

## Tesis de Posgrado

# Esteroles y saponinas en algunas plantas textiles

Pontis Videla, Horacio G.

1953

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](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:**

Pontis Videla, Horacio G.. (1953). Esteroles y saponinas en algunas plantas textiles. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0739\\_PontisVidela.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0739_PontisVidela.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pontis Videla, Horacio G.. "Esteroles y saponinas en algunas plantas textiles". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1953.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0739\\_PontisVidela.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0739_PontisVidela.pdf)

RESUMEN DE LA TESIS : ESTEROLES Y SAPONINAS EN ALGUNAS PLANTAS

TEXTILES

Debido a la importancia que las sapogeninas han alcanzado últimamente por su utilización como punto de partida para la síntesis de hormonas sexuales y corticales, particularmente de la cortisona, se ha estudiado la fracción esteroide del *Phormium tenax* (Liliáceas) y de tres especies de *Agaves* (Amarilidáceas) : *A. sisalana*, *A. americana* y *A. americana* var. *marginata*.

El método seguido comprende la extracción de los esteroides del tejido vegetal con alcohol 95 % hirviendo, hidrólisis ácida del extracto concentrado, seguida por extracción de los esteroides libres con éter etílico, evaporación del éter, saponificación del residuo y nueva extracción con éter etílico o éter de petróleo. El producto crudo obtenido por evaporación, se estudia por cristalización fraccionada y/o cromatografía.

En esta forma se ha aislado de los rizomas del *Phormium tenax* por primera vez,  $\beta$ -sitosterol p.f. 135-135,5°, que fué identificado por análisis del esteroide y de su acetato, y por la preparación de éste p.f. 127-128°, y de su m-dinitrobenzoato p.f. 208-209°. También se ha aislado una fracción de p.f. 153-154°,  $[\alpha]_D - 40^\circ$ , que da reacción de Liebermann positiva, y que por falta de material no fué posible identificar, habiendo preparado con este objeto únicamente su m-dinitrobenzoato p.f. 219-220°.

Se ha confirmado que las especies de *Agaves* estudiadas, aclimatadas en el país contienen sapogeninas como los ejemplares autóctonos de México, su de Estados Unidos y Africa Oriental, estudiados por otros autores, aislando hecogenina, acompañada de 9-dehidrohecogenina.

El método usado para investigar la presencia de 9-dehidrohecoge-

nina, es la espectrometría ultravioleta, y está basado en que los sistemas cetónicos  $\alpha\beta$  no saturados, como el que presenta aquella genina, tienen una fuerte banda característica en 238  $m\mu$  con un coeficiente de extinción molecular  $\epsilon_{\max}$  de alrededor de 11.000 para una sustancia pura.

El punto de fusión de la hecogenina hallado en cada caso parece depender de la cantidad de 9-dehidrohecogenina que la acompaña. Así, la aislada del Agave sisalana funde a 251-253° (0,8 % de 9-dehidrohecogenina), mientras que hecogenina del Agave americana funde a 243° (15 %), y una fracción hecogenina aislada del Agave americana var. marginata de p.f. 238-247° tiene 8 % de 9-dehidrohecogenina.

La identificación de la hecogenina fué realizada en cada caso por la preparación de su acetato y de su 2-4-dinitrofenilhidrazona.

*H. M. J. Ponte Vizcay*

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTEROLES Y SAPONINAS  
EN ALGUNAS PLANTAS TEXTILES

*Tesis: 739*

Tesis presentada para optar al título

de

DOCTOR EN QUÍMICA

por

HORACIO G. PONTIS VIDELA

A mis padres

Al Dr. Venancio Deulofeu mi sincero agradecimiento por sus valiosas enseñanzas y su constante guía en la terminación de mis estudios.-

Al Ingeniero Hernando Campos Menéndez mi reconocimiento por su iniciativa a la que se debió la iniciación del presente trabajo.-

Al Dr. Andrés Stoppani mi reconocimiento por la generosa hospitalidad brindada para la realización de la mayor parte de este trabajo en los laboratorios de la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas.-

Mi agradecimiento al Dr. Jorge O. Deferrari por el interés prestado a este trabajo y al Dr. Daniel Bassi por las determinaciones de espectro ultravioleta que lo acompañan.-

En estos últimos años, el interés despertado por las sapogeninas ha sido considerable, debido a su utilización como punto de partida para la síntesis industrial de hormonas sexuales y corticales, particularmente de la cortisona. Las sapogeninas se encuentran en distintas especies de las familias de Amarilidáceas, Liliáceas y Dioscoreáceas, autóctonas en su mayoría de Méjico y del Sud de Estados Unidos. Algunas de estas especies se han aclimatado en el país, y por ello era de particular interés conocer su contenido en sapogeninas.-

De acuerdo a esto hemos realizado el estudio del *Phorwiun tenax* (Liliáceas), de donde sólo hemos podido aislar  $\beta$ -sitosterol, y de tres especies de Agaves (Amarilidáceas): *A. sisalana*, *A. americana*, y *A. americana* var. *marginata*, confirmando que contienen sapogeninas como los ejemplares de los países donde se originaron. Se ha aislado hecogenina, acompañada de 9-dehidrohecogenina.

### Phorwiun tenax

El *Phorwiun tenax* originario de Nueva Zelandia, se cultiva en cierta extensión en nuestro país, particularmente en la zona del Delta, con objeto de aprovechar su fibra. Su estudio presentaba así la ventaja de contar con la posibilidad de un futuro aprovechamiento de los residuos de la industrialización de la fibra, como se ha hecho recientemente con el sisal (1).

Los trabajos que se encuentran en la bibliografía sobre el *Phorwiun tenax* se refieren principalmente a su fibra, tratan

do solamente los de Aitken (2) y Bawdt (3), su composición química. Estos autores han hecho el análisis de las hojas, pero concentrando su atención sobre el contenido en celulosa y lignina con vistas a su aprovechamiento textil.

La falta de información sobre los esteroides presentes en el *Phoradendron tenax* nos llevó a efectuar un ensayo preliminar con raíces, rizomas y hojas extrayéndolas con metanol - agua y observando el residuo que se obtenía por hidrólisis ácida. Se encontró el mayor residuo en los rizomas y sobre éstos se aplicó el método de Marker (4) para concentrar esteroides, con algunas modificaciones que se detallan en la parte experimental.

A pesar de la bondad del método anterior que pudimos comprobar en el estudio de los *Agaves*, no hemos podido encontrar saponinas en el *Phoradendron tenax*, por el contrario de sus rizomas hemos aislado por primera vez  $\beta$ -sitosterol p.f. 135-135<sup>o</sup>, que fué identificado por análisis del esteroil y de su acetato y por la preparación de éste y de su *m*-dinitrobenzoato (Tabla I).



