

Tesis de Posgrado

Acido nordihidroguayarético en Larreas argentinas : L. Divaricata y L. Cuneifolia (nombre vulgar: "jarilla")

Ruth, Emiliano F.

1946

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

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

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

Cita tipo APA:

Ruth, Emiliano F.. (1946). Acido nordihidroguayarético en Larreas argentinas : L. Divaricata y L. Cuneifolia (nombre vulgar: "jarilla"). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0468_Ruth.pdf

Cita tipo Chicago:

Ruth, Emiliano F.. "Acido nordihidroguayarético en Larreas argentinas : L. Divaricata y L. Cuneifolia (nombre vulgar: "jarilla)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1946.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0468_Ruth.pdf

ACIDO NORDIHIIDROGUAYARETICO EN LARREAS ARGENTINAS:

L. DIVARICATA Y L. CUNEIFOLIA

(NOMBRE VULGAR: "JARILLA")



A HIS PARES

FOENBA

PLAN DE TESIS

1) Palabras previas	pág. 2
2) Introducción bibliográfica	pág. 3
3) Labor experimental:	
a) Preparación de las muestras	pág. 14
b) Extracción y purificación del compuesto e identificación del mismo	pág. 14
c) Ensayos del poder inhibidor de oxidación de grasas del compuesto obtenido	pág. 25
4) Conclusiones	pág. 37
5) Bibliografía	pág. 38

1) PALABRAS PREVIAS.

Habiendome propuesto realizar en mi trabajo de Tesis un estudio sobre algún principio activo de una planta autóctona argentina, y comentando dicho deseo con el Dr. Pedro Cattaneo, me sugirió investigar la presencia del ácido nordihidroguayarático en la especie *Larrea divaricata* Cav., dominante en muchas zonas de nuestro país.

Dicho compuesto, que adquirió últimamente interés por su notable propiedad de inhibir la oxidación de grasas, había sido aislado hace aproximadamente cuatro años de la citada especie en los EEUU.

Me hago un deber, manifestar en este lugar mi agradecimiento al Dr. Arnoldo Ruspini, padrino de mi Tesis, por la eficaz colaboración con que me distinguió en todo momento, al Dr. Pedro Cattáneo, por haberme sugerido el interesante tema del presente trabajo, al Laboratorio de Microanálisis de la Cátedra de Química Orgánica (Ingeniería Industrial) a cargo del Dr. Rafael Labriola, en que se realizó el análisis elemental del producto aislado, a las autoridades de las Oficinas Químicas Nacionales, por las facilidades que me acordaron para la realización del trabajo experimental y al Dr. Rodolfo Brenner, por cuyo intermedio me fué posible conseguir el material vegetal necesario.

2) INTRODUCCION BIBLIOGRAFICA.

Larrea Cav.⁽¹⁾, género perteneciente a la familia de las zigofiláceas y dedicado a don Juan Antonio Hernández de Larrea, Deán de Zaragoza, es un género típicamente americano, que se presenta como arbustos o subarbustos, de base siempre leñosa, con hojas opuestas y estipuladas, pinatilobadas o partidas en dos ramas más o menos divaricadas. La cara interna de las estipulas posee un epitelio glandular que segrega resina que recubre todas las partes vegetativas. Vive en Chile, Argentina y Bolivia (región limítrofe con nuestro país), Méjico y zona sur de los EEUU.

Su distribución geográfica en la Argentina comprende a: Jujuy, Salta, Tucuman, Catamarca, Santiago del Estero, La Rioja, San Luis, Córdoba, San Juan, Mendoza, Buenos Aires, La Pampa, Neuquén, Río Negro y Chubut.

La superficie de nuestro territorio cubierta por las especies de éste género es muy extensa y abarca con predilección las zonas desérticas, áridas y secas. *Larrea divaricata Cav.* vive desde Chubut hasta Salta, siendo un elemento dominante en muchas zonas.

Las Larreas argentinas comprenden a cuatro especies:

Larrea divaricata Cav.

Larrea cuneifolia Cav.

Larrea nítida Cav.

Larrea Ameghinoi Speg.



Fig. 12. — *Larrea divaricata* Cav. : a, rama $\times 1$, (Lil., 235); b, fruto $\times 1$ (Castillon 249); c, semi-
 lla $\times 1$; d, ovario $\times 2$; e, e', escamas estaminales $\times 2$; f, estambre $\times 2$; g, antera $\times 5$; h, h', h'',
 h''', sépalos $\times 2$; i, pétalo $\times 2$ (Lil., 249).

siendo las dos primeras, llamadas vulgarmente: "jarilla", las más difundidas.

Larrea divaricata Cav. es un arbusto ramoso ($\pm 3m$) de tallos leñosos, cilíndricos, ramas jóvenes prismáticas, pubescentes, internodios de hasta 2 cm, de hojas opuestas, subsésiles, biestipuladas, de un par de folíolos poco soldados, divergentes, oblongoagudos, con un tercer folíolo en forma de mucrón filiforme, pequeño.

Distribución geográfica en la Argentina: Salta (SO.), Catamarca, Tucuman, Santiago del Estero, La Rioja, Córdoba, San Juan, Mendoza, Neuquén, S. de Buenos Aires, Río Negro y Chubut.

Larrea cuneifolia Cav. es un arbusto ($\pm 3m$) de tallos leñosos, cilíndricos, de ramas jóvenes prismáticas, pubescentes, internodios 1,5 - 2 cm, hojas opuestas subsésiles, biestipuladas, bifoliadas, con un tercer folíolo reducido a un corto mucrón filiforme. Los folíolos están soldados en toda su longitud, son asimétricos, agudos y cubiertos de pelos adpresos en ambas caras.

Distribución geográfica en la Argentina: Salta, Tucuman, Catamarca, La Rioja, Santiago del Estero, Córdoba, San Juan, Mendoza, San Luis, La Pampa, Neuquén, Río Negro y Chubut.-

Si bien la literatura no menciona investigaciones farmacológicas detalladas sobre *Larrea Divaricata Cav.*, es conocido su uso como medicamento por los indígenas⁽²⁾ que

