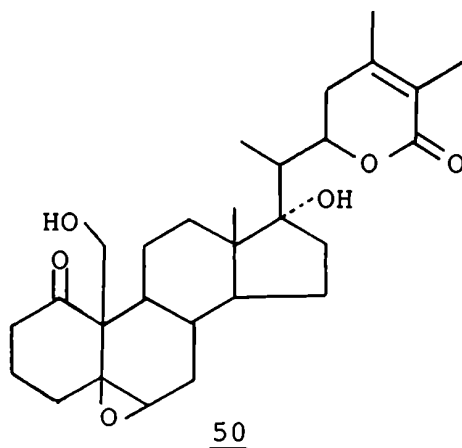
*Jaborosa leucotricha* es una especie psamófila del monte que, desde el litoral oceánico en Chubut llega a algo más de 2000 m.s.m. en el oeste de Mendoza, San Juan, La Rioja, norte de Catamarca, Tucumán y Salta [24]. En un estudio previo del extracto metanólico de hojas de esta especie proveniente de Mendoza se aisló un withanólido al cual se denominó jaborosalactona L (28) cuya estructura se representa en la página 12 del capítulo 1 [30]. En este trabajo de tesis se continuó el estudio de los withanólidos presentes en las hojas de plantas de esta especie y se comenzó el estudio de los frutos. Las plantas estudiadas fueron recolectadas en "El Carrizal", provincia de Mendoza. La parte aérea seca y pulverizada de la planta se sometió al esquema separativo de la figura 22. De la fracción soluble en hexano se aisló en forma mayoritaria ácido oleanólico (49) que se identificó por comparación por CGL-EM con una muestra auténtica del mismo. La fracción soluble en éter contenía principalmente hidrocarburos





CH: cromatografía en columna de silicagel H.

Figura 22. Separación de los withanólidos presentes en *Jaborosa leucotricha*.



y al ser analizada por ccd en sílicagel presentaba manchas que revelaban como posibles withanólidos. Su análisis detallado será objeto de estudios posteriores. La solución etanólica se evaporó a sequedad y el residuo se sometió a una cromatografía en columna de sílicagel H, eluyendo con mezclas de hexano-acetona de polaridad creciente. De las fracciones eluidas se analizaron primeramente dos, las cuales revelaban la presencia de un componente mayoritario. A partir de la fracción menos polar se aisló jaborosalactona L (28) la cual fue identificada por comparación de sus espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con los descriptos en la literatura [30]. De la segunda fracción se obtuvo un withanólido no descrito anteriormente al cual se denominó jaborosalactona O y al que se le asignó la estructura 50 de acuerdo a la siguiente evidencia experimental.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (tabla 10) (figura 23) de 50 no

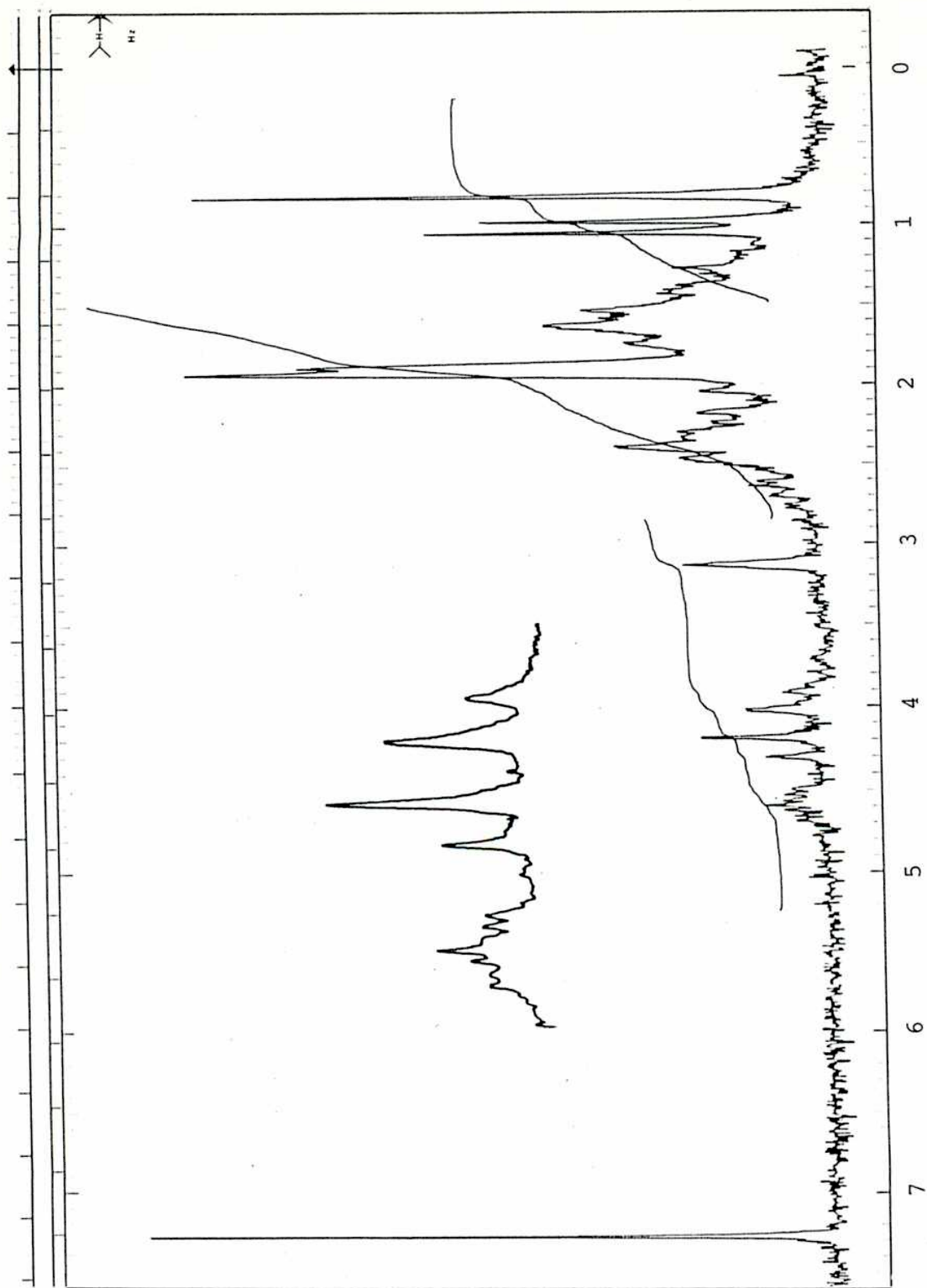


Figura 23. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 100 MHz en deuterocloroformo de jaborosilactona D.

TABLA 10. Desplazamientos químicos de los protones relevantes de 50 en deuterocloroformo.

H	$\delta$ (ppm)	Mult, J(Hz)	H	$\delta$ (ppm)	Mult, J(Hz)
6	3,12	sa	21	1,00	d 7
18	0,81	s	22	4,58	ddd 10; 6,5; 3
19A	3,94	dd 11; 1,5	27	1,87	sa
19B	4,22	d 11	28	1,92	sa

TABLA 11. Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de 50 en deuterocloroformo.

C	$\delta$ (ppm)	C	$\delta$ (ppm)	C	$\delta$ (ppm)	C	$\delta$ (ppm)
1	210,7	8	30,6	15	23,5	22	78,5
2	31,4 <sup>a</sup>	9	42,4 <sup>b</sup>	16	36,4	23	32,7 <sup>c</sup>
3	31,1 <sup>a</sup>	10	55,9	17	84,9	24	150,0
4	35,6	11	18,0	18	14,7	25	121,3
5	64,1	12	31,9 <sup>c</sup>	19	62,7	26	166,7
6	59,3	13	48,1	20	42,6 <sup>b</sup>	27	12,3
7	21,5	14	50,8	21	9,5	28	20,4

a,b,c: intercambiables.

mostró protones olefinicos indicando una estructura de tipo 2,3-dihidrowithanólido. La presencia de un epóxido 5 $\beta$ ,6 $\beta$  fue inferida a partir de la señal ancha a 3,12 ppm correspondiente al H-6, sugiriendo un 1-oxo-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxiwithanólido. En relación a la cadena lateral ésta resultaba semejante a la de jaborosalactona L (28); la presencia de dos singuletes a  $\delta$  1,87 y 1,92 eran consistentes con los metilos 27 y 28 de una 22,26-lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada y se observaba un doble doble doblete ( $J=6,5, 3$  y  $10$  Hz) a 4,58 ppm correspondiente al H-22. La multiplicidad de esta última señal y el doblete presente a 1,00, el cual se asignó al H-21, confirmó la ausencia de un grupo hidroxilo en C-20. La señal para el metilo 18 a 0,81 ppm revelaba la presencia de un grupo hidroxilo  $\alpha$  en el carbono 17. Por último, la ausencia de un singulete correspondiente al H-19 en la región de 0,8 a 1,4 ppm y la existencia de un cuarteto AB a 3,94-4,22 ppm sugirió la presencia de un grupo hidroxilo en C-19. Aunque se conocen lactonas esteroidales 19-hidroxiladas en las familias de los cardenólidos y bufadienólidos, este sería el primer withanólido natural 19-hidroxilado. La confirmación final de la estructura se obtuvo a partir del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (tabla 11) y la fase relativa de las señales en el espectro APT el cual mostró la presencia de sólo 4 grupos metilo que coincidían con los C-18, 21, 27 y 28 de jaborosalactona L (28). La señal a 62,7 ppm se asignó al C-19. La estereoquímica del C-17 pudo inferirse de los desplazamientos químicos del C-21 (9,5 ppm) y del C-18 (14,7 ppm) y por comparación con el espectro de jaborosalactona L.

Se estudió la conformación de la cadena lateral de 50 utilizando el programa PCMODEL, igual que en el caso de los withanólidos

de *Jaborosa bergii*, con respecto a la rotación alrededor de los enlaces C17-C20 y C20-C22. Los resultados se representan en la tabla 12. De los 9 rotámeros posibles de la cadena lateral alrededor de los enlaces mencionados, 6 fueron descartados ya que resultaban considerablemente más energéticos que los que se detallan en la tabla 12. De acuerdo a los valores de constantes de acoplamiento experimentales se podría predecir, por ejemplo, una contribución al equilibrio conformacional de los rotámeros a1, a2 y a3 de 10, 30 y 60% respectivamente. En la figura 24 se muestran las conformaciones de energía mínima encontradas para 50.

TABLA 12. Energías relativas (kcal/mol) y constantes de acoplamiento del H-22 calculadas según la ecuación de Altona (Hz).

	Angulo H20-H22	Angulo 017-C21	$E_{\text{MMX}}$	$J_{\text{H0,22}}$	$J_{\text{22,22x}}$	$J_{\text{22,22a}}$
Rotám. a1	70,61	66,45	0,31	0,84	4,41	11,30
Rotám. a2	-63,58	67,82	1,23	1,56	1,68	11,54
Rotám. a3	-169,20	71,40	0,00	10,31	4,92	10,98

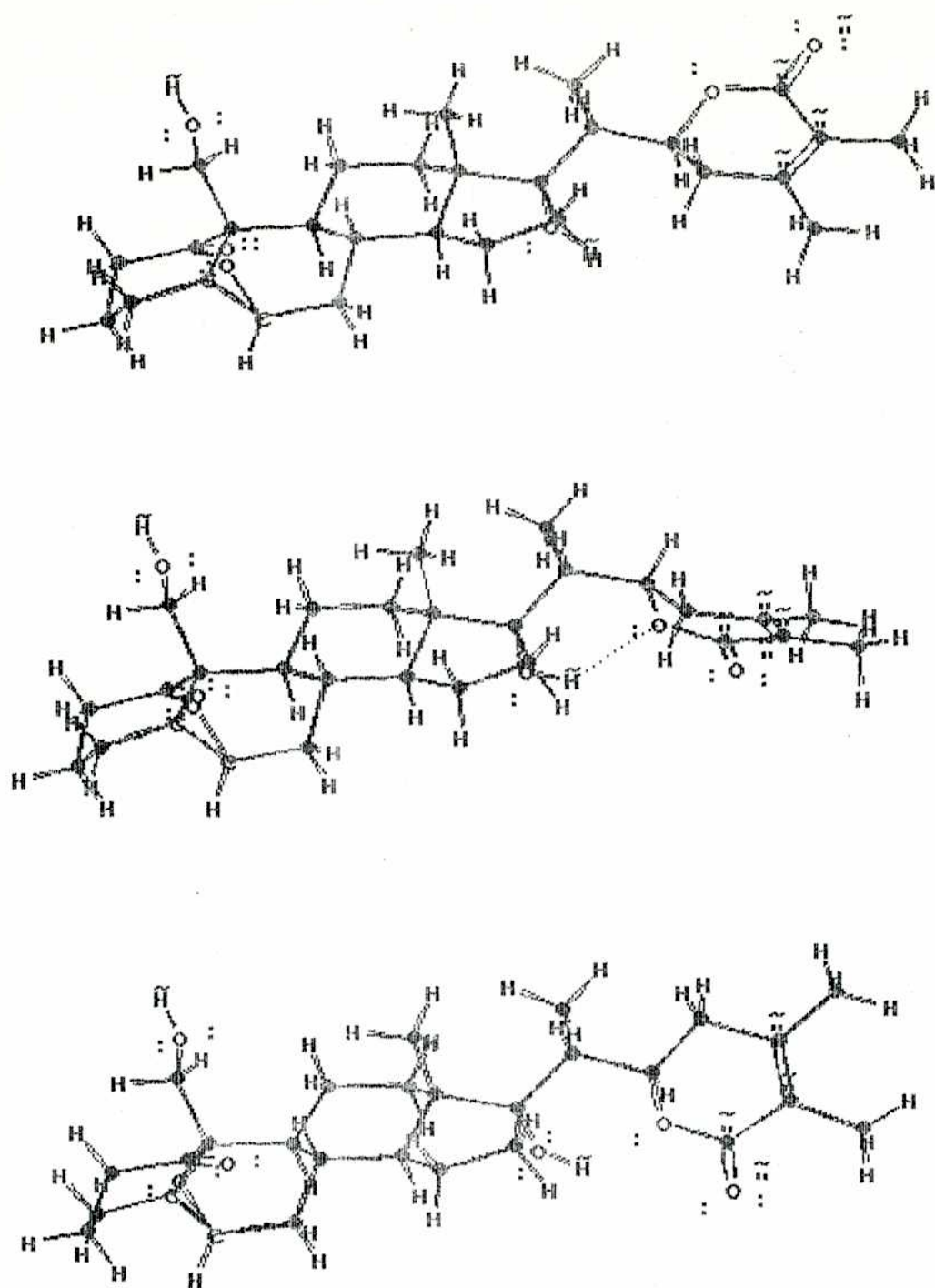


Figura 24. Conformaciones de mínima energía de Jaborosalactona O.



### Espectro de masa de jaborosalactona O (50)

El espectro de masa de impacto electrónico a 70 ev de 50 no presentó ión molecular pero mostró en forma análoga a jaborosalactona L el ión de  $m/z$  457 ( $M^+$ -metilo). Con respecto a la cadena lateral se encontraron las fragmentaciones descritas para 28: la pérdida del anillo E para dar el ión a  $m/z$  125 (pico base); la ruptura del enlace C17-C20, promovida por el hidroxilo en carbono 17, para dar el ión a  $m/z$  153 y la ruptura del anillo D a través de los enlaces C13-C17 y C15-C16 para dar el ión a  $m/z$  197. Las restantes fragmentaciones presentes en el espectro no pudieron ser racionalizados con los datos disponibles. En la figura 25 se representan las fragmentaciones mencionadas.

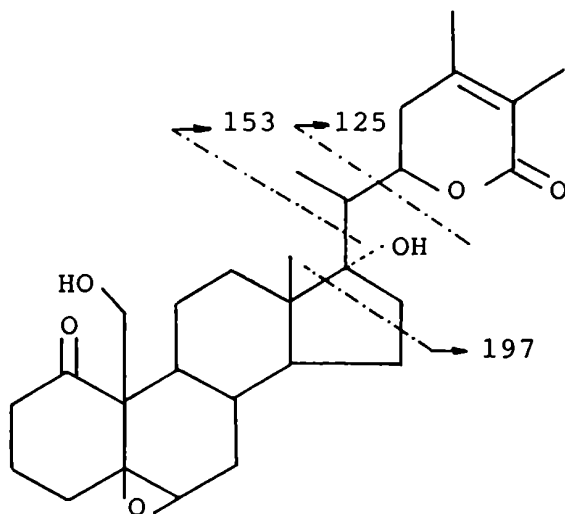


Figura 25. Fragmentaciones características a 70 ev de jaborosalactona O (50).

## AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE WITHANOLIDOS DE *JABOROSA ODONELLIANA*

*Jaborosa odonelliana* es una especie perenne con un fuerte sistema subterráneo que crece principalmente en zonas húmedas. Las plantas estudiadas en este trabajo se recolectaron en "El Jardín", estancia "La Asunción", departamento La Candelaria, provincia de Salta, no existiendo estudios anteriores de los withanólidos presentes en esta especie.

Las plantas enteras secas y pulverizadas se extrajeron con éter etílico y el material insoluble se extrajo posteriormente con etanol en frío. El residuo obtenido por evaporación del extracto etéreo se particionó entre hexano, metanol y agua. La fase acuosa se concentró y se extrajo con éter. Al concentrar la solución etérea cristalizó una sustancia que resultó ser un nuevo withanólido, el cual fue caracterizado por métodos químicos, espectroscópicos y estudios de difracción de Rayos X. Al mismo se lo denominó jaborosalactona P (51).

El extracto etanólico se decoloró con carbón activado y se concentró a sequedad. El residuo se cromatografió en una columna de silicagel y se obtuvo por elución con cloroformo una fracción constituida por el mismo withanólido cristalizado a partir de la solución etérea.

El espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto aislado 51 (figura 26, tabla 13) presentó dos protones olefínicos a  $\delta$  6,74 y  $\delta$  5,83 típicos de un sistema 2-en-1-ona en el anillo A, además de un doblete ancho a  $\delta$  5,59 asignado al H-6 el cual indicaba la presen-

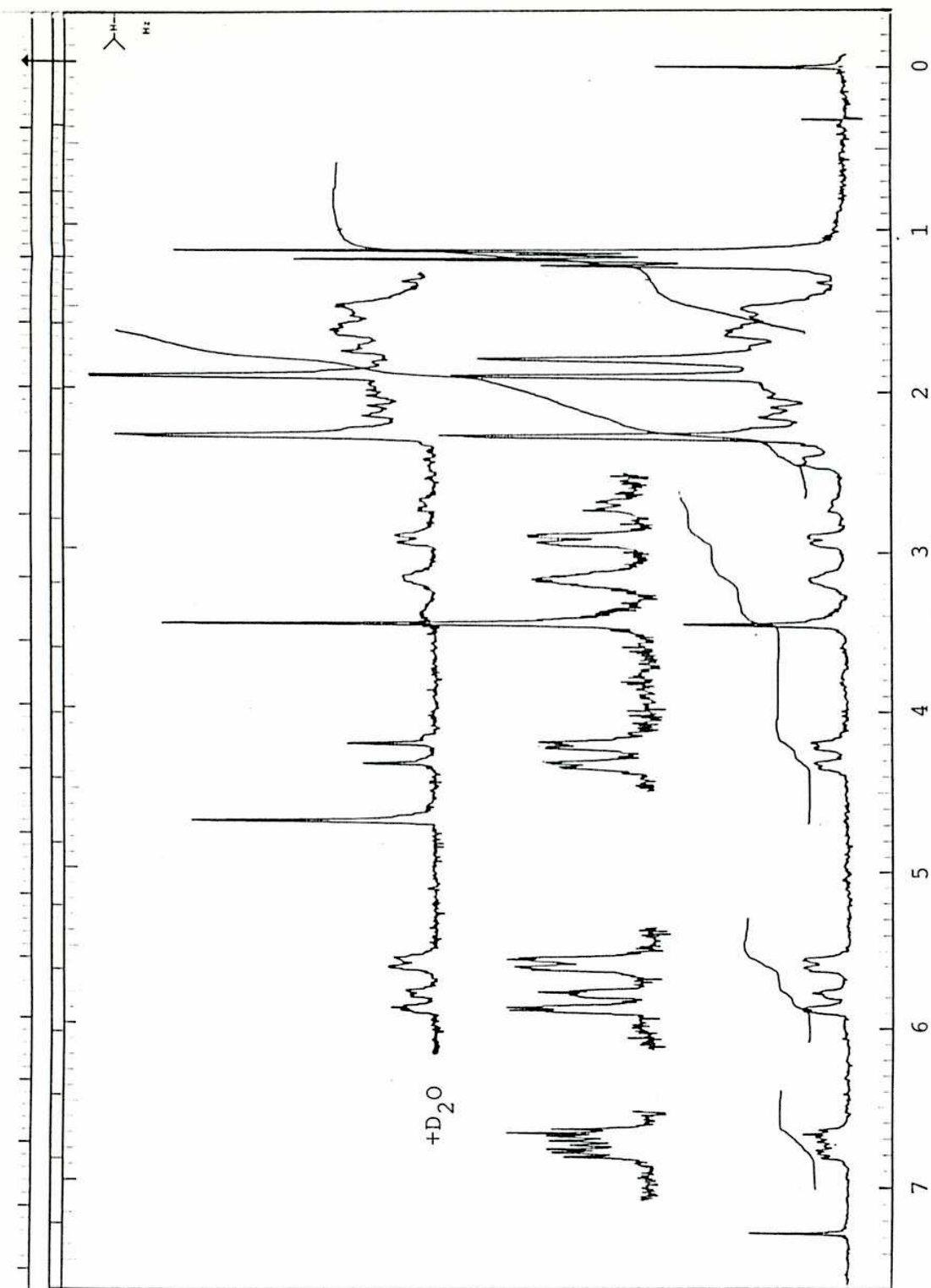
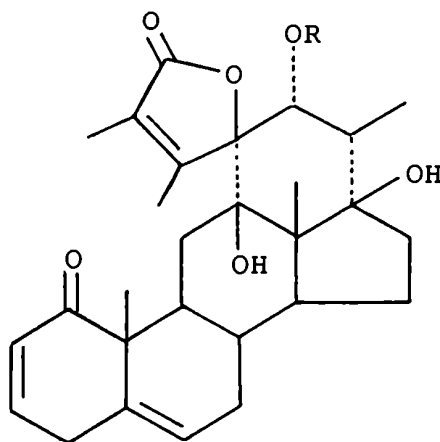


Figura 26. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 100 MHz en deuterocloroformo de jaborosalactona P.



**51:** R=H

**52:** R=Ac

**53:** R=H, 1,2-dihidro

cia de un doble enlace adicional en la posición 5,6. El doble doblete a  $\delta$  4,22 se asignó a un metino con grupo hidroxilo (H-22) ya que por tratamiento con  $D_2O$  desaparecía su acoplamiento de menor constante (3,5 Hz) junto con un doblete ancho a  $\delta$  3,42 correspondiente al hidroxilo acoplado con él (hidroxilo 22). Por acetilación de **51** con anhídrido acético-piridina se obtuvo **52** observándose que la resonancia a 4,22 ppm se transformó en un doblete ( $J_{20,22}=12,5$  Hz) desplazándose a  $\delta$  5,75. Por otro lado permanecían dos señales intercambiables con  $D_2O$  lo cual indicaba que se trataba de dos grupos hidroxilo terciarios (tabla 13).

Las dos señales de metilos a  $\delta$  1,91 y 2,27 ( $CH_3$ -27 y  $CH_3$ -28) indicaban que estos pertenecían a un anillo  $\gamma$ -lactónico  $\alpha,\beta$ -insaturado, similar al descrito para el trechonólido A (**20**) [20a] mencionado en la página 4. El doblete a  $\delta$  1,21 asignado al metilo 21 confirmó la ausencia de un grupo hidroxilo en C-20. El singulete a  $\delta$  1,20 se asignó al metilo 19 por comparación con el

espectro de la withametelina (21) [21] (página 7) y el metilo restante a  $\delta$  1,15 al metilo 18.

Por hidrogenación de 51 sobre Pd/C 10% en etanol se obtuvo su 2,3-dihidroderivado 53 el cual mostró en su espectro RMN  $^1\text{H}$  la desaparición de las señales olefínicas del H-2 y del H-3 (tabla 13) y el corrimiento de la señal correspondiente al metilo 19 a  $\delta$  1,27

El análisis del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (tabla 14) y de la fase relativa de las señales obtenidas por la técnica de APT [73] indicaron en forma clara la presencia de cinco grupos metilo los cuales correlacionaban con las señales correspondientes en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  según los experimentos de desacople heteronuclear efectuados. La aparición de la señal correspondiente al C-21 a 11,3 ppm era consistente con una orientación  $\beta$  del hidroxilo de C-17. También resultaba evidente del espectro la presencia de las resonancias debidas a dos carbonos carbonílicos a  $\delta$  202,8 y 173,3 para C-1 y C-26 respectivamente, así como las señales de seis carbonos olefínicos en un rango de  $\delta$  entre 124 y 158 ppm. La resonancia a  $\delta$  71,0 fue asignada al C-22 por desacople selectivo de la señal en el espectro protónico a  $\delta$  4,22. Las señales a  $\delta$  50,0 y 51,2 se asignaron a los C-10 y 13 respectivamente quedando tres carbonos cuaternarios más en la región de 82 a 98 ppm. La resonancia a  $\delta$  97,6 correspondía a un carbono lactónico (C-23) y las encontradas a  $\delta$  82,0 y 82,9 se asignaron al C-12 y al C-17. La sustitución en C-12 desplazó también la resonancia del C-11 a 30,0 ppm.

El espectro de masa de impacto electrónico de la sustancia en cuestión no presentó ión molecular pero mostró como rupturas

TABLA 13. Desplazamientos químicos de los protones relevantes de los compuestos 51-53

H	<u>51</u>	<u>52</u>	<u>53</u>
2	5,83 dd (10;2,5)	5,83 dd (10;2,5)	---
3	6,74 ddd (10;5;2)	6,73 ddd (10;5;2)	
4	2,81 dd (21;5) 3,28 da (21)	2,82 dd (21;5) 3,29 da (21)	
6	5,59 da (6)	5,59 da (6)	5,49 da (5,5)
18	1,15 s	1,17 s	1,12 s
19	1,20 s	1,20 s	1,27 s
21	1,21 d (7)	1,04 d (7)	1,19 d (7)
22	4,22 dd (12,5;3,5)	5,75 d (12,5)	4,23 dd (12,5;3,5)
27	1,91 sa	1,94 sa	1,99 sa
28	2,27 sa	2,31 sa	2,30 sa
12 $\beta$ -OH	3,45 s	3,47 sa	3,37 s
17 $\beta$ -OH	1,80 s	3,47 sa	2,24 s
22-OH	3,42 d (3,5)		
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	---	1,96 s	---

Desplazamientos químicos en ppm medidos en deuterocloroformo, constantes de acoplamiento en Hz.

TABLA 14. Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de jaborosalactona P  
(51).

C	$\delta^*$	C	$\delta^*$
1	202,8(C)	15	23,2(CH <sub>2</sub> )
2	127,3(CH)**	16	32,1(CH <sub>2</sub> )
3	144,8(CH)**	17	82,9(C) <sup>c</sup>
4	33,3(CH <sub>2</sub> )**	18	12,7(CH <sub>2</sub> )**
5	136,0(C)	19	18,2(CH <sub>2</sub> )**
6	124,2(CH)**	20	40,5(CH) <sup>d</sup>
7	34,0(CH <sub>2</sub> )**	21	11,3(CH <sub>2</sub> )**
8	32,6(CH)	22	71,0(CH)**
9	40,0(CH)**	23	97,6(C)
10	50,0(C) <sup>b</sup>	24	157,5(C)
11	30,0(CH <sub>2</sub> )	25	130,7(C)
12	82,0(C) <sup>c</sup>	26	173,3(C)
13	51,2(C) <sup>b</sup>	27	9,5(CH <sub>2</sub> )**
14	44,1(CH) <sup>d</sup>	28	18,7(CH <sub>2</sub> )**

\* Determinados por técnica APT. \*\* Señal asignada por desacoplamiento selectivo de  $^1\text{H}$ . a,b,c,d: los valores pueden ser intercambiados.

principales las debidas a la escisión de los enlaces C17-C20 y C12-C23 rindiendo los iones de  $m/z$  300 (pico base,  $C_{17}H_{24}O_5^+$ ) y  $m/z$  168 (cadena lateral). También resultó importante la ruptura del anillo B en los enlaces C9-C10 y C7-C8 para dar el ión a  $m/z$  135 ( $C_{11}H_{11}O^+$ ). El espectro FAB de 51 dio un ión  $M+2$  ( $m/z$  470) y un ión  $M+1+Na$  ( $m/z$  492). En la figura 27 se representan las rupturas más importantes del espectro de impacto electrónico. Los espectros FAB y de impacto electrónico se muestran en la figura 28.

La confirmación final de esta estructura se obtuvo a partir del análisis por difracción de rayos X. La estructura obtenida por este método y la calculada por MMX se representan en la figura 29; en la primera se puede visualizar la presencia de tres moléculas de agua en el cristal (O(7), O(8) y O(9)). Las coordenadas atómicas y de los hidrógenos se resumen en las tablas 15 y 16. Los cristales

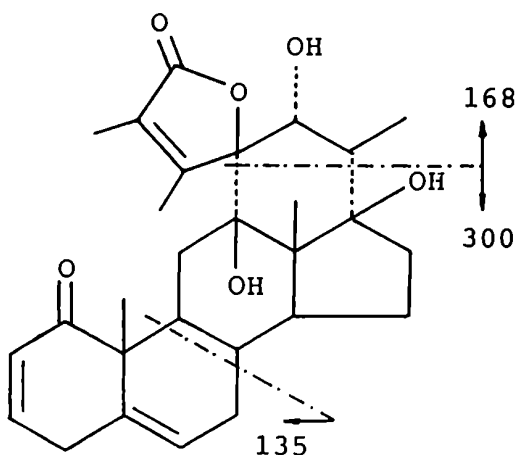


Figura 27. Rupturas más importantes del espectro de impacto electrónico de 51.



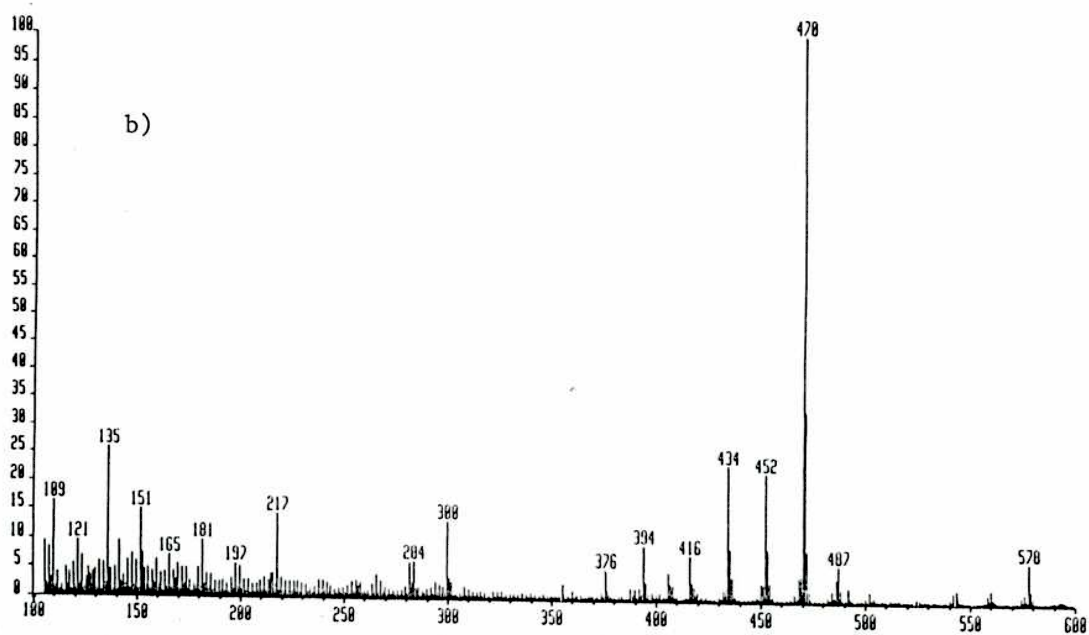
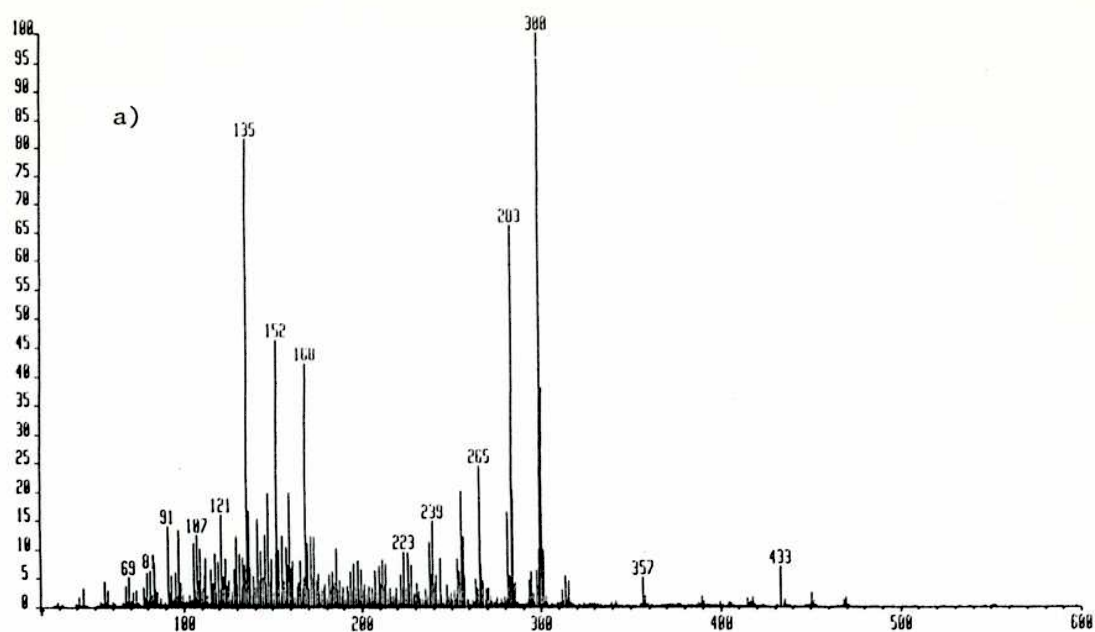


Figura 28. a) Espectro de impacto electrónico y b) FAB en matriz de tioglicerol de jaborosalactona P.

eran ortorrómbicos  $P2_12_12_1$ ,  $a=7,1766(13)$  Å,  $b=11,377(2)$  Å,  $c=30,962(6)$  Å. Estos datos definieron la orientación de los grupos hidroxilos de C-12 y C-17 como  $\beta$  y la configuración de los C-22 y 23 como R y S respectivamente. Esta información estructural estuvo en total acuerdo con los datos espectroscópicos antes discutidos. El arreglo espacial era consistente con la gran constante de acoplamiento observada entre los H-20 y 22 (12,5 Hz) los cuales presentaban una orientación anti. La estructura de mínima energía obtenida utilizando el programa MMX, se compara satisfactoriamente con la obtenida por rayos X.

