

## Tesis de Posgrado

# Estudio químico de los productos aislados de *Schkuria Pinnata* var. *Pinnata* (lam.)

Flematti, Susana María

1972

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:**

Flematti, Susana María. (1972). Estudio químico de los productos aislados de *Schkuria Pinnata* var. *Pinnata* (lam.). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1412\\_Flematti.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1412_Flematti.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Flematti, Susana María. "Estudio químico de los productos aislados de *Schkuria Pinnata* var. *Pinnata* (lam.)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1972. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1412\\_Flematti.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1412_Flematti.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Tesis  
1412

**Estudio Químico de los  
Productos Aislados de  
SCHKURIA PINNATA  
var. PINNATA (Lam.)**

**SUSANA M. FLEMATTI  
1972**

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO QUIMICO DE LOS PRODUCTOS AISLADOS DE  
SCHKURIA PINNATA var. PINNATA (LAM.)

SUSANA MARIA FLEMATTI

1412 =

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

1972

A Santiago

A mis padres

Mi más sincero agradecimiento al  
Dr. Eduardo G.Gros, quien sugiriera el tema de esta tesis, por su enseñanza y constante dedicación, las cuales me permitieron llevar a cabo el presente trabajo.

Agradezco también:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires, por haberme concedido sendas becas que me permitieron llevar a cabo el presente trabajo.

Al Dr. Pedro Cattaneo por su desinteresada colaboración.

Al Ing. Agron. A.R.Galvani (INTA, V.Mercedes, S.Luis), por la ayuda prestada en la recolección del material vegetal.

A la Dra. Blanca B. de Deferrari por los microanálisis.

Al Dr. Marcelo J. Vernengo (Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología), por permitirme el uso del cromatógrafo gaseoso.

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

Al Dr. J. Hunziker, por la clasificación del material vegetal.

Al Dr. G. Ourisson (Universidad de Strasbourg, Francia) por los espectros de masa realizados.

Al Dr. C.J.W. Brooks (Universidad de Glasgow, Escocia), por los cromatogramas gaseosos y espectros de masa realizados.

Al Dr. A. González González (Universidad de La Laguna, Tenerife, España), por las muestras de acetato de lupeol y acetato de taraxasterol.

Al Dr. T. G. Halsall (Universidad de Oxford, Inglaterra), por la muestra de acetato de  $\Psi$ -taraxasterol.

Al Dr. E. Ritchie (Universidad de Sydney, Australia), por la muestra de acetato de moretenol.

Al Dr. R. J. Hamilton (Colegio Regional de Tecnología de Liverpool, Inglaterra) y al Dr. J. A. Lambertson (CSIRO, Melbourne, Australia), por las muestras de hidrocarburos.

Al Dr. J. Romo (Universidad Nacional Autónoma de México, México) por la muestra de mexicanina A.

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

## INTRODUCCION



La familia de las Compuestas, es una cosmopolita reunión de plantas, con cerca de 1.000 géneros y unas 20.000 especies distribuidas por el mundo entero. En la República Argentina crecen espontáneos 197 géneros que comprenden alrededor de 1.400 especies. A dicha familia pertenece la Schkuria pinnata, var. pinnata (Lam.) que fue objeto del presente trabajo.

Es una planta anual de 20-40 cm de altura, ampliamente distribuida en nuestro país, desde el norte hasta La Pampa y sur de la provincia de Buenos Aires. Se la encuentra además en otras zonas de la América del Sur, desde el Ecuador hasta el centro de Chile, en Paraguay y en Uruguay.

Dentro de la familia de las Compuestas, la Schkuria pinnata pertenece, a la subfamilia Asteroideae, tribu Helenieae, subtribu Heleniinae, género Schkuria.

Su nombre común, "matapulgas", pone de manifiesto la creencia popular acerca de la supuesta propiedad de repeler insectos que se le atribuye a la planta mencionada.

Del extracto de éter de petróleo de la Schkuria pinnata han sido aislados hidrocarburos normales saturados, así como también alcoholes primarios de cadena normal. En el mismo extracto han sido hallados además esteroides y triterpenoides.

A continuación se reseña el trabajo realizado, con el

objeto de aislar e identificar los compuestos mencionados.

Se indican además estudios llevados a cabo con los extractos clorofórmico y alcohólico de la citada planta, en la tentativa de aislar otros productos químicos en ella contenidos. De esas labores no se obtuvieron resultados concretos.

HIDROCARBUROS DE PLANTAS DE LA FAMILIA DE LAS COMPUESTAS

Desde mucho tiempo atrás es conocido que en las plantas existen ciertos tipos de compuestos químicos que aunque de naturaleza inerte deben poseer cierto grado de utilidad fisiológica para el organismo que los contiene. Dentro de esta categoría de sustancias se pueden ubicar a la goma, la gutapercha, ligninos, ceras, etc.

En general, poco se conoce acerca del tipo de función biológica que cumplen estos compuestos en un organismo vegetal, aunque en ciertos casos han sido esbozadas teorías que podrían ser catalogadas de simples conjeturas dado que la respectiva utilidad para el vegetal no ha sido fehacientemente comprobada; dentro de esta última categoría podemos considerar a las ceras. En una planta, las superficies que están expuestas a la atmósfera están recubiertas usualmente por una capa de material orgánico que contiene ceras y que recibe el nombre genérico de cutícula.

Es comúnmente aceptado que esta cutícula sirve para mantener el balance de agua de la planta además de poseer funcionalidad protectora entre las que se incluyen la disminución de los daños mecánicos que pueden sufrir las células que forman las hojas, la inhibición del ataque por hongos e insectos y además determinan la conducta de las plantas frente a los

productos agrícola-químicos.

Las ceras contenidas en la cutícula se hallan constituidas por una amplia variedad de compuestos orgánicos; estas mezclas complejas pueden ser sometidas a procedimientos analíticos a fin de determinar cuali y cuantitativamente los diversos constituyentes que las forman.

Las investigaciones que se han llevado a cabo sobre la distribución de ciertas clases de compuestos en distintos tipos de vegetales, a pesar de haberse realizado en un reducido número de plantas, sirvieron para dar la pauta que tal distribución puede ser de valor taxonómico y este método de clasificación es actualmente un recurso muy común.

Los estudios realizados con ceras revelaron que las mismas eran mezclas difíciles de separar por los métodos comunes; las nuevas técnicas cromatográficas y espectrográficas determinaron nuevos avances en estas investigaciones.