**TABLA I**

(a)

**Datos comparativos del  $\beta$ -sitosterol y sus derivados**

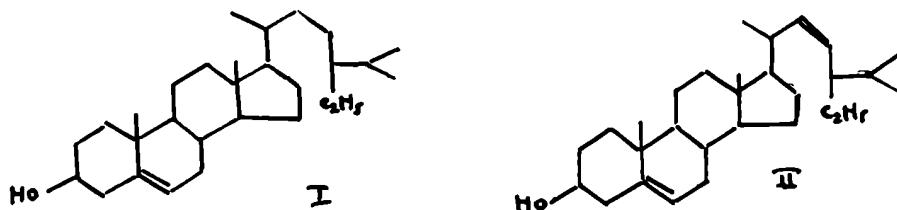
esterol		acetato	m-dinitrobenzoato		literatura
P.F. °C	$[\alpha]_D$	P.F. °C	P.F. °C	$[\alpha]_D$	
135-135,5	-36,6°	127-128	208-209	-15,2°	(b)
137,5-138,5	-34°	126,5-127,5	203-209	-	(8)
135-135,5	-34,2°	126-127	207-208	-21,7°	(24)
136-137	-36,6°	125-126	202-203	-10,4°	(7)
137	35°	128	203	-10,6°	(17)

(a) Todos los poderes rotatorios en cloroformo

(b) Datos correspondientes al presente trabajo

Los sitosteroles son los esteroides más comunes en los vegetales; Anderson (5,6) encontró que consistían en una mezcla de por lo menos tres sustancias no saturadas, designadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  -sitosterol. De ellos, el  $\beta$ -sitosterol se halla ampliamente distribuido; es el esteroide presente en mayor cantidad en el aceite de semilla de algodón (7) y en el aceite de Calycanthus (8). Ha sido aislado del aceite de germen de trigo (6,9) y la sustancia denominada cincho, aislada de la corteza de quina (10) se ha identificado con el  $\beta$ -sitosterol (11, 12,13). También se lo ha aislado recientemente de la corteza del Fagara coco (14), y parece ser un constituyente de los si-

tosteroles del aceite de germen de centeno (15), y del aceite de raíz (6,9).



El  $\beta$ -sitosterol (I) es un alcohol no saturado de fórmula  $C_{29}H_{50}O$  (16,17). Su producto de hidrogenación,  $\beta$ -sitostanol es idéntico al stigmasterol (18,19), y se ha obtenido una sustancia idéntica al  $\beta$ -sitosterol por hidrogenación selectiva del doble enlace de la cadena lateral del stigmasterol (II) (20). Además el  $\beta$ -sitosterol ha sido degradado a ácido 3 $\beta$ -hidroxinorallocolánico (21), y a través de su epidihidro acetato, a androsterona (22). El  $\beta$ -sitosterol está así completamente caracterizado como 22-dihidro stigmasterol (23).

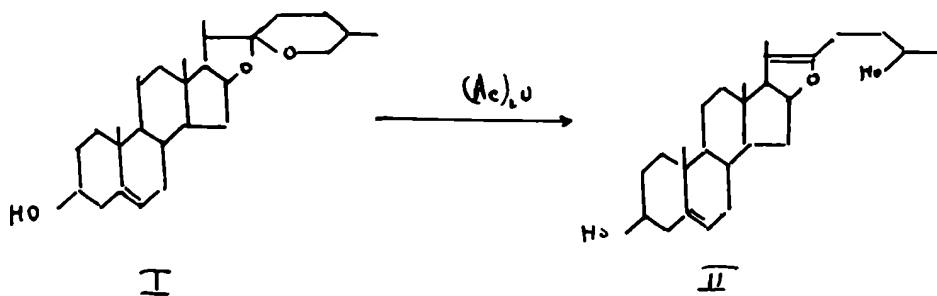
Del mismo Phoradendron tenax hemos aislado una pequeña fracción de p.f. 153-154° [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -40° que da reacción de Liebermann positiva y que por falta de material no nos fué posible identificar, habiendo preparado con este objeto únicamente su m-di-nitrobenzoato, p.f. 219-220°. Los datos anteriores, si bien in-completos, parecen indicar que se trata de stigmasterol muy in-

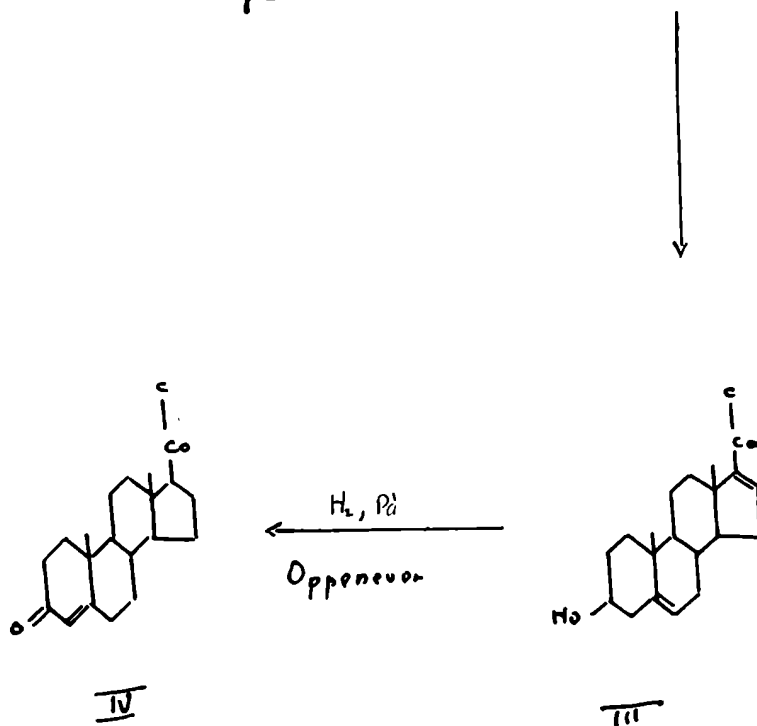
puro. En algunos casos (5,24) se ha señalado que el  $\beta$ -sitosterol está acompañado por aquél. En el nuestro no podemos afirmarlo pero es evidente que otro esteroide acompaña al  $\beta$ -sitosterol.-

### Las saponinas

Hasta hace relativamente pocos años, el colesterol, los ácidos biliares, y ciertos fitosteroles, constituían el principal material usado en la síntesis industrial de hormonas sexuales y corticales. La posibilidad de obtener estas hormonas más fácilmente se logró cuando los estudios sobre saponinas demostraron la facilidad con que se obtenían de ellas derivados de las series del pregnano y del androstano.-

Las saponinas aisladas de *Dioscoreas* y *Smilax*: diosgenina, neodiosgenina, nologenina y sarsasapogenina, son las que permiten llegar a hormonas sexuales en menor número de pasos. Así, de acuerdo a los trabajos de Marker (4,25), diosgenina (I) se transforma por calentamiento con anhídrido acético en pseudodiosgenina (II), la cuál es oxidada a una cetona no saturada (III), de donde se pasa por hidrogenación selectiva y oxidación de Oppenauer a progesterona (IV).-