Si se compara la estructura de la jaborosalactona P (51) con la del trechonólido A (20) se puede ver que ambos compuestos deben tener precursores biosintéticos relacionados muy cercanamente. En 51 el cierre de anillo sobre C-12 ocurrió con C-23 mientras que en 20 la sustitución sobre C-12 ocurrió con el hidroxilo de C-22. El hecho que la configuración absoluta del C-22 de 51 y 20 sea inversa conduciría a postular precursores epiméricos en este carbono para los mismos. El epímero 22R hipotético, que actuaría como el precursor más cercano a 51, de ciclar por formación de un hemiacetal daría el epímero de C-22 del trechonólido A; este compuesto hipotético tendría el anillo lactónico de cinco miembros en la orientación  $\beta$  axial termodinámicamente desfavorable.

La reclasificación de la especie *Jaborosa laciniata*, a partir de la cual se aisló el trechonólido A, en el género *Jaborosa* es reciente y sin duda la información química precedente avala dicha clasificación.

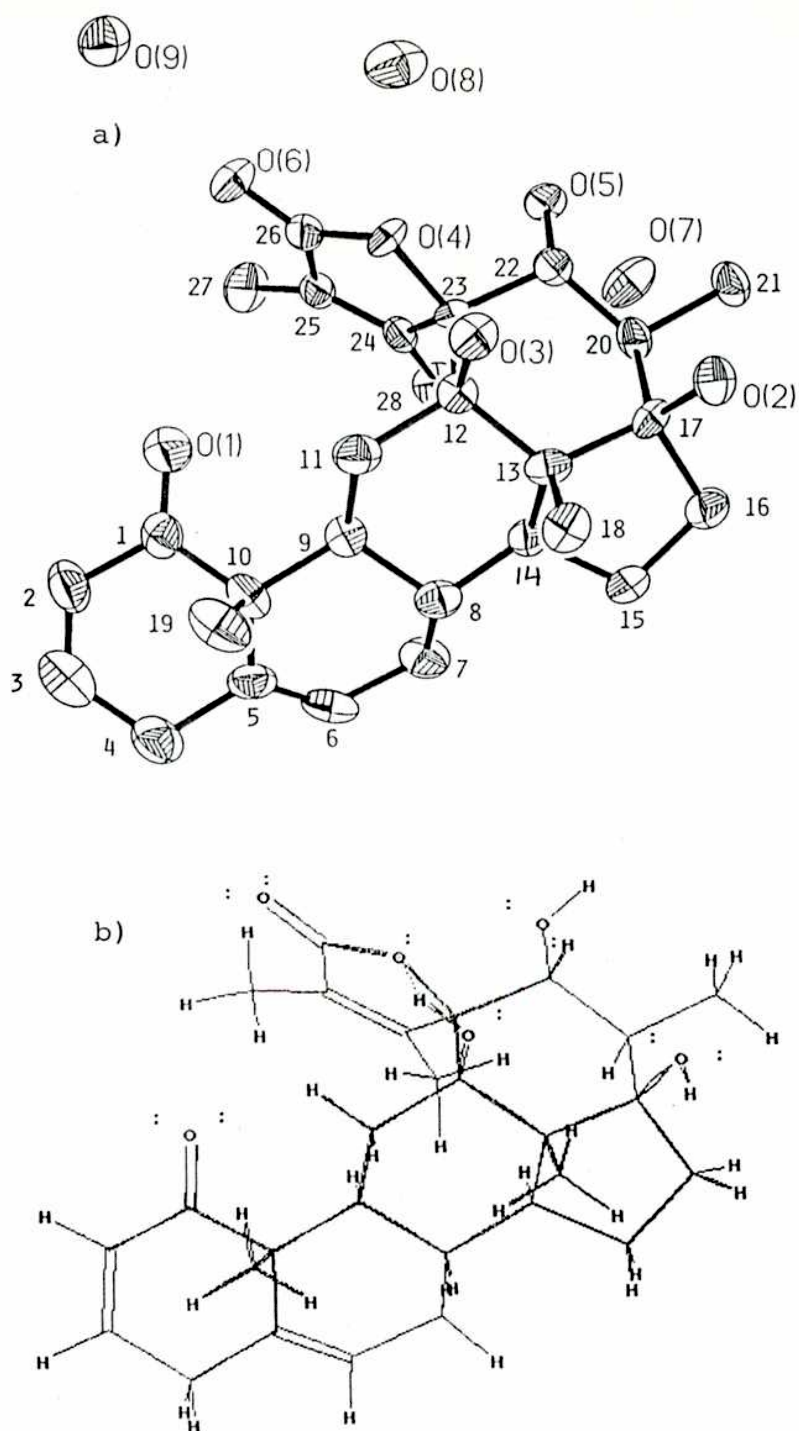


Figura 29. a) Estructura obtenida por difracción de Rayos X y b) por MMX de jaborosalactona P.

TABLA 15. Coordenadas atómicas ( $\times 10^4$ ) y parámetros de desplazamiento isotrópico ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) de jaborosalactona P

	x	y	z	U(eq)
O(1)	8319(5)	2747(3)	489(1)	37(1)
O(2)	8670(4)	8096(2)	1962(1)	23(1)
O(3)	10802(4)	5965(3)	1519(1)	25(1)
O(4)	9772(4)	3982(2)	1758(1)	21(1)
O(5)	6921(4)	4542(2)	2405(1)	23(1)
O(6)	10636(5)	2152(3)	1598(1)	29(1)
O(7)	2854(5)	4964(3)	2509(1)	40(1)
O(8)	8564(5)	2233(3)	2546(1)	43(1)
O(9)	11443(5)	-170(3)	1817(1)	34(1)
C(1)	8138(6)	3301(4)	157(1)	25(1)
C(2)	8114(7)	2685(4)	-266(1)	36(2)
C(3)	7353(7)	3175(5)	-617(2)	39(2)
C(4)	6488(8)	4356(4)	-615(1)	35(1)
C(5)	6329(7)	4892(4)	-166(1)	28(1)
C(6)	4827(7)	5510(4)	-58(1)	30(1)
C(7)	4581(6)	6107(4)	372(1)	29(1)
C(8)	6413(6)	6271(4)	604(1)	23(1)
C(9)	7496(6)	5097(4)	608(1)	19(1)
C(10)	7906(7)	4648(4)	143(1)	25(1)
C(11)	9246(6)	5147(4)	893(1)	24(1)
C(12)	9004(6)	5677(3)	1348(1)	18(1)
C(13)	7969(6)	6863(3)	1318(1)	20(1)
C(14)	6159(6)	6697(4)	1067(1)	22(1)
C(15)	5090(7)	7840(4)	1146(2)	32(1)
C(16)	5864(6)	8232(4)	1604(1)	25(1)
C(17)	7260(6)	7402(3)	1751(1)	20(1)
C(18)	9203(6)	7777(4)	1093(1)	25(1)
C(19)	9752(7)	5149(5)	-42(1)	34(2)
C(20)	6528(6)	6464(3)	2072(1)	19(1)
C(21)	6215(7)	7004(4)	2521(1)	25(1)
C(22)	7758(6)	5371(3)	2115(1)	19(1)
C(23)	8148(6)	4752(3)	1684(1)	18(1)
C(24)	6688(6)	3861(3)	1543(1)	20(1)
C(25)	7429(6)	2804(4)	1499(1)	21(1)
C(26)	9399(7)	2880(3)	1615(1)	22(1)
C(27)	6589(8)	1650(4)	1374(2)	36(2)
C(28)	4622(6)	4065(4)	1509(1)	27(1)

U definido como un tercio de la traza del tensor  $U_{ij}$ ,  
ortogonalizado.

TABLA 16. Coordenadas ( $\times 10^4$ ) y parámetros de desplazamiento isotrópico ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) de los átomos de hidrógeno de jaborosalactona P (51).

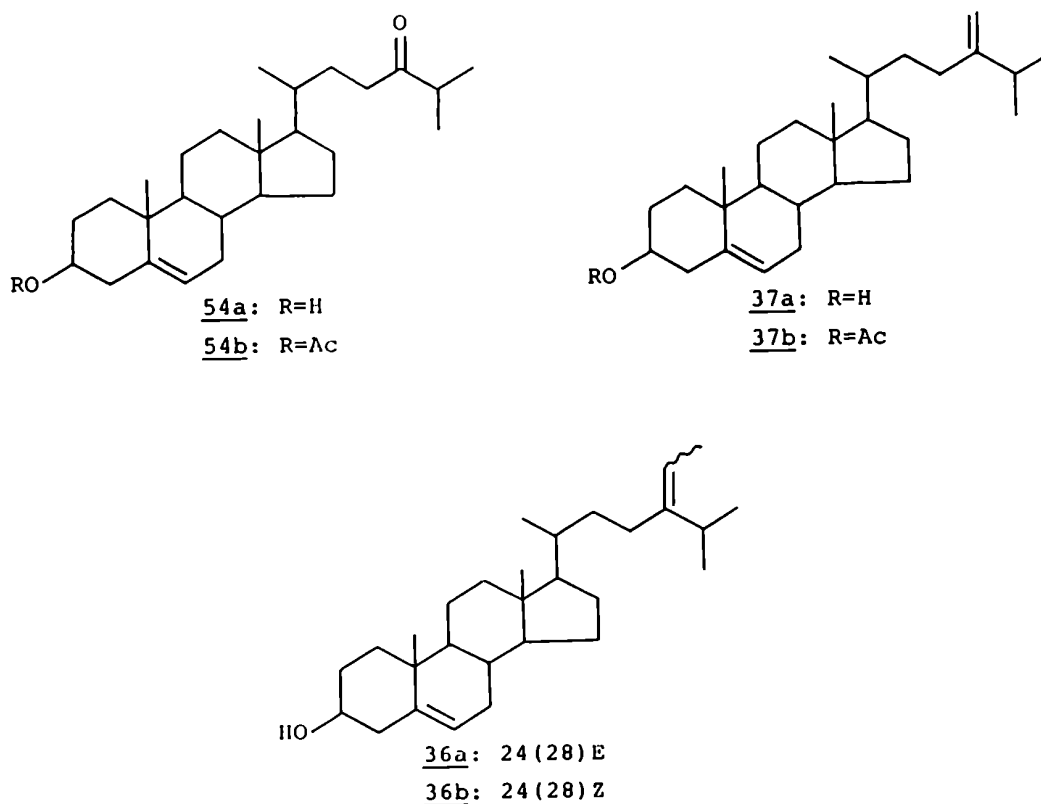
H	x	y	z	U
2A	8692	1927	-288	57
3A	7340	2728	-880	38
4A	7243	4868	-788	165
4B	5267	4304	-738	34
6	3847	5572	-267	39
7A	4015	6860	325	37
7B	3784	5634	550	27
8	7102	6863	451	16
9	6693	4529	741	19
11A	9694	4357	926	63
11B	10161	5609	745	21
14	5410	6051	1165	43
15A	5434	8419	936	60
15B	3772	7712	1135	13
16A	6121	9029	1597	46
16B	4651	8174	1800	34
18A	9647	7462	824	40
18B	10241	7962	1276	38
18C	8498	8478	1038	37
19A	9674	5990	-57	69
19B	9965	4838	-326	39
19C	10765	4935	144	44
20	5379	6194	1950	5
21A	5428	7681	2495	9
21B	7387	7234	2643	36
21C	5632	6435	2706	25
22	8925	5654	2223	13
27A	5294	1748	1309	140
27B	6725	1104	1609	54
27C	7223	1352	1124	137
28A	4359	4884	1551	64
28B	3995	3611	1726	92
28C	4197	3828	1228	111
02	9779	8495	2053	600
03	12104	6086	1559	500
05	6585	4019	2635	559
07A	2028	4899	2267	437
07B	2209	4744	2768	102
08A	9595	2180	2742	468
08B	7733	1587	2595	51
09A	11302	-835	1629	225
09B	12045	-412	2079	374

**CAPITULO III**  
**SINTESIS DE 24-METILENCOLESTEROL**  
**ISOTOPICAMENTE MARCADO**

## GENERALIDADES

Con la finalidad de llevar a cabo los estudios biosintéticos en *Acnistus breviflorus* de acuerdo a lo enunciado en el capítulo I, se hizo necesaria la síntesis de 24-metilencolesterol (37a) isotópicamente marcado con  $^{14}\text{C}$  en C-24 y con  $^3\text{H}$  en alguna posición del núcleo esteroidal, no modificable en la conversión del precursor a withanólidos.

Idler y Fagerlund llevaron a cabo la primera síntesis de 24-metilencolesterol [83a], sólo dos años después de su aislamiento (en 1955) a partir de varias especies de moluscos [83b,84]. La estructura había sido establecida en base a una degradación química y la síntesis fue realizada con la finalidad de confirmar la misma. Por otra parte los autores estaban también interesados en probar si, en la naturaleza, los esteroides de 28 carbonos epiméricos en C-24 se originaban en la reducción biológica de 24-metilencolesterol y, siguiendo un camino análogo, si los esteroides de 29 carbonos epiméricos en C-24 provenían de fucosterol (36b) ((Z)24-etilidencolesterol). En consecuencia se requería una síntesis de 24-metilencolesterol y fucosterol que permitiera la obtención de los respectivos compuestos marcados con  $^{14}\text{C}$  en la porción alquilidén. La síntesis de 24-metilencolesterol fue realizada mediante una reacción de Wittig entre acetato de 24-cetocolesterol (54b) y metilentrifenilfosforano en éter etílico (1 hora a 25 °C y 6 horas

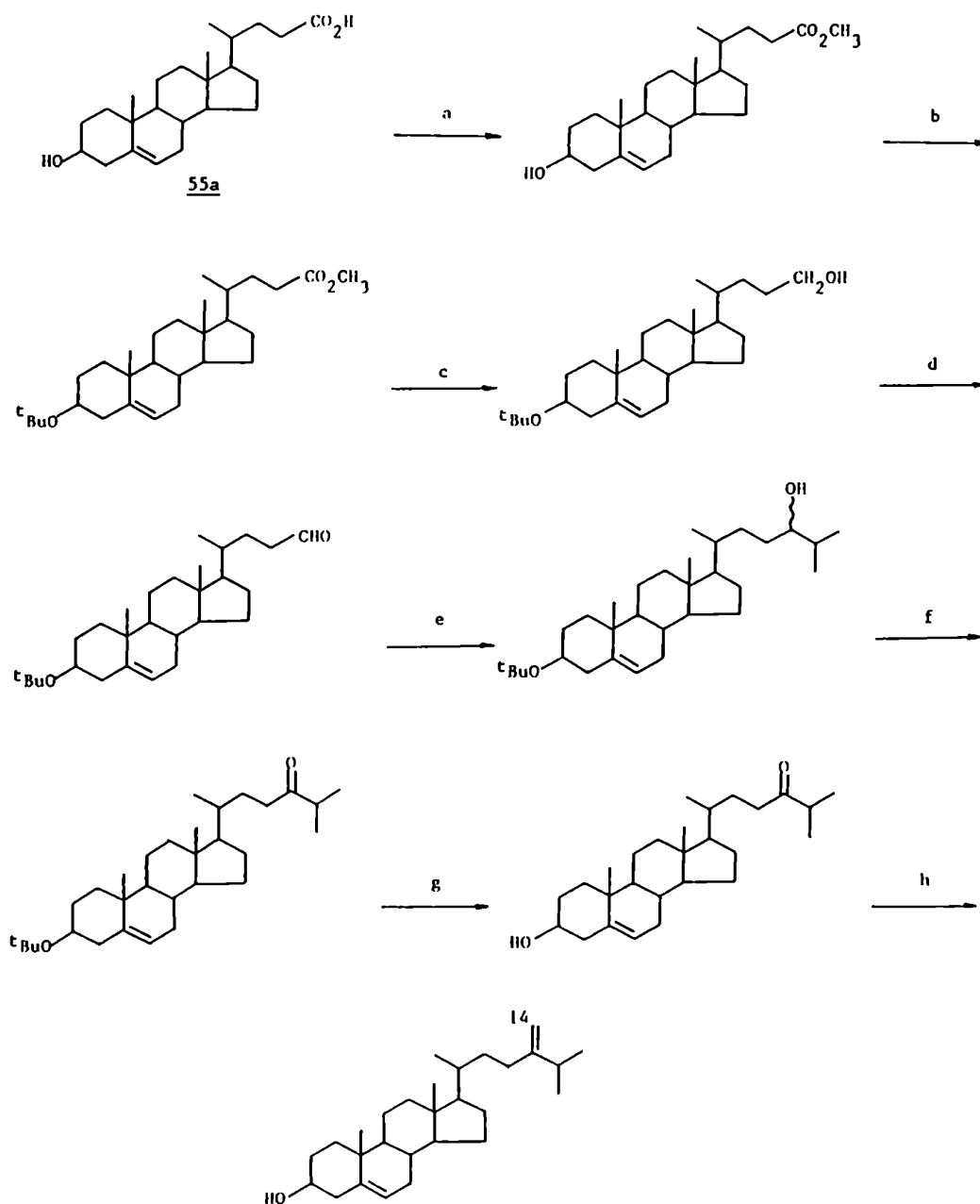


a 65 °C en recipiente cerrado). Después del proceso de aislamiento y purificación los autores informaron la obtención de 24-metilen-colesterol con un rendimiento del 70% [83a].

Tres años después J. P. Dusza llevó a cabo la reacción de acetato de 24-cetocolesterol (54b) con etiliditridenilfosforano para obtener fucosterol, discutiendo el mecanismo de la reacción de Wittig en base a la estereoquímica obtenida [85]. Si bien se empleó la técnica anteriormente mencionada (aumentando el tiempo de reacción a 65 °C) se obtuvo un rendimiento de 45% de una mezcla de los isómeros E y Z (isofucosterol y fucosterol) en relación 9:1.

En 1971 M. Fétizon y col. [86] llevaron a cabo una síntesis de 24-metilencolesterol [28-<sup>14</sup>C] a partir de ácido colénico (55a)





a) MeOH, ClH(g) R:96%; b)  $\text{F}_3\text{B-Et}_2\text{O, H}_3\text{PO}_4, \text{Me}_2\text{C=CH}_2$  R:76%; c)  $\text{LiAlH}_4$  R:62%; d)  $\text{CO}_2\text{Ag}_2/\text{celite}$  R:91% e)  $i\text{-PrMgBr}$  R:66; f)  $\text{CO}_2\text{Ag}_2/\text{celite}$  R:81%; g)  $\text{CF}_3\text{COOH}$  R:39%; h)  $\text{Ph}_3\text{P=}^{14}\text{CCH}_2$  R1:1,5% R2:18% (R1 respecto al fosforano y R2 respecto al esteroide). R2 total=1,6%.

Figura 30. Síntesis de 24-metilcolesterol [28- $^{14}\text{C}$ ] realizada por Fétizon y col.

siguiendo el esquema de la figura 30. La última etapa de esta síntesis consistía en la reacción de Wittig sobre 24-cetocolesterol en condiciones análogas a las descritas por Idler y Fagerlund. Sin embargo los autores no pudieron obtener un rendimiento superior al 19% para la reacción en cuestión. El análisis de los trabajos anteriores mostraba un panorama poco claro acerca de la eficiencia de la reacción de Wittig para la síntesis de 24-alkilidenesteroides los cuales son por otra parte intermediarios claves en la biosíntesis de distintas sustancias esteroideas [87]. Recientemente Djerassi y col. desarrollaron una aproximación diferente para la preparación de 24-metilencolesterol y otros esteroides de 28 y 29 carbonos [87]. Esta involucra la reacción de (20S)-20-(iodometil)pregnano *i*-metileter (56) con el derivado alilpotasio proveniente de 2,3-dimetil-1-buteno (figura 31). Si bien los autores indican que dicha preparación sería utilizada para la síntesis de precursores biosintéticos, no especifican el tipo de marcación a introducir ni su posición.

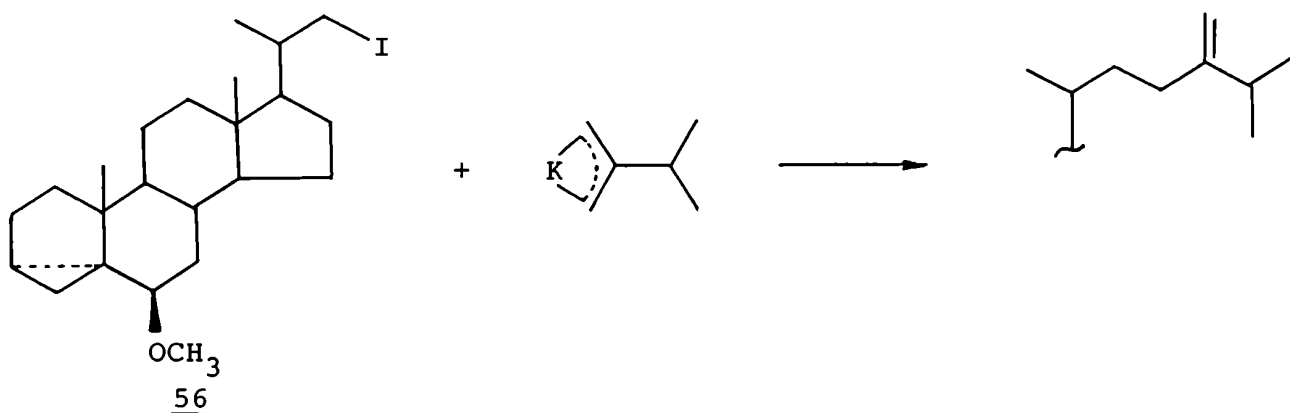
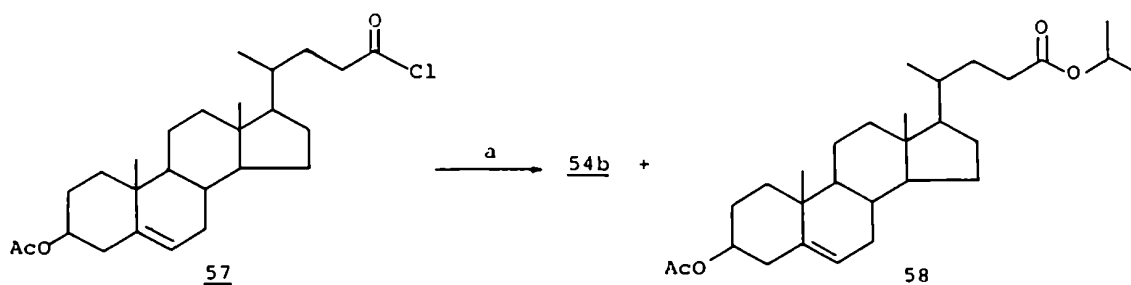


Figura 31. Síntesis de esteroides de 28 y 29 C realizada por Djerassi y col.

La preparación de acetato de 24-cetocolesterol (54b) que utilizaban Idler y Fagerlund [88] tenía como paso clave la reacción del cloruro del ácido 3 $\beta$ -acetoxicolénico (57) con diisopropilcadmio, con un rendimiento del 50% (figura 32). La misma había sido descrita por Riegel y col. y tenía la desventaja de la obtención del éster 58 como subproducto. Este inconveniente no pudo ser explicado ni subsanado por los mencionados autores. Más adelante se dará, en base a los resultados obtenidos en esta tesis una explicación a este hecho así como la manera de evitar dicha reacción secundaria (pág. 104). Este procedimiento no resultaba entonces un método eficiente para la obtención de acetato de 24-cetocolesterol, aplicable a la síntesis del compuesto isotópicamente marcado en alguna posición de la cadena lateral, como por ejemplo en C-24. En relación a esto último se podría citar a Lin y col [89]: "*la síntesis de 24-cetocolesterol por acción de diisopropilcadmio sobre el*

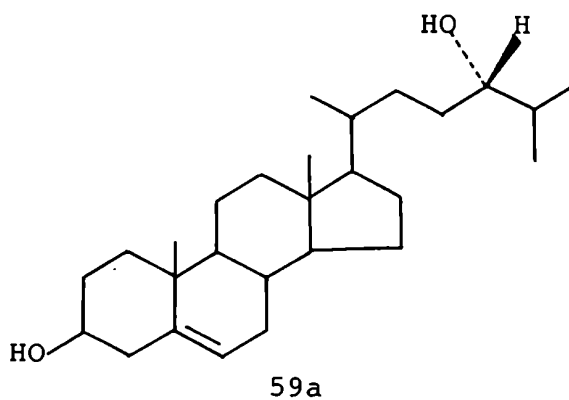


a) (*i*-Pr)<sub>2</sub>Cd R:50%.

Figura 32. Reacción del cloruro del ácido 3 $\beta$ -acetoxicolénico con (*i*-Pr)<sub>2</sub>Cd.

cloruro del ácido 3 $\beta$ -acetoxicolénico resultó poco exitosa no sólo en nuestras manos sino en la de otros que la llevaron a cabo".

Una preparación alternativa de 54a por ozonólisis de fucosterol (36b) está limitada a la disponibilidad de este último a partir de algas marinas [90]. Dicha preparación era parte de la síntesis de 24S-hidroxicolesterol (59a) (cerebrosterol) isotópicamente marcado para su uso en estudios de metabolismo en cerebro de mamíferos, desarrollada por Lin y col.. La síntesis de 59a y de su epímero en C-24 había sido descrita a partir de 24-cetocolesterol por reducción con  $B^{14}H_4Na$  y resolución de la mezcla epimérica transformando los alcoholes en los respectivos benzoatos y separándolos por cristalización [91] o por cromatografía [92]. Sin embargo, como se desprende de lo anteriormente enunciado, resultaba necesario disponer de un método eficiente para la obtención de 24-cetocolesterol. Esto se logró a partir de ácido 3 $\beta$ -hidroxicolénico (55a) por reacción con isopropillitio en benceno obteniendo un rendimiento del 46%, con recuperación del material de partida que no reaccionaba [89]. La posibilidad de recuperar el ácido colénico en forma inalterada pone en ventaja



esta síntesis frente a la desarrollada por Riegel [88], aún cuando los rendimientos de la cetona 54a son comparables.

Por último, existe en la literatura una patente [93] en la cual se describe la obtención de la cetona 54b a partir de ácido 3 $\beta$ -acetoxicolénico (55b), por formación del cloruro de ácido con cloruro de tionilo y reacción del mismo en benceno con una solución etérea de ZnBr<sub>2</sub>/*i*-PrMgBr (con un rendimiento de la cetona acetilada de 53%) seguido de tratamiento con KOH/MeOH 5 % en metanol:benceno (1:1) rindiendo el 24-cetocolesterol (54a) con un rendimiento total de 49%.

Como es evidente de los trabajos mencionados más arriba, el ácido 3 $\beta$ -hidroxicolénico (55a) (o su derivado 3 $\beta$ -acetoxi) resultaba también un intermediario importante en la síntesis de 24-metilcolesterol. El ácido 3 $\beta$ -hidroxicolénico, un producto de degradación del colesterol [94,95] ha sido empleado como material de partida para la síntesis de diversos derivados esteroidales [88,96-99]. Sin embargo hasta 1976 había sido obtenido únicamente por degradación oxidativa de acetato de 5,6-dibromocolesterol [100], como un subproducto en la preparación de androstenolona o como un producto de transformación de ácidos biliares naturales [101]. En 1977 G. Burton y E. Gros en relación con estudios biosintéticos de bufadienólidos en sapos, desarrollaron una síntesis del mencionado ácido marcado en C-24 con <sup>14</sup>C a partir de acetato de pregnenolona (60) [102,103]. Sin embargo la misma presentaba el inconveniente de la formación de los isómeros 20R y 20S durante la hidrogenación del doble enlace 20(22) de un esteroide intermediario. Una síntesis posterior de ácido 3 $\beta$ -acetoxicolénico a partir de

pregnenolona [104] procede con un rendimiento total del 54%, pero su aplicabilidad para la síntesis del análogo marcado se encuentra supeditada a la disponibilidad de 1-Br-3,3-etilendioxipropano isotópicamente marcado. Por otro lado, si bien los autores informan la obtención del isómero 20R en un paso de hidrogenación catalítica del doble enlace 20(22) los resultados obtenidos por Burton y Gros ponen en duda la formación de un único isómero en las condiciones descritas.

En base a todo lo expuesto se planteó el esquema retrosintético de la figura 33 para el 24-metilencolesterol (37a), teniendo en cuenta que el mismo debía permitir la introducción de marcación isotópica en carbono 24 con  $^{14}\text{C}$ .

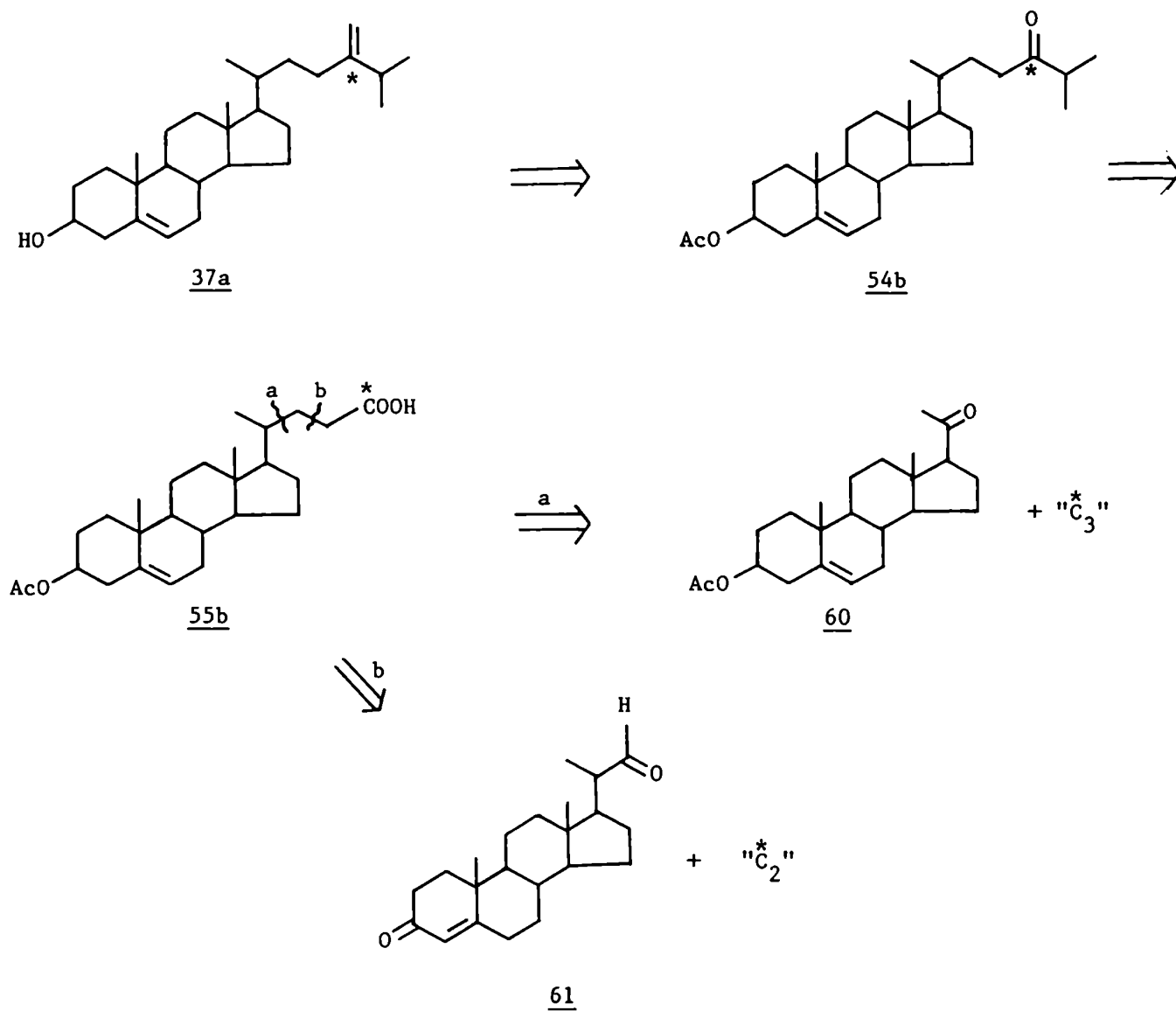


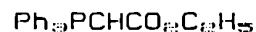
Figura 33. Esquema retrosintético de 24-metilcolesterol  
[24-<sup>14</sup>C].

## SINTESIS DEL ACIDO 3 $\beta$ -ACETOXICOLENICO

De acuerdo al esquema de la figura 33 se pueden plantear dos caminos alternativos hacia el ácido 3 $\beta$ -acetoxicolenico (55b): uno a partir de acetato de pregnenolona (60) por incorporación de 3 carbonos (análogo al seguido por Burton y Gros) y otro a partir de un aldehído de 22 carbonos como por ejemplo 20 $\beta$ -carboxaldehído-pregn-4-en-3-ona (61) por incorporación de 2 carbonos. Ambos compuestos disponibles comercialmente y de bajo costo. La síntesis a partir de este último evitaba la obtención de los isómeros 20R y 20S que se producían en el caso de utilizar acetato de pregnenolona como precursor y por otro lado permitía introducir la marcación isotópica utilizando como unidad de 2 carbonos bromoacetato de etilo [1-<sup>14</sup>C], disponible en nuestro laboratorio, mediante una reacción de Reformatsky o de Wittig. Para llevar a cabo la construcción de la cadena de 24 carbonos a partir de 61 se optó por una reacción de Wittig con carbetoximetilentrifenilfosforano (62) o alternativamente una reacción de Wittig-Horner con el anión de carbetoximetilfosfonato de dietilo (63).