Ha sido establecido que las ceras de superficie, denominando así a aquellas que forman parte de la cutícula que reviste las hojas y tallos tiernos, son sustancias formadas por alcanos de cadena larga, alcoholes, cetonas, aldehidos, acetales, ésteres y ácidos, pero el completo estudio de los constituyentes de las mismas es mucho más complicado, dado

que es necesario determinar con exactitud la posición y número de grupos funcionales y el grado de ramificación e insaturación en el caso de un definido tipo de compuestos.

Es de tener en cuenta además, el número creciente de otros tipos de constituyentes conocidos que se van determinando a medida que se incrementa el poder de resolución de los modernos instrumentos analíticos.

Generalmente, un determinado tipo de compuestos como por ejemplo alcanos, alcoholes, etc, se presentan como una serie homóloga donde la longitud de cadena de los homólogos varía usualmente de  $C_{21}$  a  $C_{37}$ .

Como elemento para la taxonomía de plantas, la determinación de los constituyentes de ceras parece ser un método ventajoso en vista de numerosos factores entre los que se cuentan: la presencia de tales compuestos universalmente, dado que son raras las plantas que no posean ceras en sus cutículas superficiales; la variación de su composición con las distintas especies; el hecho de que las ceras son extracelulares y en muchos casos un producto final de las funciones metabólicas esenciales de la planta; la simplicidad para la obtención de muestras y los métodos rápidos de microanálisis de que se dispone actualmente.

Erdtman<sup>1</sup> ha señalado que las sustancias más valiosas taxonómicamente no son las involucradas en el metabolismo primario, sino aquellos co-productos que son relativamente estables.

La fracción de hidrocarburos que forma parte de las ceras, cumple bastante bien con los anteriores requerimientos, mientras que su gran complejidad es una ventaja en la medida que provee un método taxonómico positivo; además, en muchos casos, la composición de fracciones de los mismos es característica para ciertas especies.

Para que tales tipos de compuestos, por ejemplo los hidrocarburos, puedan ser usados como guía taxonómica, es esencial tener un conocimiento claro de los pasos biogénéticos involucrados en la formación de los mismos.

Esto es primordial para el reconocimiento y valoración de los híbridos y para la detección de paralelismos químicos y convergencias en la evolución<sup>2</sup>.

Consideremos ahora cuales son los posibles mecanismos de formación de estas sustancias en la planta.

Aunque un gran número de rutas biosintéticas para hidrocarburos, alcoholes alifáticos, etc, fueron postuladas hace algunos años por Chibnall y Piper<sup>3,4</sup>, Channon y Chibnall<sup>3,4</sup> y por

Kreger, Wanless y Warth<sup>3,4</sup>, sólo dos mecanismos, el de condensación y el de elongación, han sido considerados con mayor atención recientemente<sup>5</sup>.

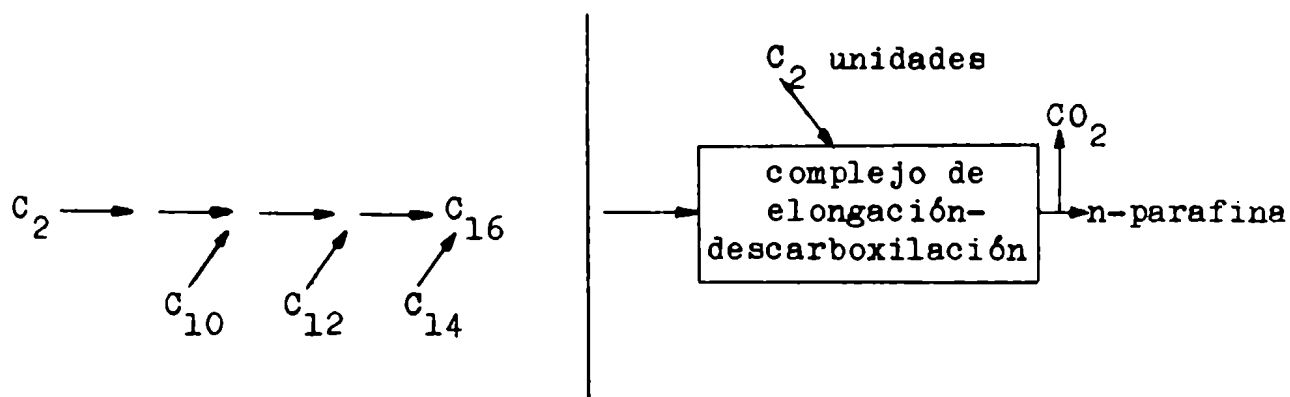
Sobre la base de datos experimentales, existiría una clara evidencia de que los pasos más probables para la biosíntesis de parafinas (lípidos simples), sería la elongación de la cadena de un ácido graso común, como el ácido palmítico, a ácidos de cadenas más largas seguida de la descarboxilación de estos últimos<sup>6</sup>.

De acuerdo con esta hipótesis, el producto de una síntesis "de novo", el ácido de  $C_{16}$  por ejemplo, proporcionaría el sustrato sobre el que actuaría el complejo enzimático de elongación-descarboxilación.

Este complejo adicionaría sucesivamente unidades de dos carbonos hasta que la longitud de la cadena llegara a la vecindad de  $C_{30}$ ; luego el ácido sería descarboxilado formándose así la parafina particular la que sería luego eliminada de la célula.

Lo anterior se puede visualizar en el esquema siguiente:



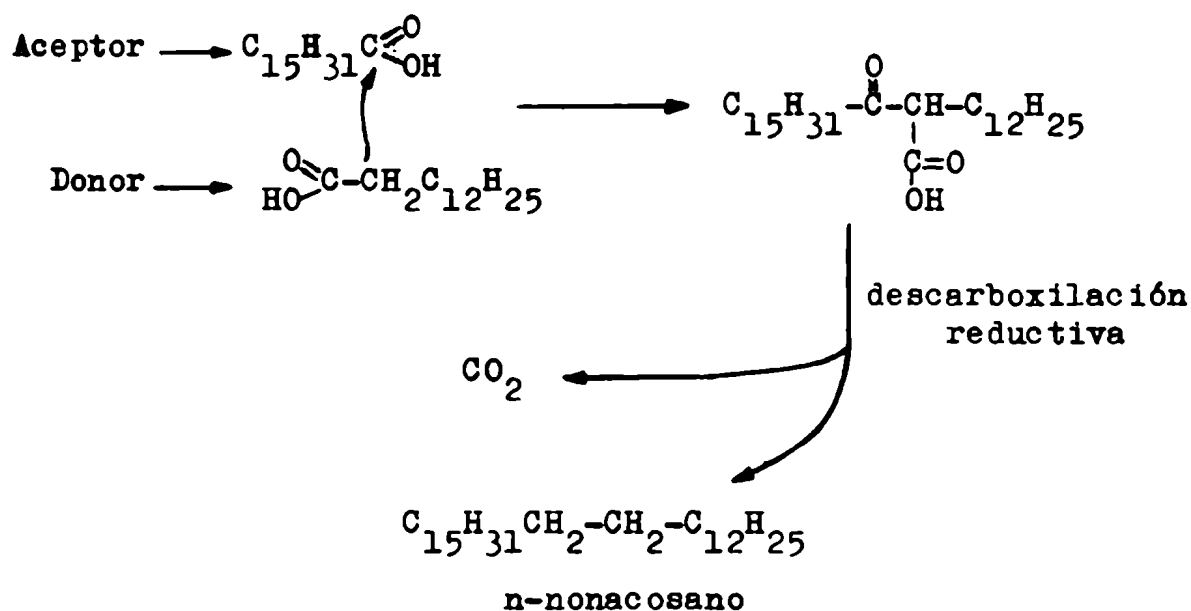


Resulta obvio suponer que la cadena de 30 átomos de carbono sería la preferida para la descarboxilación en aquellas plantas donde n-nonacosano ( $C_{29}H_{60}$ ) es la parafina que predomina.

El mismo razonamiento es aplicable para otras plantas que posean predominio de otro u otros hidrocarburos; por lo tanto, puede ocurrir descarboxilación con cadenas que contienen menos y más de 30 átomos de carbono, dando origen a otras parafinas; en plantas donde  $C_{31}H_{64}$  ó  $C_{33}H_{68}$  son los hidrocarburos más abundantes, el complejo enzimático sería similar al descrito pero con una muy leve diferente especificidad para operar.

El segundo mecanismo de biosíntesis postulado consiste en la condensación de dos ácidos grasos distintos (aceptor y donador), seguida de la descarboxilación específica de uno de ellos. Este mecanismo, que también tiene bases experimentales,

puede representarse en el esquema siguiente ejemplificado para el caso del n-nonacosano:



En general, en las plantas se presenta una variada proporción de hidrocarburos alifáticos con cadenas que varían usualmente entre 23 y 35 átomos de carbono. El estudio de la composición de esta fracción de alcanos puede arrojar ideas sobre la clasificación de un vegetal como también confirmar o desechar asignaciones ya efectuadas.

Se han llevado a cabo estudios de este tipo con plantas de las familias Crassulaceae<sup>7,8</sup>, Graminae<sup>9</sup>, Palmae<sup>10</sup>, Scrophulariaceae<sup>9</sup>, Rosaceae<sup>9</sup>, Leguminosae<sup>9</sup>, Ericaceae<sup>9</sup>,

Euphobiaceae<sup>9</sup>, Liliaceae<sup>11</sup>, etc, pero poco trabajo ha sido realizado con plantas de la familia de las Compuestas y por ende, se han efectuado muy pocas correlaciones químico-taxo-  
nómicas.

Los pocos casos que registra la literatura sobre este tipo de estudio en el caso de las Compuestas figuran en la Tabla 1. De la observación de esta Tabla se puede deducir que en todos los géneros estudiados, se han encontrado hidrocarburos de 23 a 35 átomos de carbono predominando los normales de número impar de carbonos sobre los de número par y dentro de los primeros se hallaron en mayor proporción los de C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> y C<sub>31</sub>. En el género Artemisia ninguna de las tres especies estudiadas tiene alcanos mayores de 31 átomos de carbono, como así tampoco existen en ellas hidrocarburos ramificados.

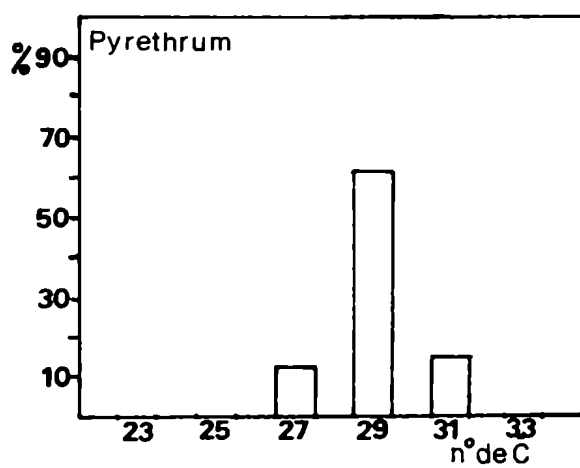
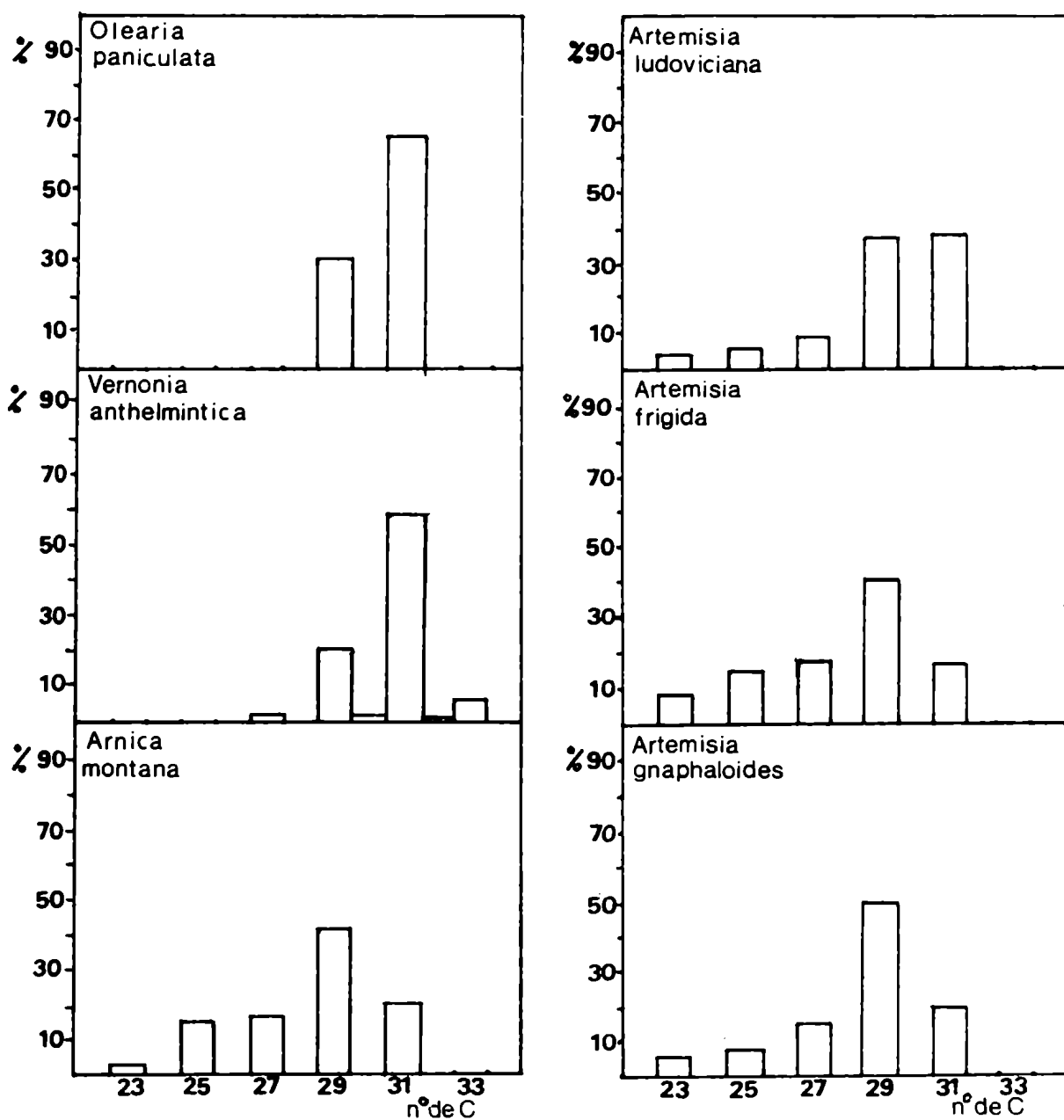
Podemos representar los datos de la Tabla 1 en forma de diagramas para visualizar mejor la distribución de los n-alcanos.