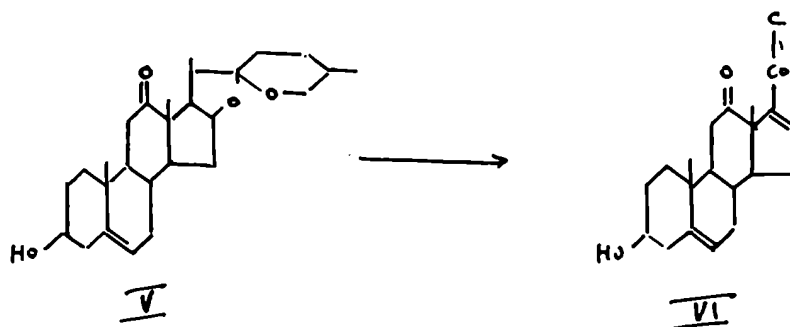


En forma más o menos semejante se obtiene también de diogenina (26) dehidro-iscandrosterona, punto de partida para diversas síntesis de testosterona (27). Además, también se obtiene testosterona de sarsasapogenina (4), y más recientemente los trabajos de Rosenkranz (28) permiten pasar de ésta a las hormonas estrógenas: estrona, estradiol y equilenina.

Por otra parte, algunas de las sapogeninas aisladas de *Agave*, *Yuccas* y de ciertas *Dioscoreas* (29,30,31), tienen sustituyentes en el anillo C: un grupo cetónico o un hidroxilo en la posición 12, constituyendo así materiales más indicados para la síntesis industrial de la cortisona (32).

Estas sapogeninas por calentamiento con anhídrido acéti-

co, en una reacción general a todas las geninas, se transforman en las pseudosapogeninas, de las cuales por oxidación y posterior hidrólisis se llega a derivados del 16-dehidropregnano, (4). Así, de botogenina (V) aislada de *Dioscorea mexicana*, se obtiene 16-dehidro pregnano-5-ol-3-diona-12,20 (VI) (33).-

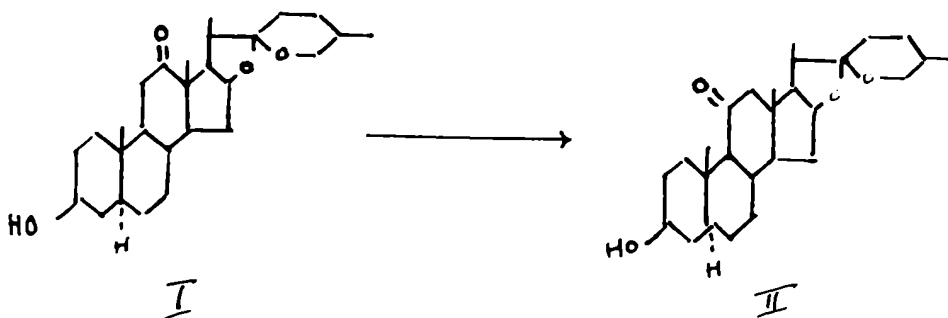


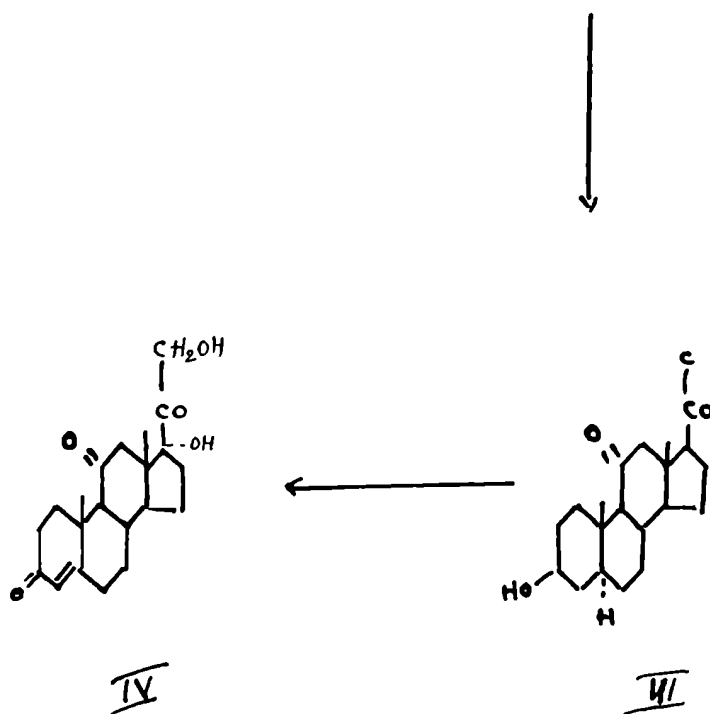
Los rendimientos con que obtienen estos derivados varían de 40 a 50% (32), por el contrario en el caso de otros esteroides naturales, la mayor pérdida del rendimiento la constituye la eliminación de su cadena lateral. Además, el número de pasos para llegar a compuestos corticales, es menor en el caso de las sapogeninas, ya que por intermedio de sus derivados del 16-dehidro-pregnano, constituyen las sustancias a partir de las cuales es más fácil construir la cadena lateral de las hormonas corticales. (32)-

### Los Agaves. La Hecogenina

Los Agaves pertenecen a la familia Amarilidáceas, y son plantas autóctonas del sudoeste de Estados Unidos, Méjico y Africa Oriental. De sus distintas especies se han aislado en total seis sapogeninas (1,4,29,31), cuatro de ellas con un grupo cetónico en C<sub>12</sub>: hecogenina, manogenina, 9-de hidromanogenina, y 9-dehidrohecogenina, teniendo las restantes dos por el contrario un hidroxilo en la posición 12: agavogenina y rockogenina.

De las geninas aisladas de los Agaves, la que tiene una estructura más apropiada para la síntesis de la cortisona, es la hecogenina (I). Efectivamente, Djerassi (34) la ha convertido en 11-cetotigogenina (II), que ha sido transformada (35) en allo-pregnan 3 $\beta$ -ol-11,20-diona (III). De este derivado del pregnano obtenido también de diosgenina, Rosenkranz (36) ha sintetizado cortisona (IV), con lo cual se puede decir que también se la ha obtenido de hecogenina.





La hecogenina fué aislada por primera vez por Marker (4,29) de *Hechtia texensis*, planta nativa de Méjico, y posteriormente se halló que se encontraba muy distribuída entre las distintas especies de Agaves, entre ellas las estudiadas por nosotros (1,4,29).

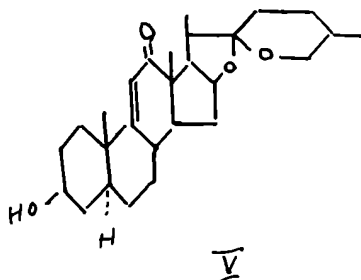
De las distintas especies aclimatadas en el país, hemos elegido para nuestro estudio al Agave sisalana, por la importancia textil que representa su cultivo potencial, así como por el posible aprovechamiento de los residuos de su industrialización, y al Agave americana, y Agave americana var. mar



ginata, por hallarse bastante distribuidos en el interior del país, particularmente en la Provincia de Córdoba.