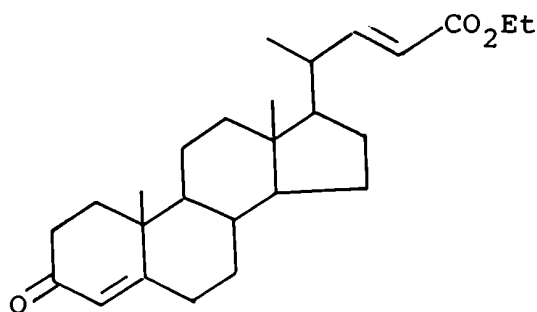
63



62

Si bien la reacción de 61 con 63 estaba descrita con un rendimiento del 82% para dar una mezcla *cis/trans* de 64a,b [105] la síntesis de 63 a partir de fosfito de trietilo y bromoacetato de etilo procedía con un rendimiento de 70% y el fosfonato líquido debía ser destilado para su purificación. Este procedimiento no resultaba muy conveniente para la síntesis del

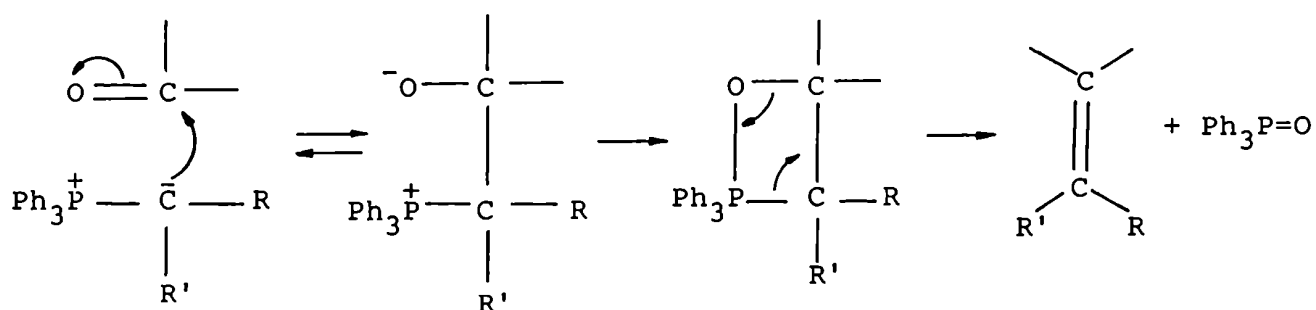




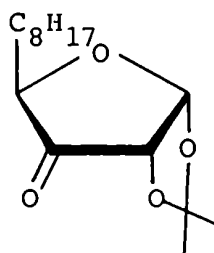
64a: 22(23)E

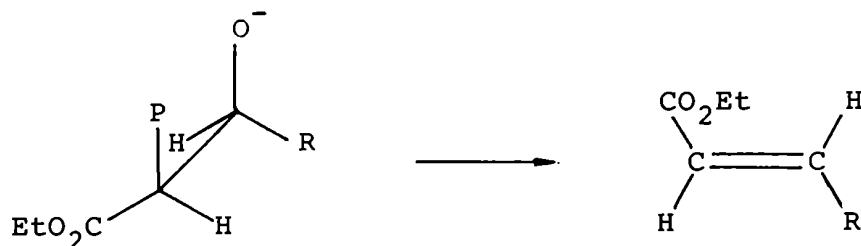
64b: 22(23)Z

análogo marcado con <sup>14</sup>C en pequeña escala. Como contrapartida la reacción de Wittig utilizando 62 presentaba la ventaja de que el fosforano era un sólido cristalino estable que podía obtenerse con excelente rendimiento mediante una ligera modificación de la técnica descrita (velocidad de agregado de álcali y control cuidadoso de la temperatura) [106]. No obstante la relación fosforano/aldehído utilizada en la literatura para la reacción en cuestión (10 días en benceno a 23°C) era demasiado alta (180/1) para su uso en la síntesis del compuesto isotópicamente marcado y el rendimiento obtenido respecto del aldehído era de 78% [107]. Se intentó entonces la reacción del carbetoximetilentrifenilfosforano (62) con el aldehído 61 en benceno a reflujo utilizando una relación fosforano/aldehído 1,2/1. De esta manera se trató de forzar la formación de la betaina, que como se sabe en el caso de fosforanos estabilizados constituye la etapa limitante de la reacción [108]. Se obtuvo así 64a,b con un rendimiento del 87%, el cual resultó ser mayoritariamente el isómero *trans*. La formación preponderante de este isómero pudo determinarse por el espectro RMN <sup>1</sup>H el cual presentaba en la zona de hidrógenos olefínicos, señales a δ 5,75



(doblete  $J=16$  Hz) y 6.84 (doble doblete  $J=16$  y 9 Hz) correspondientes a los hidrógenos 23 y 22 respectivamente. Simultáneamente se encontró en la literatura una reacción de 62 con la cetona 65 en acetonitrilo a temperatura ambiente que procedía con excelente rendimiento y utilizaba una relación fosforano/cetona de 1,2/1 [109]. Se probó entonces la reacción en estas condiciones y siguiendo el avance de la misma por cromatografía en capa delgada se determinó un tiempo de reacción de tres días, obteniéndose exclusivamente el isómero *trans* 64a con un rendimiento del 95%. Se pueden hacer algunas consideraciones acerca de la estereoquímica de la reacción. Si la betaina posee dos carbonos asimétricos, existen dos pares de diastereoisómeros. En los casos en los que la formación de la betaina es reversible, como es el de los fosforanos estabilizados, el diastereoisómero más estable termodinamicamente

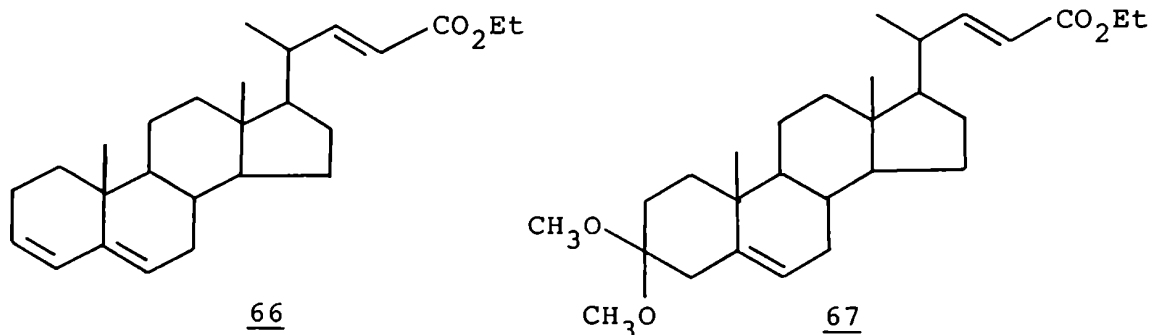
65

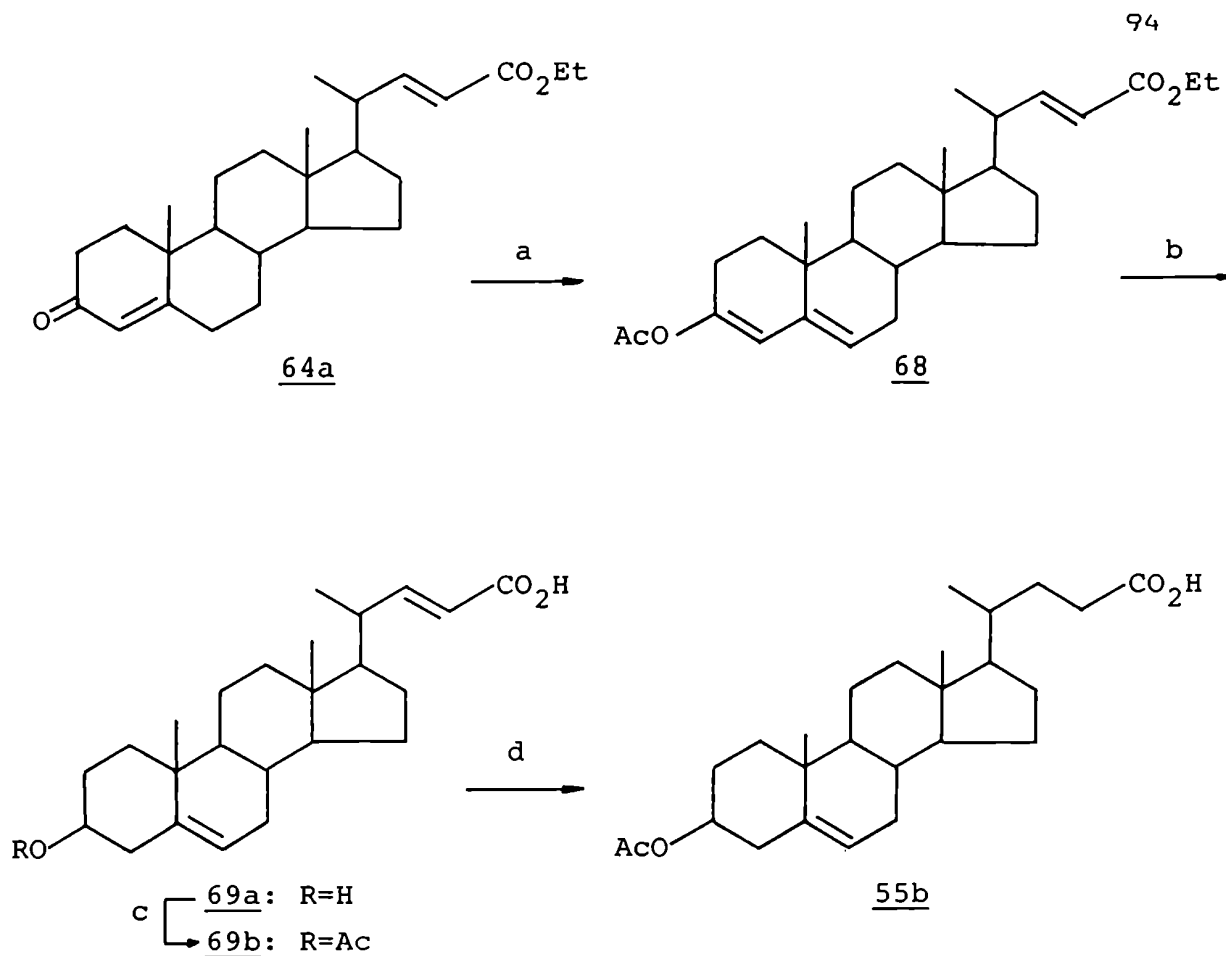


se formaría predominantemente antes de que ocurra la eliminación (un proceso *syn*), y este diastereoisómero dará preferentemente la olefina *trans*. Todo esto justifica una preponderancia del isómero *trans* con el fosforano utilizado. La formación única del isómero *trans* en el caso de utilizar acetonitrilo se debe probablemente a que este solvente estabiliza al diastereoisómero termodinámicamente más estable en mayor medida que en el caso de los otros solventes utilizados.

El siguiente paso realizado fue la transformación del sistema  $\Delta^4$ -3-ceto de 64a a 3 $\beta$ -hidroxi- $\Delta^5$  en condiciones que no afectaran al éster en C-24. Según se conoce la reducción directa del sistema mencionado con  $\text{BH}_3\text{Na}$  no es conveniente ya que se obtienen mezclas del alcohol 3 $\alpha$  y 3 $\beta$  además de reducción parcial del doble enlace conjugado. Teniendo en cuenta que se ha informado la reducción selectiva de carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados al correspondiente alcohol alílico, utilizando  $\text{BH}_3\text{Na}$  en presencia de haluros de lantánidos [110], se intentó la reacción de 64a con  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot \text{BH}_3\text{Na}$  en MeOH (5 minutos a 25°C). Luego de acidificar, el análisis por ccd en silicagel mostró la presencia de dos componentes. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla indicaba la presencia de ambos compuestos en relación 2:1; el mayoritario presentaba señales a  $\delta$  5.91 (d J=10Hz),  $\delta$  5.54 (da J=10Hz),  $\delta$  5.36 (ba) y

$\delta$  0,96 (s) que se asignaron a los hidrógenos 4, 3, 6 y 19 respectivamente del compuesto 66. Por otra parte las señales del compuesto minoritario a  $\delta$  5,36 (ba), 3,33 (s), 3,35 (s) y 1.04 (s) se asignaron a los hidrógenos 6,  $-\text{OCH}_3$ , y 19 del compuesto 67. Se probó entonces un camino alternativo para llevar a cabo la transformación, que involucraba la conversión de 64a en el enol acetato y la posterior reducción de este último con  $\text{BH}_3\text{Na}/\text{EtOH}$ , teniendo en cuenta que en el medio básico de la reacción se forma el 3-ceto- $-\Delta^5$  esteroide que sufre una reducción muy rápida al 3 $\beta$ -hidroxi compuesto [111,112]. El tratamiento de 64a con cloruro de acetilo en anhídrido acético a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 16 horas dio con muy buen rendimiento el enol acetato 68 [113]. Este se disolvió en etanol 95% y se redujo con  $\text{BH}_3\text{Na}/\text{etanol}$  70% a 5°C (2 horas). La mezcla de reacción se calentó bajo reflujo y se agregó NaOH 5%, continuándose el calentamiento a fin de saponificar el éster etílico en C-24. Luego de acidificar se obtuvo el ácido 69a con 88% de rendimiento (respecto de 64a). Finalmente por tratamiento con anhídrido acético/piridina seguido de hidrólisis del anhídrido formado, se obtuvo el ácido 3 $\beta$ -acetoxicola-5,22-diénico (69b) (fig. 34), el cual por hidrogenación sobre dióxido de platino en dioxano:ácido acético (30:1) dio el ácido 55b.





a)  $\text{ClAc}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ; b) 1.  $\text{BH}_3\text{Na}$ , 2.  $\text{NaOH } \Delta$ , 3.  $\text{ClH}/\text{H}_2\text{O}$ ; c) 1.  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pi}$ , 2.  $\text{H}_2\text{O}/\text{H}^+$ ; d)  $\text{H}_2$ ,  $\text{PtO}_2$  en dioxano:ácido acético (30:1).

Figura 34. Secuencia de síntesis de **55b** a partir de **64a**.

#### SINTESIS DE $3\beta$ -ACETOXICOLEST-5-EN-24-ONA

Para llevar a cabo esta síntesis se presentaban dos posibilidades según se indica en la figura 35: a partir del ácido **69b** obtener la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada **70**, la cual por hidrogenación del doble enlace 22(23) rendiría la cetona **54b** u obtener esta última a partir del ácido  $3\beta$ -acetoxicoléico (**55b**). Se probaron distintas posibilidades, todas las cuales involucraban la conversión del

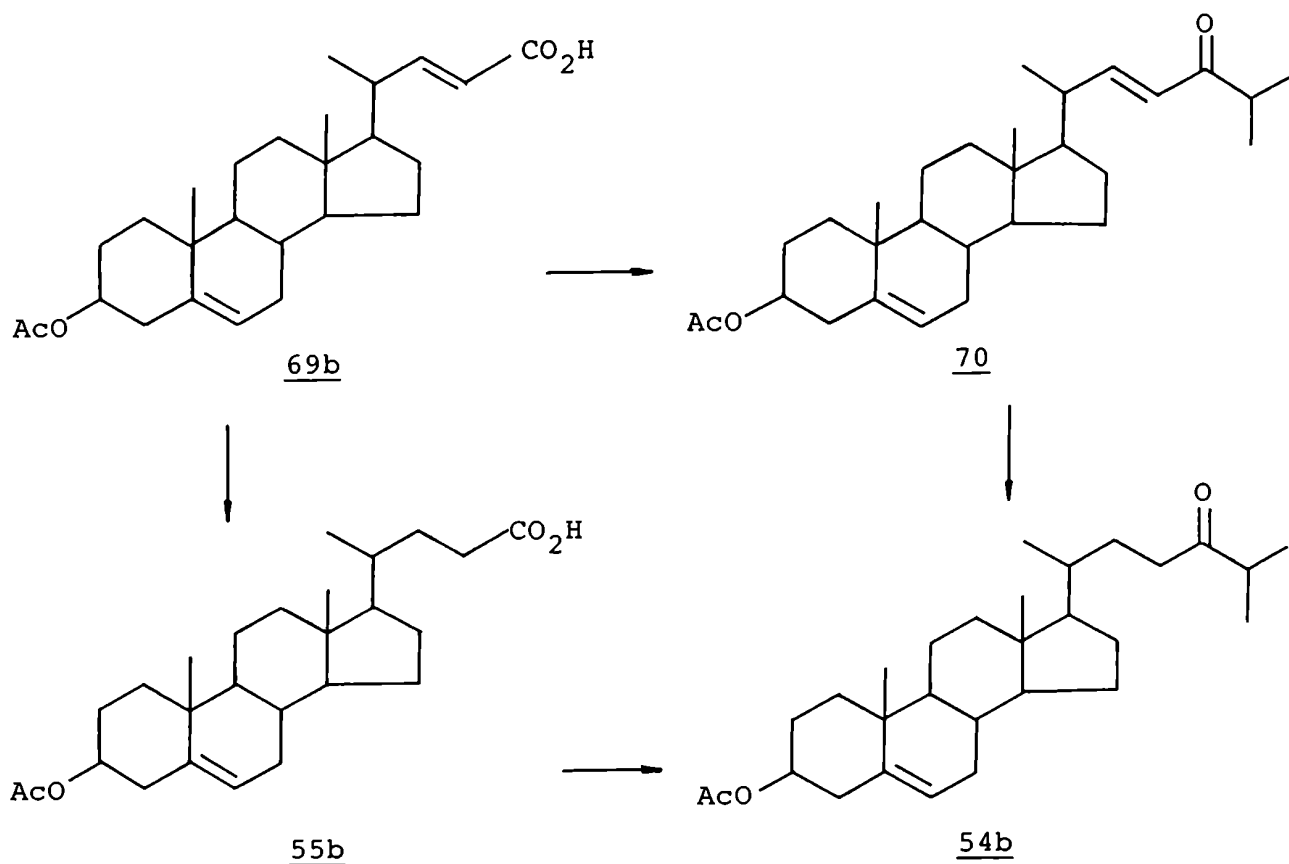
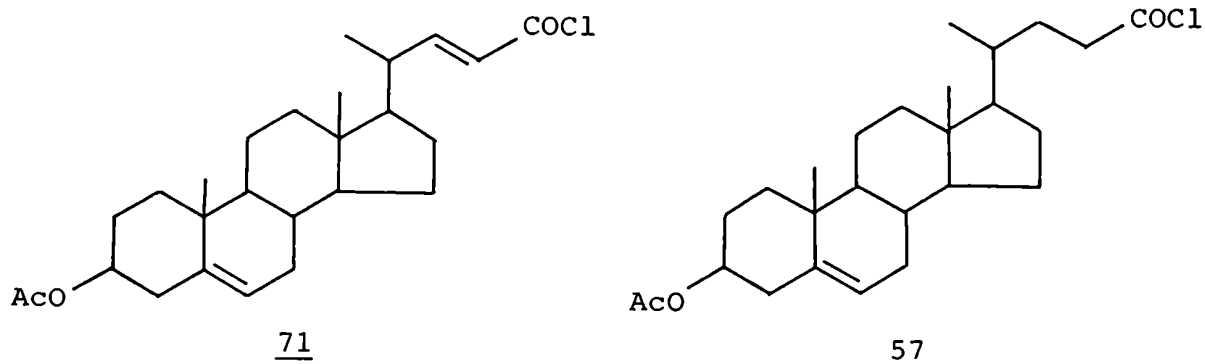


Figura 35. Posibles caminos a **54b** a partir de **69b**.

ácido (**69b**, **55b**) en el cloruro de ácido correspondiente y posterior reacción con distintos reactivos organometálicos.

#### Formación del cloruro de ácido

La formación del cloruro de ácido se llevó a cabo por reacción del ácido (**69b** ó **55b**) con cloruro de oxalilo en benceno anhidro. En el caso del ácido  $\alpha,\beta$ -insaturado **69b** la reacción fue muy rápida (una hora) y el cloruro de ácido obtenido (**71**) resultó muy reactivo y extremadamente fácil de hidrolizar. El ácido **55b** en cambio, reaccionó más lentamente con el cloruro de oxalilo (5 ho-



ras) y el cloruro de ácido correspondiente (57) resultó menos reactivo que el anterior, no siendo tan fácilmente hidrolizable. El tiempo de formación del cloruro de ácido se determinó en ambos casos siguiendo el avance de la reacción por RMN  $^1\text{H}$  (utilizando como solvente benceno deuterado).

#### Reacción con ioduro de isopropilmanganeso

Se han informado diversas preparaciones de cetonas a partir de cloruros de ácidos carboxílicos con ioduros de compuestos organomanganesianos [114,115]. Por este motivo se intentó la reacción de 71 con *i*-PrMnI en diclorometano anhidro (15 min a  $-30^\circ\text{C}$  y 3 horas a  $22^\circ\text{C}$ ) recuperándose mayoritariamente el ácido 69b y una pequeña cantidad de un producto de mayor  $R_f$  en ccd en silicagel. Este, de acuerdo a las señales a 1695, 1670, 1625 y 990 de su espectro IR así como las señales a  $\delta$  6,08 (d  $J=16\text{Hz}$ ) y  $\delta$  6,74 (dd  $J=9\text{Hz}$  y  $J=16\text{Hz}$ ) correspondientes a los hidrógenos de carbono 23 y 22 respectivamente del sistema  $\Delta^{22,23}$ -24-ceto, se asignó a la cetona 70. El bajo rendimiento obtenido podría deberse a la inestabilidad de los RMnI cuando R es secundario, lo cual no permite extender los

tiempos de reacción a temperatura ambiente [114].

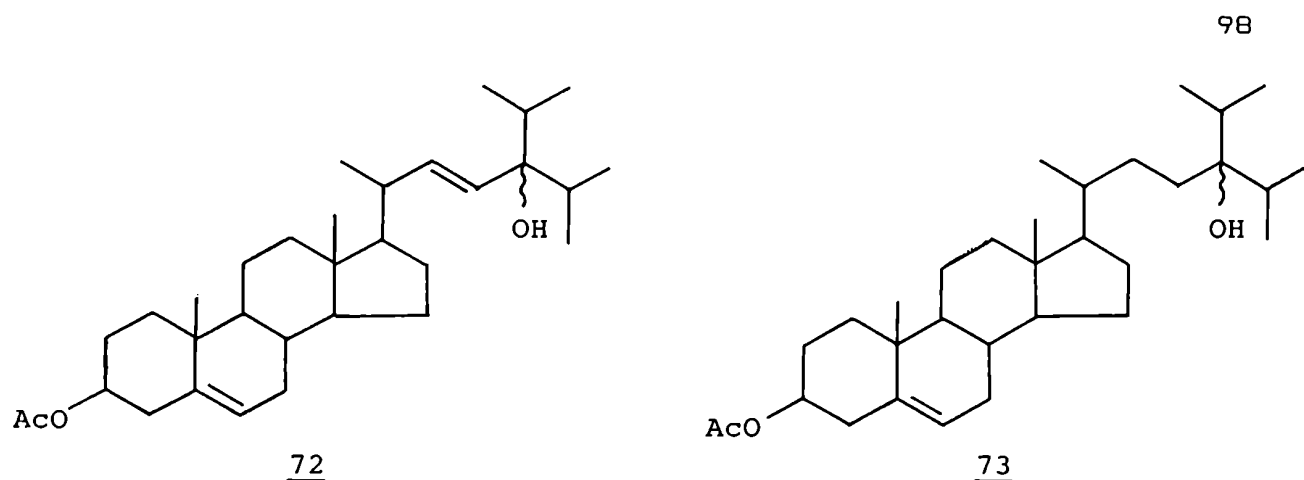
Aún cuando estos resultados no fueron satisfactorios permitieron que se buscaran condiciones de hidrogenación de la cetona 70 para obtener 54b. La mezcla del ácido 69b y la cetona 70 se disolvió en EtOH absoluto y se hidrogenó a presión atmosférica utilizando Pd/C 10% como catalizador. En estas condiciones se observó en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del producto la desaparición de las señales correspondientes a los hidrogenos de carbono 22 y 23 de la cetona 70, pero permanecieron inalteradas las señales a  $\delta$  5,76 y  $\delta$  6,96 correspondientes a los hidrógenos de carbono 23 y 22 respectivamente del ácido 69b.

#### Reacción con bromuro de isopropilmagnesio

La reacción de haluros de acilo con reactivos de Grignard no es generalmente utilizada para la síntesis de cetonas ya que la cetona inicialmente formada reacciona con una segunda molécula del reactivo de Grignard para dar la sal del alcohol terciario. Sin embargo, se han preparado cetonas por este método usando bajas temperaturas, adición inversa (adición gota a gota del reactivo de Grignard sobre el haluro de acilo), exceso de haluro de acilo, etc, obteniéndose en muchos casos resultados satisfactorios [116].

Teniendo presente esto último se realizó la reacción de 71 y de 57 con *i*-PrMgBr en benceno a 5°C y en THF a -78°C, utilizando adición inversa. En todos los casos ensayados se obtuvo como producto de reacción una mezcla constituida por la cetona esperada (70 ó 54b), el ácido de partida (69b ó 55b) y cantidades importantes del alcohol correspondiente (72 o 73) el cual se



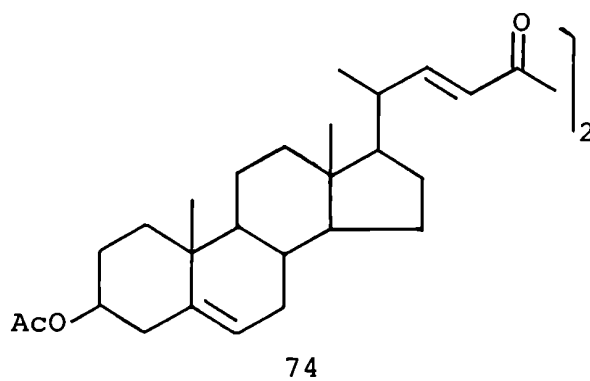


identificó por sus espectros IR y RMN  $^1\text{H}$ . Si bien la proporción de los productos obtenidos no resultó reproducible, se obtuvo siempre una mayor cantidad del alcohol cuando se utilizó como sustrato al cloruro de ácido  $\alpha,\beta$ -insaturado 71.

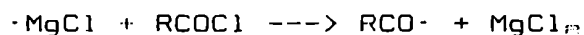
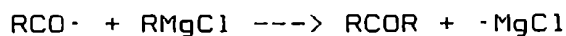
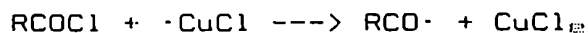
#### Reacción con bromuro de isopropilmagnesio en presencia de acetilacetato de hierro

Aunque en casos aislados la adición de cantidades catalíticas de sales de metales de transición, tales como  $\text{FeCl}_3$  [117] o  $\text{CuCl}$  [118], han mejorado la reacción directa de los reactivos de Grignard con los haluros de acilo para dar cetonas, ninguna de estas reacciones parece ser general. De acuerdo al trabajo realizado por Fiandanese y col. [119] los haluros de acilo se acoplan con los reactivos de Grignard en presencia de cantidades catalíticas de acetilacetato de  $\text{Fe(III)}$ . Esta reacción es, según los autores, general con respecto a ambos reactivos y provee un método suave y conveniente para la síntesis de cetonas alifáticas y aromáticas.

Se probó entonces la reacción del cloruro de ácido 71 con  $i\text{-PrMgBr}$  en THF a  $0^\circ\text{C}$  en presencia de cantidades catalíticas de

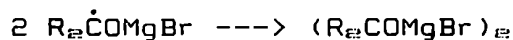
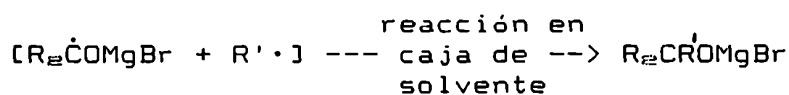


$\text{Fe}(\text{acac})_3$ . El producto aislado luego de un tratamiento conveniente se sometió a una cromatografía "flash" en columna de silicagel aislándose tres fracciones que correspondían a la cetona 70 (35%), al ácido 69b (40%) y a un producto cuyo RMN  $^1\text{H}$  presentaba señales a  $\delta$  5,82 (d J=16Hz) y  $\delta$  7,01 (dd J=16Hz y J=9Hz) (25%) que se asignaron a los hidrógenos de carbono 23 y 22 respectivamente del dímero 74. La formación del dímero 74 podría explicarse mediante un mecanismo por radicales libres favorecido por la presencia de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ , como el que se ha postulado por ejemplo para la reacción de ciertos cloruros de ácido con reactivos de Grignard en presencia de cantidades catalíticas de cloruro cuproso [118]. En esas condiciones el cloruro cuproso iniciaría un mecanismo por radicales libres el cual procedería a través de la especie ( $\cdot\text{MgCl}$ ) según se indica en la siguiente secuencia:



En la actualidad se han acumulado bastantes evidencias acerca de la participación de radicales en reacciones de Grignard

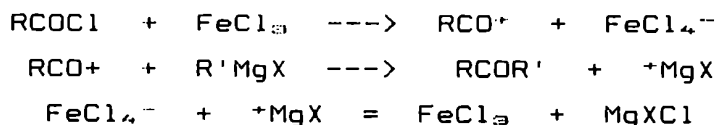
[120,121]. Algunos investigadores [120-122] postulan que el mecanismo principal de reacción de cetonas con reactivos de Grignard involucra etapas de transferencia de un electrón (SET) y no procede mayormente via intermediarios iónicos como se pensaba tradicionalmente [123], proponiéndose un mecanismo como el siguiente para la reacción de algunas cetonas con el reactivo de Grignard [124]:



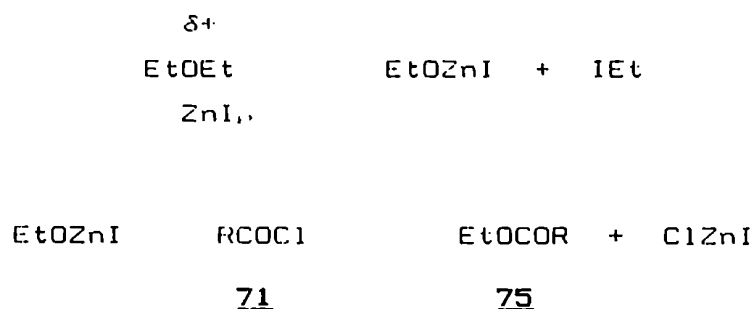
Sin embargo el mecanismo principal involucrado en este tipo de reacciones no ha sido aún absolutamente determinado ya que no se posee información definitiva acerca de como procede la transferencia de grupos alquilo o arilo al anión radical que se formaría por el camino SET [120], ni existen pruebas de la existencia de iones radicales en todas las reacciones en cuestión. Por otro lado, para el caso específico involucrado en esta tesis que es la reacción de un cloruro de ácido con el reactivo de Grignard no se plantean mecanismos de tipo SET ya que la sustitución al carbonilo por parte de este reactivo implica la ruptura de una unión C-Cl. Sin embargo podría pensarse que la presencia del  $Fe(acac)_3$  favorecería un proceso de transferencia de un electrón aún en el caso en cuestión.

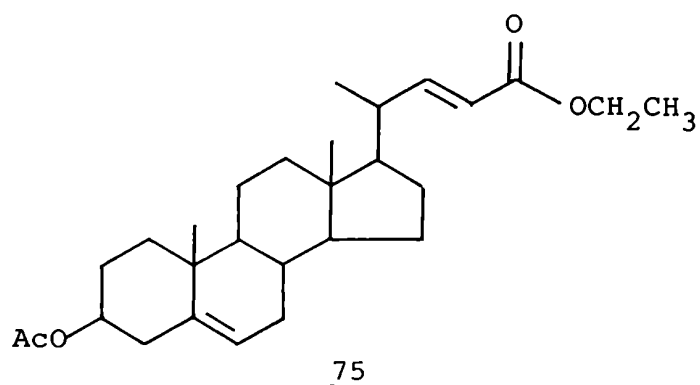
### Reacción con bromuro de isopropilmagnesio-ZnI<sub>2</sub> ó ZnBr<sub>2</sub>

La síntesis de cetonas a partir de cloruros de ácido y compuestos organozínicos fue muy utilizada en el pasado [125] sin embargo en años más recientes se han descrito pocos ejemplos [126]. La utilización de un reactivo "organozínico" está especialmente recomendada para la síntesis de cetonas en las cuales se introduce un grupo alquilo secundario mediante el reactivo organometálico [125]. Aunque inicialmente se creyó que esta reacción ocurría por simple interacción del "compuesto organozínico" con el haluro de acilo, se demostró posteriormente que los haluros metálicos del tipo MX<sub>2</sub> (M=metal, X=Cl,Br) juegan un rol importante en la misma. El reactivo formado *in situ* a partir de 2 RMgX + ZnX<sub>2</sub> reacciona rápidamente con haluros de acilo para dar cetonas, pero el reactivo diorganozínico aislado libre de la sal, no reacciona con los haluros de acilo [127,128]. Por otra parte de los datos encontrados en la literatura no resulta claro si la especie involucrada en la reacción sería un verdadero compuesto organozínico (ya sea del tipo RZnX ó R<sub>2</sub>Zn) o si la misma es el reactivo de Grignard en presencia de la sal de tipo ZnX<sub>2</sub>. El reactivo de Grignard podría formar con ZnX<sub>2</sub> un "ate-complex" como el que se discutirá más adelante en este capítulo para el caso del CdCl<sub>2</sub>, o por otro lado podría ocurrir que la reacción transcurriera por un mecanismo similar al descrito por Cason y col. para la reacción de cloruros de acilo en presencia de FeCl<sub>3</sub> [129]. La misma involucraría un mecanismo como el siguiente:



Un esquema de este tipo podría explicar una diferenciación entre el carbonilo del haluro de acilo y el de la cetona, resultando en una mayor activación del primero por parte del ácido de Lewis. Teniendo presente esto último se intentó la reacción del cloruro de ácido 57 con una solución etérea de *i*-PrMgBr/ZnBr<sub>2</sub> en benceno anhidro [93]. De esta manera se obtuvo la cetona 54b aunque con un rendimiento del 40%. Para mejorar este resultado se pensó en usar otro haluro de zinc que fuera un mejor ácido de Lewis. Se sintetizó entonces ZnI<sub>2</sub> [130] y se hizo reaccionar el cloruro de ácido 71 (este último más reactivo que su análogo hidrogenado 57) en diclorometano con una solución etérea de *i*-PrMgBr/ZnI<sub>2</sub>. Se empleó un procedimiento idéntico al utilizado con el reactivo organomanganesiano [115]. Como producto de reacción se obtuvo mayoritariamente una sustancia de R<sub>f</sub> levemente menor a la cetona 70, la cual una vez aislada y purificada se identificó mediante su espectro de RMN <sup>1</sup>H como el éster etílico 75. La obtención de 75 se podría explicar mediante un esquema como el siguiente, que implica la ruptura del éter utilizado como solvente del reactivo organometálico.