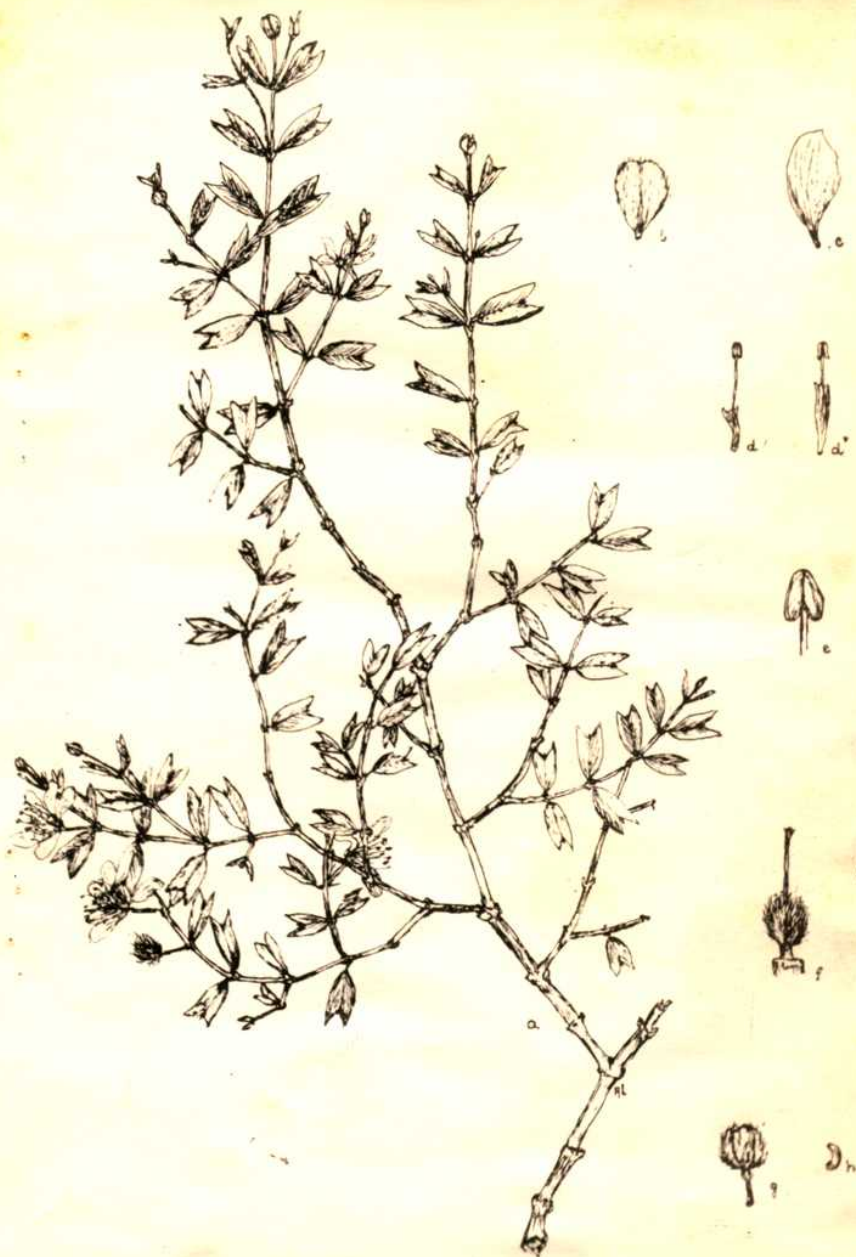


Fig. — 13. — *Lareca cuneifolia* Cav.: a, rama $\times 1$; b, sépalo $\times 2$; c, pétalo $\times 2$; d, d', estambres $\times 2$; e, antera $\times 1$; f, ovario $\times 2$ (Lillo 6948); g, fruto $\times 1$; h, semilla $\times 1$ (Castillon 2459)

habitaban el sudoeste de los EEUU. Una infusión preparada hirviendo hojas de esta planta, la tomaban internamente contra enfermedades venéreas, calambres intestinales, disturbios gástricos, inflamaciones del aparato respiratorio, tuberculosis, etc. Igualmente como tónico, antiséptico, expectorante y estimulante.

Los extractos acuosos de la planta fueron usados también en forma de baños contra el reumatismo y las hojas secas y pulverizadas para espolvorear heridas y lastimaduras.

Larrea divaricata Cav. es conocida por los nativos de la región sudoeste de EEUU por "creosote bush"⁽³⁾, arbusto de creosota, debido a que sus hojas y pequeños tallos, especialmente en los nodos, están cubiertas por una capa resinosa, que al arder con llama fuliginosa emite humos aromáticos que recuerdan al olor de la creosota. Los españoles de California la llamaban "gobernadora" e "hiedonodo". Es también conocida por los nativos bajo los nombres de palo ondo, tasajo, gumis, hediøndilla, sonora, falsa, al caparra, juamis, yah temp y etiontio.

Las investigaciones químicas sobre *L. divaricata* se han limitado primariamente a extracciones selectivas con solventes⁽⁴⁾, constantes de solubilidad del exudado resinoso⁽⁵⁾, determinaciones de cenizas⁽⁶⁾, y análisis de las mismas⁽⁷⁾. En el curso de investigaciones sobre constituyentes de plantas, realizadas en cooperación por el Dep. de Agricultura de EEUU y la Universidad de Minnesota⁽³⁾, se identificó la presencia de ácido nordihidroguayarético en *L. divaricata*. Fué la pri-

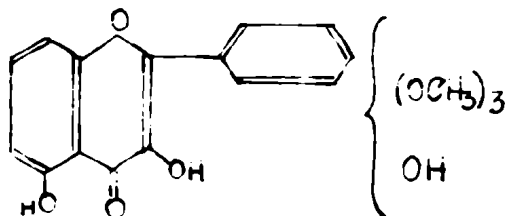


Z. dicaricata y *Z. enaeifolia*. Catamaren - entre Belén y Andalgala. (Arenal con - jarilla en VI-1939. (Foto - Schreiber)

mera vez que se aisló dicho compuesto inhibidor de oxidación de grasas en la naturaleza. En el mismo trabajo se constató la presencia de una cera, que por saponificación dió una fracción ácida y otra alcohólica. La fracción ácida constituida por una mezcla de ácidos de C_{28} y C_{26} . La fracción alcohólica contiene principalmente un alcohol de C_{30} .

La porción insaponificable de un extracto soluble en bencina, dió una pequeña proporción de esteroides, que funden a 126° - 128° C y constituidos probablemente por una mezcla. Un flavonol de grupo auxocromico en posición 5 fué aislado y parcialmente caracterizado. Si bien *Larrea divaricata* tiene un olor aromático marcado, solo se obtuvo una muy pequeña proporción de aceites volátiles al destilar por arrastre con vapor de agua. Las reacciones usuales para alcaloides dieron resultados negativos en los extractos de esta planta. Por último, se aisló e identificó la presencia de sacarosa.

En un estudio fitoquímico posterior⁽⁸⁾, se caracterizaron parcialmente los pigmentos amarillos y anaranjados de *Larrea divaricata*, habiéndose postulado la siguiente fórmula de constitución aproximada para el pigmento anaranjado, un flavonol con un grupo hidroxilo libre en posición 5, teniendo 3 grupos metoxilos y 3 grupos hidroxilos metilables o acetilables:



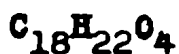
En la alta proporción de sustancias extractivas que se obtienen al tratar la planta seca y desintegrada con alcohol, éter u otros solventes orgánicos, se han aislado e identificado además las siguientes sustancias⁽⁹⁾: numerosos compuestos fenólicos, clorófila y pequeña cantidad de caucho. Se constató también la marcada actividad bactericida de los extractos alcohólicos sobre las bacterias Gram positivas, actividad que se atribuye⁽³⁾ al ácido nordihidroguayarético, y que explica el porqué del uso de dicha planta por los indígenas con fines antisépticos. Al respecto es interesante comparar la aplicación que tiene actualmente en Medicina el guayacol (éter monomético de la pirocatequina) bajo diferentes formas, para el tratamiento de afecciones catarrales, de las vías respiratorias y tuberculosis, con el uso que le daban los indígenas del hemisferio norte al "creosote bush", que contiene ácido nordihidroguayarético, y que posee en su estructura dos agrupaciones pirocatequina.

Cabe mencionar además que *L. divaricata* ha adquirido últimamente un interés ecológico, pues puede ser usada para prevenir la erosión del suelo. Vive perfectamente en tierras áridas y no necesita irrigación.

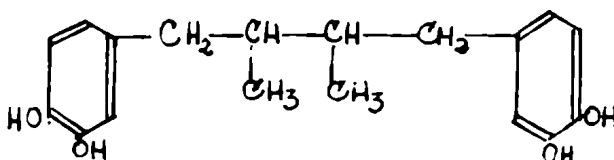
Si bien *L. divaricata* ha sido sometida en EEUU., principalmente en los últimos cuatro años a muchos ensayos e investigaciones debido al interés despertado por su contenido en ácido nordihidroguayarético, no se ha encontrado en la bibliografía consultada, fuera del punto de vista estrictamente

botánico, datos de interés fitoquímico de la especie *L. cuneifolia*, muy difundida en nuestro territorio y que domina en muchas zonas. Ha sido este hecho el que me indujo a someter dicha especie, conjuntamente con *L. divaricata*, a un estudio tendiente a establecer la presencia o no de ácido nordihidroguayarático en estas dos especies argentinas.-

Ácido nordihidroguayarático (10)



β - γ -dimetil, α - δ -bis (3,4 dihidroxifenil)-butano.