La extracción de las saponinas de las hojas de los Agaves, fué realizada aplicando el método de Marker (4) con las modificaciones detalladas en la parte experimental. El producto obtenido en la extracción fué trabajado según los casos por cristalización fraccionada y/o cromatografía. En esta forma aislamos de cada uno de los Agaves estudiados hecogenina, acompañada por 9-dehidrohecogenina.-

La hecogenina aislada por Marker, presentaba puntos de fusión variables (4) (Tabla II) lo mismo que su acetato, y se lo atribuyó en un principio a fenómenos de polimorfismo. Más tarde los estudios de Wagner (31) señalaron que la hecogenina podía estar acompañada de cantidades variables de 9-dehidrohecogenina (V), de la cual puede ser separada con relativa facilidad por cromatografía. Aquella circunstancia, plantea la posibilidad de que los puntos de fusión más bajos (Tabla II) primero encontrados correspondan a una mezcla de las dos geninas, sobre todo cuando últimamente se ha subrayado que cantidades relativamente pequeñas de otras saponinas o de otras sustancias, pueden afectar marcadamente los puntos de fusión, haciéndolos



dad por cromatografía. Aquella circunstancia, plantea la posibilidad de que los puntos de fusión más bajos (Tabla II) primero encontrados correspondan a una mezcla de las dos geninas, sobre todo cuando últimamente se ha subrayado que cantidades relativamente pequeñas de otras saponinas o de otras sustancias, pueden afectar marcadamente los puntos de fusión, haciéndolos

descender de 5° de 15° (37).-

Los puntos de fusión de la hecogenina hallados por nosotros, y que se indican en la Tabla II, apoyan aquella interpretación, como puede verse al observar los porcentajes de 9-dehidro hecogenina señalados en cada caso.-

**TABLA II**

Datos comparativos de la hecogenina y sus derivados

	(a)	(b)	Agave sisalana	Agave americana	Agave americana v. marginata
	P.F.	P.F.°C	P.F.°C	P.F.°C	P.F.°C
hecogenina	268	245.253,268	251-253	243	235-248
acetato	245	243,252	240-243	235-238	238-243
2-4-dinitrofenilhidrazina		281-282 d.	275-276 d.	274-275 d.	270-272 d.
% de 9-dehidrohecogenina			0,8	15	8 <sup>(c)</sup>

(a) Wagner, Forker, y Spitzer, J.An.Chem.Soc., 73, 2494 (1951)

Wall, Krider, Rothman y Eddy, J.Biol.Chem., 198, 541 (1952)

(b) Marker, Wagner, Ulschafer, Wittbecker, Golsmith y Rouf, J.An.Chem.Soc.,

65, 1199 (1943) ; *ibid.*, 69, 2167 (1947)

(c) Corresponde a una fracción de p.f. 238-247°

En los estudios que hemos efectuado con los Agaves, aplicamos la purificación cromatográfica al Agave sisalana, llegando a obtener hecogenina de p.f. 251-253° e investigamos en ella la presencia de 9-dehidrohecogenina por espectrometría ultravioleta, método aplicado por primera vez con este objeto por Wagner (31). Está basado en que los sistemas cetónicos  $\alpha\beta$  nosaturados presentan una fuerte banda característica en 238  $m\mu$  con un coeficiente de extinción molecular  $\epsilon_{\max}$  de alrededor de 11.000 para una sustancia pura. En esta forma comprobamos que aquella contenía menos de 0,8 % ( $\epsilon_{\max}$  87) de 9-dehidrohecogenina.

Por el contrario el método cromatográfico aplicado al Agave american var. marginata, no nos permitió obtener hecogenina de punto de fusión tan elevado como en el caso anterior, probablemente se puede atribuir este hecho, aunque no podemos afirmarlo, a que la cantidad de 9-dehidrohecogenina presente en el preparado inicial cromatografiado, no permitía una adecuada separación. Obtuvimos fracciones de p.f. 235-248° y 238-247°, mostrando el espectro de esta última 8 % ( $\epsilon_{\max}$  839) de 9-dehidrohecogenina.-

Por razones de cantidad de material, sólo trabajamos al producto obtenido en la extracción del Agave americana por cristalización fraccionada, obteniendo de esta forma hecogenina de p.f. 243°. Su espectro mostraba 15% ( $\epsilon_{\max}$  1621) de 9-dehidrohecogenina.

En cada caso la hecogenina fué identificada preparando su acetato y su 2-4- dinitrofenil-hidrazona.

En el trabajo de Wagner, antes citado (31), se puede observar una falta de relación entre los puntos de fusión de las fracciones hecogenina, y los respectivos coeficientes de extinción molecular  $\epsilon_{\max}$ . Igual circunstancia hemos podido comprobar en el presente estudio, ya que mientras a hecogenina de p.f. 243°, le corresponde  $\epsilon_{\max}$  1621, por el contrario un preparado que funde en un margen más amplio, como el aislado del Agave americana var. marginata, de p.f. 238-247° tiene  $\epsilon_{\max}$  839.

Queremos dejar constancia de nuestro agradecimiento al Dr. Dalma, de la Compañía Atanor S.A. Mixta por su obsequio de extractos alcohólicos de *Phorwiun tenax*, y a los Ingenieros Agrónomos Clos y Sívori, del Ministerio de Agricultura y Ganadería, por la cesión de los ejemplares de Agaves que permitieron la realización del presente trabajo.-

## PORTE EXPERIMENTAL

### Phormium tenax

#### Ensayo preliminar

Cien g de raíces se extraen con 1000 ml. de metanol-agua (1:1), dejándolas en contacto con el solvente un día a temperatura ambiente. Se filtra, y se hidroliza con ácido clorhídrico comercial 10 %, hirviendo a reflujo 45 minutos. Se enfría y se deja decantar de dos a tres días; se desecha parte del líquido sobrenadante, se centrifuga el resto, se lava con agua y el residuo que se obtiene una vez seco pesó - 0,12 g.

El procedimiento usado con las raíces, fué el mismo en las experiencias con rizomas y hojas. En la Tabla III se encuentran los resultados obtenidos en cada una de ellas

TABLA III

material	raíces	rizomas completos	rizomas sin corteza	hojas
cantidad extraída en g.	100	100	150	100
tiempo de contacto con metanol-agua, en días	2	1	2	1
tiempo de decantación del hidrolizado, en días	2	3	2	-
peso del residuo, en g	0,12	2,12	1,39	-

#### Aislamiento de la fracción esteroide del Phormium tenax.

Un extracto alcohólico de ca. 30 kg. de rizomas de P. tenax, preparado bajo la dirección del Dr. Palma, de la Compañía Atenor S.A. Mixta, y concentrado a ca. 700 ml

se hidroliza con ácido clorhídrico etanólico 2N; se añaden al extracto alcohólico 2200 ml de etanol y 676 ml de ácido clorhídrico concentrado (d,1,17) hirviendo la solución dos horas. -

El hidrolizado se separa en dos fracciones iguales; a la primera mitad se le agregan 750 ml de éter etílico, se agita y se filtra lavando el residuo con 1950 ml de éter. Se añade más éter y se lava el extracto etéreo con agua, hidróxido de sodio 5 % y agua. La segunda mitad del hidrolizado se trata en la misma forma. Se unen las dos soluciones etéreas, se evapora y se saponifica con 300 ml de hidróxido de potasio alcohólico 10% durante media hora. Se elimina la mayor parte del alcohol por destilación a baja presión, y el jarabe resultante se mezcla con sulfato de sodio hasta formar una pasta seca. Se la extrae en Soxhlet con éter de petróleo doce horas, y se seca el extracto con sulfato de sodio. Se evapora y el residuo coloreado en amarillo se disuelve en alcohol caliente, cristalizando por enfriamiento. El precipitado pesa 2,71 g y funde a 110-115°.