### Reacción con bromuro de isopropilmagnesio-CdCl<sub>2</sub>

Los compuestos organocádmicos han sido empleados para la síntesis de cetonas en mayor medida que otros compuestos organometálicos [125], sin embargo su uso en general está limitado al empleo de dialquilmagnios con grupos alquilos primarios o diarilmagnios ya que los compuestos organocádmicos secundarios o terciarios son muy inestables térmicamente.

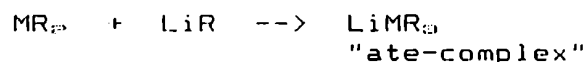
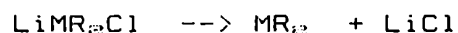
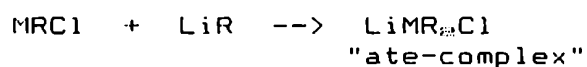
Como se mencionó anteriormente (pág.84), por reacción de diisopropilmagnio con el cloruro del ácido 3β-acetoxicolenico (57) realizada a temperatura ambiente se obtenía la cetona 54b con un 50% de rendimiento [88], sin embargo éste es probablemente el resultado de la utilización de un gran exceso de reactivo organometálico que compensaría en parte la baja estabilidad del diisopropilmagnio [125].

En reacciones de transmetalación del tipo:



donde X es un halógeno como por ejemplo Br, puede ocurrir que se formen "ate-complexes" como intermediarios [131]. Los complejos de este tipo se forman cuando se combina un ácido de Lewis con una

base para dar un ión negativo en el cual el átomo central tiene una valencia mayor a la normal. Los mismos son en muchos casos térmicamente estables y pueden participar en reacciones posteriores; en particular cuando contienen un buen grupo saliente, pueden descomponerse para dar los productos de transmetalación. Un esquema de reacción como éste se puede ejemplificar con la reacción de un organolitio con el cloruro de un metal divalente [132]:



Cuando se hizo reaccionar una solución etérea de *i*-PrMgBr con CdCl<sub>2</sub> en relación 1:1,2 a 0°C y sobre esta mezcla de reacción se agregó un equivalente del cloruro de ácido **57** en benceno, se obtuvo luego de 10 horas a temperatura ambiente un producto crudo que por purificación en columna de sílica rindió la cetona **54b** con un rendimiento del 75%. Como producto secundario de esta reacción se obtuvo el éster de isopropilo **58** al igual que Riegel y col. [88] (ver página 84). Este compuesto se formaría probablemente por reacción del cloruro de acilo con isopropóxido formado por oxidación del RMgBr con oxígeno o peróxidos presentes en el medio de reacción. Para evitar la formación del mismo se controló muy especialmente la ausencia total de oxígeno en el medio de reacción y se agregó alúmina neutra al éter recién destilado que se utilizaría para la síntesis del Grignard de manera de eliminar toda





## SINTESIS DE 24-METILENCOLESTEROL

Como se mencionó al principio de este capítulo el análisis de las distintas síntesis descritas de 24-metilencolesterol (37a) a partir de acetato de 24-cetocolesterol (54a) mostraba un panorama poco claro [83a,86]. La reacción de Wittig utilizada era efectuada en condiciones desfavorables para la síntesis de un compuesto marcado (recipiente cerrado a presión) [83a] o por otro lado no se obtenían resultados satisfactorios [86]. A pesar de esto se probó la reacción de Wittig con metilentrifenilfosforano en THF a reflujo a distintos tiempos y en distintas concentraciones, sin embargo no se obtuvieron rendimientos superiores al 40%. Un probable motivo de la dificultad de reacción observada era que en el medio básico resultante por el exceso de iluro, se favorecía la enolización de la cetona; por otra parte dicho exceso es imprescindible para lograr buenos rendimientos [83a,86,52]. Teniendo en cuenta esto último se probó un método alternativo de inserción del grupo metileno que utilizaba  $Zn/CH_2Br_2/TiCl_4$  y proveía un medio de reacción suave y no básico [133]. La reacción se llevó a cabo a 0°C en diclorometano y se siguió el avance de la misma por ccd en sílica-gel determinándose un tiempo de reacción óptimo de 45 minutos. Se obtuvo así luego de una purificación por cromatografía en columna de sílicagel, 3 $\beta$ -acetoxi-24--metilencolesterol (37b) con un rendimiento del 95%. Este producto se transformó en 24-metilencolesterol (37a) por tratamiento con NaOH 10% en solución metanólica. Esta desacetilación procedió con 75% de rendimiento y resultó ser la etapa de menor rendimiento de la secuencia. Sin

embargo, aunque no se verificó experimentalmente, sería factible lograr un mejor rendimiento llevando a cabo esta reacción en metanol:benceno 1:1 como se ha descrito para la desacetilación de 3 $\beta$ -acetoxi-24-cetocolesterol (se informa un rendimiento del 93%) [93].

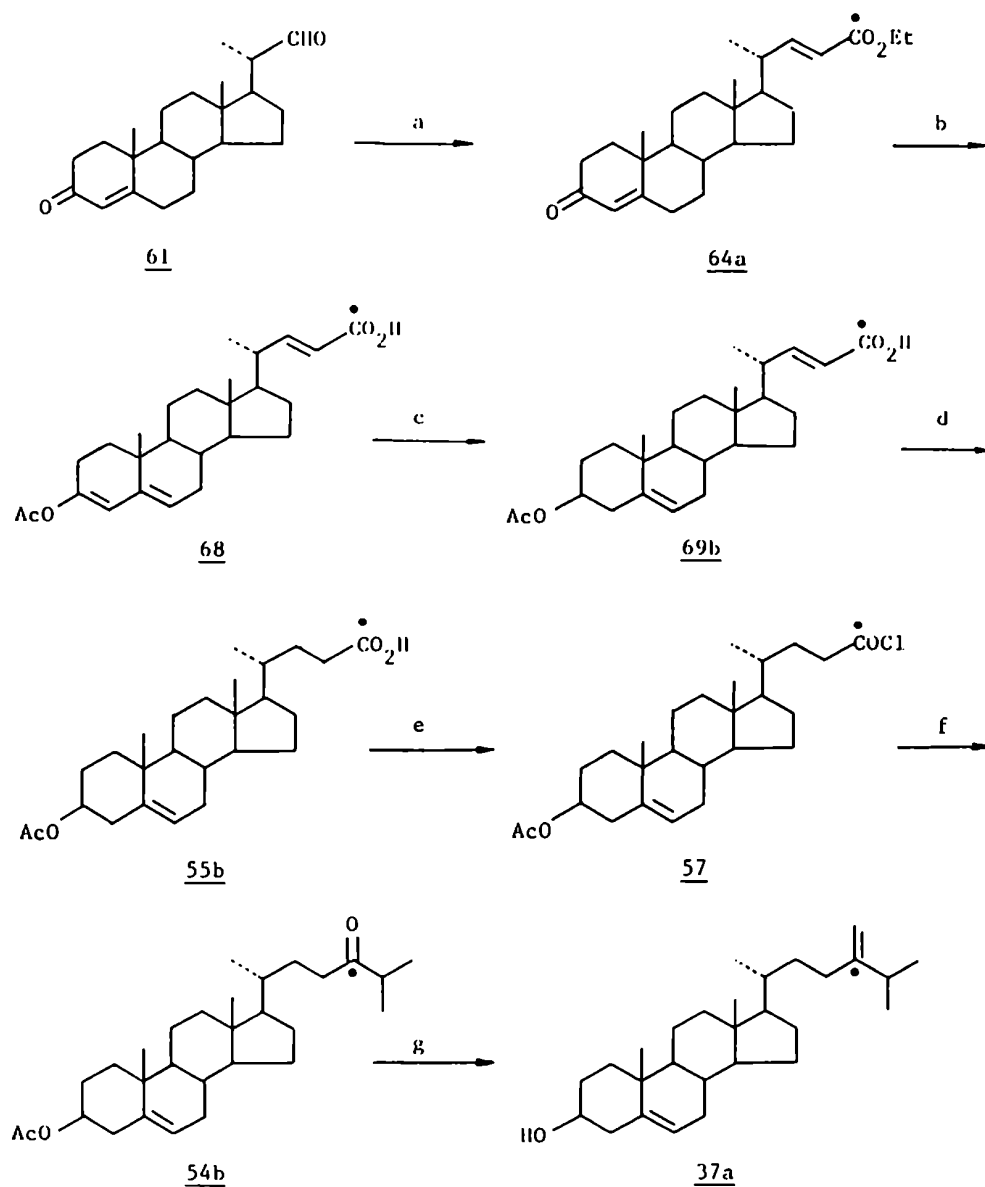
#### Síntesis de 24-metilencolesterol [24- $^{14}$ C]

En la figura 36 se representa el camino seguido para la síntesis de 24-metilencolesterol [24- $^{14}$ C]. Se partió de bromoacetato de etilo [1- $^{14}$ C] de actividad específica 1mCi/mmol y se obtuvo 24-metilencolesterol [24- $^{14}$ C] con idéntica actividad específica. El rendimiento obtenido respecto al bromoacetato de etilo fue de 44%.

#### Síntesis de 24-metilencolesterol [7- $^3$ H]

De acuerdo a lo enunciado al comienzo de este capítulo se necesitaba sintetizar además 24-metilencolesterol marcado con tritio en el núcleo esteroide. Con esta finalidad se planeó una secuencia como la que se esquematiza en la figura 37.

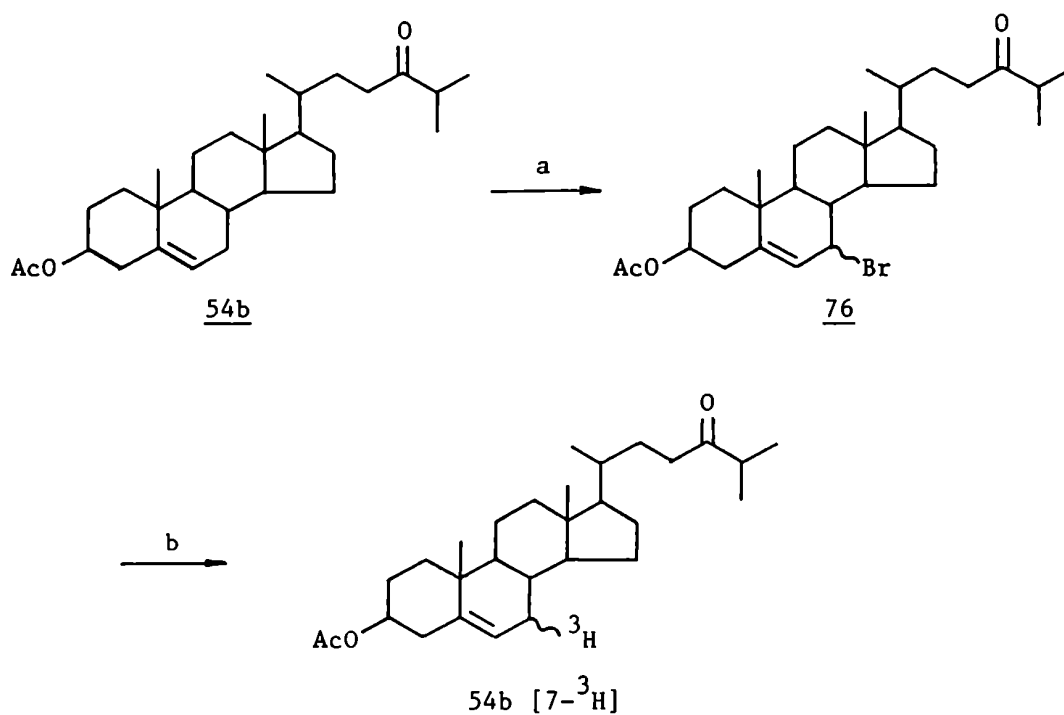
**Bromación alílica.**— La bromación directa de la cetona 54b con N-bromosuccinimida podía dar el 7-bromoderivado esperado y/o el producto de bromación  $\alpha$  al carbonilo [134]. Se probó en primera instancia la reacción de 54b con N-bromosuccinimida en relación 1:1,2 en CCl<sub>4</sub> a reflujo. El análisis por ccd en silicagel mostró una única mancha de menor movilidad que la cetona 54b; el espectro RMN  $^1$ H de esta fracción indicó que el producto era una mezcla



a)  $\text{Ph}_3\text{C}=\text{CHCO}_2\text{Et}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$  R1:80% R2:95%; b) 1.  $\text{AcCl}/\text{Ac}_2\text{O}$  R:90%; c) 1.  $\text{BH}_3/\text{Na}$ , 2.  $\text{NaOH}$   $\Delta$  3.  $\text{H}_2\text{O}/\text{H}^+$  4.  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pi}$  5.  $\text{H}_2\text{O}/\text{H}^+$  R: ; d)  $\text{H}_2$ ,  $\text{PtO}_2$ , dioxano:AcOH (30:1) R:cuant; f)  $i\text{-PrMgBr}/\text{CdCl}_2$  R:95%; g) 1.  $\text{Zn}/\text{CH}_2\text{Br}_2/\text{TiCl}_4$ ,  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  R:96% 2.  $\text{NaOH}$  10%, metanol R:75%. R1total:47%; R2total:56% (R1 respecto del fosforano, R2 respecto de alhído)

Figura 36. Secuencia de síntesis de 24-metilcolesterol

[24- $^{14}\text{C}$ ].



a) bromación alílica; b) reducción e incorporación de  $^3\text{H}$ .

Figura 37. Secuencia sintética para la introducción de  $^3\text{H}$  en posición 7.

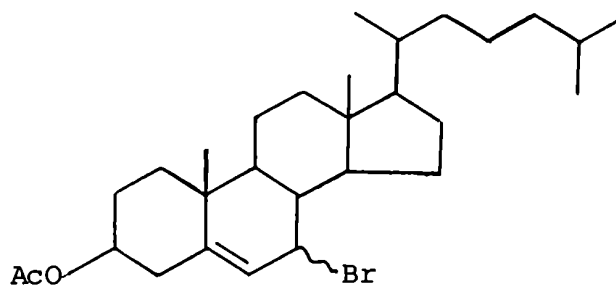
de  $7\alpha$  y  $7\beta$  bromoderivados **76** (mayoritariamente el isómero  $\alpha$ ). Por otra parte no se observaron señales correspondientes al producto de bromación  $\alpha$  al carbonilo.

**Reemplazo del 7-bromo por tritio.**— La introducción de tritio en la posición 7 del esteroide se llevó a cabo por reducción del 7-bromoderivado **76**. Esta reducción se probó utilizando los correspondientes reactivos deuterados.

Existen tres métodos para reemplazar un halógeno por deuterio o

tritio los cuales son comúnmente usados en el campo de los esteroides [135]. Estos métodos involucran el tratamiento del haluro (generalmente bromuro o ioduro) con: a) deuterio o tritio gaseoso y un catalizador de hidrogenación; b)  $\text{AlD}_4\text{Li}$  (o tritiado) y c) Zn en solventes deuterados (o tritiados). La reacción con deuterio gaseoso (y posteriormente con tritio) no era factible de ser realizada con los equipos disponibles en el laboratorio por la infraestructura especial requerida. El desplazamiento de un haluro alílico por reacción con  $\text{AlD}_4\text{Li}$  no resultaba conveniente pues la misma suele tener lugar con migración del doble enlace a la posición 6,7 [136]. La reducción de haluros alílicos con hidruros de boro, por ejemplo  $\text{NaBH}_4$ , se complica a menudo por la formación de intermediarios de boro los cuales pueden hidroborar alquenos. De igual manera no se han obtenido buenos rendimientos por reacción de haluros alílicos con  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  o  $\text{Bu}_4\text{NCNBH}_3$ . En todos los casos se obtienen productos de hidroborcación lo cual era de esperar si se considera que por reacción de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  y haluros orgánicos se forma cianoborano [137]. Por otro lado era necesario una relación molar de hidruro/ $\text{RX}=4$  siendo esto último muy desfavorable para ser utilizado con el análogo isotópicamente marcado.

Considerando lo enunciado se probó primero la reducción con zinc en distintas condiciones. Estas pruebas se llevaron a cabo utilizando acetato de 7-bromocolesterol (77) sintetizado por bromación alílica de acetato de colesterol (78). Se hizo reaccionar entonces 77 con  $\text{INa/Zn/D}_2\text{O}$  en 1,2-dimetoxietano y en THF [138]. En el primer caso 77 se descompuso por disolución en el solvente. Cuando se utilizó THF se obtuvo en parte el producto

77

esperado 78-D pero se formó además el producto de eliminación 79. Este proceso se encontraría favorecido por la formación de un sistema de dobles enlaces conjugado [139]. Se intentó la misma reacción pero con agregado de una pequeña cantidad de ACOH con la finalidad de favorecer la reducción ante la eliminación, sin embargo no se obtuvieron resultados satisfactorios. En la figura 38 se representa este tipo de reacción.

Posteriormente se probaron distintas reacciones de intercambio metal-halógeno con RLi seguido de agregado de D<sub>2</sub>O en THF optimizando tiempos y temperaturas. La mejor condición encontrada fue con BuLi en THF a -117°C. De acuerdo al espectro de RMN <sup>1</sup>H del producto de reacción acetilado se obtenía el compuesto 78-D (50%) pero también acetato de 7-dehidrocolesterol (79) (25%) y otro compuesto con hidrógenos olefínicos a  $\delta$  5,22 que podría corresponder al  $\Delta^6$  derivado por reordenamiento del anión alílico intermediario.

Se intentó posteriormente la formación del Grignard correspondiente a partir de 77 pero no se obtuvieron resultados satisfactorios. Cabe destacar que todas estas posibilidades con reactivos organometálicos obligarían a la protección previa del carbonilo de

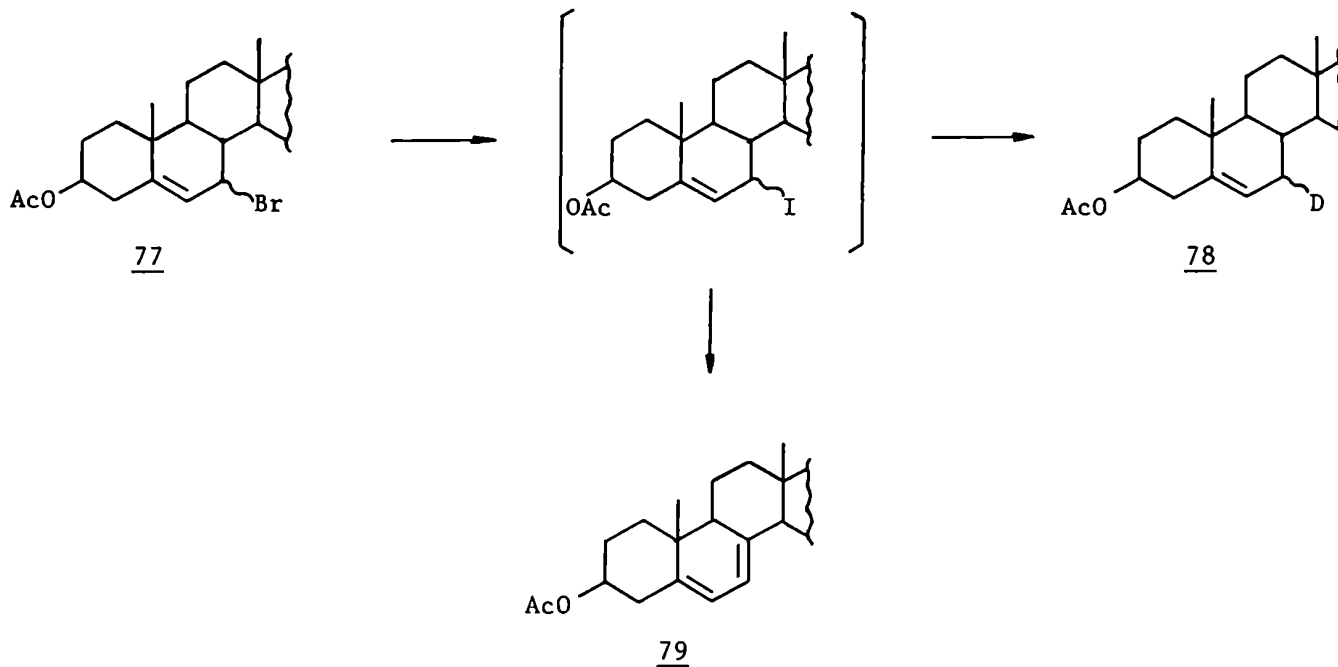
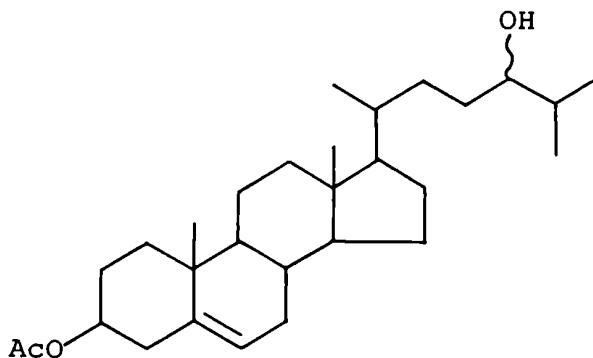


Figura 38. Reacción de 77 con  $\text{I}^-\text{Na}/\text{Zn}/\text{D}_2\text{O}$ .

54b. Por otra parte se encontraba descrita en la literatura la reducción de distintos haluros alílicos, bencílicos y terciarios con  $\text{ZnCl}_2/\text{NaBH}_3\text{CN}$  [140]. Este reactivo contendría una mezcla de sales como  $\text{Na}[\text{ZnCl}(\text{BH}_3\text{CN})_2]$ ,  $\text{Na}_2[\text{ZnCl}_2(\text{BH}_3\text{CN})_2]$ ,  $\text{Na}[\text{Zn}(\text{BH}_3\text{CN})_3]$  y  $\text{Zn}(\text{BH}_3\text{CN})_2$  si bien su composición no es conocida exactamente. El mismo no presentaba en principio los inconvenientes enunciados anteriormente para otros hidruros y además reducía cetonas mucho más lentamente que halogenuros alílicos [140]. Se intentó entonces la reacción de 76 con un equivalente de  $\text{ZnCl}_2/\text{NaBH}_3\text{CN}$  en éter durante 20 minutos. En estas condiciones se obtuvo 54b en forma cuantitativa obteniéndose sólo en algunos casos cantidades pequeñas del alcohol

**59b.** De formarse el alcohol **59b** el producto de reacción podía oxidarse con reactivo de Jones el cual rendía la cetona en forma cuantitativa.

Se sintetizó  $\text{NaCNBD}_3$  a partir de  $\text{NaCNBH}_3$  (comercial) por intercambio con agua tritiada a pH 3 [141]. Este intercambio se probó primero con  $\text{D}_2\text{O}$  a fin de optimizar las condiciones de reacción y se obtuvo así  $\text{NaCNBD}_3$  (75%-D). Esto último se determinó mediante la comparación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de una masa conocida de  $\text{NaCNBH}_3$ , más 5  $\mu\text{l}$  de dioxano usado como standard interno y el espectro de una masa también conocida del análogo deuterado más la misma cantidad de dioxano utilizada para el espectro del hidruro normal. En la figura 39 se representan ambos espectros. En los mismos se puede ver un cuarteto muy protegido correspondiente al acoplamiento con  $^{11}\text{B}$  de spin 3/2 (abundancia natural 81,2%) y en menor medida el multiplete debido al acoplamiento con  $^{10}\text{B}$  de spin 3 (abundancia natural 18,8%); a campos más bajos se observa el singlete correspondiente al dioxano. El  $\text{NaCNBD}_3$  se purificó por formación de su complejo con dioxano [141], sin embargo posteriormente se pudo comprobar que no era necesaria dicha etapa de



**59b**



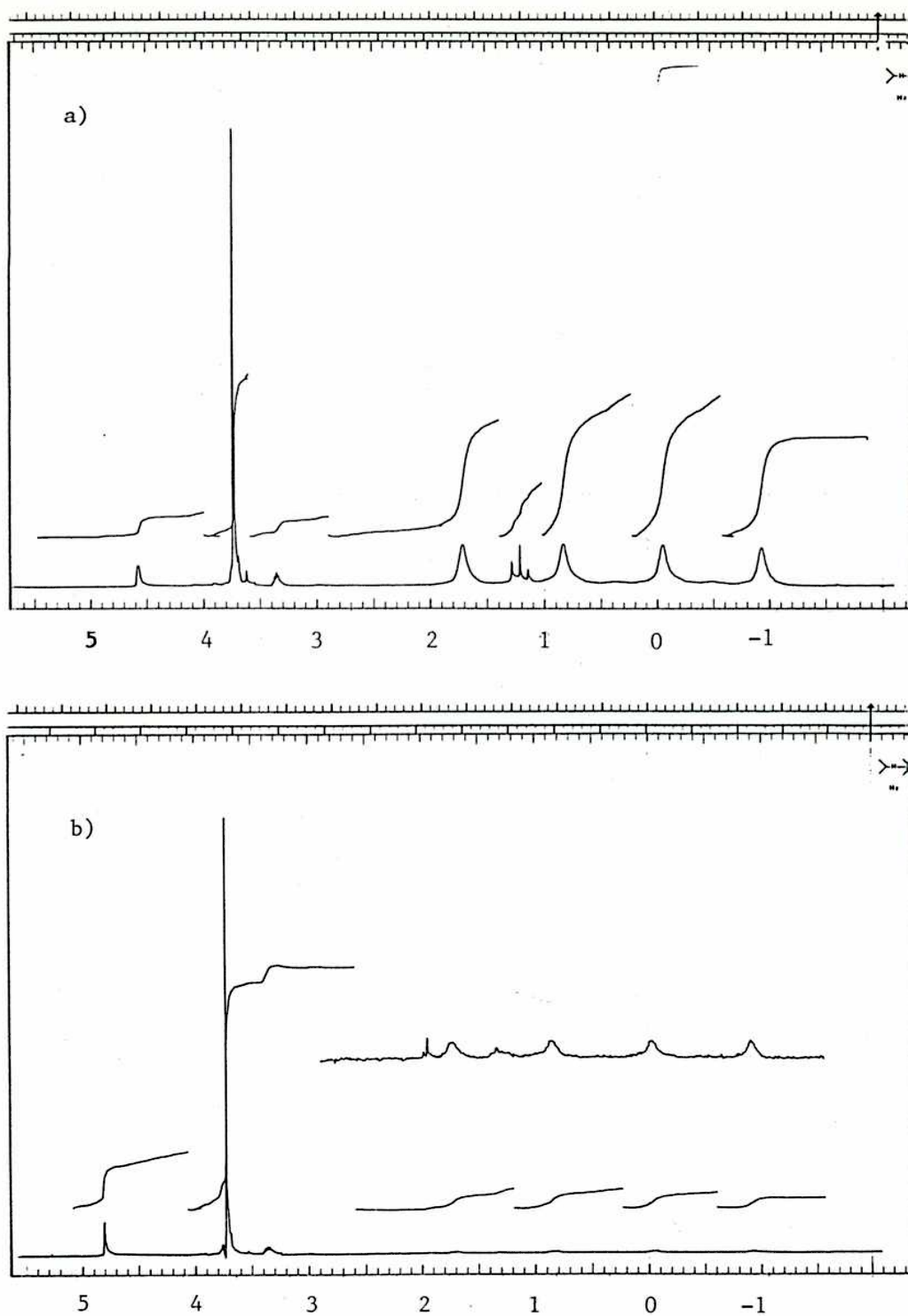
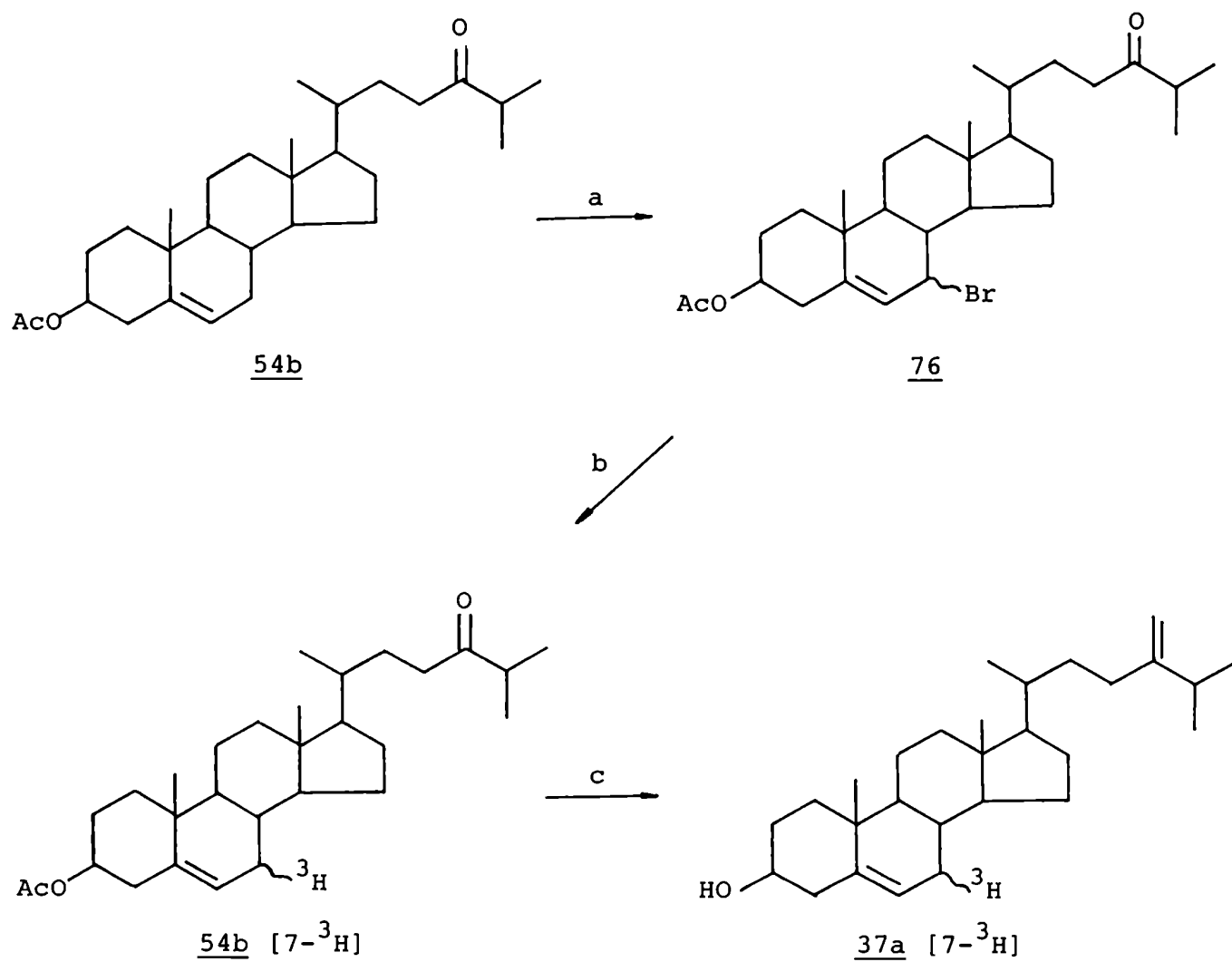


Figura 39. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  con standard interno de dioxano de a)  $\text{NaCNBH}_3$  (33,3 mg) y b)  $\text{NaCNBD}_3$  (8,1 mg).

purificación. La actividad específica del  $\text{NaCNB}^3\text{H}_3$  obtenido fue de 0,22 mCi/mmol. La reducción de 3 $\beta$ -acetoxi-7-bromo-colest-5-en-24-ona (76) con  $\text{CNB}^3\text{H}_3\text{Na}/\text{Cl}_2\text{Zn}$  dio la cetona tritiada 54b- $^3\text{H}$ , obteniéndose luego de completar la secuencia de acuerdo a lo descrito para el análogo  $^{14}\text{C}$ , 24-metilencolesterol [7- $^3\text{H}$ ] de actividad específica 0,22 mCi/mmol. En la figura 40 se esquematiza la secuencia seguida para la síntesis de 24-metilencolesterol [7- $^3\text{H}$ ] a partir de acetato de 24-cetocolesterol (54b).



a) N-Br succ, CCl<sub>4</sub>, Δ; b) ZnCl<sub>2</sub>/NaBH<sub>3</sub>CN, éter c) 1. Zn/CH<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>/TiCl<sub>4</sub>.  
2. NaOH 10%, metanol.

Figura 40. Secuencia de síntesis de 24-metilcolesterol [7-<sup>3</sup>H]  
a partir de acetato de 24-cetocolesterol.

**CAPITULO IV**  
**ESTUDIOS DE BIOSINTESIS DE WITHANOLIDOS**

Antes de realizar las experiencias con 24-metilencolesterol enunciadas en el capítulo 1 se intentó confirmar la existencia de la ruta alternativa encontrada en la biosíntesis de withanólidos en *Acnistus breviflorus* y comparar las actividades específicas del carbono 26 y del carbono 1 (perteneciente al núcleo esteroidal), aislados mediante un mismo camino degradativo de withanólidos marcados biosintetizados a partir de mevalonolactona [2- $^{14}\text{C}$ ]. Si no hubiera ruptura de cadena, ambos carbonos provenientes de carbono 2 de mevalonolactona deberían tener actividades específicas equivalentes, en caso contrario la actividad específica del carbono 26 sería menor que la del carbono proveniente del núcleo esteroidal (C-1). Posteriormente se realizarían las experiencias de incorporación de 24-metilencolesterol [24- $^{14}\text{C}$ ] y las de doble marca- ción con este trazador marcado con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ .

#### DEGRADACION DE WITHANOLIDOS RADIOACTIVOS AISLADOS DE *ACNISTUS BREVIFLORUS*

Para degradar entonces jaborosalactona A (11) de actividad específica  $1,8 \times 10^6$  dpm/mmol (biosintetizada a partir de mevalonolactona A [2- $^{14}\text{C}$ ] administrada a hojas de plantas de *Acnistus breviflorus* según el método descrito por A. Veleiro y G. Burton [64]) se planteó la siguiente secuencia de reacciones.