Sólido cristalino, de color blanco con tintes amarillentos, que se presenta bajo el microscopio en forma de agujas chatas (cristalizadas del alcohol). P.F. = 184 \pm -185 \pm C

Solubilidad (3) (9) (11)

muy soluble en:

alcohol metílico
alcohol etílico
ácido acético glacial

poco soluble en:

cloroformo
benzol, toluol, xilol calientes
agua caliente

Muy poco soluble en:

agua
ácidos diluidos.

Fácilmente soluble en grasas y aceites a 120°C (± 5 %) pero solo queda 1 % en solución al enfriar a temperatura ambiente.

Fué sintetizado en el año 1918⁽¹²⁾ del ácido guayarético, su éter dimetílico o el éter dimetílico del ácido dihidroguayarético, por reducción con ácido iodhídrico conc. (D-1,7) y su estructura establecida.

Numerosas sustancias fenólicas poseen la propiedad de inhibir marcadamente la autooxidación de grasas. En general, las más efectivas son aquellas que tiene⁽¹¹⁾ en posición orto o para, o ambas, respecto a su oxhidrilo, alguna unión oxigenada. El más simple y mejor conocido antioxidante de este tipo es la hidroquinona. Otros ejemplos tenemos en los tocoferoles, que han sido extensivamente estudiados⁽¹³⁾, pues parecen ser los principales antioxidantes que se encuentran normalmente en muchas grasas vegetales y animales. Tienen la ventaja de ser menos tóxicos y más solubles en grasas que la hidroquinona⁽¹¹⁾. Otra sustancia con notables propiedades antioxidantes es la resina de guayaco⁽¹⁴⁾. El principio activo de la misma es presumiblemente el ácido guayarético. Es un estabilizador excelente y muy práctico para prevenir la rancidez en el lardo y muy factible su aplicación a alimentos deshidratados⁽¹⁵⁾.

Estos resultados favorables, y teniendo en cuenta la semejanza de su estructura química con la del ácido nordihidroguayarético, indujeron el estudio de este compuesto desde el punto de vista de su aplicación como inhibidor de oxidación de grasas. H.O. Halvorson, director del Hormel Institute de EEUU,

en cooperación con el Dr. Lauer, reconocieron en este compuesto las extraordinarias propiedades que lo colocan en primer lugar entre los inhibidores de oxidación de grasas animales del tipo del lardo de cerdo.

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS PRINCIPALES METODOS DE EXTRACCION.

Coy W. Waller, en su tesis presentada a la Universidad de Minnesota, ensayó los primeros métodos de extracción⁽³⁾ del ácido nordihidroguayarático de *Larrea divaricata* Cav.

Para abreviar, de aquí en adelante denominaré el ácido en cuestión: NDGA (Nor-Dihidro-Guaiaretic-Acid), sigla muy usada ultimamente en EEUU para designar este compuesto.

El material usado en dicho trabajo consistió de tallos pequeños, hojas y flores de la planta mencionada, que después de secadas al aire, se molieron a un polvo N° 20 en un molino Jacobson de laboratorio. Se obtuvo un extracto alcohólico por percolación de la droga seca con alcohol etílico de 95 %, que se caracterizó por su actividad bactericida sobre las bacterias Gram positivas. Este extracto alcohólico se dividió en varias fracciones que se sometieron a sendas extracciones con agua caliente, éter etílico, éter de petróleo y cloroformo. La actividad bactericida acompañó a las fracciones solubles en éter y cloroformo. La fracción insoluble en éter se mantuvo inactiva, mientras que la insoluble en cloroformo retuvo dicha actividad.

Esta marcada actividad bactericida se atribuyó al

NDGA, que se aisló de la siguiente manera:

Método del plomo:

La fracción insoluble en cloroformo, se disolvió en alcohol y se trató con una solución alcohólica de acetato de plomo hasta precipitación completa. El pptado. se recogió en un filtro y se lavó con alcohol. Luego se suspendió dicho pptado. en alcohol y se pasó una corriente de SH_2 hasta convertir todo el Pb presente en el correspondiente sulfuro. Se filtró, evaporó el filtrado a pequeño volúmen, se diluyó con agua y se dejó reposar toda la noche, Se separó una pequeña cantidad de agujas de color rojizo que fundieron a 176°C y dieron una coloración verde intensa con Cl_3Fe .

Método con bencina del petróleo:

La parte soluble en éter de la fracción insoluble en cloroformo del extracto alcohólico, se trató con norita, se filtró y se virtió en un gran volúmen de bencina del petróleo hirviente, del cual se separó un fino polvo amarillo que fundió a 165°C . El color amarillo se eliminó tratándolo con cloroformo caliente y el producto resultante, de color crema, fundió a 180°C .

Método del agua caliente:

Por tratamiento del extracto alcohólico con agua caliente, se obtuvo una fracción acuosa que al enfriar pptó. pequeña cantidad de material cristalino. La adición de hidrosulfito de sodio al agua caliente aumentó el rendimiento de material cristalino.

Después de sucesivas recristalizaciones y purificaciones, se obtuvo NDGA cristalizado y de color blanco crema con punto de fusión = 184±-185°C.

Por tratamiento del extracto alcohólico crudo con ácido acético al 10 - 15 % se obtuvieron también resultados favorables para la preparación del material cristalino.

En un trabajo posterior⁽⁸⁾, se ensayaron con éxito extracciones fraccionadas con soluciones de bicarbonato de sodio, carbonato de sodio e hidróxido de sodio. Se obtuvieron así distintas fracciones de las sustancias fenólicas solubles en éter, facilitándose la purificación de las mismas. Así la fracción carbonato de sodio demostró ser rica en pigmentos amarillos y anaranjados, mientras que las últimas fracciones de hidróxido de sodio dieron un rendimiento apreciable de NDGA.

Basandose en estas extracciones fraccionadas, Ole Gisvolt elaboró un método⁽¹⁶⁾ que permite obtener NDGA con suficiente pureza como para poder encarar la preparación de este principio activo en escala algo mayor, pero que todavía ofrece considerables dificultades como para utilizarlo en la producción de NDGA con fines comerciales. Actualmente la firma Wm. J. Stange & Co., utiliza un procedimiento secreto⁽⁹⁾, perfeccionado por el mismo O. Gisvolt, en combinación con un método de purificación encontrado por Joseph Adams, de la citada firma, que ahora está en producción y que da un NDGA de alta pureza, libre de sustancias odoríficas y colorantes.

Por las razones mencionadas, dicho método no se puede dis-
cutir en este lugar.



3) LABOR EXPERIMENTAL

a) Preparación de las muestras.

Las extracciones del presente trabajo se realizaron sobre ejemplares de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* recolectados en el mes de agosto del presente año en Anillaco, Dep. de Castro Barros, Provincia de La Rioja.

El material usado consistió de: pequeños tallos y hojas, que después de secados al aire y sol se sometieron a una molienda grosera para la primera extracción. En las dos posteriores se trabajó sobre material solo ligeramente desmenuzado, ya que se vio que todo el NDGA se encuentra repartido⁽⁸⁾ en las resinas que recubren las distintas partes de la planta, es decir, que se halla en la parte exterior de la misma, lo que hace superfluo someterla a una molienda rigurosa. El material desmenuzado y molido presenta un color verdoso amarillento y un olor aromático característico, no desagradable cuando diluido.

b) Extracción, purificación e identificación del NDGA.