Los ensayos de cristalización de este producto, si bien dieron sustancias cristalinas, su punto de fusión no era neto, por lo cual para su división aplicamos el método cromatográfico.-

#### Aislamiento de $\beta$ -sitosterol

Un g del producto obtenido de p.f. 110-115°, se disuelve en 100 ml de benceno y se cromatografía a través de

una columna de 38 g de alúmina ( Brockmann) y de 30 mm de diámetro. Se eluye con benceno y las fracciones separadas son las indicadas en la Tabla IV.-

Las fracciones 1 y 2, son masas amarillas de aspecto céreo, poco solubles en alcohol. La fracción 3, es una masa friable muy poco coloreada; por enfriamiento de solución alcohólica de agujas. Todas las fracciones restantes dan cristales incoloros de alcohol.-

Se purifica por cromatografía las fracciones de p.f. 133 -135°, se disuelve un g en 100 ml de benceno y se pasa por una columna de 38 g de alúmina (Brockmann) y de 30 mm de diámetro. Se eluye con benceno; las fracciones separadas se indican en la Tabla IV.-

Las fracciones 4 a 11 se unen y se reocrystalizan de etanol. Se obtienen cristales de  $\beta$ -sitosterol que funden a 135-135,5°.-



TABLA IV

Fracción	Volumen, ml.	Residuo, mg	PF °C
1	100	87	55- 60
2	100	125	60 - 70
3	50	49	122- 125
4	50	69	134- 135
5	50	101	133- 135
6	50	114	134- 135
7	50	142	133- 135
8	50	119	132- 133
9	50	93	142- 144
10	50	36	150- 151
11	50	-	153- 154

TABLA V

Fracción	Volumen, ml.	PF °C
1	100	-
2	100	-
3	50	133
4	50	134
5	50	134
6	50	134
7	50	135
8	50	134,2
9	50	134
10	50	134
11	50	133,5
12	50	148

Analisis.- Calculado para  $C_{29}H_{50}O$  : C, 84,05 ; H, 12,07.

Encontrado: C, 83,55 ; 83,47 ; H, 11,90 ; 11,95

Poder rotatorio del esteroi

$[\alpha]_D$  - 36,6° (Cloroforno . 2 cm. c, 2,15)

Acetato de  $\beta$ -esteroi

0,1 g de esteroi se disuelven en caliente en 5 ml de anhídrido acético y se calienta a reflujo dos horas. Cristaliza por enfriamiento: se filtra y se recristaliza cuatro veces de alcohol. Placas que funden a 127- 128°

Analisis .-Calculado para  $C_{31}H_{52}O_2$  : C, 81,40; H, 11,59 .

Encontrado: C, 81,49 ; H, 11,04

m-dinitrobenzoato de  $\beta$ -esteroi

0,2 g de esteroi y 1 g de cloruro de m-dinitrobenzoilo, se disuelven en 15 ml de piridina y se calienta a reflujo media hora. Se enfría y se vuelca en ca. 100 ml de agua helada, produciéndose una suspensión difícil de filtrar. Se centrifuga dos veces ; el precipitado formado se suspende en agua, se filtra y se lava con agua y alcohol. El precipitado crudo pesa 0,18 g; se disuelve en alcohol, hierve con carbón y filtra. Del filtrado se obtienen agujas que funden a 208-209°.-

Este punto de fusión coincide con los hallados

por Cook y Paige (8) y por Simpson y Williams (24), trabajos más recientes que los de Windaus (17) y Wallis y Chakravorty (7) que dan p.f. 203° y 202-203° respectivamente por lo que sugerimos que el punto de fusión más elevado sea el correcto para el m-dinitrobenzoato de  $\beta$ -sitosterol.

### Poder rotatorio del m-dinitrobenzoato

Ia. muestra :  $[\alpha]_D - 16^\circ$  (Cloroforno .  $l$  2 cm. c, 0,37)  
IIa. muestra :  $[\alpha]_D - 15,2'$  (Cloroforno.  $l$  2 cm. c, 1,21)

Conviene señalar que para el poder rotatorio de este derivado, tampoco hay valores concordantes en la literatura. Mientras Windaus (17) y Wallis y Chakravorty (7) , dan como valor  $[\alpha]_D - 10,6^\circ$  y  $- 10,4^\circ$  respectivamente, Simpson y Williams (24) por el contrario indican  $[\alpha]_D - 21,7^\circ$ .-

### Aislamiento de la fracción de p. f. 153 -154°

280 mg de las fracciones de punto de fusión mayor de 136°, se disuelven en 50 ml. de benceno y se pasan por una columna de 11 g de Alúmina (Brockmann) y de 19 mm. de diámetro. Se eluye con 230 ml de benceno, y se recogen 45 - fracciones de 5 ml, cada una, que después por combinación se reducen a tres, que cristalizadas de alcohol funden : I) 136-144° II) 144,5-145,5° y III) 153- 154°.

La fracción II por una nueva cromatografía se resolvió como una mezcla de I y III.-

La fracción III, da reacción de Liebermann po-

sitiva y cristaliza en forma de placas irregulares de alcohol.