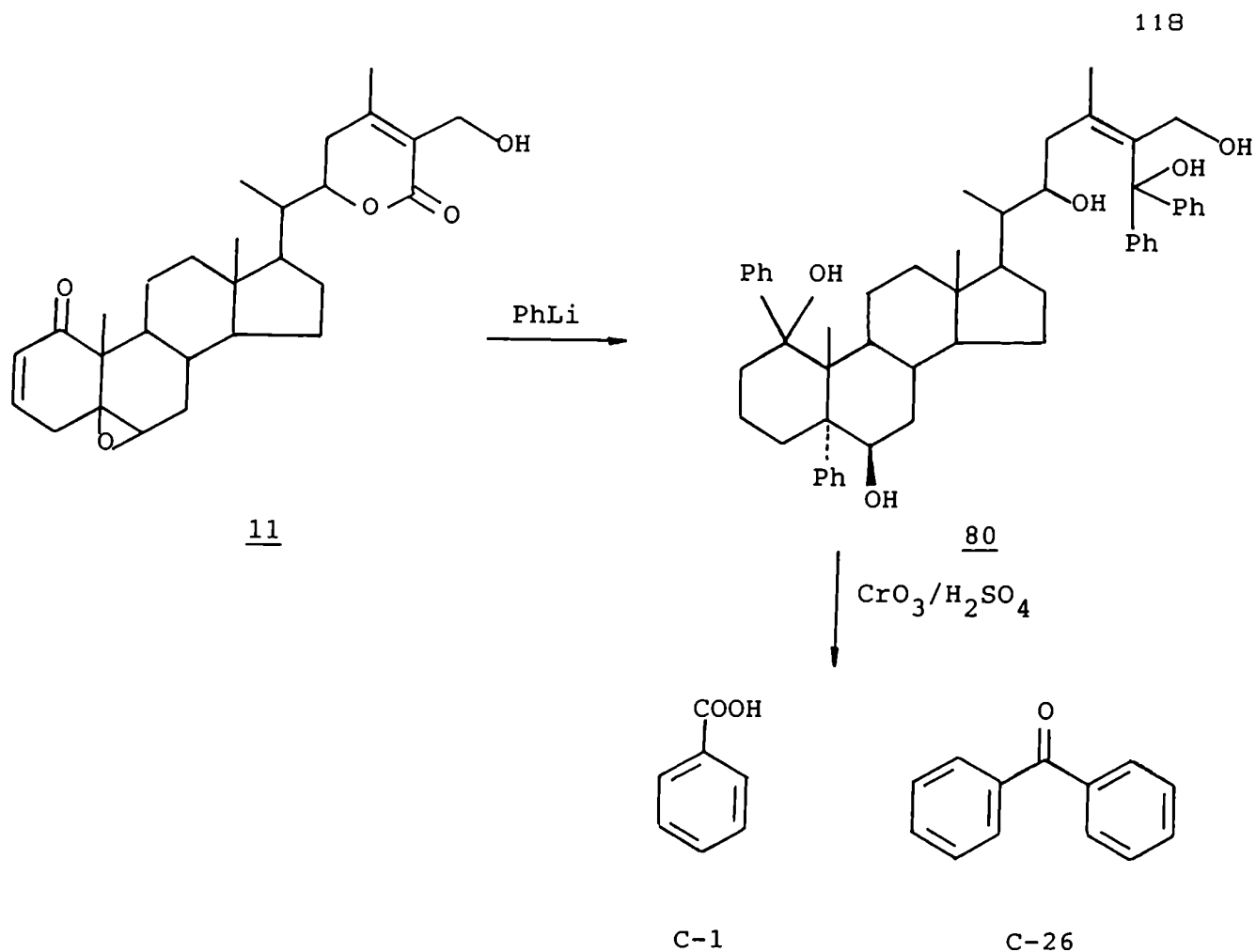
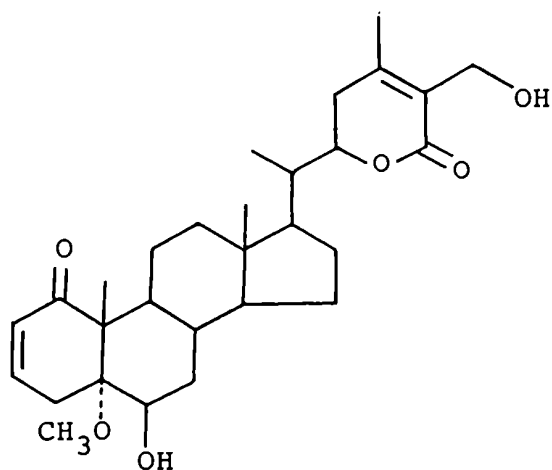
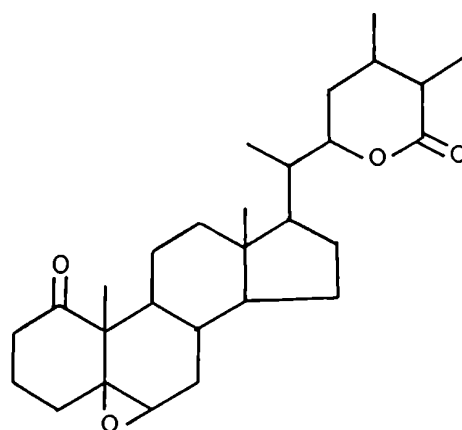


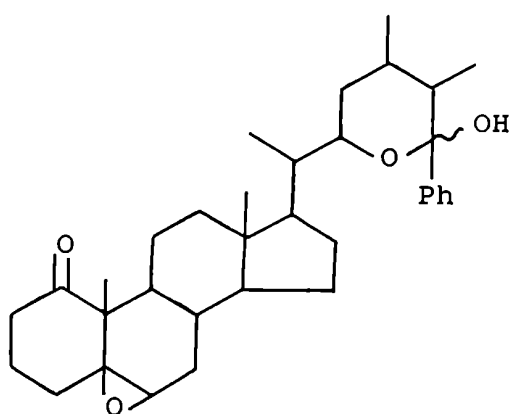
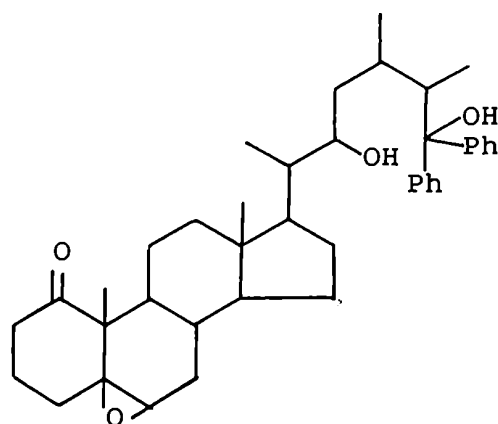
Figura 41. Secuencia planteada para la degradación de 11 [ $^{14}\text{C}$ ].

Por reacción de jaborosalactona A con fenillitio en exceso se obtendría el compuesto 80, el cual por ruptura oxidativa rendiría ácido benzoico y benzofenona (ver figura 41). Sin embargo no se obtuvieron los resultados esperados al ensayar la secuencia con el withanólido frío ya que no se logró la reacción del fenillitio sobre el carbono 1.

La reacción con fenillitio se ensayó primero sobre jaborosalactona A y luego sobre 5 $\alpha$ -metoxi-6 $\beta$ -hidroxijaborosalactona A (81). Esta última se obtuvo por tratamiento de jaborosalactona A

8182

con metanol en presencia de una cantidad catalítica de ácido sulfúrico. En ambos casos por análisis del espectro infrarrojo del producto se comprobó que persistía el carbonilo de carbono 1 sin reaccionar. El compuesto 81 tenía la ventaja de no presentar posiciones reactivas frente al fenillitio más allá de los carbonos 1 y 26 y por ende no formar el compuesto 80 que introducía un grupo voluminoso en el anillo A. Esto último podría desfavorecer el ataque al carbono 1 por parte del reactivo organolitico. En un intento de aumentar la reactividad del carbono 1 se hidrogenó jaborosalactona A (11) sobre paladio-carbón 10% en etanol, para dar 2,3,24,25-tetrahidro-27-desoxijaborosalactona A (82). Con la misma se llevó a cabo la reacción con fenillitio en tetrahydrofurano bajo reflujo. En estas condiciones se obtuvo una mezcla de los compuestos 83 y 84 los cuales fueron caracterizados por RMN  $^1\text{H}$ . Como se puede apreciar de las estructuras de estos productos el carbono 1 se mantuvo inalterado y se formó un lactol el cual por degradación con trióxido de cromo-ácido sulfúrico podría dar ácido

8384

benzoico a partir de carbono 26. Esto se comprobó realizando la oxidación con trióxido de cromo-ácido sulfúrico sobre la mezcla 83-84 y sometiendo al producto de reacción a una destilación por arrastre con vapor. La benzofenona y el ácido benzoico destilados se recogieron sobre una solución alcalina y se separaron por extracción. La benzofenona se derivatizó obteniéndose finalmente la oxima correspondiente. Luego de acidificar la solución acuosa, el ácido benzoico se extrajo exhaustivamente con éter etílico. La presencia de ácido benzoico en el extracto etéreo se determinó por cromatografía en capa delgada comparando con una muestra auténtica del mismo. Este ácido se purificó por sublimación obteniéndose en forma de agujas cristalinas de punto de fusión 121-122 °C.

En base a los resultados anteriores se descartó la posibilidad de aislar al carbono 1 y se optó por realizar la reacción sobre jaborosalactona A radioactiva para aislar al carbono 26. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 17 y permiten confirmar que existiría una ruta alternativa y mayoritaria en la biosíntesis de



TABLA 17. Actividad específica (AE) de jaborosalactona A y sus productos de degradación.

Compuesto	A.E. (dpm/mmol)	A.E. relativa (%)
jaborosalactona A ( <u>11</u> )	$9,70 \times 10^{25}$	100
2,3,24,25-tetrahidro-27-desoxijaborosalactona A ( <u>82</u> )	$9,70 \times 10^{25}$	100
benzofenona <sup>a</sup> (C-26)	$1,05 \times 10^{14}$	1,1
ácido benzoico <sup>b</sup> (C-26)	$0.83 \times 10^{14}$	0,9

a: purificada como oxima (recristalizada hasta A.E. constante).  
b: sublimado.

withanólidos en *Achistus breviflorus* en la cual la cadena lateral de un esteroide precursor se rompería parcialmente con pérdida del carbono 26. Como conclusión a este resultado confirmatorio cabe recordar que la ruptura de la cadena lateral con posterior reconstrucción del anillo lactónico no es un fenómeno inusual en la biosíntesis de lactonas esteroideas como en el caso de los cardenólidos [142a,b] y bufadienólidos de plantas [143] en los cuales están involucrados procesos similares. En estos procesos biosintéticos la cadena lateral del colesterol se rompe dando lugar a un intermediario pregnano el cual condensa luego a través del carbono 20 con acetato u oxalacetato para formar los anillos butenólido o bufadienólido respectivamente. En la figura 42 se esquematiza la formación del anillo butenólido de cardenólidos a partir de mevalonolactona [ $3-^{14}\text{C}$ ].

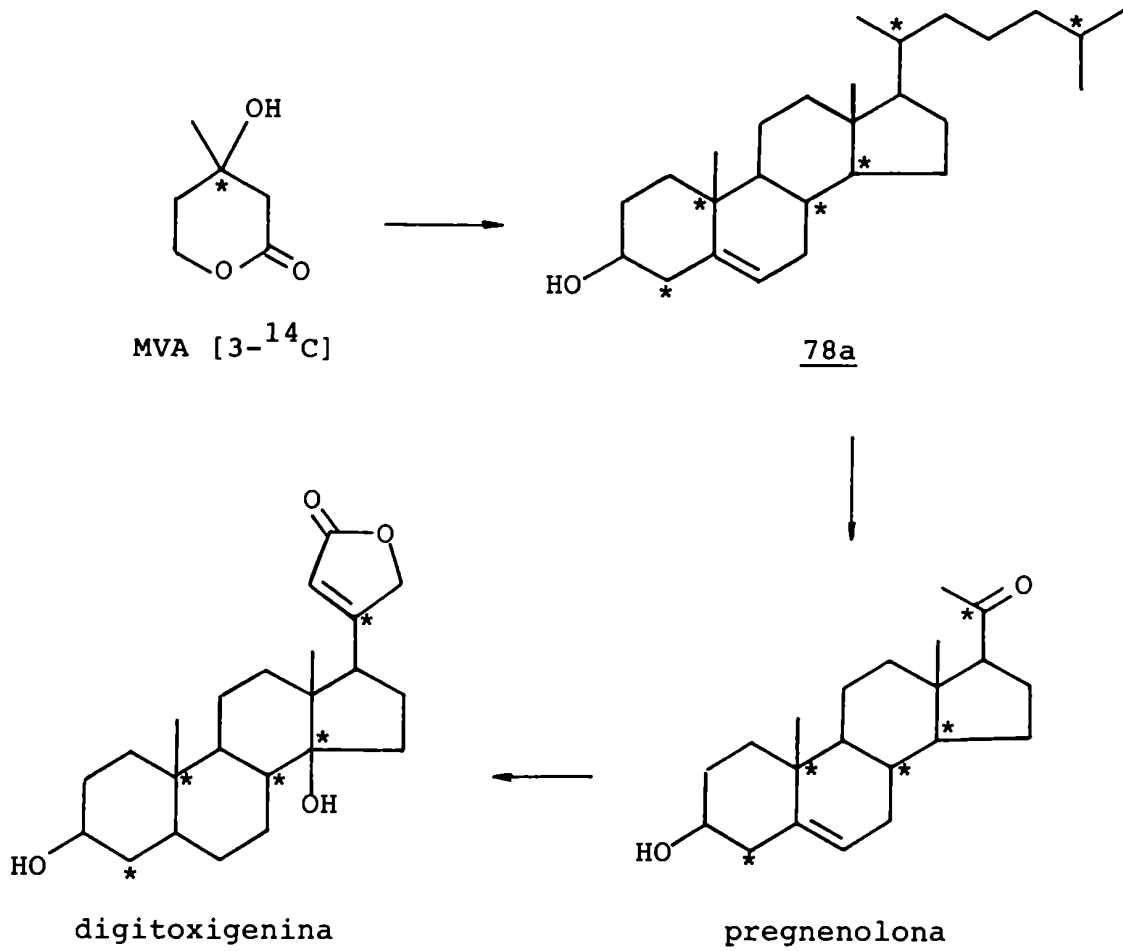


Figura 42. Biosíntesis de digitoxigenina a partir de mevalono-  
lactona [3-<sup>14</sup>C] [142a,b].

## EXPERIENCIAS DE INOCULACION DE 24-METILENCOLESTEROL [24-<sup>14</sup>C]

Para comprobar la intervención de 24-metilencolesterol (37a) como precursor de withanólidos en *Acnistus breviflorus* se administró 37a [24-<sup>14</sup>C] a hojas de plantas de esta especie [64]. La inoculación se efectuó sobre especímenes de aproximadamente 8 años de edad provenientes de semillas originarias de la provincia de Tucumán, sembradas dentro de los seis meses de la recolección. Estas plantas fueron mantenidas en condiciones naturales en el vivero de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

Las cantidades de 24-metilencolesterol [24-<sup>14</sup>C] inoculadas y los tiempos de administración se indican en la tabla 18. Transcurrido el tiempo de administración correspondiente se lavaron con agua las hojas inoculadas y el agua de lavado se juntó con el agua restante en el vaso de inoculación. De esta manera se pudo medir la cantidad de 24-metilencolesterol no absorbido. Las hojas trituradas se extrajeron con éter etílico [58], al extracto obtenido se le agregó 24-metilencolesterol frío y se purificó por columna de silicagel eluyendo primero una fracción I que contenía 24-metilencolesterol y otros esteroides y luego una fracción II que contenía a los withanólidos mayoritarios (jaborosalactona A (11), withaferina A (8) y jaborosalactona D (27c)). Los withanólidos presentes en la fracción II fueron separados por CLAR en fase reversa eluyendo con una mezcla de metanol:agua (70:30) [71] (figura 43). Las fracciones correspondientes a los withanólidos mencionados fueron colectadas y su pureza química se confirmó por CLAR. Los valores de

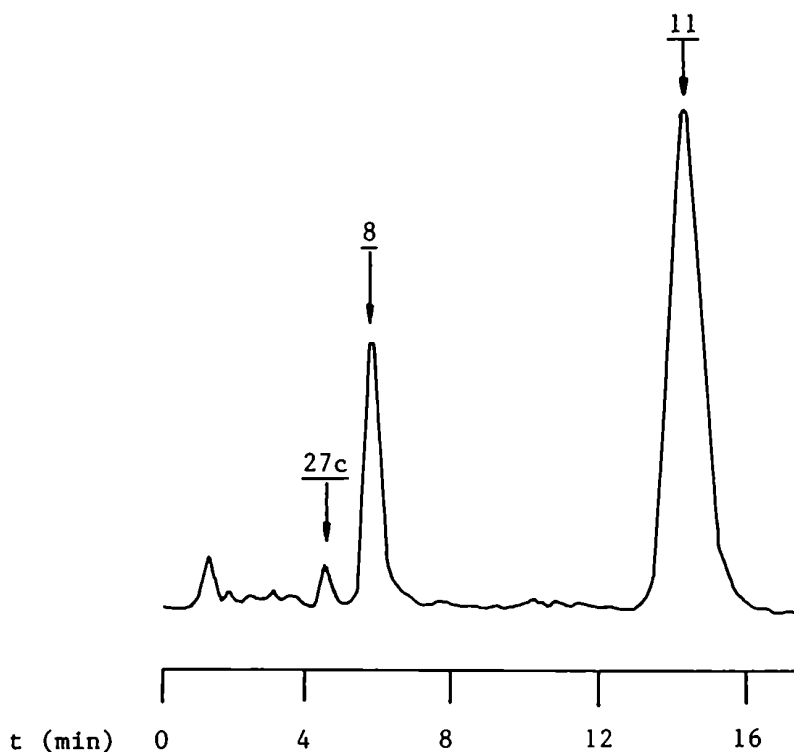


Figura 43. Separación por CLAR en fase reversa de los withanólidos presentes en la fracción II. Columna: Partisil-10 ODS-2 (250x4,6 mm), eluyendo con metanol:agua (70:30), flujo: 1 ml/min, detector UV a 220nm. Tiempos de retención: 27c 5,28; 8 6,57; 11 15,04.

incorporación absoluta obtenidos se resumen en la tabla 18. Estos resultados demostraron la intervención de 24-metilcolesterol como precursor de withanólidos en *Acnistus breviflorus*. Por otra parte de acuerdo a los valores de incorporación obtenidos a distintos tiempos desde la inoculación se pudo determinar que los mejores resultados se obtenían en las experiencias de 48 horas.

TABLA 18. Incorporación absoluta de 24-metilcolesterol [24-<sup>14</sup>C]37a a withanólidos en hojas de *A. breviflorus*.

	<u>37a</u> absorb.* (dpm)	<u>11</u>				<u>8</u>				<u>27c</u>		
		24	48	72	96hs	24	48	72	96hs	48	72	96hs
1	308.857	0,44	2,06	1,89	--	0,31	1,04	--	--	--	--	--
2	114.354	--	1,01	0,93	0,14	--	0,97	0,87	0,08	0,97	0,87	0,09
3	218.088	0,50	--	--	--	0,11	--	--	--	--	--	--
4	191.404	--	0,94	--	--	--	0,25	--	--	--	--	--

Actividad específica de 24-metilcolesterol [24-<sup>14</sup>C]:  $6 \times 10^6$  dpm/mg. Porcentajes de incorporación absoluta a 24, 48, 72 y 96 horas respecto de 37a absorbido.

\*  $\mu$ g de 24-metilcolesterol absorbido por hoja, 1: 52; 2: 20; 3: 36; 4: 32.

## INCORPORACION DE 24-METILENCOLESTEROL [24-<sup>14</sup>C, 7-<sup>3</sup>H]

La última parte del trabajo planeado consistía en administrar una mezcla de relación <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C conocida de 24-metilencolesterol [7-<sup>3</sup>H] y 24-metilencolesterol [24-<sup>14</sup>C] y al tiempo de incorporación máxima aislar los withanólidos verificando si en los mismos se había modificado o no la relación <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C.

Se utilizó 24-metilencolesterol [24-<sup>14</sup>C] de actividad específica  $6 \times 10^6$  dpm/mg y 24-metilencolesterol [7-<sup>3</sup>H] de actividad específica  $1,2 \times 10^6$  dpm/mg, sintetizados de acuerdo a lo descrito en el capítulo 3. La actividad específica de la mezcla de 24-metilencolesterol [24-<sup>14</sup>C, 7-<sup>3</sup>H] empleada en las experiencias fue de  $1,33 \times 10^6$  y  $0,93 \times 10^6$  dpm/mg de <sup>14</sup>C y <sup>3</sup>H respectivamente (<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C = 0,7). Dado que en estas experiencias se suministró una masa considerablemente mayor del precursor por hoja era dable esperar una menor incorporación absoluta en caso que el sistema se encontrara trabajando a su máxima capacidad. Los withanólidos fueron aislados de acuerdo a lo anteriormente descrito y se sometieron a una segunda purificación por CLAR en fase reversa obteniéndose un solo pico correspondiente al tiempo de retención de los mismos. A partir de la fracción menos polar resultante del fraccionamiento del extracto crudo en columna de silicagel, se aisló el 24-metilencolesterol absorbido por las hojas y no procesado. Esto se llevó a cabo por CLAR en fase reversa eluyendo con acetonitrilo:acetato de etilo:metanol (2:2:1). En la figura 44 se representa el cromatograma correspondiente, donde el pico de 24-metilencolesterol aislado, coeluyó con una muestra

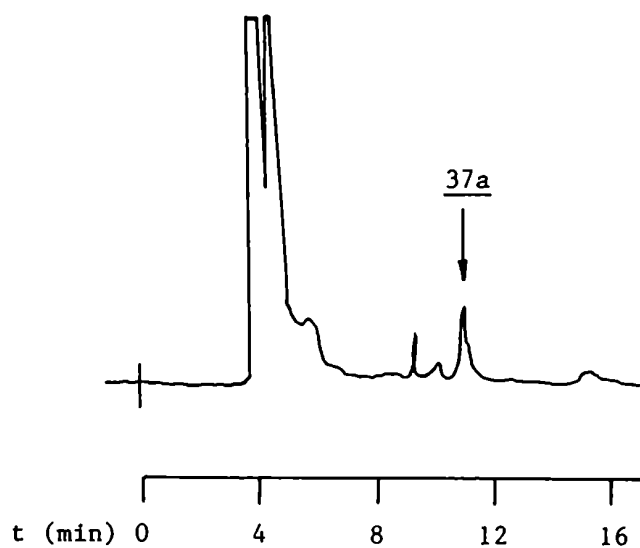


Figura 44. Aislamiento por CLAR en fase reversa del 24-metilen-  
colesterol (37a) absorbido por las hojas y no biotrans-  
formado. Columna: Altex Ultrasphere ODS 5  $\mu\text{m}$  (250x10 mm  
DI), eluyente: acetonitrilo:acetato de etilo:hexano  
(2:2:1), flujo: 3ml/min,  $t_r=10,8$ .

auténtica de este estero1. La relación  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  encontrada para el mismo fue de 0,8. Los resultados obtenidos para los withanólidos aislados se muestran en la tabla 19.

En base a los valores de relación  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  encontrados se puede establecer que la cadena lateral de 24-metilencolesterol hasta C-24 no se pierde en su biotransformación a withanólidos. Por otra parte si se consideran los buenos valores de incorporación obtenidos para este precursor en *Achistus breviflorus* (tabla 18) y los antecedentes bibliográficos discutidos es de esperar que el mismo intervenga en la ruta principal a withanólidos a partir de mevalonolactona. En tal caso este último resultado junto con la confirmación de la pérdida del C-26 de los withanólidos biosintetiza-

dos a partir de mevalonolactona [2- $^{14}\text{C}$ ] implicarían que la ruptura de la cadena lateral ocurre entre el C-24 y el C-25, o bien que el 24-metilcolesterol puede sufrir la pérdida del C-26, por ejemplo, a través de un mecanismo oxidativo seguido de descarboxilación. En la figura 45 se representan estos dos posibles caminos biosintéticos con ruptura de la cadena lateral que conducirían a withánolidos a partir de mevalonolactona [2- $^{14}\text{C}$ ].

TABLA 19. Experiencias de incorporación de 24-metilcolesterol [24- $^{14}\text{C}$ , 7- $^3\text{H}$ ].

Exp.	Cant. hojas	R $^3\text{H}/^{14}\text{C}$	
		<u>11</u>	<u>8</u>
1 <sup>a</sup>	1	0,7	0,7
2 <sup>b</sup>	7	0,6	0,7
3	12	0,7	-
4	43	0,7	-

<sup>a</sup> Incorp. abs. 0,2%; masa absorbida por hoja 103  $\mu\text{g}$ .

<sup>b</sup> Incorp. abs. 0,25%; masa absorbida por hoja 101  $\mu\text{g}$ .



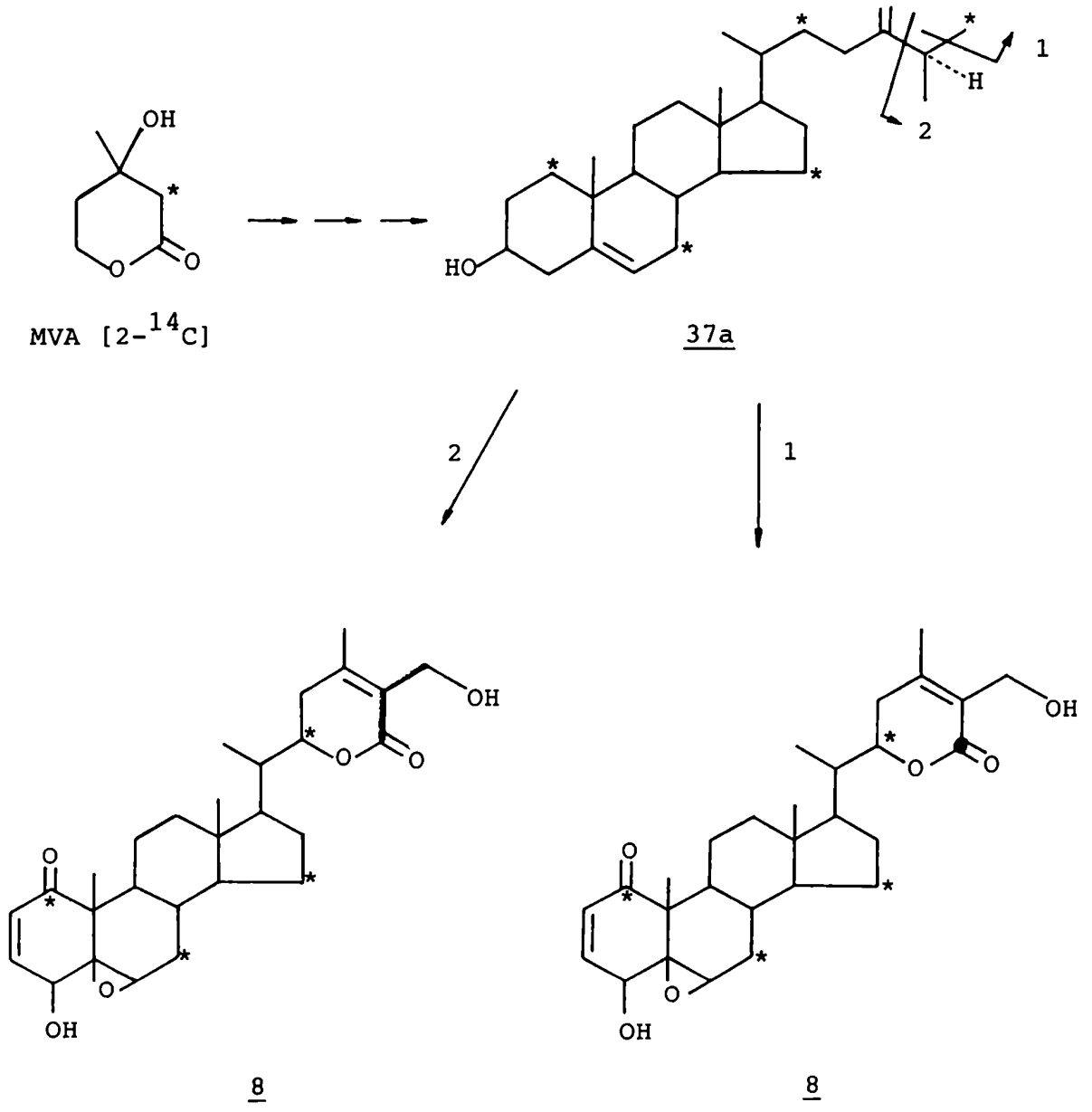


Figura 45. Posibles caminos biosintéticos que conducirían a withanólidos a partir de mevalonolactona [2-<sup>14</sup>C].

CAPITULO V  
PARTE EXPERIMENTAL

## GENERALIDADES

Los puntos de fusión (PF) fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no han sido corregidos.

Los espectros de absorción en el infrarrojo se realizaron con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 710-B, sobre una dispersión de la muestra en nujol.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN  $^1\text{H}$ ) y de  $^{13}\text{C}$  (RMN  $^{13}\text{C}$ ) se realizaron a 100 y 25,2 MHz respectivamente en un espectrómetro Varian XL-100-15, operando por pulsos y transformada de Fourier, con una computadora 620-L-100 y una unidad de discos magnéticos Sykes-7000. El solvente empleado fue cloroformo deuterado ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ) salvo en los casos en que se indique lo contrario. En todas las determinaciones se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto del TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Las señales de RMN  $^1\text{H}$  se indican en cada caso como: s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuarteto), m (multiplete) y ba (banda ancha).

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se obtuvieron en tubos de 5 mm aplicando pulsos de  $90^\circ$  y un tiempo de repetición de 4,7 segundos sobre un ancho espectral de 1500 Hz. Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  se midieron en tubos de 5 mm utilizando pulsos de  $45^\circ$  con un tiempo de

repetición de 0,71 s sobre un ancho espectral de 5700 Hz. Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplados de  $^1\text{H}$  se obtuvieron por irradiación de los protones a una frecuencia central correspondiente a 4 ppm, modulada por un barrido de onda cuadrada. Las multiplicidades de las señales fueron determinadas por la técnica de ecos de spin con desacople alternado (APT: test de protones vecinales) [73] utilizando una secuencia de pulsos  $90(\pm x) - \tau - 180(\pm y) - \tau - \text{FID}$  ( $\tau = 7$  msec) y cortando el desacoplador en el periodo entre los pulsos.

Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  con desacople selectivo se obtuvieron por irradiación de la señal de hidrógeno deseada con una frecuencia única de baja potencia (0,5 watt).

El espectro COSY 45  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  fue realizado en un espectrómetro Bruker AM-500 (Center for Biological NMR, Texas A&M University, E.E.U.U.).

Los espectros de masas (EM) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masas Varian-Mat-CH-7A, comandado por una computadora Varian-Mat-Data-System 160, por inserción directa de la muestra.

Los espectros de masas de jaborosalactona P fueron realizados en un espectrómetro de masas VG Analytical ZAB SEQ (VG Analytical, Manchester, Inglaterra). El espectro de impacto electrónico fue realizado a 70 eV y el FAB fue determinado en matriz de tioglicerol.

El espectro de difracción de rayos X fue realizado en un difractómetro Nicolet R3m/V (Department of Chemistry, Texas A&M University) con monocromador de grafito orientado  $\text{MoK}\alpha$   $\lambda = 0,71073$ ;

los datos fueron medidos para  $4,0^{\circ} \leq 20 \leq 50,0^{\circ}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las cromatografías líquidas de alta resolución (CLAR) se realizaron en un cromatografo líquido Hewlett-Packard 1084 con detector UV operando a 220 nm e inyector automático de volumen variable o en un cromatógrafo líquido Micromeritics equipado con un inyector manual (modelo 730) y detector de índice de refracción. Las condiciones utilizadas se indican para cada caso en particular.

La columna usada para separaciones analíticas y preparativos (hasta 150  $\mu\text{g}$ ) fue Whatman Partisil-10 ODS-2 (250x4,6 mm DI) y en separaciones preparativas a mayor escala se usó una columna Alltech R-Sil 18 HL 10  $\mu\text{m}$  (500x10 mm DI) y/o una Altex Ultrasphere ODS 5  $\mu\text{m}$  (250x10 mm DI).

Las cromatografías gas-líquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890A acoplado a un integrador Hewlett-Packard 3392A.

Las cromatografías en capa delgada (ccd) analíticas se realizaron sobre gel de sílice en cromatoplasas de Aldrich Chem. Co.. La detección se llevó a cabo por inmersión en una solución de ácido sulfúrico 10% en etanol y posterior calentamiento a  $100^{\circ}\text{C}$  o por exposición a vapor de yodo. También se realizaron cromatografías analíticas en fase reversa HPTLC-Rp 18 (Aldrich Chem. Co.).

Los sistemas de desarrollo utilizados en ccd analítica en silicagel fueron: 1- hexano:AcOEt (60:40); 2- hexano:AcOEt (55:45);

3- hexano:AcOEt (50:50); 4- hexano:AcOEt (75:25); 5- dicloro- metano:metanol (99:1); 6- diclorometano:hexano (2:1); 7- diclo- rometano:hexano (1:1); 8- diclorometano:metanol (97:3); 9- diclo- rometano:metanol (95:5); 10- AcOEt; 11- AcOEt:hexano:isopropanol (30:3:2); 12- hexano:ácido acético (96:4). Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes.

Las cromatografías en columnas (CC) se realizaron utilizando como adsorbente silicagel grado 923, malla 100-200 (D) Davidson Chemical y silicagel H (Merck, 10-40  $\mu\text{m}$ ) (H) eluidas bajo presión de nitrógeno. Las cromatografías "flash" (F) se realizaron según la referencia [144] utilizando gel de sílice (Kieselgel 60, malla 230-400, Merck) y bajo presión de nitrógeno.

Las mediciones de radioactividad se realizaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3003. Las muestras se disolvieron en una mezcla de 1 ml de agua y 14 ml de una solución centelladora de dioxano que contenía 100 g de naftaleno, 7 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 300 mg de 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno por cada 1000 ml.

Los solventes fueron purificados por destilación y evaporados a presión reducida a menos de 45°C en rotavapor-R (Buchi). Los solventes para CLAR fueron bidestilados y filtrados a través de membranas de teflón de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Los solventes anhidros se prepararon según las siguientes técnicas:

-diclorometano: se reflujo sobre pentóxido de fósforo, destiló y guardó sobre tamices moleculares 4Å.

-benceno: se reflujo sobre cinta de sodio, destiló y guardó sobre trozos de sodio.

-éter etílico: se pasó a través de una columna de alúmina neutra y se reflujo sobre sodio-benzofenona hasta coloración azul. Se destiló antes de usar. Para la reacción de síntesis de 3 $\beta$ -acetoxicolest-5-en-24-ona se recogió el destilado sobre alúmina neutra.

-tetrahidrofurano: se reflujo sobre sodio-benzofenona hasta coloración azul y destiló antes de usar.