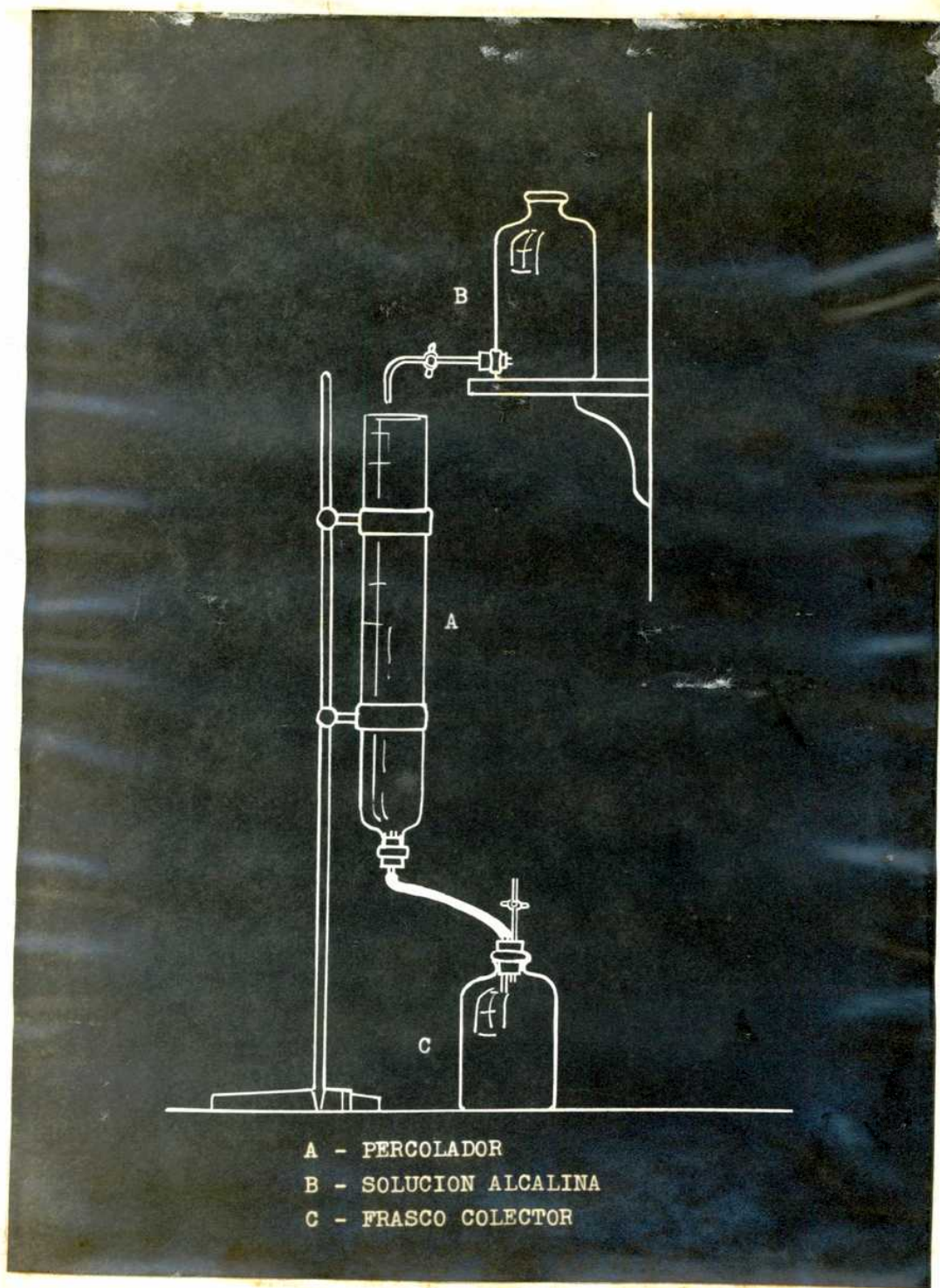
En la extracción del NDGA se siguió en términos generales el método elaborado por Ole Gislvold⁽¹⁶⁾, que consiste en obtener numerosas fracciones de las sustancias fenólicas de la planta por medio de extracciones sucesivas de la parte éter-soluble de la planta con solución alcalina.

la. Extracción sobre hojas y tallos de L. divaricata.

1.400 gramos del material vegetal preparado como se indicó en el capítulo anterior, se sometieron a una percolación con 6 litros de solución de HONa al 5 %, a la que se añadió 2 % de $S_2O_4Na_2$ para evitar en lo posible la oxidación del NDGA, muy poco estable en medio alcalino. Se utilizó un percolador de vidrio de 10 cm de diámetro por 75 cm de altura, conectado por su parte inferior por medio de un tubo de goma a un frasco colector, conteniendo ácido clorhídrico al $\frac{1}{4}$, para acidificar inmediatamente el líquido percolado. Se dejó actuar la solución alcalina durante aproximadamente 1 hora, y el líquido recogido y acidulado se dejó sedimentar 60 horas.

Se depositó en el fondo una masa altamente viscosa, no adherente a las paredes del frasco y de color amarillo parduzco, que los americanos llaman "NDGA sludge", barro de NDGA, y que contiene aproximadamente de 10 - 15 % del citado principio.

Se decantó el líquido sobrenadante y se disolvió el barro en 750 ml de alcohol etílico de 96%, acidulando con ClH al tornasol. Se agregaron 2 litros de éter sulfúrico y se filtró, eliminandose la parte alcohol-soluble e insoluble en éter. El líquido límpido se lavó con 3 litros de agua, en porciones de 1 litro por vez, y luego se procedió a la extracción fraccionada con solución de HONa al 5 % más 2,5 % de $S_2O_4Na_2$.



Para cada extracción se usaron 30 ml de dicha solución alcalina, agitando de 2 a 3 minutos, acidulando el líquido decantado con ClH al $\frac{1}{2}$ y llevando al baño maría para evaporar el éter que había pasado disuelto.

Después de dejar en reposo por 24 horas, las distintas fracciones presentaban un depósito con el aspecto siguiente:

- Fracción 1: brea negra, algo fluida.
" 2: " " , poco fluida.
" 3: " " , sólida.
" 4: " pardo negruzca, poco fluida.
" 5: sólido amorfo, de color pardo rojizo.
" 6: " " , " " anaranjado (pigmentos amarillos y anaranjados).
" 7 a 14: fracciones sólidas y cristalinas, de color amarillo-anaranjado, con alto porcentaje de NDGA.
" 15: sólido anaranjado rojizo, pocos cristales.
" 16: " rojizo, muy pocos cristales.
" 17: líquido oleoso, color pardo rojizo, sin cristales.

Las fracciones 7 a 14 reportaron 60 gramos de NDGA impuro, que corresponde a 4,3 % con respecto al material vegetal seco.

Se hicieron ensayos de purificación sobre las fracciones obtenidas, con los siguientes resultados:

Disolución de una parte del NDGA bruto en ácido acético glacial caliente, reprecipitación por agregado de

igual volúmen de agua y reposo hasta el día siguiente.

Después de filtrar por un embudo Buchner y lavar con agua, se secó en estufa a 60°C y se tomó el P.F. Fundió entre 160° y 177°C [teórico: 185°-185°C).

Otra parte del producto bruto (35 gramos) se disolvió en 50 ml de CH_3COOH glacial en caliente y luego se diluyó con un gran exceso de agua (500 ml). Pptó. una masa aceitosa que cristalizó al cabo de 48 horas. En la superficie del líquido sobrenadante flotaron cristales de aproximadamente 1 mm de largo, con un P.F. = 180°C. En cambio, los cristales que se habían formado en la masa sedimentada, tenían un grado de pureza menor, fundiendo entre 155°C - 170°C.

Prosiguiendo con las tentativas de purificación, se disolvió en muy pequeño volúmen de ácido acético glacial caliente el material cristalino obtenido en la primera purificación (P.F. 160°-177°C). Dicha solución concentrada se enfrió en un baño de hielo y los cristales separados, después de filtrar y lavar primero con ácido acético glacial y finalmente con agua, se secaron en estufa. En esta purificación, acompañada de gran pérdida de material, se obtuvo un polvo cristalino de color amarillento, con un P.F. = 183°-184°C.

Se realizó una última recrystalización disolviendo dichos cristales en acetona y reprecipitando por agregado de agua, dejando reposar por 24 horas. De esta operación se obtuvo un producto de alta pureza, de color blanco crema, con un P.F. = 184° - 185°C, igual al teórico.

Los cristales se observaron al microscopio, directamente y con luz polarizada, presentando la forma de agujas chatas, terminadas en punta en ambos extremos. Se adjuntan dos fotomicrografías tomadas del preparado.