Poder rotatorio de la fracción de p.f. 153-154°

$[\alpha]_D - 40^\circ$  (cloroforno .  $l$  2 dm.  $c$ , 0,4)

m-dinitro benzato de la fracción de p.f. 153-154°

29,5 mg de la fracción de p.f. 153-154° , y 600 mg de cloruro de m-dinitrobenzilo se disuelven en 2,25 ml, de piridina. Se calienta a reflujo a baño maría media hora. Se enfría y se vuelve en ca. 50 ml de agua helada. Se filtra, lavando con agua y con alcohol, obteniéndose un precipitado de color oscuro, que se disuelve en benceno, hierve con carbon, y se filtra. Se elimina el disolvente del filtrado por destilación a presión reducida, y el residuo se recristaliza de mezcla alcoholbenceno ( 3 : 1) se obtienen agujas de p.f. 219 - 220°.-

Amara

Acave sinalaya

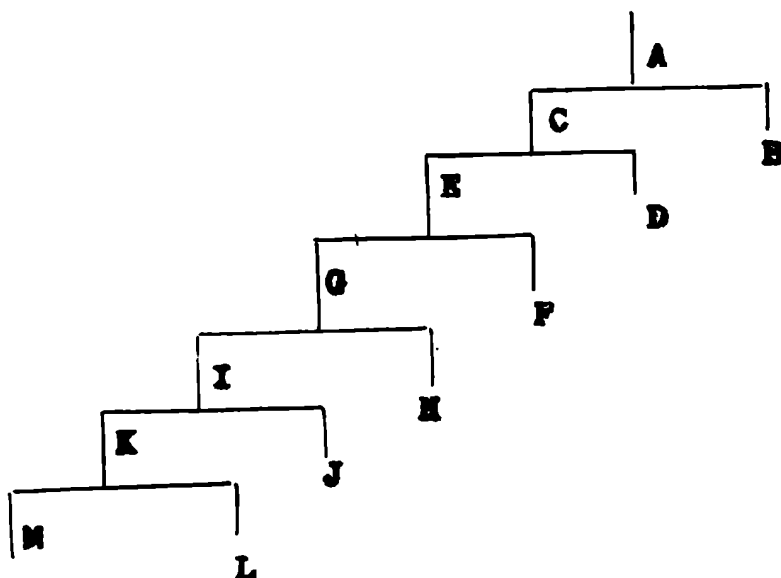
Aislamiento de la fracción esteroide

Quince kg de hojas frescas se cortan en trozos pequeños y se secan a vacío. El material seco obtenido - 775 g - se hierve a baño maría , doce horas con etanol 95 %, cambiando el disolvente cada cuatro horas. Se emplean en total 15 litros de alcohol. El extracto de color verde oscuro se concentra a ca 1000 ml por destilación a presión reducida.-

Se hidroliza con ácido clorhídrico etanólico 2N; se añaden a la solución alcohólica 370 ml de ácido clorhídrico concentrado (d,l,II) y se lleva a dos litros por agregado de etanol 95%, hirviendo la solución dos horas. Se neutraliza al tornasol agregando 160 g de hidróxido de sodio y se concentra a menos de la mitad por destilación a baja presión, y se evapora el resto a baño maría. El jarabe que se obtiene se mezcla con sulfato de sodio hasta formar una pasta seca que se extrae en Soxhlet con éter etílico. El extracto etéreo se evapora y se saponifica con 200 ml de hidróxido de potasio alcohólico 10% durante media hora. Se elimina la mayor parte del alcohol por destilación a presión reducida, y el jarabe que se obtiene se mezcla con sulfato de sodio hasta formar una pasta seca. Se la extrae con éter etílico en Soxhlet y se concentra el extracto a ca 50 ml. Se deja evaporar, y el residuo coloreado que se obtiene se pesa seco: 4.49 g.-

Fraccionamiento del producto obtenido en la extracción.

Se hierve el producto obtenido en la extracción con 300 ml de acetona, dando una solución opaca que se hierve con carbón y se filtra. Del filtrado (A) por enfriamiento se separa un precipitado de aspecto ceroso de p.f. 80-100° (B)



Su agua madre (C) se lleva a sequedad por destilación a presión reducida, y el residuo se cristaliza de 20 ml de acetona, obteniéndose cristales de p. f. 200- 225° (D) Peso 630 mg. El agua madre (E) de esta fracción se lleva a sequedad por destilación a baja presión, cristalizándose el residuo de 10 ml. de acetona. Se obtienen por enfriamiento cristales de p.f. 120- 130° (F) .El filtrado (G) obtenido de ésta última cristalización se concentra, se enfría y se filtra, separándose un precipitado cristalino de p.f. 210- 230° (H) Peso 82 mg. Su agua madre (I) se concentra y después de un día en heladera se filtra, obteniéndose cristales de p.f. 120- 122° (J) . El filtrado (K) correspondiente a esta fracción se concentra hasta la mitad y después de varios días en heladera, se filtra, separándose un precipitado cristalino de p.f. 210-220° (L) . Peso 60 mg. El agua madre (M) se deja evaporar.-

Purificación de la fracción B. ( p.f. 200-225° )-

Se disuelve B ( 630 mg) en 70 ml de benceno y se cromatografía por una columna de alúmina ( 38 g) de 15 mm. de diámetro. Se eluye con 1450 ml de benceno, recogiendo 19 fracciones de 50 ml cada una, y una de 500 ml, que evaporadas dieron las siguientes sustancias : I (1) De aspecto ceroso, amarillenta.- II(2-12) Cristaloide hacia el final, muy poca cantidad por fracción. III (13-19) Cristalina, de acetona funde a 131-133° . Da reacción de Liebermann positiva. - IV (fracción de 500 ml) Cristalina, de acetona agujas de p.f.195° Recristalizada de éter etílico funde a 195- 196°. Acetilada dió agujas de p.f. 187 -190°.-

Análisis. - C, 75,34 . H. 10,59

Evidentemente esta fracción se trata de un compuesto menos oxigenado que las saponinas, y no fué ulteriormente estudiado.-

Se hierve tres veces la alúmina usada con 50 ml, de etanol, se reúnen los extractos, y se lleva a sequedad por destilación a presión reducida, obteniéndose un residuo cristalino coloreado. Se disuelve en exceso de acetona, se decolora con carbon, se concentra, se enfría y filtra. Se obtienen cristales de p.f. 230-240° (V)

Aislamiento de saponina de p.f. 251-253°.-

0,177 g de la fracción V se disuelven en 40ml.

de benceno y se cromatografían por una columna de alúmina (15g) de 17 mm. de diámetro. Se eluye con 1400 ml de benceno, recogiendo 28 fracciones de 50 ml cada una, que evaporadas dan muy poco residuo por fracción. De las fracciones 10-19 se obtienen 8 mg. de una sustancia que de acetona da cristales que funden a 185-186°, y que por falta de material no fué ulteriormente estudiada.-

Se hierve la alúmina usada con etanol y se lleva a sequedad el extracto por destilación a presión reducida. El residuo cristalino que se obtiene se disuelve en acetona, enfría y filtra. Se obtienen agujas que recristalizadas de acetona dieron mesocinina de p.f. 251-253°. Rinde 97 mg.

La fracción H ( p.f. 210-230°) se une a residuos de agua madre de la fracción V de p.f. 215-235°, y por un proceso similar al descrito para B, y repetidas cristalizaciones del producto obtenido en las cromatografías, se obtuvieron cristales de p.f. 250 - 254°.-

#### Acetato de mesocinina

15 mg de cinina se disuelven en 1,5 ml de anhídrido acético. Después de una hora de calentamiento a reflujo, se destila a baja presión el exceso de anhídrido. El residuo se cristaliza de 5 ml de metanol, obteniéndose agujas de p.f. 240 -243° . Rinde 10 mg.