Como puede apreciarse de la observación de los diagramas, en las cuatro últimas plantas se presenta un mayor predominio del hidrocarburo de 29 átomos de carbono y la distribución de los alcanos es muy semejante en todas ellas; es digno de remarcar además, que las tres últimas especies pertenecen a

Tabla 1-

Porcentaje de n-alcenos de número de átomos indicado

<u>Planta</u>	<u>Tribu</u>	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Olearia <sup>12</sup> paniculata	Astereae							32,7		67,3				
Vernonia <sup>13</sup> anthelmintica	Vernoniae			0,8	tr.	2,9	0,5	21,3	3,2	59,7	1,5	7,1	0,4	0,6
Arnica <sup>14</sup> montana	Senecioneae	2,7	1,6	15,8	0,6	16,3	1,3	40,3	1,2	20,3				
Artemisia <sup>15</sup> ludoviciana	Anthemidæe	4,1	<1,0	5,2	<1,0	8,7	<1,0	38,4	<1,0	38,9	-	tr.		
Artemisia <sup>15</sup> frigida	"	7,7	<1,0	14,3	<1,0	15,7	<1,0	40,8	<1,0	17,7				
Artemisia <sup>15</sup> gnaaphaloides	"	4,5	<1,0	4,7	-	15,7	<1,0	50,0	<1,0	21,3				
Pyrethrum <sup>16</sup>	"		0,13	0,35	0,85	10,3	3,7	61,4	3,4	14,1	1,1	2,1	0,5	1,3



la misma tribu, Anthemidae.

En el caso de la Artemisia ludoviciana, la variación entre  $C_{29}$  y  $C_{31}$  es muy pequeña y como la distribución de hidrocarburos es similar a la que ocurre en los casos de las anteriores, podemos incluirla entre aquellas ya citadas.

Las dos primeras plantas, Olearia paniculata y Vernonia anthelmintica, aunque pertenecen a distintas tribus guardan semejanza entre sí observándose un gran predominio de hentriacontano,  $C_{31}H_{64}$ .

HIDROCARBUROS EN LA SCHKURIA PINNATA

Con el objeto de poder relacionarla con las otras plantas de la familia de las Compuestas ya descritas, se considerará a continuación la composición de las fracciones de hidrocarburos aislados de la Schkuria pinnata.

El extracto de éter de petróleo de la planta seca fue saponificado siguiendo los procedimientos corrientes y la fracción insaponificable fue tomada con éter etílico. El residuo obtenido por evaporación del solvente fue fraccionado por cromatografía en columna de alúmina en cuatro fracciones cristalinas (I-IV) por elución con éter de petróleo y mezclas de éter de petróleo-benceno. La selección de las fracciones se realizó de acuerdo con el solvente de elución utilizado.

Los residuos obtenidos por evaporación del solvente de las distintas fracciones no presentaban absorción en el espectro infrarrojo a  $1750-1600\text{ cm}^{-1}$  ó  $3600-3400\text{ cm}^{-1}$ , lo cual implicaba la ausencia de grupos carbonilo e hidroxilo respectivamente (Figura 1).

El bajo valor del punto de fusión y el aspecto del espectro de resonancia magnética nuclear (Figura 2), nos hizo suponer que estábamos en presencia de hidrocarburos alifáticos.

Las fracciones (I-IV) fueron analizadas por cromatografía gaseosa (páginas 28,29) y los resultados son mostrados en la Tabla 2.



Algunos de los picos de n-alcenos fueron asignados por co-cromatografía con hidrocarburos patrones mientras que, para poder determinar con exactitud de que hidrocarburos se trataba en los casos en que no existían muestras patrones, se aplicó el método de graficar el log. del tiempo de retención versus el número de átomos de carbono<sup>17</sup> (Figura 3, pág.17).

Es un hecho conocido que en cromatografía en fase gaseosa el tiempo de retención de un dado producto dependerá de numerosos factores, pero que si lo que se analiza por este método es una serie homóloga de un cierto tipo de compuesto químico, los tiempos de retención respectivos serán proporcionales a alguna propiedad creciente de la serie, como ser, número de átomos de carbono, punto de ebullición, número de metilenos, etc.