Las acetilaciones se realizaron por tratamiento de 1 mmol de esteroide con anhídrido acético (7 ml) y piridina (7 ml) durante 15 horas a temperatura ambiente.

El agua tritiada y el bromoacetato de etilo [1- $^3$ C] fueron provistos por la Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina.

La (R,S) mevalonolactona [2- $^3$ C] 48,6 mCi/mmol fue adquirida a New England Nuclear Corp.

### Reactivos generales

El magnesio utilizado en las síntesis del reactivo de Grignard se desengrasó con éter etílico y se secó en estufa con vacío a 120°C durante 24 horas.

El zinc utilizado se activó por tratamiento con ácido clorhídrico 1N y posterior lavado con agua, etanol absoluto y éter etílico; se secó en estufa a 1 Torr y 110°C durante 12 horas.

El cloruro de zinc anhidro se obtuvo por fusión en cápsula y solidificación en atmósfera anhidra.

El cloruro de cadmio anhidro se obtuvo por secado en estufa a 110°C durante 24 horas.

El reactivo de Jones se preparó disolviendo 27 g de trióxido de

cromo en una mezcla de 23 ml de ácido sulfúrico (c) y 100 ml de agua.

**Solución etérea de bromuro de isopropilmagnesio**

Se agregó éter anhidro (3 ml) y bromuro de isopropilo (275  $\mu$ l) sobre magnesio (70 mg) bajo atmósfera de nitrógeno anhidro (excluyendo totalmente el oxígeno) con agitación. Se dejó reaccionar durante 35 minutos a temperatura ambiente hasta total desaparición del magnesio, obteniéndose una solución transparente e incolora.



## SINTESIS DEL ACIDO 3 $\beta$ -ACETOXICOL-5-EN-24-OICO (55b)

### Bromuro de carbetoximetiltrifenilfosfonio

Se secó trifenilfosfina (19,65 g) disolviendo en benceno anhidro y llevando a sequedad en rotavapor. La trifenilfosfina anhidra se disolvió en benceno (37,5 ml) y se agregó una solución de bromoacetato de etilo (8,3 ml) recién destilado en benceno (37,5 ml). Se dejó agitando durante 16 horas. El sólido resultante se filtró y lavó con tolueno y pentano. Se obtuvo bromuro de carbetoximetiltrifenilfosfonio (30 g, rend. 93%) de PF:157-158 °C (lit. [106] 157-158°C).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  1,08 (3H, t, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 4,06 (2H, c, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 5,52 (2H, d, J=14Hz,  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ ); 7,58-8,03 (15H, m, H aromáticos).

### Carbetoximetiltrifenilfosforano (62)

Se disolvió bromuro de carbetoximetiltrifenilfosfonio (1 g) en agua (23,4 ml) y se enfrió a 0 °C. Sobre esta solución se agregó con agitación gota a gota NaOH 0,1N hasta viraje de fenolftaleína. El precipitado blanco obtenido se filtró y se lavó con agua fría. Se secó en desecador y se obtuvo carbetoximetiltrifenilfosforano (62) (0,75 g, rend. 94%) de PF:124-125 °C (lit. [106] 124-125°C).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  1,02 (3H, t, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 3,4 (1H, ba,  $-\text{HC}=\text{PPh}_3$ ); 3,97 (2H, c, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 7,30-7,90 (15H, m, H aromáticos).

**3-oxocola-4,22-dien-24-oato de etilo (64a)**

Se disolvió 20 $\beta$ -carboxaldehído-3-oxopregn-4-eno (61) (600 mg) en acetonitrilo (37 ml) y se agregó una solución de carbetoximetilentrifenilfosforano (62) (750 mg) en acetonitrilo (3 ml). Se dejó agitando durante tres días a T ambiente. Por evaporación del solvente se obtuvo un producto crudo que se purificó por columna de silicagel (F) eluyendo con hexano-acetato de etilo (60:40). Se obtuvo 3-oxocola-4,22-dien-24-oato de etilo (64a) (682 mg, rend. 95%), homogéneo por ccd (sistema 1).

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1720 (C=O, ester); 1670 (C=O,  $\Delta^4$ -3-ceto); 1640 (C=C); 1200 (C-O), 990 (olefina trans).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,76 (3H, s, Me-18); 1,10 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 1,20 (3H, s, Me-19); 1,3 (3H, t, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 4,19 (2H, c, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 5,74 (1H, s, H-4); 5,75 (1H, d, J=16Hz, H-23); 6,84 (1H, dd, J=16 y J=9Hz, H-22).

EM, m/z (%): 398 [ $\text{M}^+$ ] (97,6), 356 (65,8), 271 (75,7), 229 (68,8), 149 (68,2), 147 (83,9), 145 (74,8), 133 (77,5), 128 (100), 124 (89,3), 123 (76,5), 119 (75,4), 109 (68,3), 107 (80,5), 93 (68,0).

**Cola-3,5,22-trien-24-oato de etilo (66) y****3,3-dimetoxicola-5,22-dien-24-oato de etilo (67).**

Se disolvió 3-oxocola-4,22-dien-24-oato de etilo (64a) (38,6 mg) en metanol caliente (3,5 ml) y se agregó con agitación  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (15 mg) y  $\text{NaBH}_4$  (38,6 mg). Se dejó reaccionar durante 5 minutos, se agregó ácido clorhídrico 10% hasta leve acidez y se dejó a este pH durante 10 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. La

solución orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó el solvente. El producto obtenido resultó una mezcla de dos compuestos principales según el análisis por ccd en silicagel (sistema 2). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla indicó la presencia de 66 y 67 en relación 2:1.

RMN  $^1\text{H}$ : 66  $\delta$  0,72 (3H, s, Me-18); 0,96 (3H, s, Me-19); 1,08 (3H, d J=7Hz, Me-21); 1,3 (3H, t J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 4,19 (2H, c J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 5,36 (1H, ba, H-6); 5,54 (1H, da J=10Hz, H-3); 5,73 (1H, d J=16Hz, H-23); 5,91 (1H, da J=10Hz, H-4); 6,84 (1H, dd J=16 y 9Hz, H-22).

RMN  $^1\text{H}$ : 67  $\delta$  0,75 (3H, s, Me-18); 1,04 (3H, s, Me-19); 1,10 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 1,3 (3H, t, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 3,33 y 3,35 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ); 4,19 (2H, c, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 5,36 (1H, ba, H-6); 5,73 (1H, d J=16Hz, H-23); 6,84 (1H, dd, J=16 y 9Hz, H-22).

### 3-acetoxicola-3,5,22-trien-24-oato de etilo (68)

Se disolvió 3-oxocola-4,22-dien-24-oato de etilo (64a) (674 mg) en  $\text{Ac}_2\text{O}$  (34,4 ml) y se agregó  $\text{AcCl}$  (41,3 ml). La solución se calentó bajo reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 16 horas, se evaporó el solvente y se completó el secado a 0,5 Torr. Se obtuvo 3-acetoxicola-3,5,22-trien-24-oato de etilo (68) (670 mg, rend. 90%), homogéneo por ccd (sistema 3).

RMN  $^1\text{H}$ : 0,76 (3H, s, Me-18); 1,10 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 1,28 (3H, s, Me-19); 1,3 (3H, t, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 2,13 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2-$ ); 4,18 (2H, c, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 5,39 (1H, da, H-6); 5,68 (1H, s, H-4); 5,76 (1H, d, J=16Hz, H-23); 6,84 (1H, dd, J=16 y J=9Hz, H-22).

**Acido 3 $\beta$ -hidroxicola-5,22-dien-24-oico (69a)**

Se disolvió 3-acetoxicola-3,5,22-trien-24-oato de etilo (68) (670 mg) en etanol 95% (350 ml) y se enfrió a 5°C. Se disolvió NaBH<sub>4</sub> (1,27 g) en etanol:agua (70:30) (32 ml) y sobre esta solución se agregó la solución de 68 enfriada. Se dejó 2,5 horas a 5°C, se calentó a ebullición y se agregó una solución acuosa de NaOH 5% (32 ml). La mezcla se calentó bajo reflujo durante 15 horas y se evaporó el etanol. La fase acuosa resultante se lavó con éter etílico, se acidificó hasta pH 2 y se extrajo exhaustivamente con éter. El extracto etéreo se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Se obtuvo ácido 3 $\beta$ -hidroxicola-5,22-dien-24-oico (69a) (552 mg, rend.98%), homogéneo por ccd (sistema 4).

RMN <sup>1</sup>H:  $\delta$  0,73 (3H, s, Me-18); 1,02 (3H, s, Me-19); 1,11 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 3,6 (1H, sa, H-3); 5,36 (1H, da, H-6); 5,75 (1H, d, J=16Hz, H-23); 6,96 (1H, dd, J=16 y J=9Hz).

**Acido 3 $\beta$ -acetoxicola-5,22-dien-24-oico (69b)**

Se disolvió el ácido 3 $\beta$ -hidroxicola-5,22-dien-24-oico (69a) (552 mg) en piridina anhidra (14 ml) y se agregó anhídrido acético (14 ml). Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 16 horas, se agregó agua y ácido clorhídrico hasta pH 3, la mezcla se agitó 1 hora y se extrajo con diclorometano. El extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Se obtuvo el ácido 3 $\beta$ -acetoxicola-5,22-dien-24-oico (69b) (596 mg, rend. 97%), homogéneo por ccd (sistema 1).

RMN <sup>1</sup>H:  $\delta$  0,73 (3H, s, Me-18); 1,03 (3H, s, Me-19); 1,11 (3H, d,

## SINTESIS DE 3 $\beta$ -ACETOXICOLEST-5-EN-24-ONA (54b)

### Cloruro de 3 $\beta$ -acetoxicola-5,22-dien-24-oilo (71)

Se suspendió el ácido 3 $\beta$ -acetoxicola-5,22-dien-24-oico (69b) (100 mg) en benceno anhidro (2 ml) y se agregó cloruro de oxalilo (2 ml). Se dejó 1 hora a temperatura ambiente y en reposo. Se evaporó el solvente, se agregó benceno (3 ml) y se volvió a evaporar hasta sequedad. Se completó el secado a 0,5 Torr. Se obtuvo 71 (104 mg, rend. 100%).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,74 (3H, s, Me-18); 1,03 (3H, s, Me-19); 1,15 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 2,04 (3H, s, -OCOCH<sub>3</sub>), 4,6 (1H, H-3), 5,38 (1H, da, H-6); 6,01 (1H, d, J=16Hz, H-23), 7,11 (1H, dd, J=16 y J=9Hz, H-22).

### Cloruro de 3 $\beta$ -acetoxicol-5-en-24-oilo (57)

Se empleó el procedimiento descrito para la preparación de 71. Se partió de 55b (100 mg), benceno anhidro (2 ml) y cloruro de oxalilo (2 ml). El tiempo necesario para completar la reacción fue de 5 horas (104 mg, rend. 100%).

IR (cm<sup>-1</sup>): 1795 (C=O, cloruro de ácido), 1735 (C=O, éster).

RMN  $^1\text{H}$  en C<sub>7</sub>D<sub>8</sub>:  $\delta$  0,55 (3H, s, Me-18); 0,71 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 0,92 (3H, s, Me-19), 1,75 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-); 4,58 (1H, ba, H-3); 5,34 (1H, da, H-6).

**Reacción del cloruro de 3 $\beta$ -acetoxicola-5,22-dien-24-oilo (71)  
con ioduro de isopropilmanganeso**

Preparación de ioduro manganeso.

Se agregó éter etílico anhidro (10 ml) sobre iodo (2,54 g) y manganeso en polvo (550 mg). Se dejó reaccionar durante 15 horas con agitación a temperatura ambiente y en atmósfera anhidra. Después de este tiempo se observó desaparición del color metálico del manganeso y la formación de un sólido de color rosado. Se evaporó el éter y se guardó en atmósfera de nitrógeno en oscuridad.

Preparación de ioduro de isopropilmanganeso.

Se suspendió ioduro de manganeso (64,9 mg) en éter etílico anhidro (2 ml) bajo atmósfera de nitrógeno y se agregó 1 equivalente de solución de bromuro de isopropilmagnesio (página 135). Se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.

Reacción con 71

Se agregó una solución de 71 (30 mg) en diclorometano anhidro (2 ml) sobre la suspensión de ioduro de isopropilmanganeso manteniendo la temperatura en  $-30^{\circ}\text{C}$ . Después de 15 minutos, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se mantuvo a esa temperatura durante 3 horas con agitación. Se agregó ácido clorhídrico 1N (5 ml) y se extrajo con diclorometano. El extracto se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. El análisis por ccd (sistema 1) mostró la presencia

mayoritaria del ácido 69b y en menor proporción un producto de mayor movilidad que correspondió a 3 $\beta$ -acetoxicolesta-5,22-dien-24-ona 70. La mezcla se separó por cromatografía en columna de silicagel (F) eluyendo con hexano:acetato de etilo (60:40). Se obtuvo 70 (5 mg) puro, homogéneo por ccd (sistema 1).

IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 1735 (C=O, ester), 1695 (C=O, cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada), 1625 (C=C), 990 (olefina trans).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,72 (3H, s, Me-18); 1,025 (3H, s, Me-19); 1,09 (3H, d,  $J=7\text{Hz}$ , Me-21); 1,26 (6H, d,  $J=7\text{Hz}$ ,  $-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2,04 (3H, s,  $-\text{OCOCH}_3$ ); 2,8 (1H, m,  $J=7\text{Hz}$ , H-25); 4,6 (1H, sa, H-3); 5,38 (1H, da, H-6), 6,06 (1H, d,  $J=16\text{Hz}$ , H-23), 6,73 (1H, dd,  $J=16$  y  $9\text{ Hz}$ , H-22).

#### Hidrogenación de una mezcla de 69b y 70

Se disolvió una mezcla 1:1 de 69b y 70 (50 mg) en EtOH absoluto (10 ml) y se agregó Pd-C 10% (5 mg). La mezcla se hidrogenó a presión atmosférica y temperatura ambiente durante 15 horas con agitación. Se filtró el catalizador sobre lecho de celite y se evaporó el solvente. Se obtuvo una mezcla constituida según el espectro de RMN  $^1\text{H}$  por 69b y acetato de 24-cetocolesterol 54b. La misma se separó en las condiciones descriptas más arriba.

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,69 (3H, s, Me-18); 0,93 (3H, d,  $J=7\text{Hz}$ , Me-21); 1,03 (3H, s, Me-19); 1,09 (6H, d,  $J=7\text{Hz}$ ,  $-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2,04 (3H, s,  $-\text{OCOCH}_3$ ); 2,58 (1H, m,  $J=7\text{Hz}$ , H-25); 4,6 (1H, sa, H-3); 5,38 (1H, da, H-6).

EM,  $m/z$ : 442 ( $M^+$ ) (3,5); 382 ( $M-\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (100); 367 (15,7); 315

(3,6); 296 (19,3); 281 (12,2); 255 (24,5); 253 (12,5); 228 (9,1); 20 (27,7); 211 (5,7); 71 (76,3).

### Reacción de 71 con bromuro de isopropilmagnesio

#### Método A. En benceno.

Se agregó gota a gota y con agitación 1 equivalente de solución etérea de bromuro de isopropilmagnesio sobre una solución de 71 (50 mg) en benceno anhidro (4 ml) bajo atmósfera de nitrógeno a 5°C. Se detuvo la reacción por agregado de solución de ácido clorhídrico 1N (8 ml) y se extrajo con diclorometano. La solución orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. El análisis por ccd (sistema 3) reveló la presencia del ácido 69b, la cetona 70 y un componente de menor movilidad que correspondió al alcohol 72. La mezcla se separó en sus componentes por cromatografía en columna de silicagel eluyendo con acetato de etilo:hexano (40:60). Las cantidades de los productos obtenidos no fueron reproducibles sin embargo se obtuvieron rendimientos que oscilaron entre 25 y 50% de 72.

IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3400 (-OH, alcohol); 1150 (C-O).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,72 (3H, s, Me-18); 0,82 (6H, d, J=7Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,87 (6H, d, J=7Hz, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,03 (3H, s, Me-19); 1,13 y 1,15 (3H, d J=7Hz, Me-21); 2,04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-); 4,6 (1H, ba, H-3); 5,35 (2H, d, J=12Hz, H-22 y 23); 5,39 (1H, ba, H-6).

#### Método B. En Tetrahidrofurano.

Se siguió un procedimiento idéntico al del método A. Se



disolvió 71 (50 mg) en tetrahidrofurano anhidro (4 ml) y la temperatura de reacción se mantuvo a  $-78^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvieron resultados análogos al método anterior.

#### Reacción de 57 con bromuro de isopropilmagnesio

(en benceno o en tetrahidrofurano)

Se siguió el mismo procedimiento en ambos solventes que para 71. Los resultados fueron similares, aunque los rendimientos del alcohol correspondiente 73 oscilaron entre 15 y 20% cuando se usó benceno como solvente y entre 20 y 35% cuando se usó tetrahidrofurano como solvente.

IR,  $\text{cm}^{-1}$ : 3400 ( $-\text{OH}$ , alcohol); 1150 ( $\text{C}-\text{O}$ )

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,69 (3H, s, Me-18); 0,93 (3H, d, Me-21); 0,94 (12H, d,  $\text{J}=7\text{Hz}$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 1,02 (3H, s, Me-19); 2,04 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2-$ ); 4,64 (1H, m, H-3); 5,39 (1H, ba, H-6).

#### Reacción de 71 con bromuro de isopropilmagnesio en presencia de acetilacetato de hierro (III)

##### Preparación de acetilacetato de hierro (III).

Se agregaron tres equivalentes de acetilacetona sobre 1 equivalente de hidróxido férrico (preparado a partir de cloruro férrico e hidróxido de sodio) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente y con agitación durante 20 horas. El sólido rojo obtenido se filtró y se lavó con agua. Se disolvió en diclorometano y se evaporó el solvente a sequedad. Luego se disolvió en benceno y se evaporó nuevamente el solvente. Se completó el secado a 0,5 Torr. PF:  $182-184^{\circ}\text{C}$  (lit. [145]  $182-184^{\circ}\text{C}$ ).

**Reacción con 71.**

Se preparó bromuro de isopropilmagnesio utilizando Mg (60 mg), bromuro de isopropilo (300  $\mu$ l) y tetrahidrofurano anhidro (3 ml), de acuerdo al procedimiento general descrito en la página 135. Sobre acetilacetato de hierro (III) (16 mg) y 71 (50 mg) en tetrahidrofurano anhidro (1,5 ml) se agregó la solución de bromuro de isopropilmagnesio (300  $\mu$ l) recién preparada, manteniendo la temperatura en 0°C. Se dejó subir la temperatura hasta la ambiente, luego de 10 minutos se detuvo la reacción por agregado de ácido clorhídrico 1N y se extrajo con diclorometano. El extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna de silicagel (F) eluyendo con hexano:acetato de etilo (70:30). Se obtuvo 70 (25 mg, rend. 49%), 69b (15 mg) y un producto que se identificó como el dímero 74 (7 mg).

RMN  $^1\text{H}$  74:  $\delta$  0,73 (3H, s, Me-18); 1,03 (3H, s, Me-19); 1,11 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 2,04 (3H, s, -OCOCH<sub>3</sub>); 4,6 (1H, sa, H-3); 5,38 (1H, da; H-6); 5,81 (1H, d, J=16Hz, H-23); 7,01 (1H, dd, J=16 y J=9Hz, H-22).

**Reacción del cloruro de 3 $\beta$ -acetoxicolenilo (57) con bromuro de isopropilmagnesio-bromuro de zinc**

Se agregó 1 equivalente de solución etérea de bromuro de isopropilmagnesio sobre una suspensión de bromuro de zinc (23 mg) en benceno anhidro (2 ml) manteniendo la temperatura a 5°C. Se agregó posteriormente 57 (40 mg) disuelto en benceno (2 ml) y se

agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos permitiendo que la temperatura se elevase a la ambiente. Se detuvo la reacción por agregado de ácido clorhídrico 1N (6 ml) y se extrajo con diclorometano. El extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y evaporó el solvente. El producto obtenido se purificó según lo descrito en la preparación anterior. Se obtuvo 70 (18 mg) y 69b (19 mg) identificados por los espectros de RMN <sup>1</sup>H correspondientes.

**Reacción de 71 con bromuro de isopropilmagnesio-ioduro de zinc**  
**Preparación de ioduro de zinc.**

Se hizo reaccionar polvo de zinc (500 mg) con iodo (2 g), en éter anhidro (10 ml) bajo atmósfera anhidra durante 16 horas y en ausencia de luz. La solución resultante se filtró y se evaporó el solvente. Se completó el secado a 0,5 Torr. El sólido blanco (2,4 g, rend. 98%) resultante se conservó en oscuridad.

**Reacción con 71**

Se agregó 1 equivalente de solución etérea de bromuro de isopropilmagnesio sobre ioduro de zinc (370 mg) en éter etílico (2,5 ml) con agitación a 0°C y en atmósfera de nitrógeno. Sobre esta solución se agregó 71 (50 mg) disuelto en diclorometano (4 ml). Se dejó reaccionar durante una hora. Se agregó ácido clorhídrico 1N y se extrajo con diclorometano. El extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna de silicagel (F) eluyendo con hexano:acetato de etilo (60:40). Se obtuvo un producto

que se identificó como 3 $\beta$ -acetoxicola-5,22-dien-24-oato de etilo (75).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,73 (3H, s, Me-18); 1,03 (3H, s, Me-19); 1,11 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 1,3 (3H, t, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 2,04 (3H, s,  $-\text{OCOCH}_3$ ); 4,19 (2H, c, J=7Hz,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 4,6 (1H, sa, H-3); 5,38 (1H, da; H-6); 5,74 (1H, d, J=16Hz, H-23); 6,85 (1H, dd, J=16 y J=9Hz, H-22).

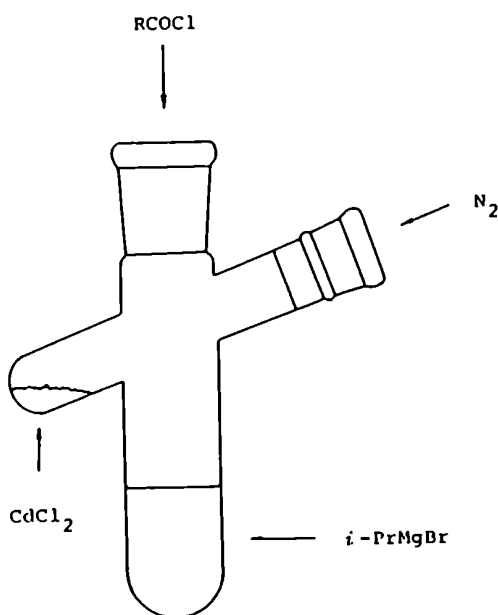
### Reacción de cloruro de 3 $\beta$ -acetoxicolenilo 57 con bromuro de isopropilmagnesio-cloruro de cadmio

#### Obtención de 3 $\beta$ -acetoxicolest-5-en-24-ona (54b).

La reacción se llevó a cabo en un tubo como el esquematizado más abajo en atmósfera de nitrógeno (libre de  $\text{O}_2$ ). Se preparó bromuro de isopropilmagnesio según lo descrito (pág. 135) a partir de Mg (70 mg), *i*-PrBr (275  $\mu\text{l}$ ) y éter anhidro (2 ml). Sobre la solución del Grignard enfriada a 0°C se volcó cloruro de cadmio anhidro (625 mg) finamente pulverizado y se dejó durante 20 minutos con agitación a la misma temperatura. Se agregó 57 (105 mg) disuelto en benceno anhidro (6,5 ml) y la suspensión se agitó durante 10 horas a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción por agregado de una solución de ácido clorhídrico 1N:tetrahidrofurano (1:1). Se agregó ácido clorhídrico 0,2N y se extrajo con diclorometano. El extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de silicagel (D) eluyendo con hexano:acetato de etilo (60:40). Se obtuvo acetato de 24-cetocolesterol (54b) (100 mg, rend. 95%), homogéneo por ccd (sistema 1).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,69 (3H, s, Me-18); 0,93 (3H, d,  $J=7\text{Hz}$ , Me-21); 1,03 (3H, s, Me-19); 1,09 (6H, d,  $J=7\text{Hz}$ ,  $-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2,04 (3H, s,  $-\text{OCOCCH}_3$ ); 2,58 (1H, m,  $J=7\text{Hz}$ , H-25); 4,6 (1H, sa, H-3); 5,38 (1H, da, H-6).

EM,  $m/z$  (%): Ver pág. 143.



### Síntesis de 24-metilencolesterol (37a)

#### Reacción de 3 $\beta$ -acetoxi-24-cetocolesterol con metilentrifenilfosforano.

A una suspensión de bromuro de trifenilfosfonio (1,17 g) en tetrahidrofurano anhidro (30 ml) bajo atmósfera de nitrógeno seco, se agregó butillitio 1M en hexano (4,3 ml). La mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 45 minutos, tomando ésta un color rojo intenso y apareciendo un precipitado blanco de bromuro

de litio. Se agregó entonces 54b (100 mg) disuelto en tetrahidrofurano (5 ml) y se calentó bajo reflujo durante 24 horas. Se agregó ácido clorhídrico 1N y se extrajo con éter. Se obtuvieron mezclas de 54a y 37a en proporciones variables (nunca mayor de 60% de 37a) según análisis por cgl, comparando con muestras auténticas. Columna: 5% fenilmetilsilicona (35 m capilar, DI: 0,31); temperatura de inyección: 260°C; flujo: 195 ml/min; tr. de 37a: 6,39 min., tr. de 54a: 8,34 min..

#### Reacción de 54b con $Zn-CH_2Br_2-TiCl_4$ .

##### Preparación del reactivo de $Zn-CH_2Br_2-TiCl_4$ .

Sobre una suspensión de zinc activado (208 mg) en tetrahidrofurano anhidro (2,5 ml) se agregó dibromometano anhidro (100  $\mu$ l) y se enfrió a -40°C bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregó gota a gota y con agitación tetracloruro de titanio en un lapso de 15 minutos y se continuó la agitación 3 días a 5°C. La suspensión resultante se guardó a -20°C.

##### Obtención de 3 $\beta$ -acetoxi-24-metilencolest-5-eno (37b).

Se disolvió 54b (50 mg) en diclorometano anhidro, se agregó el reactivo de  $Zn-CH_2Br_2-TiCl_4$  (1,2 ml) a 0°C y se dejó reaccionar durante 45 minutos hasta total desaparición de 54b (ccd). Se agregó una pasta de bicarbonato de sodio-agua y se agitó hasta obtener una solución transparente. La misma se filtró y se secó sobre sulfato de sodio. Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo el cual se purificó por cromatografía en columna de silicagel (F) eluyendo con hexano:acetato de etilo (3:1). Se obtuvo

**37b** (48,5 mg, rend. 96%), homogéneo por ccd (sistema 4).

**3 $\beta$ -hidroxi-24-metilencolest-5-eno (37a)**

Se disolvió **37b** (44 mg) en metanol (6,5 ml), se agregó hidróxido de sodio 10% (0,7 ml) y se agitó durante 45 minutos bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregó agua y ácido clorhídrico 1N hasta pH neutro, se extrajo con diclorometano y se secó sobre sulfato de sodio. Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo el cual se purificó por columna de silicagel (H) eluyendo con hexano:acetato de etilo (60:40). Se obtuvo **37a** (30 mg, rend. 75%), homogéneo por ccd (sistema 5).

RMN  $^1\text{H}$ : 0,68 (3H, s, Me-18); 0,95 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 1,01 (3H, s, Me-19); 1,03 (6H, d, J=7Hz,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3,52 (1H, ba, H-3); 4,69 (2H, da, J=6Hz,  $\text{CH}_2=$  28); 5,35 (1H, da, J=5Hz, H-6).  
EM, m/z (%): 398  $\text{M}^+$  (16,3); 383 (10,8); 314 (100); 300 (20,8); 299 (32,8); 271 (57,0); 253 (11,5); 231 (12,3); 213 (20,6).

**ENSAYOS CONDUCENTES A LA SINTESIS DE 24-METILENCOLESTEROL [7- $^3\text{H}$ ]**

**3 $\beta$ -acetoxi-7-bromocolest-5-en-24-ona (76)**

Se disolvió **54b** (40 mg) en tetracloruro de carbono (3,5 ml) recién destilado y se agregó N-bromosuccinimida (21,6 mg). La solución se calentó bajo reflujo durante 25 minutos, se dejó enfriar y se filtró la succinimida. El filtrado se lavó con solución saturada de tiosulfato de sodio, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Se obtuvo un producto

homogéneo por ccd (sistema 3) que se identificó como 76 (47 mg, rend. 100%). Beilstein: positivo.

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,72 (3H, s, Me-18); 0,93 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 1,06 (3H, s, Me-19); 1,10 (6H, d, J=7Hz,  $-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2,04 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ); 2,58 (1H, m, J=7Hz, H-25); 4,6 (1H, sa, H-3); 4,68 (1H, ba, H-7); 5,76 (1H, d, J=6Hz, H-6  $7\alpha$ -Br).

### **3 $\beta$ -acetoxi-7-bromocolest-5-eno (77)**

Se sintetizó utilizando el mismo procedimiento que se describió para 76. Se partió de acetato de colesterol (78) (63 mg), N-bromosuccinimida (31 mg) y tetracloruro de carbono (4 ml). Se obtuvo un producto homogéneo por ccd (sistema 6) que se identificó como 77 (74 mg, rend. 100%). Beilstein: positivo.

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,72 (3H, s, Me-18); 0,88 (6H, d, J=7Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 0,91 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 1,04 (3H, s, Me-19  $7\alpha$ -Br); 1,08 (3H, s, Me-19  $7\beta$ -Br); 2,04 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ); 4,6 (1H, sa, H-3); 4,68 (1H, ba, H-7); 5,58 (1H, da, H-6  $7\beta$ -Br); 5,77 (1H, d, J=6Hz, H-6  $7\alpha$ -Br).

### **Reducción de los 7-bromo a 7-deuterioesteroides**

#### **Reacción de 77 con yoduro de sodio-zinc- $\text{D}_2\text{O}$ .**

Se disolvió 77 (63 mg) en tetrahidrofurano anhidro (6 ml). Sobre esta solución se agregó  $\text{D}_2\text{O}$  (0,5 ml), yoduro de sodio (59 mg) y zinc activado (59 mg) y se calentó a  $80^\circ\text{C}$  con agitación durante 4 horas. Se filtró la mezcla de reacción sobre celite. El filtrado se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. El análisis por RMN  $^1\text{H}$  del producto de reacción crudo



indicó la presencia de 78 [ $^7\text{-}^2\text{H}$ ] pero también de 79 (40%).

RMN  $^1\text{H}$ : 78  $\delta$  0,68 (3H, s, Me-18); 0,87 (6H, d J=7Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,93 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 1,02 (3H, s, Me-19); 2,04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-); 4,62 (1H, sa, H-3); 5,38 (1H, da, H-6).

RMN  $^1\text{H}$ : 79  $\delta$  0,62 (3H, s, Me-18); 0,87 (6H, d, J=7Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,91 (3H, s, Me-19); 0,94 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 2,04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-); 4,64 (1H, sa, H-3); 5,39 (1H, da, H-6); 5,55 (1H, da, H-7).

#### Reacción de 77 con yoduro de sodio-zinc-D<sub>2</sub>O-ácido acético.

Se disolvió 77 (51 mg) en tetrahydrofurano anhidro (5 ml). Sobre esta solución se agregó D<sub>2</sub>O (0,4 ml), yoduro de sodio (49 mg), zinc (49 mg) y ácido acético (250  $\mu\text{l}$ ) y se calentó a 80°C con agitación durante 3 horas. El análisis por RMN  $^1\text{H}$  del producto crudo reveló la presencia de 78 [ $^7\text{-}^2\text{H}$ ] y de 79 (30%) (por comparación con la mezcla anterior).

#### Reacción de 77 con butillitio-D<sub>2</sub>O.

Se disolvió 77 (54 mg) en tetrahydrofurano anhidro (3 ml). Sobre esta solución enfriada a -117°C se agregó butillitio 1M en hexano (482  $\mu\text{l}$ ) y se dejó reaccionar con agitación durante 1,5 horas. Se agregó D<sub>2</sub>O (0,5 ml) y ácido clorhídrico 1N, se dejó subir la temperatura hasta la ambiente y se extrajo con diclorometano. El extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. La comparación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla acetilada con la obtenida en la página anterior indicó la presencia de colesterol (78-D) (50%),

dehidrocolesterol (79) (25%) y de un tercer componente el cual presentaba una señal a 5,22 ppm y que se asignó tentativamente como 3 $\beta$ -hidroxicolest-6-eno.

#### Preparación de NaCNBD<sub>2</sub>

Se agregó una traza de naranja de metilo a una solución de NaCNBH<sub>2</sub> comercial (50 mg) en D<sub>2</sub>O (0,25 ml). La solución resultante se llevó a pH=3 por agregado ClD 0,1% v/v y luego se mantuvo el pH por agregado periódico de ClD 0,025% v/v durante 30 minutos. El intercambio se detuvo por agregado de carbonato de sodio hasta neutralidad y la solución se evaporó a sequedad. El residuo se agitó durante una noche con tetrahidrofurano anhidro (4 ml), se filtró y se secó a 0,5 Torr. El sólido se guardó en atmósfera anhidra; se obtuvo NaCNBD<sub>2</sub> [75%-D] (50 mg, rend. 97%).

RMN <sup>1</sup>H: ver página 114.

#### Purificación de NaCNBD<sub>2</sub>

Se disolvió NaCNBD<sub>2</sub> [75%-D] (50 mg) en tetrahidrofurano anhidro (0,5 ml) y se ajustó el pH a 9 por agregado de ácido clorhídrico 1M:metanol (1:1). La solución se volcó con agitación sobre dioxano (1,25 ml), se filtró el precipitado obtenido y el sólido se agitó durante 2 horas con acetato de etilo (2 ml). Esta solución se filtró sobre celite y el filtrado se calentó bajo reflujo. Se agregó dioxano (0,8 ml) y se enfrió a 0°C. El complejo de dioxano cristalino obtenido se filtró, se secó a 0,5 Torr durante 4 horas a temperatura ambiente y se guardó en desecador. Para obtener el hidruro a partir de este complejo, el mismo se

calentó a 80°C a 0,5 Torr.