#### 2-4-dinitro fenil hidrazona de mesocinina.

4 mg de acetato disueltos en 0,6 ml de etanol



se tratan con 4 mg de 2-4 dinitro fenil-hidrasina disueltos en un ml de etanol con 0,05 ml de ácido clorhídrico concen- trado. A los tres minutos de hecha la mezcla comienza a pre- cipitar. Después de 5 horas de reposo a temperatura ambiente se filtra; precipitado de p.f. 270- 273 d. Recristalizado de etanol funde a 275 - 276 ° d.

Encuentro de absorción ultravioleta

	PF.	$\epsilon_{\text{máx}}$	mp	% de 9-de hidrococaina
hecogenina	231-233°	87	240	0,8

Asaya americana

Aislamiento de la fracción esterificada

Cinco kg de hojas frescas se trabajan en idéntica forma que el A. sigalana, con la sola diferencia de que el extracto hidrolizado no se neutralizó. Se obtienen 3,9 g de residuo crudo.

Aislamiento de hecogenina de p.f. 243°

Se hierve el producto obtenido en al extracción con 270 ml de acetona, sin llegar a obtener una disolución total. Después de 48 horas en heladera el precipitado de aspecto céreo formado se filtra; una vez seco pesa 1,57 g y funde a 70 - 90°,- Su agua madre se concentra a la mitad, se deja 48 horas en heladera y se filtra. Se obtiene un precipitado cristalino que seco pesaba 604 mg y fundía a 238-240°.- Por recristalización de éter etílico se obtienen agujas de p.f. 243°.

Rinde 314 mg.-

Acetato

0,15 g de gúmina se tratan con 7,5 ml de anhídrido acético en la misma forma que en el A. sisalana. Se obtienen agujas de metanol que funden a 235-238°. Rinde 118 mg.

2-4- dinitro fenil hidrazina

0,04 g. de acetato disueltos en 6 ml de alcohol, se tratan con 0,04 mg de 2-4-dinitrofenilhidrazina, disueltos en 10 ml de alcohol con 0,2 ml de ácido clorhídrico concentrado. Siguiendo igual técnica que en el caso del A. sisalana se obtienen agujas de p.f. 274- 275° d.

Espectro de absorción ultravioleta

	P.F.	$\epsilon_{\text{m}\mu}$	m $\mu$	% de 9- <u>benilarcheo-</u> <u>gúmina.</u>
hocogúmina	243'	1621	239	15
acetato	235-238°	1231	239	11

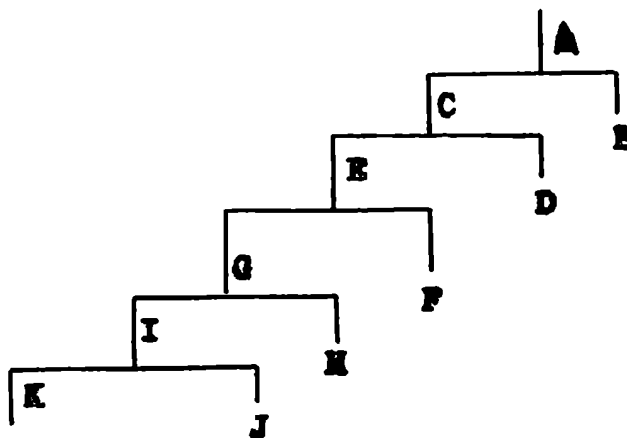
Aislamiento de la fracción esteroide de las raíces

886 g de raíces se trabajan en igual forma que las hojas del A. americana, y se obtienen 2,58 g de residuo crudo.

Aislamiento de la fracción de alto punto de fusión

Se hierve el producto obtenido en la extracción con 150 ml de acetona, obteniéndose una suspensión (A) que se enfría y filtra, separándose un precipitado ceroso de p.f. 75 -

85° (E): Su agua madre (C) se concentra, se enfría y se filtra, obteniéndose un precipitado ceroso de p. f. 70-80° (D)



El filtrado (E) correspondiente a esta última fracción, se concentra, enfría y filtra, separándose un precipitado cristalino que funde a 110-120° (F) El agua madre (G) de esta cristalización se concentra a la mitad, y se obtiene por enfriamiento un precipitado cristalino de p.f. 110- 120° (H). Su agua madre (I) se concentra a menos de la mitad, separándose por enfriamiento cristales de p. f. 220- 230° (J) Peso 40 mg. El agua madre (K) se deja evaporar. La fracción (J), recristalizada de acetona funde a 235 - 242° .Rinde 19 mg.

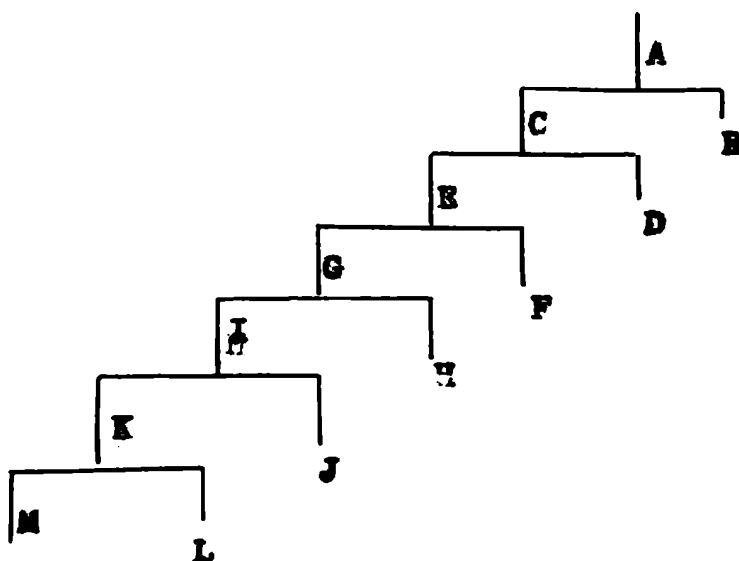
Agave americana var. maximata

Aislamiento de la fracción esteroide

Cinco kg de hojas frescas se tratan en idéntica forma que el Agave sisalana; se obtienen 3.92 g de residuo bruto.

Fraccionamiento del producto obtenido en la extracción.