Por lo tanto, si una muestra que contiene varios miembros de una serie homóloga es analizada por cromatografía gaseosa, la representación gráfica del log. del tiempo de retención en función de algunas de esas propiedades crecientes de la serie homóloga viene dada por una recta de cierta pendiente que será característica de la propiedad creciente utilizada.

Este método tiene la ventaja de que sólo son necesarios dos ó tres compuestos para establecer la pendiente de la

Tabla 2- Análisis por cromatografía en fase gaseosa de las  
fracciones de hidrocarburos obtenidas por cromatografía en columna del extracto de éter de petróleo de la Schkuria pinnata.

Fracción	Solvente de elución	Nº de fracciones	Punto de fusión	Nº de carbonos	Porcentaje				
I	éter de petróleo	1-103	62-63°	25	1,1				
				26	0,6				
				27	5,3				
				28	2,2				
				29	86,5				
30	1,0	30	3,2	31	3,2				
				29	20,8				
				30	5,1				
31	74,0	II	éter de petróleo-benceno (95:5)	104-203	67-67,5°	29	1,9		
30	2,3	III	éter de petróleo-benceno (90:10)	204-260	67,5-68,5°	30	91,5		
31	4,2	32	4,2	IV	éter de petróleo-benceno (75:25)	261-675	68,5-69,5°	31	52,0
32	8,5	33	35,6	29	1,9				
30	2,1	31	52,0	32	8,5				
33	35,6	33	35,6	33	35,6				

recta, y una vez obtenida la misma, pueden identificarse los otros miembros de la serie por interpolación.

En nuestro caso, las sustancias patrones utilizadas fueron n-nonacosano ( $C_{29}H_{60}$ ), n-triacontano ( $C_{30}H_{62}$ ) y n-dotriacontano ( $C_{32}H_{66}$ ).

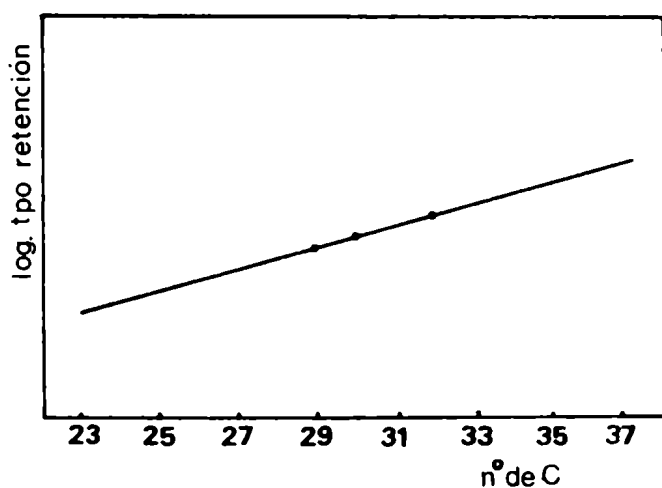


Figura 3

Los resultados cuantitativos que aparecen en la Tabla 2, fueron obtenidos por medición de las áreas de los picos y expresadas como porcentaje de la suma total de las áreas de los picos en cada fracción.

Observando la Tabla 2 pueden obtenerse las siguientes conclusiones: a) en la Schkuria pinnata no existen n-alcenos menores de 25 átomos de carbono, ni mayores de 33 átomos de

carbono; b) los componentes en mayor proporción son los de  $n-C_{29}$ ,  $n-C_{31}$  y  $n-C_{33}$  y en general el contenido de hidrocarburos con número impar de carbonos es mucho mayor que el de número par, con lo que se confirma un resultado muy común en vegetales superiores<sup>3</sup>; c) no fue detectada la presencia de hidrocarburos ramificados.

Considerando el contenido total de hidrocarburos en la planta y no el parcial de cada fracción que figura en la Tabla 2, se pueden obtener los siguientes porcentajes totales (Tabla 3).

En dicha Tabla 3 se destaca, que al igual que lo que ocurría en las dos primeras plantas analizadas en la Tabla 1, predomina el alcano normal de 31 átomos de carbono, siendo la distribución de hidrocarburos también del mismo tipo como puede apreciarse en el siguiente diagrama.

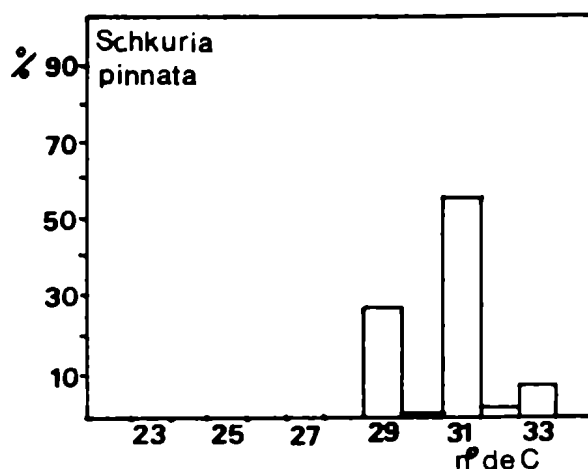


Tabla 3- Porcentaje de n-alcenos en la planta Schkuria  
pinnata de número de átomos indicados

<u>nº de átomos de carbono</u>	<u>porcentaje</u>
25	0,3
26	0,15
27	1,3
28	0,55
29	27,7
30	2,6
31	55,2
32	3,2
33	8,9

Desde el punto de vista taxonómico, para una misma distribución de alcanos, no es demasiado importante la mayor o menor proporción de un determinado componente; lo que si tiene importancia es la presencia o ausencia de ciertos hidrocarburos, hecho que implica la existencia o no del sistema enzimático que los genera.

Si comparamos el diagrama de distribución de n-alcanos de la Schkuria pinnata con el de los otros géneros mencionados vemos que existe similitud entre Schkuria pinnata (tribu Helenieae), Vernonia anthelmintica (tribu Vernoniae) y Olearia paniculata (tribu Astereae).

Estas tres tribus, de acuerdo con Cabrera<sup>18</sup>, están relacionadas entre sí desde el momento que presentan algunas semejanzas de tipo morfológico.

En las tres predomina el hidrocarburo de 31 átomos de carbono, pero la distribución de alcanos es semejante sólo en las dos primeras.

Posiblemente estos dos géneros tengan sistemas enzimáticos similares mientras que el tercero podría tener una muy leve diferencia en la forma de operar, que se traduce en la ausencia de alcanos menores de 29 y mayores de 31 átomos de carbono, haciendo la salvedad de que los datos extraídos de la literatura sean completos.