En el método de extracción seguido, una de las dificultades que se presentaron y que obstaculizaron la obtención de NDGA puro, fué la pptación. de azufre libre por descomposición del $S_2O_4Na_2$, al acidular con ClH y calentar en baño maría los extractos alcalinos de NDGA.

Este azufre acompañó al NDGA en varias recrystalizaciones, como se observó al efectuar determinaciones cualitativas de S por el método de Lassaigne en algunas de las fracciones obtenidas.

Se encontró que acidulando con un ácido débil, v.gr. ácido acético, este inconveniente no se producía, modificandose la técnica de extracción en tal sentido para las siguientes extracciones.

2a. Extracción sobre hojas y tallos de Larrea divaricata Cav.

Se realizó una segunda extracción sobre 600 gramos de material vegetal solo ligeramente desmenuzado, por las razones indicadas en el capítulo de preparación de las muestras. Se usaron 2,4 litros de solución $HONa, S_2O_4Na_2$ para la percolación, que duró aproximadamente $\frac{3}{4}$ hora, acidulando esta vez con CH_3COOH y dejando reposar el pptado. formado por 70 horas.



Acido nordihidroguayarético cristalizado de una solución hidroacética .(130 aumentos)



Los mismos cristales vistos con luz polarizada (nicoles cruzados).

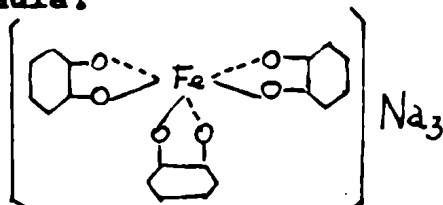
En la superficie flotó un barro esponjoso, de consistencia gomosa, y de color pardo negruzco, que se despreció por no contener practicamente NDGA, prosiguiendose las operaciones con el pptado. denso del fondo, como se indicó anteriormente: decantación del líquido sobrenadante, disolución del "barro de NDGA" en 400 ml de alcohol etílico, agregado de 1 litro de éter etílico, filtración y lavado con agua, procediéndose finalmente a la extracción con solución al 5 % de HONa más 2,5 % de $S_2O_4Na_2$ (cada vez 12 ml). Se aciduló aquí también cada fracción obtenida con CH_3COOH .

Los resultados obtenidos fueron muy parecidos a los de la extracción anterior, dando las fracciones 5-11, aproximadamente 25 gramos de NDGA impuro, lo que representa un 4,2 % sobre droga seca.

Igualmente se purificó parte de estos extractos impuros, con la técnica indicada más arriba, procediéndose luego a efectuar determinaciones y reacciones de caracterización con los resultados siguientes:

Una solución alcohólica de dichos cristales, adicionada de una gota de Cl_3Fe al 10 %, adquiere un intenso color verde brillante, que desaparece por agregado de una gota de ClH . Alcalinizando con una solución diluída de CO_3Na_2 , reaparece el color verde, que por adición de un exceso de solución de CO_3Na_2 pasa a azul, violeta, púrpura y finalmente rojo vino⁽³⁾. Dicha reacción de coloración es semejante a la que produce la pirocatequina⁽¹⁷⁾, que es constituyente de la molécula de NDGA.

Al complejo rojo de hierro formado, Weinland⁽¹⁸⁾ le asigna la siguiente fórmula:



Otra reacción de coloración debida a la oxidación de la función fenólica es la siguiente: Vertiendo una solución alcohólica de los cristales mencionados en agua débilmente alcalina, se producen las siguientes coloraciones: verde fugaz, rojo vino intenso, pasando finalmente a pardo.

Igualmente que la pirocatequina, el NDGA presenta una sal de Pb practicamente insoluble en alcohol, de color blanco.

Constantes del ácido nordihidroguayarético obtenido

P.F. = 184:185°C	teórico: 184:185°C
Peso molecular (Rast) = 290;310	" 302
Análisis elemental	
C = 71,61 ; H = 8,00	"
C = 71,61 ; H = 7,76	" C=71,48;H=7,34

Reacciones de coloración con

Cl_3Fe y álcali: positivo.

Igualmente las solubilidades del compuesto en los distintos solventes corresponden con lo que indica la bibliografía.

Extracción sobre tallos y hojas de Larrea cuneifolia Cav.

600 gramos de tallos y hojas secas, ligeramente desmenuzadas, se sometieron a una percolación y extracción fraccionada siguiendo la técnica anterior. También en esta operación se observó la analogía de los resultados obtenidos en los distintos pasos, con los de la extracción de hojas y tallos de *L. divaricata*: las primeras 3 fracciones dieron una sustancia resinosa, semisólida y de color negro, luego 2 fracciones anaranjado amarillentas amorfas, prácticamente sin NDGA, obteniéndose entre las fracciones 6 - 16, 29 gramos de extractos muy ricos en NDGA. Las fracciones 17 y 18, oleosas y con pocos cristales en su seno y la 19, aceitosa y sin principio de cristalización.

En esta extracción el NDGA bruto obtenido correspondió a 4,9 % sobre droga seca, es decir, es algo superior a los rendimientos obtenidos en *L. divaricata* (4,2-4,3 %). Por purificación de estas fracciones con la técnica usada anteriormente, se obtuvo NDGA con P.F. = 184±-185°C.

No se observó depresión del punto de fusión en una mezcla de NDGA obtenido de *L. divaricata* y *L. cuneifolia*.

Los rendimientos de NDGA no purificado pueden considerarse buenos, comparandolos con un resultado publicado en EEUU⁽⁸⁾: 3,92 % sobre droga seca (*L. divaricata*), y usando una técnica de extracción parecida. El contenido real de este principio es seguramente mayor, así análisis efectuados en la División de Química Fisiológica de la Universidad de Minnesota

dieron como resultado aprox. 7 % de NDGA⁽¹¹⁾. Proporción tan alta no es posible obtener en los métodos de extracción prácticos, debido a que el NDGA se encuentra formando parte de una mezcla muy compleja y heterogénea, con acompañantes que poseen propiedades muy semejantes, y por tal razón, difíciles de separar.

Con los resultados favorables obtenidos, se dió por terminado el trabajo experimental en la parte que se refiere a: Extracción, purificación e identificación del NDGA.-

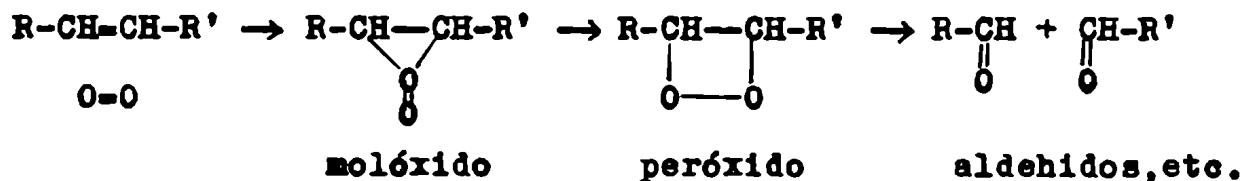
c) Ensayos del poder inhibidor de oxidación de grasas del compuesto obtenido.

Breves consideraciones sobre el fenómeno de rancidez.

La forma de aparición más importante de rancidez en grasas es la producida por la acción del oxígeno del aire. Una alteración debida a microorganismos⁽¹⁹⁾ solo puede ocurrir en presencia de: humedad conveniente, sustancias nitrogenadas, sales minerales y a un rango de temperatura óptimo.

En cambio, la oxidación atmosférica ocurre espontáneamente cuando los compuestos que contienen grasas no saturadas se exponen al aire. Se acepta hoy en día que el oxígeno actúa en la siguiente forma: ataque de una doble ligadura de un ácido graso no saturado, con formación de un peróxido altamente reactivo. Este producto de adición es generalmente muy inestable y se descompone rápidamente por polimerización, isomerización o rotura de la cadena, a la manera de un ozónido, para producir compuestos de peso molecular más bajo.