Se hierve el producto crudo con 150 ml de acetona obteniéndose una solución opaca que se hierve con carbón y se filtra. Del filtrado (A), por enfriamiento se separa un precipitado no cristalino de p. f. 110- 120 ° (B). Su agua madre (C) se lleva a sequedad por destilación a baja presión, y el residuo se cristaliza de 25 ml. de acetona, obteniéndose cristales de p.f. 230-242° (D) Peso 485 mg. Del agua madre (E) de esta fracción se elimina el disolvente por destilación a presión reducida, y el residuo se cristaliza de 12 ml de acetona. Se obtienen por enfriamiento cristales de p.f. 220 -240° (F) Peso 37 mg. El filtrado (G) obtenido de esta última cristalización se concentra, se enfría y se filtra, separándose un precipitado cristalino



de p.f. 195 -205° (M). Su agua madre (I) se concentra, se enfría y se filtra, obteniéndose cristales de p. f. 205-210° (J) El filtrado (K) correspondiente a esta fracción se concentra hasta la mitad, se enfría y se filtra, separándose un

precipitado de p. f. 110- 110° (L) .El agua madre ( M) se deja evaporar.-

Aislamiento de la fracción homogénea de p.f. 235- 248°

Las fracciones D y F (522 mg) se disuelven en 50 ml. de benceno y se pasan por una columna de albúmina (38 g) de 30 mm. de diámetro. Se eluye con 1250 ml de benceno, seguido por 200 ml de benceno-cloroforno ( 1:1) y por 200ml. de mezcla cloroforno-etanol ( 4:1) . Se recogen 33 fracciones de 50 ml. que por combinación una vez evaporadas dan lugar a dos : I ) ( 1-29) . Eluida con benceno y benceno-cloroforno. De aspecto ceroso, y cristalofide hacia el final.- II) (30-33) . Eluida con cloroforno -etanol. Cristalina. Recristalizada de acetona se obtiene fracción homogénea de p.f. 235 - 248°. Peso 328 mg. De su aguada, se separa por concentración y enfriamiento, cristales que recristalizados dos veces de éter etílico anhidro funden a 239-246° (K) .

Aislamiento de la fracción homogénea de p.f. 238 - 247°

Se reúnen las fracciones H y J, y se recristalizan de éter etílico anhidro dos veces. Se obtienen cristales de p. f. 235- 245° (S)

Se unen (R) y (S) , y se recristalizan de éter etílico anhidro, obteniéndose cristales que funden a 238 - 247°.-

Acetato de la fracción hucogénina de p. f. 235-248°.-

0,282 mg. de la fracción hucogénina de p. f. 235-248° se trata con 15 ml de anhídrido acético en la misma forma que en el Agave sisalana. Se metanol cristales que funden a 227-239°. Rinde 192 mg. Recristalizado de éter etílico funden a 238-243°.-

2-4- dinitrofenil hidrazina de la fracción hucogénina de p. f. 235-248°.-

5 mg de acetato disueltos en 0,75 ml de alcohol, se trata con 5 mg de 2-4- dinitro fenilhidrazina disueltos en 1,25 ml de etanol con 0,03 ml. de ácido clorhídrico concentrado. Siguiendo igual técnica que en el caso del A. sisalana se obtiene cristales de p. f. 270-272° d.

Espectro de absorción ultravioleta.

	p.f.	$\epsilon_{\text{máx}}$	$\text{m}\mu$	% de 9-dihidro- cogénina.
Fracción hucogénina	238-247°	830	240	7,6
acetato	238-243°	232	238	2,1

## CONCLUSIONES

Hemos estudiado la fracción esteroide del *Phoradendron tenax* (Liliáceas) y de tres especies de Agaves (Amariilidáceas): *Agave sisalana*, *Agave americana*, y *Agave americana* var. *marginata*.

Los resultados son los siguientes:

- 1o.- Se ha aislado por primera vez de los rizomas del *Phoradendron tenax*  $\beta$ -sitosterol.
- 2o.- Se ha confirmado la presencia de saponinas en las hojas de las tres especies de Agaves estudiados, aislado hecogenina, acompañada de cantidades variables de 9-dehidrohecogenina.

M. López

Francisco Vial

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Callow, Cornforth, y Spensley, *Chesand Industry*, 699 (/1951)
- 2 - Aitken P.W., *New Zealand J.Sci.Tech.*, 9 226 (1927)
- 3 - Brandt C.W., *New Zealand J.Sci.Tech.*, 18, 613-27 (1937)
- 4 - Marker, Wagner, Ulshafer, Wittbecker, Goldsmith y Rouf, *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 2167 (1947)
- 5 - Anderson y Shriner, *J. Biol. Chem.*, 71, 401 (1927)
- 6 - Anderson, Shriner y Burr, *J. Am. Chem. Soc.*, 48, 2987 (1926)
- 7 - Wallis y Chakravorty, *J. Org. Chem.*, 2, 335 (1937)
- 8 - Cook y Paige, *J. Chem. Soc.*, 336 (1944)
- 9 - Anderson y Shriner, *J. Am. Chem. Soc.*, 48, 2976 (1926)
- 10 - Liebermann, *Ber.*, 17, 868 (1884); 18, 1803 (1885)
- 11 - Discherl y Naim, *Ann.*, 555, 57 (1943); 558, 231 (1947)
- 12 - Windaus y Deppe, *Ber.*, 66, 1689 (1938)
- 13 - Discherl, *Z. physiol. Chem.* 257, 239 (1938)
- 14 - Comin, J., *Tesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, 1953*
- 15 - Gloyer y Schuette, *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 1901 (1939)
- 16 - Sandqvist y Bengtsson, *Ber.*, 64, 2167 (1931)
- 17 - Windaus, v. Werder y Gschaidler, *Ber.*, 65, 1006 (1932)
- 18 - Bengtsson, *Z. physiol. Chem.*, 237, 46 (1935)
- 19 - Marker y Whittle, *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 2704 (1937)
- 20 - Bernstein y Wallis, *J. Org. Chem.*, 2, 341 (1937)
- 21 - Fieser, L.F. y Fieser, M., "Natural Products Related to Phenanthrene", *Reinhold Publishing Corp., New York. N.Y., 1949, pág. 287.-*



# BIBLIOGRAFIA

-20-

- 22 - Dalmer, v. Werder, V. Heringmann y Heyns, Ber., 68, 1814 (1935)
- 23 - Fieser, L.F. y Fieser M., loc.cit., pág. 286
- 24 - Simpson y Williams, J.Chem.Soc., 733 (1937).
- 25 - Marker. R., J.Am.Chem. Soc., 69, 2395 (1947)
- 26 - Marker, Crooks, Jones y Shabica, J.Am.Chem.Soc., 64, 1276 (1942)
- 27 - Fieser, L.F. y Fieser M., loc.cit., pág. 371
- 28 - Rosenkranz, Djerassi, Kaufmann, Pataki y Romo, Nature, 165, 814 (1950)
- 29 - Marker, Wagner, Ulshafer, Wittbecker, Goldsmith y Rouf, J. Am.Chem. Soc., 65, 1199 (1943)
- 30 - Marker y López, J.Am.Chem.Soc., 69, 2397 (1947)
- 31 - Wagner, Forker y Spitzer, J.Am.Chem.Soc., 73, 2494 (1951)
- 32 - Marker y Applezweig, Chem.Eng.News, 27, 3348 (1951)
- 33 - Marker R., J.Am.Chem. Soc., 71, 2656 (1949)
- 34 - Djerassi, Ringold y Rosenkranz, J.Am.Chem.Soc., 73, 5513 (1951)
- 35 - Chamberlain, Ruyle, Erickson, Chamerda, Aliminos, Erickson, Sita y Tishler J.Am.Chem.Soc., 73, 2396 (1951)
- 36 - Rosenkranz, Pataki y Djerassi, J.Am.Chem.Soc., 73, 4055 (1951).
- 37 - Wall, Krider, Rothman, y Eddy, J.Biol. Chem., 198, 541 (1952).-