---

HIDROCARBUROS EN LA SCHKURIA PINNATA

PARTE EXPERIMENTAL



## General

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de absorción en el infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 137-B, "Infracord" para suspensiones en Nujol.

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron determinados a 60 MHz, mediante un espectrómetro Varian A-60 usando deuterocloroformo como solvente, con tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en  $\delta$  (ppm) relativos al tetrametilsilano (0 ppm).

La cromatografía gas-líquido fue llevada a cabo con un cromatógrafo Varian Aerograph, modelo 1860 H, de dos columnas equipado con un detector de llama.

Las cromatografías analíticas en capa delgada se realizaron utilizando como fase fija óxido de aluminio G (Merck). Las sustancias fueron detectadas con vapores de yodo.

Todas las evaporaciones de solvente fueron realizadas a presión reducida con baño externo a una temperatura menor de 50°.

### Extracción y aislación de la fracción de hidrocarburos

Planta S.pinnata entera, seca y molida (1 kg) fue extraída con éter de petróleo en un extractor continuo (sohxlet modificado) durante 64 hs. El solvente fue evaporado y el residuo (35 gr) fue secado sobre parafina.

El residuo gomoso, fue disuelto en metanol (200 ml), se añadió hidróxido de potasio sólido (30 gr) y la solución fue refluada durante 1 hora. Una vez a temperatura ambiente se agregó H<sub>2</sub>O (200 ml) y la mezcla fue extraída con éter etílico (5 x 200 ml).

El extracto etéreo fue lavado con ácido clorhídrico diluido, solución acuosa de CO<sub>3</sub>HNa, agua y fue secado con SO<sub>4</sub>Mg.

El solvente fue evaporado y el residuo (9,6 gr) fue cromatografiado por una columna (85 x 4 cm) de alúmina (Woelm, neutra, grado I, 900 gr), eluyéndose primero con éter de petróleo y luego con proporciones crecientes de benceno en éter de petróleo (Tabla 2). Fueron recogidas fracciones de 10 ml cada una.

Una vez evaporado el solvente se obtuvieron residuos cristalinos que fueron reunidos en cuatro fracciones (I-IV) de acuerdo a la proporción de solvente usado (Tabla 2).

Las fracciones fueron recristalizadas de ciclo hexano-etanol.

La cromatografía en capa delgada de las cuatro fracciones mostraba una sola mancha de Rf 1 en todos los solventes ensayados.

Muestras pesadas de I, II, III y IV fueron analizadas por cromatografía gas-líquido, isotérmicamente a 250° usando columnas de acero inoxidable (6 pies x 1/8 pulg.), rellenas con 3% de SE-30 (Silicone gum-rubber) sobre Chromosorb W silanizado; el gas portador utilizado fue N<sub>2</sub> a una velocidad de flujo de 40 ml/minuto.

Simultáneamente se llevaron a cabo co-cromatografías con sustancias patrones (n-C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>, n-C<sub>30</sub>H<sub>62</sub> y n-C<sub>32</sub>H<sub>66</sub>).

A continuación se consignan los datos de cada fracción.

### Fracción I

Punto de fusión: 62-63°

Espectro i.r.: presenta bandas a 2860 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>3</sub>), 1460 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>2</sub>)  
y doblete a 720-730 cm<sup>-1</sup>((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>). Figura 1.

Espectro de r.m.n.: Figura 2.

Cromatografía gaseosa: Figura 4.

<u>n° de carbonos</u>	<u>tpo de retención(seg)</u>	<u>log.tpo de retención</u>
25	259,4	2,414
26	347	2,540
27	474,3	2,676
28	611	2,786
29	852	2,930
30	1072	3,030
31	1381	3,140

### Fracción II

Punto de fusión: 67-67,5°

Espectro i.r.: Figura 1.

Espectro de r.m.n.: Figura 2.

Cromatografía gaseosa: Figura 5.

<u>n° de carbonos</u>	<u>tpo de retención(seg)</u>	<u>log.tpo de retención</u>
29	813	2,91
30	1044	3,02
31	1555,20	3,19

### Fracción III

Punto de fusión: 67,5-68,5°

Espectro i.r.: Figura 1.

Espectro de r.m.n.: Figura 2.

Cromatografía gaseosa: Figura 6.

<u>nº de carbonos</u>	<u>tpo de retención(seg)</u>	<u>log.tpo de retención</u>
29	794,4	2,90
30	1000	3,00
31	1480	3,17
32	1950	3,29

#### Fracción IV

Punto de fusión: 68,5-69,5°

Espectro i.r.: Figura 1.

Espectro de r.m.n.: Figura 2.

Cromatografía gaseosa: Figura 7.

<u>nº de carbonos</u>	<u>tpo de retención(seg)</u>	<u>log.tpo de retención</u>
29	759,1	2,88
30	1100	3,04
31	1414	3,15
32	1863	3,27
33	2571	3,41

Sustancias patrones

Cromatografía gaseosa: Figuras 8, 9 y 10.

<u>nº de carbonos</u>	<u>tpo de retención(seg)</u>	<u>log.tpo de retención</u>
29	822,2	2,915
30	1150	3,06
32	, 2041	3,31