Como paso intermedio entre el compuesto autooxidable y su peróxido, Staudinger⁽²⁰⁾ sostiene la formación de una sustancia extremadamente inestable, a la que le asigna el nombre de "molóxido", con la siguiente fórmula probable:



Este molóxido es el que daría inmediatamente el peróxido de ácido graso, cuya presencia se ha podido constatar por muchas de las reacciones características de la función -O-O-, pero que no se ha podido aislar por ser muy inestable y no cristalizabile. Solo en algunos pocos casos, como en el ergosterol y tetrahidronaftaleno⁽²¹⁾, se ha podido obtener el peróxido en estado de pureza. En general, la absorción de oxígeno no se detiene en la relación: 2 átomos de oxígeno por cada doble ligadura, así se vió que el ácido oleico a 80°C absorbe aproximadamente 4 átomos de oxígeno por molécula⁽²²⁾ dando una baja proporción de peróxido y relativamente gran cantidad de agua y anhídrido carbónico, debido a descomposiciones secundarias y oxidación posterior.

Sin entrar a considerar los fenómenos posteriores a la aparición del peróxido, por no corresponder a la índole del presente trabajo, y que proporcionan a la grasa las características propiedades organolépticas de olor y sabor rancio, el hecho de poder determinar la presencia de la función -O-O- (p.ej., mediante el índice de peróxido) con exactitud y rapidez, es una circunstancia favorable que nos permite descubrir cualquier rancidez incipiente con suficiente antelación, antes que los caracteres organolépticos, especialmente el olor, nos revelen su presencia.

Es conocido que las grasas naturales poseen, bajo el efecto del oxígeno atmosférico, una fase de refractariedad a la oxidación, lapso que se conoce como "período de inducción" y

durante el cual la grasa se mantiene practicamente invariable. Se considera que el final de dicho período está determinado por la acción de los compuestos con función "peróxido", que actuarían como catalizadores positivos, promoviendo los fenómenos posteriores. Muchos datos experimentales confirman esta suposición, p.ej: la adición de pequeña cantidad de grasa oxidada a una muestra fresca reduce dicho período de inducción en forma notable⁽²³⁾.

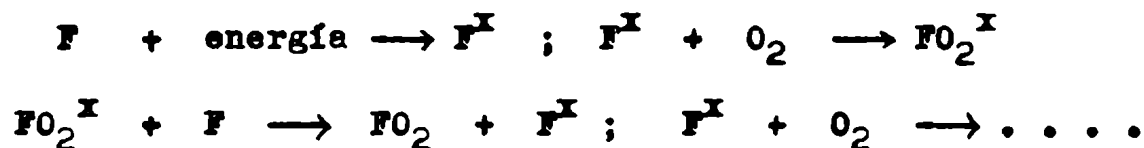
También se observó que dicho período de inducción se acortaba cuanto más puro era el compuesto autooxidable: los glicéridos resintetizados de los ácidos destilados de aceites naturales, poseen un período de inducción que representa solo una pequeña fracción del que posee el aceite original⁽²⁴⁾. Es evidente, pues, que existen en las grasas naturales sustancias con propiedades antioxidantes, y la rancidez no se hace aparente hasta que dichos antioxidantes no desaparezcan del medio, lo que ocurre normalmente por destrucción oxidativa.

Varias teorías se han propuesto para explicar la acción de estos inhibidores de oxidación, habiéndose destacado en los últimos 20 años las de Moureau y Dufraisse⁽²⁵⁾, actualmente poco consideradas por no responder satisfactoriamente a los hechos experimentales, y la de las "reacciones en cadena" de Christiansen⁽¹⁹⁾.

Según esta teoría, una molécula activada de la sustancia autooxidable se une con una molécula de oxígeno, dando lugar a la formación de un peróxido, con liberación de una considerable cantidad de energía. Esta molécula de peróxido recién formada es capaz de pasar dicha energía a otra (o posiblemente más que una)

molécula de sustancia, iniciándose una cadena (o cadenas) de reacciones de óxido-reducción, que puede propagarse a miles de moléculas.

El largo de esta cadena de reacciones depende de la eficiencia con que la energía es transmitida, y de la presencia de sustancias extrañas (catalizadores positivos o negativos (inhibidores)).



F = sustancia autooxidable ;)^X = molécula activada.

Cuando una molécula activada de peróxido entra en contacto con una de inhibidor (A), esta última capta dicha energía, y como consecuencia general, pero no absoluta, ella se oxida en subsiguientes choques con oxígeno. De cualquier manera, falla en su turno para activar otras moléculas del substrato autooxidable y la cadena de reacciones se corta:



Esta teoría explica también la aceleración de la autooxidación debido a factores capaces de activar las moléculas reaccionantes, iniciando reacciones en cadena, p.ej.: energía radiante (calor o luz), catalizadores positivos, energía química, etc.

Basandose en esta propiedad de diversos factores de influir notablemente en el período de autooxidación, se han elaborado métodos acelerados para investigar y poder comparar la estabilidad de grasas. Con ellos es posible determinar en horas

o días, lo que en condiciones normales duraría meses.

Parte práctica.

A) Método y aparato usado.

Para observar el efecto inhibitor del NDGA aislado en el presente trabajo, se ha elegido un método basado en el "Ensayo de estabilidad de Swift⁽²⁶⁾", combinandolo con parte de las dos modificaciones propuestas por R.W. Riemenschneider, J. Eurer y R.M. Speck⁽²⁷⁾ y el "Committee on Analysis of Commercial Fats and Oils⁽²⁸⁾".

La base del método consiste en hacer burbujear aire lavado a través de las muestras de grasa, mantenidas en un baño a temperatura constante. Determinaciones sucesivas del Índice de peróxido, nos permiten seguir el proceso de oxidación desde el comienzo del período de inducción hasta la aparición de los típicos caracteres organolépticos de rancidez.

En detalle, el aparato usado, del cual se acompañan 2 ilustraciones, consta de un sistema distribuidor de aire, conectado por un lado con una fuente de aire a presión (bomba Pfeiffer's) y por el otro con tres tubos de ensayo de 4 cm X 20 cm, cerrados con tapones de goma con dos perforaciones, una para el tubo de burbujeo, y por el cual pasa el aire que viene del tren de aereación, y otra para el tubo de desprendimiento, ambos de 4 mm de diámetro. Los tres tubos están sumergidos en un baño de aceite mineral, de color claro y alto punto de inflamación, que se encuentra en el interior de una estufa de doble pared, entre las cuales se coloca agua. Esta camisa de agua

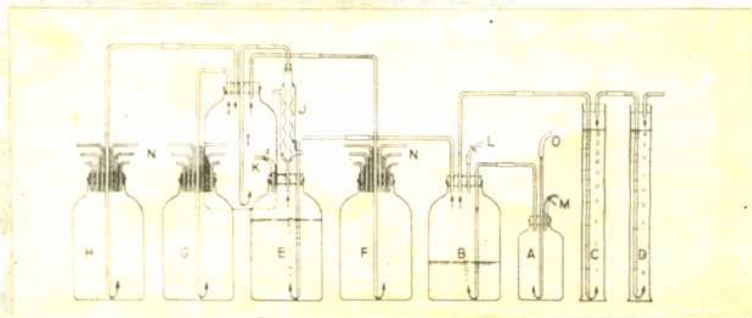


Fig.1: Tren de aereación del "Swift stability test", usado en la modif. de Riemenschneider, Turer y Speck.-