#### Reacción de 76 con NaCNBD<sub>3</sub>/ZnCl<sub>2</sub>

3β-acetoxicolest-5-en-24-ona [7-<sup>1</sup>H] (54b-D).- A una solución agitada de cloruro de zinc (6,2 mg) recién secado, en éter anhidro (1 ml) se le agregó NaCNBD<sub>3</sub> (5,7 mg) a temperatura ambiente. La mezcla se dejó agitando durante 20 minutos en atmósfera anhidra. Se agregó 76 (45 mg) disuelto en éter anhidro (1 ml) y se dejó agitando durante media hora. La reacción se detuvo por agregado de solución saturada de bicarbonato de sodio, se agregó éter y se lavó con agua y solución saturada de cloruro de sodio. La solución etérea se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Se obtuvo 54b-D (38 mg), homogéneo por ccd (sistema 1). El mismo resultó según su espectro de RMN <sup>1</sup>H idéntico a una muestra auténtica de 54b.

#### Reacción de 77 con NaCNBD<sub>3</sub>/ZnCl<sub>2</sub>

Se empleó un procedimiento análogo al descrito para 76. Se partió de 3β-acetoxi-7-bromocolest-5-eno (77) (44 mg), cloruro de zinc (6,2 mg), NaCNBD<sub>3</sub> (5,6 mg), éter etílico (2 ml). Se obtuvo acetato de colesterol (78) [7-<sup>1</sup>H] (36 mg, rend. 97%), homogéneo por ccd (sistema 7).

RMN <sup>1</sup>H: 78 δ 0,68 (3H, s, Me-18); 0,87 (6H, d, J=7Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,93 (3H, d, J=7Hz, Me-21); 1,02 (3H, s, Me-19); 2,04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-); 4,62 (1H, sa, H-3); 5,38 (1H, da, H-6).

**SINTESIS DE 24-METILENCOLESTEROL [24-<sup>14</sup>C] (37a)**

En todos los casos el procedimiento es idéntico al descrito para el compuesto frío, excepto aclaración expresa. Todos los productos fueron espectroscópicamente idénticos (RMN <sup>1</sup>H y/o EM) a los análogos no marcados.

**Bromuro de carbetoximetiltrifenilfosfonio [1-<sup>14</sup>C]**

Se partió de bromoacetato de etilo [1-<sup>14</sup>C] (0,4 g) act. esp. 1 mCi/mmol, trifenilfosfina (629 mg), benceno (7 ml). Se obtuvo bromuro de carbetoximetiltrifenilfosfonio [1-<sup>14</sup>C] (960 mg, rend. rad. 93%) act. esp. 0.93 mCi/mmol.

**Carbetoximetiltrifenilfosforano [1-<sup>14</sup>C] (62)**

Se partió de bromuro de carbetoximetiltrifenilfosfonio [1-<sup>14</sup>C] (960 mg), agua (23,4 ml), NaOH (0,1 N). Se obtuvo carbetoximetiltrifenilfosforano [1-<sup>14</sup>C] (720 mg, rend. rad. 94%) act. esp. 0.94 mCi/mmol.

**3-oxocola-4,22-dien-24-oato de etilo [24-<sup>14</sup>C] (64a)**

Se partió de carbetoximetiltrifenilfosforano [1-<sup>14</sup>C] (62) (720 mg), 20 $\beta$ -carboxaldehído-3-oxo-pregnen-4-eno (576 mg), acetonitrilo (38 ml). Se obtuvo 64a [24-<sup>14</sup>C] (655 mg, rend. rad. 80%) act. esp. 0,9 mCi/mmol.

**3-acetoxicola-3,5,22-trien-24-oato de etilo [24-<sup>14</sup>C] (68)**

Se partió de 64a [24-<sup>14</sup>C] (655 mg), anhídrido acético

(33,4 ml), cloruro de acetilo (40 ml). Se obtuvo 68 [24-<sup>14</sup>C] (665 mg, rend. rad. 92%).

**Acido 3 $\beta$ -hidroxicola-5,22-dien-24-oico [24-<sup>14</sup>C] (69a)**

Se partió de 68 [24-<sup>14</sup>C] (651 mg), etanol 95% (340 ml), borohidruro de sodio (1,23 g), etanol:agua (70:30) (31 ml), hidróxido de sodio 5% (31 ml). Se obtuvo 69a [24-<sup>14</sup>C] (536 mg, rend. rad. 98%).

**Acido 3 $\beta$ -acetoxicola-5,22-dien-24-oico [24-<sup>14</sup>C] (69b)**

Se partió de 69a [24-<sup>14</sup>C] (536 mg), piridina anhidra (13,5 ml), anhídrido acético (13,5 ml). Se obtuvo 69b [24-<sup>14</sup>C] (578,7 mg, rend. rad. 97%).

**Acido 3 $\beta$ -acetoxicol-5-en-24-oico [24-<sup>14</sup>C] (55b)**

Se partió de 69b [24-<sup>14</sup>C] (578 mg), solución de dioxano:acético (30:1) (77 ml), óxido de platino (57 mg). Se obtuvo 55b [24-<sup>14</sup>C] (580 mg, rend. rad. 100%) act. esp. 0,93 mCi/mmol.

**Cloruro de 3 $\beta$ -acetoxicol-en-24-oico [24-<sup>14</sup>C] (57)**

Se partió de 55b [24-<sup>14</sup>C] (100 mg), benceno anhidro (2 ml), cloruro de oxalilo (2 ml). Se obtuvo 57 [24-<sup>14</sup>C] (104 mg, rend. rad. 100%).

**3 $\beta$ -acetoxicolest-5-en-24-ona [24-<sup>14</sup>C] (54b)**

Se partió de magnesio (70 mg), bromuro de isopropilo (275  $\mu$ l), éter etílico anhidro (2 ml), cloruro de cadmio (625 mg), 57

(104 mg) en benceno anhidro (6,5 ml). Se obtuvo 54b [24-<sup>14</sup>C] (100 mg, rend. rad. 95%).

#### **3 $\beta$ -acetoxi-24-metilencolest-5-eno [24-<sup>14</sup>C] (37b)**

Se partió de 54b [24-<sup>14</sup>C] (50 mg), diclorometano anhidro (5 ml), reactivo de Zn-CH<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>-TiCl<sub>4</sub> (1,2 ml). Se obtuvo 37b [24-<sup>14</sup>C] (48 mg, rend. rad. 96%).

#### **3 $\beta$ -hidroxi-24-metilencolest-5-eno [24-<sup>14</sup>C] (37a)**

Se partió de 37b [24-<sup>14</sup>C] (48 mg), metanol (7 ml), NaOH 10% (0,7 ml). Se obtuvo 37a (33 mg, rend. rad. 75%). El mismo se sometió a una purificación por CLAR en fase reversa, columna Altex Ultrasphere 5  $\mu$ m (250x10mm), eluyendo con acetonitrilo:acetato de etilo:metanol (2:2:1), flujo: 3 ml/min, resultando un único pico a tr:10,8, act. esp. 1,07 mCi/mmol.

#### **SINTESIS DE 24-METILENCOLESTEROL [7-<sup>3</sup>H]**

En todos los casos se empleó el procedimiento descrito para el compuesto frío.

#### **3 $\beta$ -acetoxi-7-bromo-colest-5-en-24-ona (76)**

Se partió de 54b (40 mg), tetracloruro de carbono (3,5 ml), N-bromosuccinimida (21,6 mg). Se obtuvo 76 (47 mg, rend. 100%).

**Preparación de  $\text{NaB}^3\text{H}_3\text{CN}$** 

Se partió de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (50 mg),  $^3\text{H}_2\text{O}$  (0,25 ml) act. esp. 8,4 mCi/mmol, ácido clorhídrico 0,1% v/v, ácido clorhídrico 0,025% v/v, tetrahidrofurano anhidro (4 ml). Se obtuvo  $\text{NaB}^3\text{H}_3\text{CN}$  (49 mg, rend. 98%) act. esp. 0,22 mCi/mmol.

**3 $\beta$ -acetoxicolest-5-en-24-ona [7- $^3\text{H}$ ] (54b)**

Se utilizó  $\text{ZnCl}_2$  (6,5 mg) en éter etílico anhidro (1 ml),  $\text{NaCNB}^3\text{H}_3$  (5,9 mg) act. esp. 0,22 mCi/mmol, 76 (47 mg) en éter etílico (1 ml). Se obtuvo 54b [7- $^3\text{H}$ ] (39 mg, rend. 98%) act. esp. 0,20 mCi/mmol.

**3 $\beta$ -acetoxi-24-metilencolest-5-eno [7- $^3\text{H}$ ] (37b)**

Se partió de 54b [7- $^3\text{H}$ ] act. esp. 0,20 mCi/mmol (39 mg), diclorometano anhidro (3,9 ml), reactivo de  $\text{Zn-CH}_2\text{Br}_2\text{-TiCl}_4$  (940  $\mu\text{l}$ ). Se obtuvo 37b [7- $^3\text{H}$ ] (37,4 mg, rend. rad. 96%).

**3 $\beta$ -hidroxi-24-metilencolest-5-eno [7- $^3\text{H}$ ] (37a)**

Se partió de 37b [7- $^3\text{H}$ ] (37 mg), metanol (5,4 ml),  $\text{NaOH}$  10% (0,5 ml). Se obtuvo 37a [7- $^3\text{H}$ ] (25 mg, rend. rad. 75%). El producto se purificó de igual manera que su análogo [24- $^{14}\text{C}$ ] (pág. 158) act. esp. 0,22 mCi/mmol.

## AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE WITHANOLIDOS DE *JABOROSA BERGII*

### Procesamiento del material vegetal

Las hojas secas y pulverizadas (3,9 kg) de plantas de *Jaborosa bergii* (recolectadas en Liborio Luna, provincia de San Luis, Argentina) se extrajeron con éter etílico a temperatura ambiente. Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo (67 g) el cual se fraccionó por cromatografía en columna de silicagel (H). La siembra se realizó en una pastilla de silicagel (D) y se eluyó bajo presión de nitrógeno con mezclas de hexano:benceno desde una polaridad de 99:1 hasta 1:99 y benceno:cloroformo desde 99:1 a 1:99 para separar los componentes de baja polaridad y pigmentos. Luego se continuó la elución con mezclas de diclorometano:metanol desde una relación 99:1 a 19:1 rindiendo cuatro fracciones de polaridad creciente: F1, F2, F3, F4.

La fracción F1 (1,4 g) se separó por cromatografía flash eluyendo con diclorometano:metanol (28:1). La fracción menos polar de la misma se sometió a una nueva cromatografía flash eluyendo con  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ -MeOH (28:1). La fracción menos polar de la misma se purificó posteriormente por CLAR en fase reversa (Altex Ultrasphere ODS 5  $\mu\text{m}$  (250x10mm)) eluyendo con MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30), flujo 3 ml/min. En la figura 16 de la página 43 se representa el cromatograma correspondiente. Se aisló un pico correspondiente a una mezcla de jaborosalactona M (45) y su dehidroderivado 47 (5 mg) (tr: 7,8).



RMN  $^1\text{H}$ : Ver tabla 5, página 45.

#### **Hidrogenación de la mezcla 45 + 47.**

Se disolvió la mezcla (5 mg) en etanol absoluto (2 ml) y se agregó Pd/C 10% (1 mg). La solución se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Se filtró sobre lecho de celite y se evaporó el solvente filtrado. Se obtuvo jaborosalactona M (45) (5 mg), homogéneo por ccd (sistema 8).

RMN  $^1\text{H}$ : ver tabla 5, pág. 45.

RMN  $^{13}\text{C}$ : ver tabla 6, pág. 46.

La fracción F2 (250 mg) se separó por cromatografía "flash" eluyendo con diclorometano-metanol (28:1) rindiendo una fracción (15 mg) constituida por jaborosalactol M (43) y su dehidro-derivado 42.

RMN  $^1\text{H}$ : ver tabla 5, pág. 45.

RMN  $^{13}\text{C}$ : ver tabla 6. pág. 46.

#### **Hidrogenación de la mezcla 42 + 43.**

Se partió de la mezcla (15 mg) y se empleó el procedimiento descrito para la mezcla de 45 y 47. El tiempo necesario para completar la reacción fue de 1 hora. Se obtuvo jaborosalactol M (43) el cual se recristalizó de acetato de etilo. PF: 234-236°C.

RMN  $^1\text{H}$ : ver tabla 5, pág. 45.

RMN  $^{13}\text{C}$ : ver tabla 6, pág. 46.

EM, m/z (%): 472 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ) (1), 454 ( $\text{M}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$ ) (4), 436

( $M^+ - 3H_2O$ ) (5), 318 (67), 298 (3), 227 (31), 171 (57), 143 (65), 153 (94), 140 (89), 137 (68), 127 (30), 125 (62), 109 (100).

#### Oxidación de jaborosalactol M (43) con reactivo de Jones

Se disolvió 43 (10 mg) en acetona (1 ml) y se agregó reactivo de Jones gota a gota a 0°C durante 4 minutos hasta persistencia de color levemente naranja. Se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Se obtuvo jaborosalactona M (45) (9 mg) idéntica a la obtenida en la pág. 161.

#### Obtención de jaborosalactona M 14 $\beta$ ,17 $\beta$ -sulfito (46)

Se disolvió 45 (5 mg) en piridina anhidra (0,8 ml) y se agregó cloruro de tionilo (0,1 ml) recién destilado en piridina (0,5 ml) a -12°C. Se dejó reaccionar a esta temperatura durante dos minutos. Se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. La solución orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Se obtuvo 46 (5 mg), homogéneo en ccd (sistema 9). PF: 119-123°C (descompone).

RMN  $^1H$ : ver tabla 5, pág 45.

EM, m/z (%): 470 ( $M^+ - SO_2$ ) (5), 452 ( $M - H_2SO_3$ ) (23), 292 (100), 264 (37), 64 (89).

Microanálisis: valor calculado  $C_{20}H_{20}O_6S$ : S=6,0%.

valor encontrado: S=6,3 %.

La fracción F3 (40 mg) se sometió a una segunda separación cromatográfica por columna de silicagel "flash" (F) eluyendo con

acetato de etilo:hexano (9:1) obteniéndose dos fracciones principales. La menos polar (15 mg) consistió de un withanólido F3' el cual se encuentra aún en estudio. La fracción más polar se recristalizó de acetato de etilo rindiendo jaborosalactol N (48) puro, homogéneo por ccd (sistema 10). PF: 183-185°C (descompone).

RMN  $^1\text{H}$ : ver tabla 5, pág. 45.

RMN  $^{13}\text{C}$ : ver tabla 6, pág. 46.

EM, m/z (%): 470 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ) (1), 452 ( $\text{M}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$ ) (3), 434 ( $\text{M}^+ - 3\text{H}_2\text{O}$ ) (3), 171 (9), 155 (4), 153 (6), 143 (6), 137 (31), 127 (5), 125 (63), 109 (68), 43 (100).

La fracción F4 presentaba en ccd (sistema 8) manchas que revelaban como withanólidos y presentaban una absorbancia al UV a 220 nm. Su análisis será objeto de estudios posteriores.

AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE WITHANOLIDOS DE *JABOROSA LEUCOTRICHA*

**Material vegetal**

*Parte aérea.*- Las plantas de *Jaborosa leucotricha* utilizadas fueron recolectadas en "El Carrizal", provincia de Mendoza, Argentina.

La parte aérea seca y pulverizada (1,24 kg) se extrajo sucesivamente con hexano, éter etílico y etanol. De la fracción soluble en hexano se aisló en forma mayoritaria una sustancia la cual fue identificada por cgl-masa, comparando con una muestra auténtica, como ácido oleanólico.

La fracción soluble en éter contenía hidrocarburos y según el análisis por ccd posibles withanólidos.

La solución etanólica se evaporó a sequedad y el residuo se sometió a una separación por cromatografía en columna de silicagel H eluyendo con mezclas de hexano:acetona desde una relación (99:1 a 0:100). Se obtuvieron dos fracciones principales que contenían withanólidos F1 y F2.

La fracción F1 estaba constituida principalmente por jaborosalactona L (28). PF:215-217°C (lit. [30] 215-217°C).  
 RMN <sup>1</sup>H: δ 0,80 (3H, s, Me-18), 1,01 (3H, d J=7, Me-21), 1,26 (3H, s, Me-19), 1,87 (3H, s, Me-27), 1,92 (3H, s, Me-28), 3,13 (1H, sa, H-6), 4,59 (1H, ddd J=10, 6,5 y 3 Hz, H-22), 6,02 (1H, ddd, J=10, y 0,5, H-2), 6,85 (1H, ddd J=10, 6 y 2,5 Hz, H-3).  
 EM m/z (%): 439 [M-Me]<sup>+</sup> (4), 436 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (1), 313 (19), 283 [M-H<sub>2</sub>O-rupt.C17-C20, C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (6), 265 (19), 240 (39),

227 (28), 209 (11), 197 (16), 171 (19), 157 (15), 147 (12), 137 (46), 131 (19), 125 [rupt. C20-C22] (100), 109 (41).

La fracción F2, más polar que F1, estaba constituida principalmente por jaborosalactona O (50) (35 mg), la cual se recristalizó de acetato de etilo. PF: 191-193°C.

RMN <sup>1</sup>: ver tabla 10, pág. 63.

RMN <sup>13</sup>C: ver tabla 11, pág. 63.

EM, m/z (%): 457 (M<sup>+</sup>-Me) (1), 443 (19), 311 (18), 271 (13), 227 (19), 213 (27), 211 (24), 197 (24), 159 (25), 153 (8), 137 (37), 125 (100), 109 (59).

#### **Frutos de *Jaborosa leucotricha***

Los frutos de *Jaborosa leucotricha* (315 g) fueron extraídos con éter etílico. El extracto obtenido (9,1 g) se fraccionó por adsorción en silicagel (H) eluyendo con mezclas hexano-acetona de polaridad creciente. La fracción eluida con acetona 20% se identificó como jaborosalactona L (28).

**AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE WITHANOLIDOS DE *JABOROSA ODONELLIANA***

Las plantas utilizadas fueron recolectadas en "El Jardín", Estancia La Asunción, depto. La Candelaria, Salta, Argentina.

Se extrajo con éter etílico plantas enteras y pulverizadas (2 kg) y el material insoluble resultante se extrajo con etanol en frío. El residuo obtenido luego de evaporar el extracto etéreo (12 g) se particionó entre hexano (1250 ml), metanol (300 ml) y agua (100 ml). La fase acuosa se concentró y se extrajo con éter etílico. Al concentrar la fase etérea se obtuvo un precipitado cristalino. El mismo se caracterizó como jaborosalactona P (51) (458 mg), PF: 262-264°C (etanol).

Microanálisis: calc. para  $C_{20}H_{34}O_6 \cdot 3H_2O$ : C 64,35; H 8,10.

encontrado: C 64,33; H 8,17.

RMN  $^1H$ : ver tabla 13, pág. 72.

RMN  $^{13}C$ : ver tabla 14, pág. 73.

EM : ver pág. 75.

EM FAB (en matriz de tioglicerol): ver pág. 75.

El extracto etanólico se decoloró con carbón activado y se evaporó a sequedad. El residuo se sometió a una cromatografía en columna de silicagel (F) eluyendo con cloroformo. Se obtuvo así una segunda fracción de jaborosalactona P (96 mg). Por acetilación con anhídrido acético:piridina (1:1) se obtuvo el 22-acetato 52. PF: 235-237°C (etanol).

**2,3-dihidrojaborosalactona P (53).**

Se disolvió 51 (22 mg) en etanol absoluto (8 ml) y se agregó paladio-carbón 10% (2 mg). La solución se hidrogenó durante 2,5 horas a presión atmosférica. Se filtró sobre celite y se evaporó el solvente. Se obtuvo 53 (22 mg). PF: 232-234°C (etanol-agua).

**Datos cristalográficos de 51**

Cristales ortorrómbicos  $a=7,1966(13)$  Å,  $b=11,377(2)$  Å,  $c=30,962(6)$  Å. Grupo espacial  $p2_12_12_1$ , y  $z=4$ . La estructura fue resuelta por métodos directos y refinada usando 2326 reflexiones únicas observadas con  $|F| \geq 2,5\sigma |F|$ .

## DEGRADACION QUIMICA DE JABOROSALACTONA A [ $^{14}\text{C}$ ]

Las plantas de *Acnistus breviflorus* (Griseb) utilizadas en las experiencias descriptas provenían de semillas originarias de la provincia de Tucumán, recolectadas durante los años 1980-1981 y sembradas dentro de los 6 meses de recolección. Las plantas utilizadas en las experiencias de degradación contaban con 5 años de edad y las utilizadas en las experiencias de incorporación de 24-metilencolesterol contaban con 8 años de edad y habían sido mantenidas en condiciones naturales en el vivero de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

### Jaborosalactona A [ $^{14}\text{C}$ ] (11)

La jaborosalactona A [ $^{14}\text{C}$ ] ( $0,97 \times 10^6$  dpm/mmol) utilizada fue obtenida biosintéticamente a partir de mevalonolactona [ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ] ( $143 \mu\text{Ci}$ ) [64].

### Obtención de 5 $\alpha$ -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B (81)

A una solución de jaborosalactona A (24 mg) en metanol (16 ml) se agregó ácido sulfúrico 8N (0,12 ml). Se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente, se volcó sobre bicarbonato de sodio 5% (10 ml) y se extrajo con diclorometano. Se obtuvo 81 (25 mg), homogéneo por ccd (sistema 11). PF: 203-204°C (AcOEt) (lit. [7] 200-201°C).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,76 (3H, s, Me-18); 1,01 (3H, d, J=6Hz, Me-21); 1,31 (3H, s, Me-19); 2,06 (3H, s, Me-18); 4,38 (3H, s, Me-27); 4,46 (1H, dt, J=3 y J=12Hz, H-22); 5,82 (1H dd,  $J_{2,3}=10\text{Hz}$   $J_{2,4}=2\text{Hz}$ , H-2);



6,56 (1H, ddd,  $J_{3,2}=10\text{Hz}$   $J_{3,4}=5\text{Hz}$   $J_{3,5}=2\text{Hz}$ , H-3); 3,92 (1H, ba, H-6); 3,02 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ -).

**Reacción de 81 con fenilitio y posterior ruptura oxidativa con  $\text{CrO}_3/\text{SO}_4\text{H}_2$**

Se hizo reaccionar 81 (25 mg) con fenilitio 1M en benceno-éter etílico (5 ml). El éter se destiló y la solución remanente se calentó bajo reflujo en atmósfera de nitrógeno anhidro durante 2 horas. Se dejó durante 16 horas a temperatura ambiente, se acidificó con ácido clorhídrico 2N y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. El producto crudo obtenido consistió en una mezcla de productos según el análisis por ccd en silicagel (sistema 11).

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3300, 1685 (C=O, C-1), 750 y 700 (aromáticos).

**Obtención de 2,3,24,25-tetrahidro-27-desoxijaborosalactona A (82)**

Se disolvió jaborosalactona A (11) (30 mg) en etanol absoluto (5 ml) y se agregó paladio-carbón 10% (15 mg). Se hidrogenó a presión atmosférica durante 20 horas. Se filtró sobre celite y por evaporación del solvente se obtuvo 82 (30 mg), homogéneo por ccd (sistema 11).

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  0,67 (3H, s, Me-18), 0,92 (6H, d  $J=7\text{Hz}$ , Me-21 y Me-28), 1,13 (3H, d,  $J=7\text{Hz}$ , Me-27), 1,18 (3H, s, Me-19), 3,12 (1H, ba, H-6), 4,33 (1H, dt,  $J=12$  y  $3,5$  Hz, H-22).

**Reacción de 82 con fenillitio y posterior ruptura oxidativa con trióxido de cromo-ácido sulfúrico**

Se disolvió 82 (30 mg) en tetrahidrofurano anhidro (2 ml) y se agregó a una solución agitada de fenillitio (5 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml). Se calentó bajo reflujo durante 3 horas, se acidificó con ácido clorhídrico 2N y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se filtró. Por evaporación del solvente se obtuvo una mezcla de 83 y 84.

RMN  $^1\text{H}$  83:  $\delta$  0,74 (3H, s, Me-18), 0,98 (3H, d, J=7Hz, Me-21), 1,16 (3H, s, Me-19), 1,26 (3H, d, J=7Hz, Me-28), 1,27 (3H, d, J=7, Me-27), 3,12 (1H, ba, H-6), 4,35 (1H, dt, J=12 y 3,5 Hz, H-22), 6,8-7,4 (5H, m, fenilo).

RMN  $^1\text{H}$  84:  $\delta$  0,74 (3H, s, Me-18), 0,98 (3H, d, J=7Hz, Me-21), 1,16 (3H, s, Me-19), 1,25 (6H, d J=7Hz, Me-27 y Me-28), 3,12 (1H, ba, H-6), 3,86 (1H, m, H-22), 6,8-7,4 (10H, m, fenilo).

La mezcla de 83+84 se suspendió en ácido sulfúrico 10 % (10 ml) y se agregó trióxido de cromo (3 g). Se destiló por arrastre con vapor y el destilado se recogió sobre solución acuosa de hidróxido de sodio. La solución alcalina se extrajo exhaustivamente con éter etílico. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Se obtuvo benzofenona (5 mg) idéntica por ccd con una muestra auténtica (sistema 10) (revelado con 2,4-dinitrofenilhidrazina en ClH 2 N). La fase acuosa se acidificó y se extrajo con éter etílico. El extracto obtenido se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Se obtuvo un

residuo el cual se sublimó a presión atmosférica y 110°C rindiendo cristales de ácido benzoico (4 mg), idéntico por ccd (sistema 12) (revelado con verde de bromo-cresol 0,04%) con una muestra auténtica. PF: 121-122°C. La benzofenona cruda se disolvió en solución de etanol:agua (5:1) (70 µl) y se trató con clorhidrato de hidroxilamina (9 mg). La mezcla se alcalinizó por agregado de hidróxido de sodio (16,8 mg) y se agitó a 100°C durante 5 minutos. La solución resultante se volcó sobre ácido clorhídrico diluido y la oxima de la benzofenona se filtró y recristalizó de etanol-agua rindiendo el compuesto puro (4 mg). PF: 142-143°C.

#### EXPERIENCIAS DE INCORPORACION DE 24-METILENCOLESTEROL ISOTOPICAMENTE MARCADO

##### Administración del precursor [24-<sup>14</sup>C] y [24-<sup>14</sup>C, 7-<sup>3</sup>H]

Técnica general.- El precursor marcado (<sup>14</sup>C ó <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H) se suspendió en agua (0,3-0,5 ml), se agregó Tween 20 (2 gotas) y se sometió a ondas de ultrasonido. En la suspensión resultante se sumergieron los tallos de hojas de *Acnistus breviflorus* recién cortadas y aplastadas en su extremo. Las cantidades de radioactividad inoculadas, masas y tiempos de administración del trazador se indican en las tablas 18 (pág. 125) y 19 (pág. 128). El agua evaporada se fue reponiendo periódicamente a lo largo de la experiencia.

### Aislamiento de los withanólidos marcados

Las hojas inoculadas se lavaron con agua y se extrajeron con éter etílico (10 ml por cada hoja) durante 24 horas. El extracto etéreo se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Al residuo obtenido se agregó 24-metilencolesterol frío (5-8 mg), se adsorbió sobre silicagel (D) y la pastilla se sembró en una columna de silicagel (D). Se eluyó con hexano:AcOEt (50:50) separándose una fracción que contenía 24-metilencolesterol y otros esteroides. Por elución con acetato de etilo se separó la fracción que contenía withanólidos. Se evaporó el solvente y el residuo obtenido se disolvió en metanol (1 ml) y se fraccionó por CLAR fase reversa en una columna Whatman ODS-2\* (250x4,6 mm) (en las experiencias 1 y 2) ó en una columna Altex Ultrasphere ODS<sup>o</sup> 5 µm (250x10 mm) (en las experiencias 3 y 4). Se eluyó con metanol:agua (70:30), flujo\*: 1 ml/min, flujo<sup>o</sup>: 3 ml/min. Las fracciones correspondientes a jaborosalactona D (27c) (tr\*=5,3, tr<sup>o</sup>=7,8), withaferina A (8) (tr\*=6,6, tr<sup>o</sup>=8,2) y jaborosalactona A (11) (tr\*=15,0, tr<sup>o</sup>=17,3) se colectaron y evaporaron a sequedad. Cada withanólido se sometió a una segunda purificación por CLAR en las condiciones anteriores, observándose en el cromatograma correspondiente un sólo pico correspondiente al tiempo de retención del withanólido en cuestión. Se midió la radioactividad del withanólido puro aislado. En las experiencias de doble marcación se aisló el 24-metilencolesterol presente en la fracción eluida con acetato de etilo:hexano (50:50) a partir del extracto crudo por CLAR en fase reversa, columna Altex Ultrasphere ODS 5 µm , eluyendo con acetonitrilo:AcOEt:hexano (2:2:1), flujo: 3 ml/min, tr=10,8) (ver pág. 127).

## METODOS COMPUTACIONALES

Los programas fueron ejecutados bajo Microsoft DOS 3.30 en una computadora IBM PS/2 30 con procesador Intel 8086 (8 MHz), coprocesador matemático Intel 8087, 640 K de memoria principal, 128 K de memoria de pantalla y 200 K de memoria auxiliar, disco rígido de 3,5" (20 Mb), disco flexible de 3,5" (720 Kb), monitor color de alta resolución, tarjeta gráfica MCGA operando en modo VGA monocromático (640 x 480 fixels) para la presentación de gráficos de alta resolución y un dispositivo puntero tipo "ratón". La impresión de gráficos se realizó en una impresora IBM Proprinter 4202.

PCMODEL (versión 2.0) es una versión para 300 átomos del programa MODEL (versión VAX 1.1) de C. Still, Universidad de Columbia. Fue modificado por Kosta Steliu Universidad de Montreal y adaptado para IBM-PC y compatibles por M.M. Midland, Riverside, Universidad de California. Las modificaciones tratan principalmente de hacer la estructura de archivos del PCMODEL compatible con MMX, MM2, MNDO y MOPAC, agregando algunas características mejoradas del MMX y también mejoras en los gráficos. Aunque se hace una referencia explícita a los programas de Allinger MM2 y MMP2 (QCPE) a lo largo de todo el PCMODEL, tanto MM2 como MMP2, en sus formas actuales, no logran manejar muchos detalles que el PCMODEL les atribuye.

PCMODEL es un programa de modelado molecular interactivo el cual utiliza la mayoría de las características del programa MMX excepto para cálculos pi VESCF y analizador de ángulos diedros. El

### Aislamiento de los withanólidos marcados

Las hojas inoculadas se lavaron con agua y se extrajeron con éter etílico (10 ml por cada hoja) durante 24 horas. El extracto etéreo se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente. Al residuo obtenido se agregó 24-metilencolesterol frío (5-8 mg), se adsorbió sobre silicagel (D) y la pastilla se sembró en una columna de silicagel (D). Se eluyó con hexano:AcOEt (50:50) separándose una fracción que contenía 24-metilencolesterol y otros esteroides. Por elución con acetato de etilo se separó la fracción que contenía withanólidos. Se evaporó el solvente y el residuo obtenido se disolvió en metanol (1 ml) y se fraccionó por CLAR fase reversa en una columna Whatman ODS-2\* (250x4,6 mm) (en las experiencias 1 y 2) ó en una columna Altex Ultrasphere ODS<sup>o</sup> 5 µm (250x10 mm) (en las experiencias 3 y 4). Se eluyó con metanol:agua (70:30), flujo\*: 1 ml/min, flujo<sup>o</sup>: 3 ml/min. Las fracciones correspondientes a jaborosalactona D (27c) (tr\*=5,3, tr<sup>o</sup>=7,8), withaferina A (8) (tr\*=6,6, tr<sup>o</sup>=8,2) y jaborosalactona A (11) (tr\*=15,0, tr<sup>o</sup>=17,3) se colectaron y evaporaron a sequedad. Cada withanólido se sometió a una segunda purificación por CLAR en las condiciones anteriores, observándose en el cromatograma correspondiente un sólo pico correspondiente al tiempo de retención del withanólido en cuestión. Se midió la radioactividad del withanólido puro aislado. En las experiencias de doble marcación se aisló el 24-metilencolesterol presente en la fracción eluida con acetato de etilo:hexano (50:50) a partir del extracto crudo por CLAR en fase reversa, columna Altex Ultrasphere ODS 5 µm , eluyendo con acetonitrilo:AcOEt:hexano (2:2:1), flujo: 3 ml/min, tr=10,8) (ver pág. 127).

programa está diseñado de manera que resulte fácil de utilizar y tiene una variedad de opciones para crear y presentar estructuras, así como opciones de presentación y cálculo de superficies moleculares, superposición de conformeros, cálculo de constantes de acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (ecuación de Altona), etc.

El programa MMX deriva del MM2 (QCPE 395) con las subrutinas pi del MMP1 (QCPE 318) incorporadas. Está basado en el MM2P de D. Roher, adaptado a Microsoft Fortran 77 V 4.0 por J.J Gajewski y K.E. Gilbert. Incluye además rutinas pi ampliadas y de convergencia rápida. Incorpora constantes del MODEL V 1.3 (Clark Still) y tiene una capacidad máxima de 128 átomos. El programa opera en forma no interactiva y es complementario del PCMODEL. El campo de fuerza MMX utilizado por PCMODEL y MMX es una extensión del MM2 de Allinger [80] que incorpora el concepto de parámetros generalizados de C. Still, permitiendo el cálculo de una gran variedad de estructuras. La versión utilizada reconoce 60 tipos de átomos incluyendo radicales, aniones, cationes, metales de transición y átomos de estados de transición.

Los programas PCMODEL (V 2.0) y MMX fueron adquiridos a Serena Software, Blomington, Indiana.