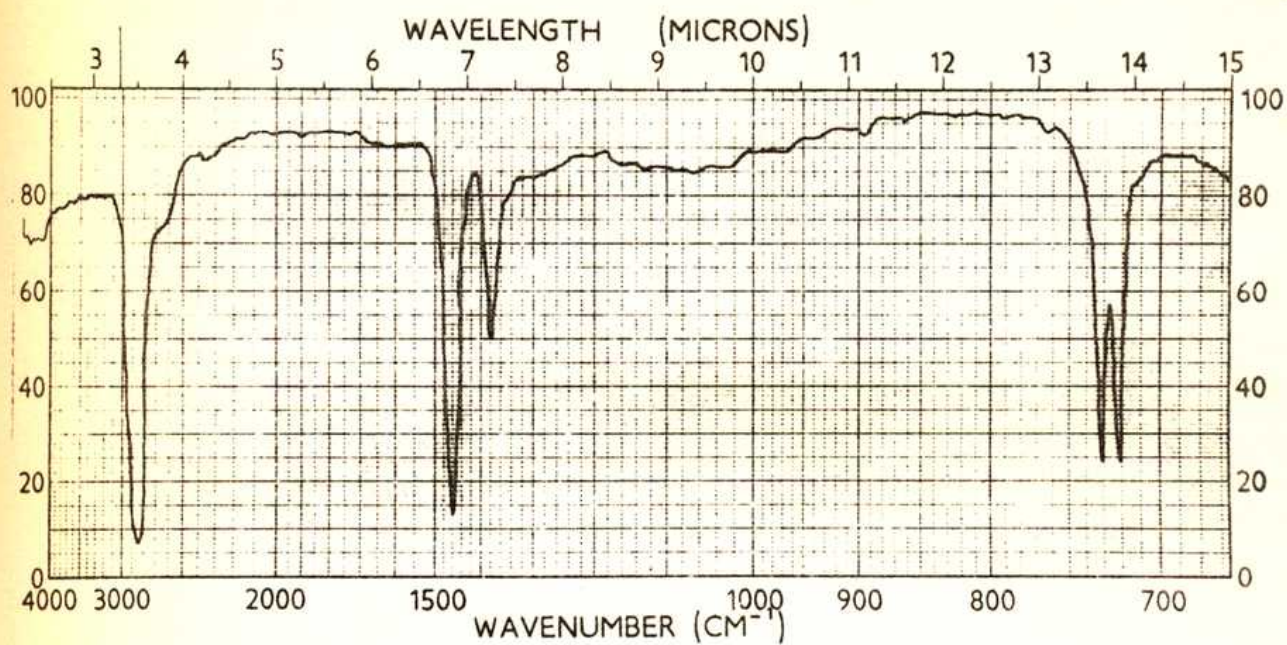


Figura 1: Espectro i.r. de fracciones de hidrocarburos

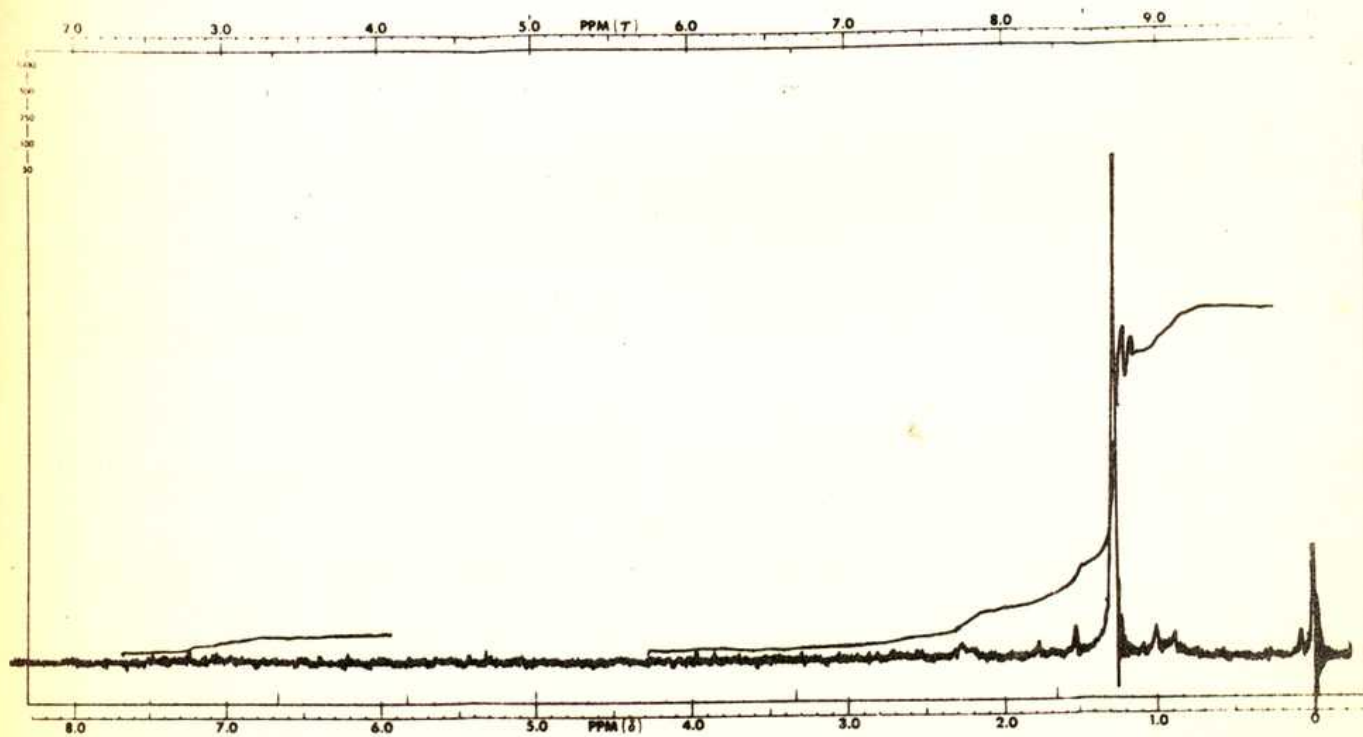


Figura 2: Espectro de r.m.n. de fracciones de hidrocarburos

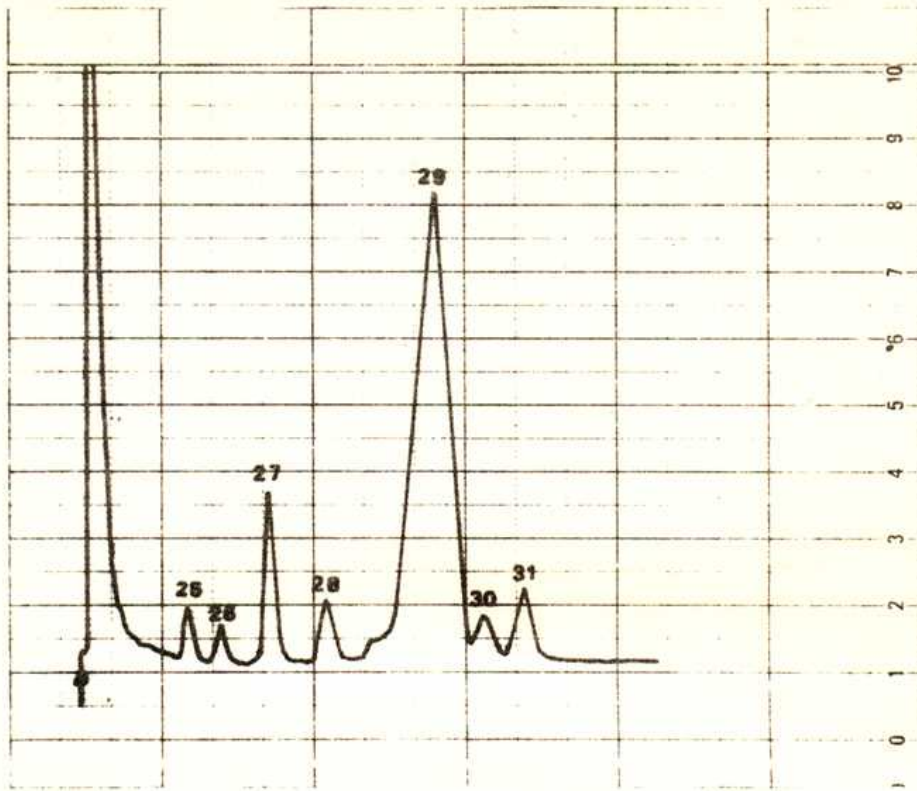


Figura 4: Fracción I, cromatograma gaseoso