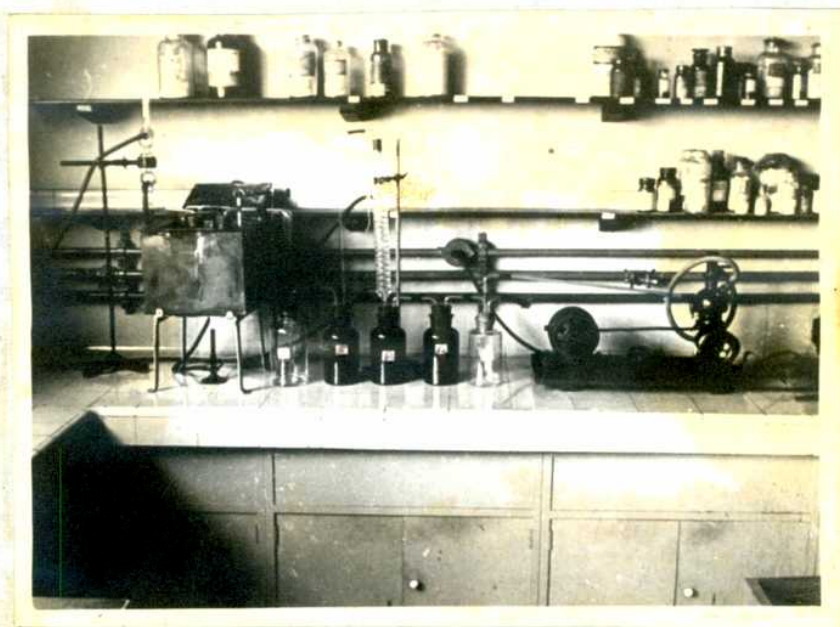


Fig.2: Aparato completo usado en el presente trabajo.-

comunica con el exterior por medio de un refrigerante a reflujo, que condensa el agua que se evapora y mantiene un nivel constante del mismo. Para la calefacción se utilizó un mechero Bunsen, manteniendo la temperatura del baño interior de aceite a 97°C. Para ello es conveniente agregar al baño de agua un 10 % de glicerina, que permite llegar fácilmente a dicha temperatura.

En el tren de aereación (fig.1), el aire que entra por O, debe burbujear primero por un frasco lavador con agua B, pasando luego al frasco E que contiene una solución ácida de bicromato de potasio ($2\% \text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2 + 1\% \text{SO}_4\text{H}_2$). Un refrigerante a reflujo, por cuya camisa circula agua a 15°C, regula la humedad que arrastra el aire que sale de E, y que después de llegar a K, pasa a los frascos distribuidores F, G y H, cada uno con seis salidas, lo que permite hacer 18 determinaciones a la vez. Esto, según indica el diagrama.

Para nuestra determinación, en la que solo se utilizaron 3 tubos de burbujeo, se suprimieron los frascos H y F, lo mismo que las columnas de agua C y D, reguladoras de presión, pues se vió que esta se puede mantener perfectamente constante mediante la llave de escape M.

El aire se hace burbujear por los 3 tubos a una velocidad aprox. de 2,33 ml/seg. (pequeñas variaciones de esta velocidad no influyen en los resultados), manteniendo un nivel de aceite del baño de 5 cm por encima del nivel de la grasa de los tubos. Los tubos de burbujeo, perfectamente centrados, deben llegar a 0,5 cm del fondo de los tubos de aereación.

Determinación del Índice de Peróxido.⁽²⁷⁾

0,2 gr de muestra se disuelven en un erlenmeyer de 200 ml con 20 ml de una mezcla cloroformo-acética (60 % ácido acético + 40 % cloroformo). Se agrega 1 ml de solución saturada de ioduro de potasio, agitando justamente 1 minuto en la obscuridad. Se agregan 100 ml de agua, 2 ml de engrudo de almidón y se titula el iodo liberado con solución $S_2O_3Na_2$ N/100, usando una microbureta de 2 ml, graduada al 0,02 ml.

$$\text{mequiv. de -O-O- por 1Kgr de muestra} = \frac{\text{ml } S_2O_3Na_2 \cdot N \cdot 1000}{\text{peso muestra}}$$

Un título en blanco, efectuado diariamente, no debe exceder de 0,01 ml de $S_2O_3Na_2$ N/100, y se restará de los ml gastados.

B) Técnica.

Todo el equipo en su lugar, con las conexiones en orden, las soluciones de lavado, el agua y el aceite del baño en su nivel, los tubos de aereación y burbujeo perfectamente desengrasados y limpios y sin trazas de metales que puedan actuar como catalizadores positivos de oxidación.

Para ensayar el poder inhibidor de oxidación del NDGA, se utilizó lardo (grasa de cerdo, obtenida por fusión a B.M. de la llamada manteca en rama, que recubre la parte baja del riñón y entrañas del cerdo) y que después de filtrar en caliente por papel de filtro banda negra, se colocó en los tubos de aereación a razón de 20 ml por cada tubo. El tubo 1, con el lardo tal cual, sirvió de testigo. A los otros dos se les agregó NDGA en la

siguiente proporción:

Tubo 1 :	lardo (testigo)
Tubo 2 :	lardo + 0,05 % NDGA
Tubo 3 :	lardo + 0,10 % NDGA

Se calentaron los 3 tubos a 97±7°C, disolviendo el inhibidor por agitación. Después de sumergirlos en el baño de aceite, mantenido a la misma temperatura, se inició el burbujeo de aire, anotando la hora de partida.

Para las sucesivas determinaciones del I. de P., se paró cada vez la bomba de vacío comprimido. Después de la toma de muestras, se conectaron de nuevo los tubos, reiniciando el pasaje de aire y llevando un control del tiempo a lo largo de toda la determinación.

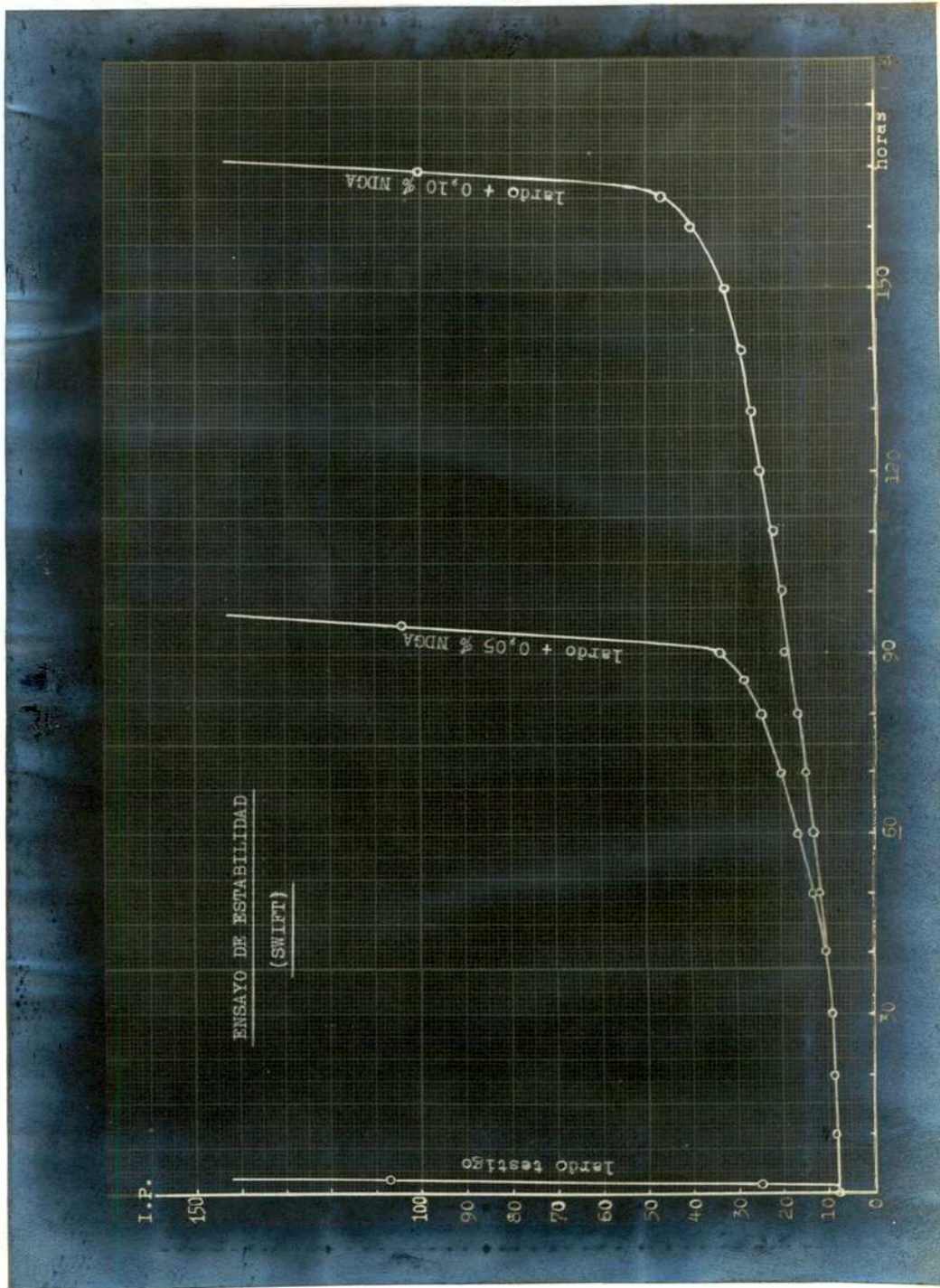
Un inconveniente que no se pudo evitar por razones comprensibles, fué el siguiente: El funcionamiento del aparato tuvo que ser suspendido cada noche para reiniciarlo a la mañana siguiente. Este hecho, que hubiera sido un inconveniente de importancia en determinaciones del tiempo exacto de estabilidad de una grasa bajo las condiciones del ensayo de Swift, no representó mayor problema para nuestra determinación, en la que solo se midió un período relativo de estabilidad, por comparación con las otras dos muestras, sometidas a las mismas condiciones.