Los datos de radioactividad en experiencias de doble marcación fueron procesados con el programa H3/C14. Las curvas de calibración fueron construidas con Lotus 123 Microsoft V 2.0. H3/C14 fue escrito en QuickBasic Microsoft 4.0 y compilado como archivo ejecutable. El código fuente se indica a continuación.

```

REM *****H3/C14 por G. Burton*****
start: CLS
INPUT "eficiencia C-14 en canal 1"; C1
INPUT "eficiencia C-14 en canal 2"; C2
INPUT "eficiencia Tritio en canal 1"; T1
INPUT "eficiencia Tritio en canal 2"; T2
INPUT "cuentas en canal 1"; CPM1
INPUT "cuentas en canal 2"; CPM2

CLS : PRINT "Eficiencia C-14 "; C1; C2
PRINT "Eficiencia Tritio "; T1; T2
PRINT "Cuentas "; CPM1; CPM2

A = C1 / C2; B = T2 / T1
DPNC = (CPM2 - B * CPM1) * 100 / (C2 * (1 - A * B))
DPMT = (CPM1 - A * (CPM2 - B * CPM1)) * 100 / ((1 - A * B) * T1)

PRINT "DPM tritio: "; DPMT
PRINT "DPM C-14: "; DPNC
PRINT "T/C: "; DPMT / DPNC

INPUT "calcular otro dato (S/N)"; Q$
IF Q$ = "S" OR Q$ = "s" THEN GOTO start
END

```

El cálculo de planos de cuadrados mínimos se realizó con el programa PLANOS (V 89.1). Este permite calcular a partir de un archivo en formato MMX (obtenido por PCMODEL o MMX) el mejor plano para un grupo de átomos, determinar desviaciones de átomos a los planos calculados y ángulos entre planos. El programa fue escrito en QuickBasic Microsoft V 4.0 y compilado como archivo ejecutable. El código fuente se indica a continuación.



```

REM *****PLANOS V 89.1 por G. Burton (26-4-89)*****
DECLARE SUB angulo (aa1!, aa2!, bb1!, bb2!, ang1!)
DECLARE SUB desv (a1!, b1!, c1!, cord1!, cord2!, cord3!, des1!)
DECLARE SUB leer (l$)
DECLARE SUB numero (a!, b!, LI$, num!)
ON ERROR GOTO handler
REM $STATIC
SCREEN 0: COLOR 2, 0: CLS : arch% = 0: KILL "planos.out"
PRINT "          CALCULO DE PLANOS DE CUADRADOS MINIMOS": PRINT
start: INPUT "Nombre del archivo"; AR$: IF AR$ = "" THEN END
arch% = 1: OPEN AR$ FOR INPUT AS #1
OPEN "planos.out" FOR APPEND AS #2
PRINT #2, "PLANOS 89.1"
PRINT #2, "          CALCULO DE PLANOS DE CUADRADOS MINIMOS": PRINT #2,
CALL leer(LI$): CALL numero(61, 65, LI$, ncom): NOMES = LEFT$(LI$, 60)
PRINT #2, AR$: PRINT #2, NOMES
lab1:
FOR j = 1 TO 2
    CALL leer(LI$)
NEXT j
IF LEFT$(LI$, 1) <> " " THEN CALL leer(LI$)
CALL numero(1, 5, LI$, ncon)
CALL numero(26, 30, LI$, natch)
IF natch MOD 8 > 0 THEN ncon = 1 + ncon + INT(natch / 8) ELSE ncon = ncon + natch / 8

FOR j = 1 TO ncon
    INPUT #1, LI$
NEXT j

DIM cord(ncom, 3)
FOR j = 1 TO ncom STEP 2
    IF EOF(1) THEN GOTO lab2
    FOR k = 1 TO 3
        INPUT #1, cord(j, k)
    NEXT k
    INPUT #1, junk1, junk2
    IF EOF(1) OR j + 1 > ncom THEN GOTO lab2
    FOR k = 1 TO 3
        INPUT #1, cord(j + 1, k)
    NEXT k
    INPUT #1, junk1, junk2
lab2: NEXT j

DIM plano(ncom, 10): DIM aa(10): DIM bb(10): DIM cc(10): pl = 1
lab3: tnp = 1: j = 1
WHILE tnp <> 0
    INPUT "atomo para calcular plano medio (0 para terminar)"; tnp
    plano(j, pl) = tnp: j = j + 1
WEND

```

```

xm = 0: ym = 0: zm = 0: n = 0
FOR j = 1 TO natom
  IF plano(j, pl) <> 0 THEN
    xm = cord(plano(j, pl), 1) + xm
    ym = cord(plano(j, pl), 2) + ym
    zm = cord(plano(j, pl), 3) + zm
    n = n + 1
  END IF
NEXT j
xm = xm / n: ym = ym / n: zm = zm / n
u2 = 0: v2 = 0: uv = 0: uz = 0: vz = 0
FOR j = 1 TO natom
  IF plano(j, pl) = 0 THEN GOTO lab4
  u2 = u2 + (cord(plano(j, pl), 1) - xm) ^ 2
  v2 = v2 + (cord(plano(j, pl), 2) - ym) ^ 2
  uv = uv + (cord(plano(j, pl), 1) - xm) * (cord(plano(j, pl), 2) - ym)

  uz = uz + (cord(plano(j, pl), 1) - xm) * cord(plano(j, pl), 3)
  vz = vz + (cord(plano(j, pl), 2) - ym) * cord(plano(j, pl), 3)
lab4: NEXT j
d = u2 * v2 - uv ^ 2
a = (uz * v2 - uv * vz) / d: b = (vz * u2 - uv * uz) / d: c = zm - a * xm - b * ym
aa(pl) = -a / b: cc(pl) = -c / b: bb(pl) = 1 / b
CLS: PRINT "mejor plano para los atomos"
FOR j = 1 TO natom
  IF plano(j, pl) <> 0 THEN PRINT plano(j, pl); " ";
NEXT j
PRINT: PRINT: PRINT "Ecuación del plano A * x - y + B * z + C = 0"
PRINT "A="; aa(pl): PRINT "B="; bb(pl): PRINT "C="; cc(pl): PRINT
INPUT "Desea calcular desviaciones al plano (S/N)"; Q$
IF Q$ = "N" OR Q$ = "n" THEN GOTO lab6
PRINT "CALCULO DE DESVIACIONES DE ATOMOS RESPECTO DEL PLANO"
PRINT
lab31: DIM atomos(natom): tnp = 1: j = 1
WHILE tnp <> 0
  INPUT "atomo para calcular desviacion (0 para terminar)"; tnp
  atomos(j) = tnp: j = j + 1
WEND
IF atomos(1) = 0 THEN GOTO lab5

PRINT #2, "  Desviaciones del plano medio definido por los atomos"
FOR j = 1 TO natom
  IF plano(j, pl) <> 0 THEN PRINT #2, plano(j, pl); " ";
NEXT j
PRINT #2, : PRINT #2,
FOR j = 1 TO natom
  IF atomos(j) = 0 THEN GOTO lab5
  CALL desv(aa(pl), bb(pl), cc(pl), cord(atomos(j), 1), cord(atomos(j), 2), cord(atomos(j), 3), des)
  PRINT #2, USING "##"; atomos(j); : PRINT USING "##"; atomos(j);
  PRINT #2, "      "; : PRINT "      ";
  PRINT #2, USING "+###.#####"; des: PRINT USING "+###.#####"; des
lab5: NEXT j

```

```

PRINT #2, : PRINT #2, : PRINT : INPUT "Desea calcular otras desviaciones (N/S)"; Q$
CLS : IF Q$ = "S" OR Q$ = "s" THEN ERASE atomos: GOTO lab31
lab6: IF p1 = 10 THEN GOTO lab7
PRINT : PRINT "Desea calcular otro plano para "; AR$; " (S/N)"; : INPUT ""; Q$
CLS : IF Q$ <> "N" AND Q$ <> "n" THEN p1 = p1 + 1: ERASE atomos: GOTO lab3
IF p1 = 1 THEN GOTO fin
lab7: PRINT "CALCULO DE ANGULOS ENTRE PLANOS"
PRINT
PRINT "Planos disponibles:"
FOR k = 1 TO p1
  PRINT "plano "; k; ": "; : PRINT #2, "plano "; k; ": ";
  FOR j = 1 TO natom
    IF plano(j, k) <> 0 THEN PRINT plano(j, k); " "; : PRINT #2, plano(j, k);
  NEXT j
  PRINT : PRINT #2,
NEXT k
IF p1 = 2 THEN j = 1: k = 2: GOTO lab81
lab8: INPUT "angulo entre planos (#,#; 0,0 para terminar)"; j, k
IF j = 0 OR k = 0 THEN GOTO fin
lab81: CALL angulo(aa(j), aa(k), bb(j), bb(k), ang)
PRINT #2, "angulo entre planos "; j; "/" ; k; " "; : PRINT #2, USING "+###.##"; ang; : PRINT #2, "":
PRINT USING "+###.##"; ang; : PRINT "": PRINT
IF p1 = 2 THEN GOTO fin ELSE GOTO lab8

fin:
PRINT #2, : PRINT #2, "fin de "; NOMB$
PRINT #2, "*****"
PRINT #2,
CLOSE #1: CLOSE #2
PRINT : PRINT : INPUT "desea calcular otra molcula (S/N)"; Q$
IF Q$ <> "N" AND Q$ <> "n" THEN ERASE cord, plano, atomos, aa, bb, cc: CLS : GOTO start
lab9: PRINT : INPUT "Imprimir los datos antes de salir (S/N)"; Q$
SELECT CASE Q$

  CASE "N", "n"
  END
  CASE "S", "s"
  SHELL "COPY planos.out prn"
  CASE ELSE
  GOTO lab9
END SELECT
END

```

```

handler: xx = ERR
      IF xx = 53 AND arch% = 0 THEN
          RESUME NEXT
      ELSEIF xx = 53 AND arch% = 1 THEN
          PRINT "el archivo no existe"
          RESUME start
      ELSE
          ERROR xx
          ON ERROR GOTO 0
      END IF

```

```

SUB angulo (aa1, aa2, bb1, bb2, ang1)
REM angulos entre -90 y +90
coseno = (aa1 * aa2 + bb1 * bb2 + 1)
seno = SQR((bb1 - bb2) ^ 2 + (bb1 * aa2 - aa1 * bb2) ^ 2 + (aa2 - aa1) ^ 2)
IF aa2 > aa1 OR (aa2 = aa1 AND bb2 < bb1) THEN seno = -seno
IF coseno = 0 AND seno = 1 THEN
    ang1 = 90
ELSEIF coseno = 0 AND seno = -1 THEN
    ang1 = -90
ELSE ang1 = ATN(seno / coseno) * 180 / 3.14159265#
END IF
END SUB

```

```

SUB desv (a1, b1, c1, cord1, cord2, cord3, des1)
des1 = -(a1 * cord1 - cord2 + cord3 * b1 + c1) / SQR(a1 ^ 2 + b1 ^ 2 + 1)
END SUB

```

```

SUB leer (l%)
l$ = "": S$ = ""
WHILE S$ <> CHR$(10)
    S$ = INPUT$(1, #1): l$ = l$ + S$
WEND
END SUB

```

```

SUB numero (a, b, LI1$, num1)
n$ = ""
FOR i = a TO b
    TEMP$ = MID$(LI1$, i, 1): IF TEMP$ <> " " THEN n$ = n$ + TEMP$
NEXT i
IF n$ <> "" THEN num1 = VAL(n$) ELSE num1 = 0
END SUB

```

**RESUMEN**

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue por una lado comprobar la intervención de 24-metilencolesterol como precursor de withanólidos en *Acnistus breviflorus* y mediante experimentos de doble marcación con este trazador isotópicamente marcado con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  determinar si la cadena lateral del mismo hasta carbono 24 se conservaba en su camino a withanólidos. Para llevar a cabo este estudio se requería sintetizar al mencionado esteroles marcado con  $^{14}\text{C}$  en carbono 24 y con  $^3\text{H}$  en alguna posición del núcleo esteroles no modificable en su conversión a withanólidos.

Por otra parte se tuvo como objetivo el aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de tres especies del género *Jaborosa* dado que el aporte de nuevas estructuras permite en muchos casos la postulación de rutas biosintéticas que involucran a esos compuestos como posibles intermediarios, contribuyendo además a la taxonomía del género.

Los temas desarrollados en esta tesis fueron:

1- Introducción. En este capítulo se dan ejemplos de los principales sistemas de sustitución encontrados en los withanólidos de esqueleto esteroles no modificado y se describen además otros compuestos agrupados también bajo el nombre genérico de withanólidos cuyas características comunes son un esqueleto básico, modificado o no, del tipo ergostano y distintos grados de oxidación en los carbonos 1, 22 y 26. Se mencionan, además, las propiedades biológicas de algunos withanólidos y se resumen los antecedentes biosintéticos relacionados con la intervención de distintos este-

roles en la biosíntesis de estos compuestos así como las experiencias relacionadas a la formación de la cadena lateral de los mismos.

2- Withanólidos en *Jaborosa bergii*, *Jaborosa leucotricha* y *Jaborosa odonelliana*. En primer lugar se hace una breve referencia a los métodos utilizados anteriormente en la separación de withanólidos. Luego se describe el aislamiento y elucidación estructural de estos compuestos de las tres especies mencionadas.

A partir de *Jaborosa bergii* fueron aislados y caracterizados por métodos químicos y espectroscópicos 5 nuevos withanólidos de tipo 24,25-epoxilactoles. Los mismos poseían una estructura 14 $\beta$ ,17 $\beta$  hidroxilada no descrita anteriormente en la literatura de esteroides. Por otro lado se analizó el comportamiento por CLAR de los withanólidos mayoritarios aislados de esta especie y se realizó un estudio de la conformación de la cadena lateral de dos de estos compuestos comparando los resultados obtenidos con los valores de constantes de acoplamiento medidas experimentalmente.

De la parte aérea de *Jaborosa leucotricha* se aislaron dos withanólidos, uno de los cuales se identificó como jaborosalactona L (aislado anteriormente por Giordano y col.) y otro que se caracterizó como el 19-hidroxi-2,3-dehidroderivado del anterior, resultando el primer withanólido natural 19-hidroxilado. Se estudió también, por primera vez, el extracto de los frutos de esta especie del cual se aisló jaborosalactona L y mediante el programa computacional anteriormente mencionado se analizó la conformación de la cadena lateral del withanólido nuevo aislado.

A partir de *Jaborosa odonelliana* se aisló y caracterizó por métodos químicos, espectroscópicos y de difracción de rayos X un withanólido de estructura novedosa que resultó el primer withanólido natural de tipo espiránico.

3- Síntesis de 24-metilencolesterol [24-<sup>14</sup>C] y [7-<sup>3</sup>H]. Se desarrolló un camino de síntesis de 24-metilencolesterol [24-<sup>14</sup>C] a partir de 20 $\beta$ -carboxaldehídropregn-4-en-3-ona (61) comercial. La marcación isotópica se introdujo a partir de bromoacetato de etilo [1-<sup>14</sup>C] obteniéndose un rendimiento radioquímico total de 47%. La secuencia descrita permite no sólo obtener el esteroI mencionado sino que provee un método eficiente de síntesis de ácido 3 $\beta$ -hidroxicolénico [24-<sup>14</sup>C] y de acetato de 24-cetocolesterol [24-<sup>14</sup>C].

Resultaron especialmente exitosas las reacciones de obtención de 3-oxocola-4,22-dien-24-oato de etilo mediante una reacción de Wittig entre 61 y carbetoXimetilentrifenilfosforano en acetoni-trilo, la reacción de obtención de acetato de 24-cetocolesterol a partir del cloruro del ácido 3 $\beta$ -acetoxicolénico y un reactivo organocádmico de tipo "ate-complex" y la inserción de un grupo metileno en condiciones de no enolización para la obtención de 24-metilencolesterol.

En lo referente a la obtención del esteroI [7-<sup>3</sup>H] resultó especialmente interesante la introducción del tritio en posición 7 por reacción del acetato de 7-bromo-24-cetocolesterol con un cianoborohidruro de sodio modificado con cloruro de zinc.

4- Estudios de biosíntesis de withanólidos. Se confirmó la



existencia de la ruta alternativa encontrada en la biosíntesis de withanólidos en *Acnistus breviflorus* mediante el aislamiento del carbono 26 de jaborosalactona A marcada, biosintetizada a partir de mevalonolactona [2- $^{14}\text{C}$ ]. El carbono 26 se aisló como benzofenona a partir de **84** y como ácido benzoico a partir de **83**. Se comprobó la intervención de 24-metilencolesterol como precursor de withanólidos en *Acnistus breviflorus* mediante experiencias de incorporación del esteroil marcado con  $^{14}\text{C}$  en la posición 24. Se realizaron experimentos de doble marcación con este precursor marcado con  $^3\text{H}$  en la posición 7 y con  $^{14}\text{C}$  en la posición 24 ( $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  0,7) observándose que los withanólidos y el 24-metilencolesterol aislados de las hojas inoculadas presentaban la misma relación  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  que el esteroil precursor. De esta forma se pudo establecer que la cadena lateral de 24-metilencolesterol hasta carbono 24 no se pierde en su biotransformación a withanólidos.

5- Parte experimental. Se describe la parte experimental de la labor realizada que incluye los datos numéricos de los espectros de los compuestos descritos y no incluidos en tablas.

Parte de este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones:

"Biosynthesis of Withanolides in *Achistus breviflorus*. Chemical Degradation of <sup>14</sup>C-Labelled Jaborosalactone A and Withaferin A".  
*Z. Naturforsch.*, **42b**, 1471 (1987).

Edith S. Monteagudo, Adriana S. Veleiro, Gerardo Burton and Eduardo G. Gros.

"14 $\beta$ ,17 $\beta$ -Dihydroxywithanolides from *Jaborosa bergii*".  
*Phytochemistry*, **27**, 3925 (1988).

Edith S. Monteagudo, Gerardo Burton, Claudia M. Gonzalez, Juan. C. Oberti and Eduardo G. Gros.

"A 19-hydroxywithanolide from *Jaborosa leucotricha*".  
*Phytochemistry*, en prensa.

Edith S. Monteagudo, Gerardo Burton, Eduardo G. Gros, Claudia M. Gonzalez and Juan C. Oberti.

"A withanolide from *Jaborosa odonelliana*".  
*Phytochemistry*, en prensa.

Edith S. Monteagudo, Juan C. Oberti, Eduardo G. Gros and Gerardo Burton.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Kirson I., Glotter E., Abraham A., Lavie D., *Tetrahedron*, **26**, 2209 (1970).
2. Kurup P. A., *Current. Sc. (India)*, **25**, 57 (1956); *Chem. Abstr.* **50**, 10344h (1956).
3. Yarden A., Lavie D., *J. Chem. Soc. (c)*, 2925 (1962).
4. Glotter E., Kirson I., Lavie D., Abraham A., *Bioorganic Chemistry*, vol. 2, Academic Press, New York, 57-95 (1978).
5. Kirson I., Glotter E., *J. Nat. Prod.*, **44**, 633 (1981).
6. Row L. R., Deddy K. S., Sarma N. S., Matsmira T., Nakashima R., *Phytochemistry*, **19**, 1175 (1981).
7. Veleiro A. S., tesis doctoral (1985).
8. Nittala S. S., Lavie D., *Phytochemistry*, **20**, 2735 (1981).
9. Eastwood F. Kirson I., Lavie D., Abraham A., *Phytochemistry*, **19**, 1503 (1980).
10. Bagghi A., Neogi P., Sahai M., Ray A. B., Oshima Y., *Phytochemistry*, **23**, 853 (1984).
11. Row L. R., Deddy K. S., Dhaneji K. Matsmira T., *Phytochemistry*, **23**, 427 (1984).
12. V. Velde, Lavie D., Budhiraja R. D., Sudhir S., Garg K. N., *Phytochemistry*, **22**, 2253 (1983).
13. V. Velde, Lavie D., *Phytochemistry*, **21**, 731 (1982).
14. Sahai M. Ali A., Ray A. B., Slatkin D. J., Kirson I., *J. Chem. Res. (S)*, 152 (1983).
15. Ramaiah P. A., Lavie D. Budhiraja R., Sudhir S., Garg K. N., *Phytochemistry*, **23**, 143 (1984).
16. Gonzalez A. G., Bretón J. L., Trujillo J., *An. Quim. Real Soc. Esp. Fis. y Quim.*, **70**, 69 (1974).

17. Gonzalez A. G., Bretón J. L., Trujillo J., *An. Quim. Real Soc. Esp. Fis. y Quim.*, **70**, 64 (1974).
18. Kirson I., Glotter E., Ray A. B., Ali A., Gottlieb H. E., Sahai M., *J. Chem. Res. (S)*, 120 (1983).
19. Günter N., Nguen Quyet Chien, Ngugen Hun Khoi, *Phytochemistry*, **23**, 2293 (1984).
- 20a. Lavie D., Bessalle R., Pestchanker M. J., Gottlieb H. E., Frolow F., Giordano O. S., *Phytochemistry*, **26**, 1791 (1987).
- 20b. Parvez M., Fajardo V., Shamma M., *Acta Crystallogr. C-Cryst STR*, **44**, 553 (1988).
21. Oshima Y., Bagghi A., Hikino H., *Tetrahedron Lett.*, **28**, 2025 (1987).
22. Fajardo V., Freyer A. J., Minard R. D., Shamma M., *Tetrahedron*, **43**, 3875 (1987).
23. Ksebati M., Schmitz F., *J. Org. Chem.*, 3926 (1988).
24. Barboza G., Hunziker A., *Kurtziana*, **19**, 77 (1987).
25. Tschesche R., Schwang H., Fehlhaber H. W., Swatzke G., *Tetrahedron*, **22**, 1121 (1966).
26. Tschesche R., Schwang H., Fehlhaber H. W., Swatzke G., *Tetrahedron*, **22**, 1129 (1966).
27. Tschesche T., Schwang H., Legler G., *Tetrahedron*, **24**, 5169 (1968).
28. Tschesche T., *Chem. Ber.*, **104**, 3556 (1971).
29. Tschesche T., *Tetrahedron*, **28**, 1909 (1972).
30. Lavie D., Gottlieb H. E., Pestchanker H. J., Giordano O. S., *Phytochemistry*, **25**, 1765 (1986).

31. Power F. B., Salway A. H., *J. Chem. Soc.*, **99**, 490 (1911).
32. Kupchan S. M., Doskotch K. W., Boellinger P., McPhail A. T., Sun G. A., Saenz Renauld J. A., *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 5805 (1965).
33. Kupchan S. M., Anderson W. K., Bollinger P., McPhail A. T., Doskotch R. W., Smith R. M., Saenz Renauld J. A., Schnoer H. K., Burligame A. L., Smith D. H., *J. Org. Chem.*, **34**, 3858 (1969).
34. Shohat B., Gitter S., Abraham A., Lavie D. *Cancer Chemother. Rep.*, **51**, 271 (1967); *Chem. Abstr.*, **67**, 105691h (1967).
35. Shohat B., Gitter S., Lavie D., *Int. J. Cancer*, **5**, 244 (1970); *Chem. Abstr.*, **72**, 109573b (1970).
36. Shohat B., *Krebsforsch. Kem. Onkol.*, **80**, 97 (1973); *Chem. Abstr.*, **80**, 103803v (1974).
37. Yoshida M., Hoshi A., Kuretam K., Ishiguro H., Ikekawa N., *J. Pharmacobiol. Dyn.*, **2**, 92 (1979); *Chem. Abstr.*, **91**, 49276n (1979).
38. Kurup P. A., *Antibiot. Chemotherapy*, **8**, 511 (1958); *Chem. Abstr.*, **53**, 1458e (1959).
39. Kurup P. A., Mohan Das J., *Naturwissenschaften*, **50**, 603 (1953).
40. Ben-Efraim S., Yarden A., *Antibiot. Chemotherapy*, **12**, 576 (1962); *Chem. Abstr.*, **58**, 1718h (1963).
41. Sthi P. D., Candram P. C., Sharma K. B., Subramanian S. S., *Indian J. Pharm.*, **36**, 122 (1974); *Chem. Abstr.*, **82**, 119459q (1975).
42. Fugner A., *Arzniem. Forsh.*, **23**, 932 (1973); *Chem. Abstr.*,

- 79, 142880s (1973).
43. Shohat B., Kirson I., Lavie D., *Biomedicine*, **28**, 18 (1978);  
*Chem. Abstr.*, **89**, 70864w (1978).
44. Cordell, G. A., Farusworth N. R., *Lloydia*, **40**, 1 (1977).
45. Chrowdhurry K., Nevgy R. K., *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 919  
(1975); *Chem. Abstr.*, **83**, 108.297e (1975).
46. Das Gupta L. R., Sethi P. D., Sharma K. B., Subramanian S. S.,  
*Indian J. Pharm.*, **32**, 79 (1970); *Chem. Abstr.*, **73**.  
63549p (1970).
47. Nicholas A. W., Rosazza J. P., *Bioorganic Chemistry*, **5**, 367  
(1976); *Chem. Abstr.*, **86**, 133769e (1977).
48. Rosazza J. P., Nicholas A. W., Gustafson M. E., *Steroids*,  
**31**, 671 (1978); *Chem. Abstr.*, **89**, 105843t (1978).
49. Shohat B., Gitter S., Lavie D., *Proc. Internat. Symp on Plant  
toxins*, 2°, 769 (1970), editores de Vries A., Korchwa E.,  
Gordon y Breach, New York; *Chem. Abstr.*, **82**, 1330675  
(1975).
50. Asher K. R. S., Nemmy N. E., Eliyahn M., Kirson J., Abraham A.,  
Glotter E., *Experientia*, **36**, 998 (1980).
51. Budhiraja R. D., Sudhir S., Garg K. N., *Planta Medica*, 134  
(1984).
52. Abraham A., Kirson I., Lavie D., Glotter E., *Phytochemistry*,  
**14**, 189 (1975).
53. Glotter E., Kirson I., Abraham A., Lavie D., *Tetrahedron*,  
**29**, 1353 (1973).
54. Subramanian S. S., Sethi P. D., Glotter. E., Kirson I., Lavie  
D., *Phytochemistry*, **10**, 685 (1971).

55. Kirson I., Glotter E., Lavie D., Abraham A., *J. Chem. Soc. (c)*, 2032 (1971).
56. Lockley W. J. S., Roberts D. P., Rees H. H., Goodwin T. W., *Tetrahedron Lett.*, 3773 (1974).
57. Yn P.L.C., El-Ohmy M. M., Stohs., S. J., *Lloydia*, 37, 593 (1974).
58. Lockley W. J. S., Rees H. H., Goodwin T. W., *Phytochemistry*, 5, 937 (1976).
59. Begley M. J., Crombie L., Harm P. J, Whiting D. A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1108 (1972).
60. Bates R. B., Morehead S. R., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 125 (1974).
61. Begley M. J., Crombie L, Harm P. J., Whitting D. A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 82 (1973).
62. Kirson I., Gottlieb H. E., Glotter E., *J. Chem. Res. (S)*, 125 (1980), (M) 2134 (1980).
63. Seo S., Uomori A., Yorshinura Y, Takeda K., *J. Amer. Chem. Soc.*, 105, 6343 (1983).
64. Veleiro A. S., Burton G., Gros E. G., *Phytochemistry*, 24, 2263 (1985).
65. Gill H., Smith R. W., Whiting D. A., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1457 (1986).
66. Bukovits G. J., Gros E. G., *An. Asoc. Quím. Argentina*, 69, 7 (1981).
67. Gustafson M. E., Nicholas A. W., Rosazza J. P., *J. Chromatography*, 137, 465 (1977).
68. Hunter I., Walden M., Heftmann E., Glotter E., Kirson I., *J.*



- Chromatography, **170**, 437 (1979).
69. Tishbee A., Kirson I., *J. Chromatography*, **95**, 425 (1980).
  70. Burton G., Veleiro A. S., Gros E. G., *J. Chromatography*, **248**, 472 (1982).
  71. Burton G., Veleiro A. S., Gros E. G., *J. Chromatography*, **315**, 435 (1984).
  72. Glotter E., Abraham A., Gunzberg G., Kirson I., *J. Chem. Soc. PT I*, 341 (1974).
  73. Shoolery J. N., *J. Nat. Prod.*, **47**, 226 (1984).
  74. Gottlieb H. E., Kirson I., *Org. Magn. Res.*, **16**, 20 (1981).
  75. Nittala S. S., Lavie D., *Phytochemistry*, **20**, 2735 (1981).
  76. Glotter E., Sahai M., Kirson I., Gottlieb H. E., *J. Chem. Soc. PT I*, 2241 (1985).
  77. Glotter E. Krinsky P., Kirson I., *J. Chem. Soc. PT I*, 669 (1976).
  78. Kirson I., Gottlieb H. E., *J. Chem. Res. (M)*, 4275 (1980).
  79. Ramachandra L., Row K., Sambhi K., Deddy K., Dhaweji K., Matsmira T., *Phytochemistry*, **23**, 427 (1984).
  80. Allinger N. L, Yuh Y. H., *QCPE*, **12**, 395 (1980); Profeta S. Jr., *QCPE Bull.*, **1**, 57 (1981).
  81. Freeman P. K., *J. Amer. Chem. soc.*, **111**, 1942 (1989).
  82. Altona C., Geise H. J., Romers C., *Tetrahedron*, **24**, 13 (1968).
  - 83a. Idler D. R., Fagerlund U. H. M., *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 1988 (1957).
  - 83b. Idler D. R., Fagerlund U. H. M., *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 4142 (1955).

84. Fagerlund U. H. M., Idler D. R., *J. Org. Chem.*, **21**, 372 (1956).
85. Dusza J. P., *J. Org. Chem.*, **25**, 93 (1960).
86. Bottin J., Fetizon M., *J. Label. Compounds*, **7**, 305 (1971).
87. Giner J. L., Christian M., Djerassi C., *J. Org. Chem.*, **54**, 2117 (1989).
88. Riegel B., Kaye I. A., *J. Amer. Chem. Soc.*, 723 (1944).
89. Lin, Y. Y., Smith, L.L., *J. Label. Compounds*, **10**, 451 (1974).
90. Smith, L. L., Dhar A. K., Gilchrist J. L., Lin Y. Y., *Phytochemistry*, **12**, 2727 (1973).
91. Ercoli A., De Rugeri P., *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 3284 (1953).
92. Van Aller R. T., Chikamatsu H., De Souza N. J., John J. P., Nes W. R., *J. Biol. Chem.*, **244**, 6645 (1969).
93. Osamu N., Kenji I., Hideki T., *Chem. Abstr.*, **91**, 141103b (1979).
94. Rutzicka L., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta*, **18**, 986 (1935).
95. Kucera J., Sorm F., *Colln. Czech. Chem. Commun.*, **23**, 116 (1958).
96. Meystre C., Frey H., Neher R., Wettstein A., Miescher K., *Helv. Chim. Acta*, **29**, 627 (1946).
97. Meystre C., Wettstein A., Miescher K., *Helv. Chim. Acta*, **30**, 1022 (1947).
98. Levin R. H., McIntosh Jr. A. V., Spero G. B., Rayman D. E., Meinzer E. M., *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 511 (1948).

99. Joly R. A., Sauer H. H., Bonner J., *J. Label. Compounds.*, **5**, 80 (1969).
100. Fieser L. F., Fieser M., *Steroids*, Reinhold, New York, 509, (1959).
101. Bergstrom S., Pääbo K., *Acta Chem. Scand.*, **9**, 699 (1955).
102. Burton G., Gros E. G., *J. Steroid Biochem.*, **8**, 69 (1977).
103. Burton G., Gros E. G., *J. Label. Compounds Radiopharm.*, **13**, 627 (1976).
104. Keiichiro Fukumoto, Koji Suzuki, Hideo Nemoto, *Tetrahedron*, **38**, 3701 (1982).
105. Bergmann E. D., Solomonovici A., *Steroids*, **27**, 431 (1976).
106. Isler O., Gutmann H., Montavon M., Rüegg R., Ryser G., Zeller P., *Helv. Chim. Acta*, **40**, 1242.
107. Byon C. Y., Gut M., Lai C. K., *J. Label. Compounds.*, **21**, 65 (1983).
108. March J., *Adv. Organic Chemistry*, McGraw Hill (1977).
109. Anderson R. C., Fraser-Reid B., *J. Org. Chem.*, **50**, 4781 (1985).
110. Luche J. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 2226 (1978).
111. Belleau B., Gallagher T. F., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 4458 (1951).
112. Dauben W. G., Eastham J., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 4463 (1951).
113. Schneider J. J., *Tetrahedron*, **28**, 2717 (1972).
114. Cahiez G., Masuda A., Bernard D., Normant J. F., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 3155 (1976).
115. Cahiez G., *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1239 (1981).

- 116a. Sato F., Inoue M., Oguro K., Sato M., *Tetrahedron Lett.*, **20**, 4303 (1979).
- 116b. Eberle, Khale, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2303 (1980).
117. Cason J., *J. Org. Chem.*, **26**, 1768 (1961).
118. Cook N. C., Percival W. C., *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 4141 (1949).
119. Fiandanese V., Marchese G., Martina V., Ronzini L., *Tetrahedron Lett.*, **25**, 4805 (1984).
120. Maruyama K., Katagiri T., *J. Amer. Chem. Soc.*, 6263 (1986).
121. Ashby E. C., *Acc. Chem. Res.*, 414 (1988).
122. Holm T., Crossland I., *Acta Chem. Scand.*, **25** 59 (1971).
123. Gilman H., *Organic Chemistry, An Advanced Treatise*, Ed. Wiley, vol. II, 1880 (1950).
124. Ashby E. C., Bowers J., *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 2242 (1981).
125. Shirley D. A., *Organic Reactions*, vol. VIII, 28 (1955).
126. Furukawa J., Kawabata N., *Adv. Organomet. Chem.*, **12**, 103 (1974).
127. Michel J., Henry-Bash E., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 4898 (1968).
128. Michel J., Henry-Bash E., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 4902 (1968).
129. Cason J., Reist E., *J. Org. Chem.*, **23** 1668 (1958).
130. Brauer G., *Química Inorgánica Preparativa*, 640 (1958).
131. Bereskaya I., comunicación personal.
132. Negishi Ei-ichi, *Organo-Metallics in Organic Synthesis*, vol. 1, Ed. Wiley, New York (1980).

133. Lombardo L., *Organic Synthesis*, **65**, 81 (1987).
134. Djerassi C., *Chem. Rev.*, 271 (1948).
135. Fried , Edwards, *Organic Reactions in Steroid Chemistry*,  
**1** (1972).
136. Gutzwiller J., Djerassi C., *Helv. Chim. Acta*, **49**, 2108  
(1966).
137. Hutchins R. O., Kandasamy D., Maryanoff C. A., Masilamani D.,  
Maryanoff B. E., *J. Org. Chem.*, **42**, 82 (1977).
138. Turecek F., *J. Org. Chem.*, **48**, 2233 (1983).
139. Solo A. J., Baldev Singh, *J. Org. Chem.*, **30**, 1658 (1965).
140. Sunggak K., Yong J. K., Kyo H. A., *Tetrahedron Lett.*, **24**,  
3369 (1983).
141. Borch R. F., Bernstein M. D., Durst H. D., *J. Amer. Chem.  
Soc.*, **93**, 2897 (1971).
- 142a. Leete E., Gregory H., Gros E. G., *J. Amer. Chem. Soc.*,  
**87**, 3475 (1969).
- 142b. Gros E. G., Leete E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 3479  
(1969).
143. Galagovsky L., Porto A. M., Burton G., Gros E. G., *Z.  
Naturforsch.*, **39c**, 38 (1984).
144. Still W. C., Kahn M., Mitra A., *J. Org. Chem.*, **43**, 2923  
(1978).
145. Weast. R. C., *CRC "Handbook of Chemistry and Physics"*  
(1976).