El cuadro de la página siguiente nos da una idea precisa de la marcha de la oxidación en las 3 muestras.

**ENSAYOS DE ESTABILIDAD
(SWIFT)**

Tiempo en horas.	Indice de peróxido :		
	tubo 1 larde	tubo 2 larde + 0,05 % NDGA	tubo 3 larde + 0,2 % NDGA
0	7,6	7,6	7,5
1	7,5	7,5	7,7
1½	25,1	7,7	7,5
2	107 ^x	7,8	7,7
2½	151	7,8	7,9
3	210	7,8	8,0
10		8,1	8,2
20		8,2	8,2
30		8,5	8,6
40		10,0	10,1
50		13,0	11,1
60		16,1	12,9
70		19,9	14,5
80		24,6	16,2
85		28,2	18,1
90		33,1	19,5
95		104,8 ^x	19,5
100		204	20,0
110			22,4
120			25,3
130			26,7
140			28,9
150			32,7
160			39,8
165			46,6
170			100 ^x
175			232

x - meto clor rancio en el tubo de desprendimiento.



Para medir la eficacia de un inhibidor de oxidación, se ha definido un

Indice protector = $\frac{\text{Tiempo de estab. de la grasa + inhibidor}}{\text{Tiempo de estabilidad de grasa tal cual}}$

Considerando como final del período de estabilidad, el momento en que el aire que sale del tubo de desprendimiento comienza a denotar un neto olor rancio, hemos obtenido los índices siguientes:

	<u>Indice protector</u> (bajo las condiciones del ensayo de Swift)
Lardo + 0,05 % NDGA	48
Lardo + 0,10 % NDGA	85

Estas cifras nos dan una idea de las notables propiedades antioxidantes del NDGA, que le reservarán en un futuro muy próximo un lugar destacado en la gran industria de las materias grasas.

En las proporciones en que se utiliza para prevenir la rancidez en grasas comestibles, productos horneados, etc., (0,001 - 0,1 %), no trae aparejado inconveniente alguno, es inocuo, no varía el valor alimenticio de las dietas, como se ha comprobado en ensayos biológicos ejecutados con lotes de ratas⁽²⁹⁾, es incoloro, inodoro y no le confiere sabor extraño.

No nos aventuramos demasiado cuando consideramos que su aplicación en gran escala dará una nueva modalidad a la citada industria, permitiendo el almacenaje, manejo, transporte, envase y conservación de las materias grasas en condiciones que nos están vedadas hoy en día por la fácil alteración de las mismas.

4) CONCLUSIONES

1) Se ha aislado e identificado el ácido nordihidroguayarético en ejemplares argentinos de:

a) *Larrea divaricata* Cav., con un rendimiento de 4,2-4,3 % de NDGA bruto, calculado sobre hojas y tallos secos.

b) *Larrea cuneifolia* Cav., con un rendimiento de 4,9 % de NDGA bruto, sobre droga vegetal seca. Es la primera vez que se ha aislado dicho compuesto de la citada especie.

2) Los ensayos del poder inhibidor de oxidación del NDGA obtenido, ejecutados sobre grasa de cerdo (lardo), y utilizando el método conocido por "Ensayo de estabilidad de Swift", han dado resultados altamente satisfactorios.

3) Se sugiere la posibilidad de la obtención y aplicación industrial del ácido nordihidroguayarético en nuestro país.

Emiliano L. Ruiz

5) BIBLIOGRAFIA

- 1) - Descole, O'Donell y Lourteig, Lilloa, 5, 304 (1940)
- 2) - Train, P., Henricks, J.R., Archer, W.A., "Medicinal Uses of Plants by Indian Tribes of Nevada", U.S. Dept. Agr., Washington.
- 3) - Waller, C. y Gisvolt, O., J. Am. Pharm. Assoc., 34, 78 (1945)
- 4) - Lowe, C.B., Am. J. Pharm., 70, 234, (1898)
- 5) - Stillman, J.M., Am. Chem. J., 2 (1880)
- 6) - Kearney y Cameron, U.S. Dept. Agr. Rept., 71, 62 (1902)
- 7) - Mallery, Ecol. Monographs, 5, 1 (1935)
- 8) - Horn, G.M. y Gisvolt, O., J. Am. Pharm. Assoc., 34, 82 (1945)
- 9) - Fonyo, A., Oil & Soap, 23, 3 (1946)
- 10) - Beilstein, 1er. suplemento, 4a. ed., 6, 577 .
- 11) - Lundberg, W.O., Halvorson, H.O. y Burr, G.O., Oil & Soap, 21, 33 (1944)
- 12) - Schroeter, G., Lichtenstadt, L. e Irineu, D., Ber. 51, 1587 (1918)
- 13) - Barnes, R.H., Lundberg, W.O., Hanson, H.T. y Burr, G.O., J. Biol. Chem., 149, 313 (1943)
- 14) - Brettie, D.P., Oil & Soap, 10, 127 (1933)
- 15) - Mitchell, H.S. y Black, H.C., Ind. and Engng. Chem. 35, 50 (1943)
- 16) - Gisvolt, O., Patente US 2.382.475 (1945)
- 17) - Huntress y Mulliken, "Identification of pure organic compounds", New York (1941) p227.
- 18) - Karrer, P., "Tratado de Química Orgánica", Barcelona (1941) p494.
- 19) - Lea, C.H., "Rancidity in edible fats", New York (1939) p79.
- 20) - Staudinger, H., Ber. 58B, 1075, (1925)

REFRA

- 21) - Hock, H. y Susemihl, W., Ber. 66B, 61 (1933)
 - 22) - Hamilton, L.A. y Olecott, H.S., Ind. and Engng. Chem., 29, 217 (1933)
 - 23) - Wagner, A.M. y Brier, J.C., Ind. Engng. Chem., 23, 40, 662 (1931)
 - 24) - Hilditch, T.P. y Sleightholme, J.J., J. Soc. Chem. Ind., 51, 39
(1952)
 - 25) - Moureau, C. y Dufraisie, C., Chem. Ind. Rev., 47, 819, 848 (1928)
Chem. Rev., 3, 113 (1926)
 - 26) - King, Roschen e Irwin, Oil & Soap, 10, 105 (1933)
 - 27) - Oil & Soap, 20, 169 (1943)
 - 28) - Oil & Soap, 22, 101 (1945)
 - 29) - E.W. Crampton y M.F. Mills, C.A., 2200⁸ (1946)
-