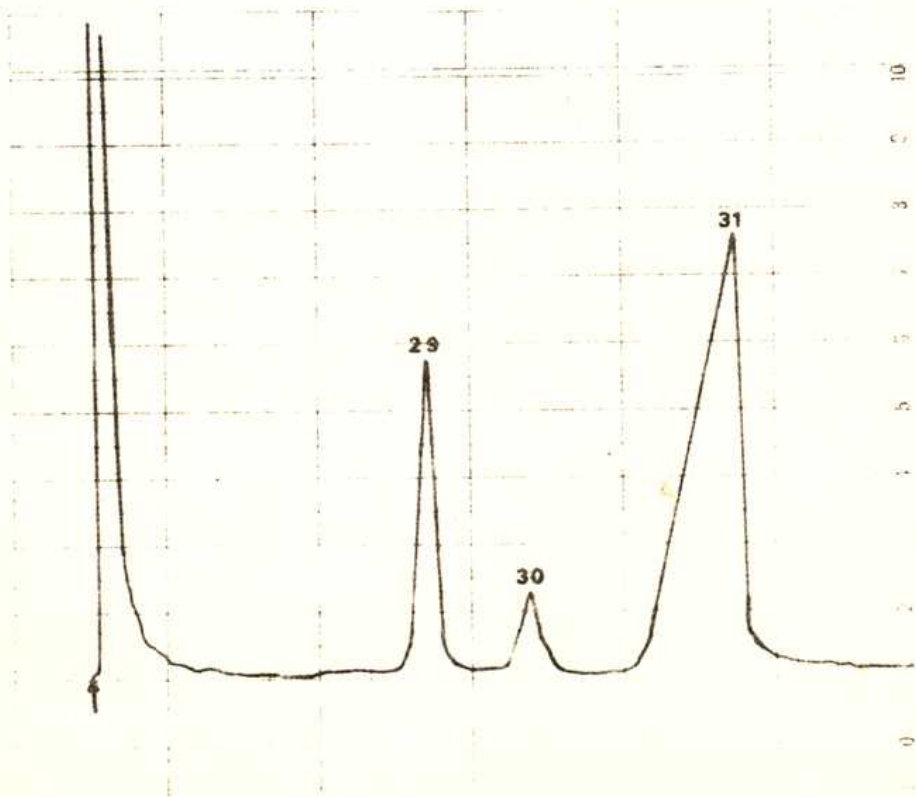


Figura 5: Fracción II, cromatograma gaseoso



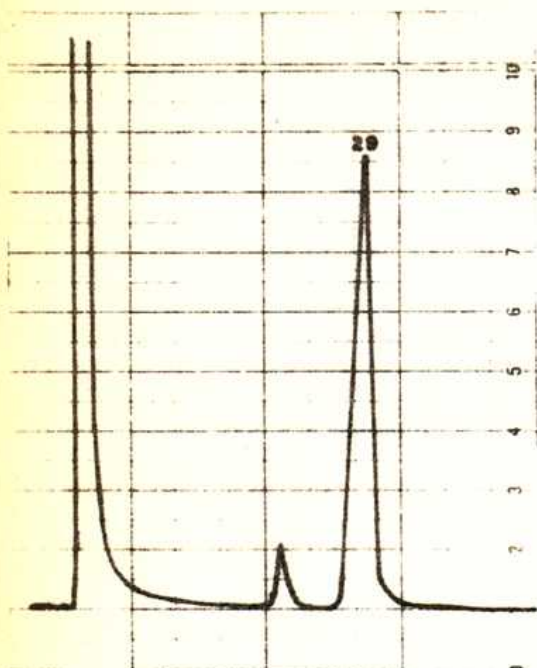


Figura 8:  $n\text{-C}_{29}\text{H}_{60}$ ,  
cromatograma gaseoso

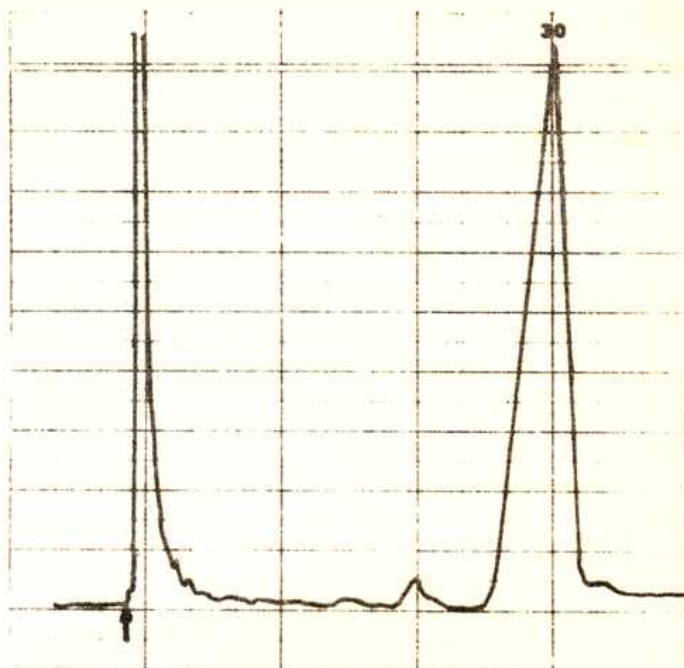


Figura 9:  $n\text{-C}_{30}\text{H}_{62}$ ,  
cromatograma gaseoso

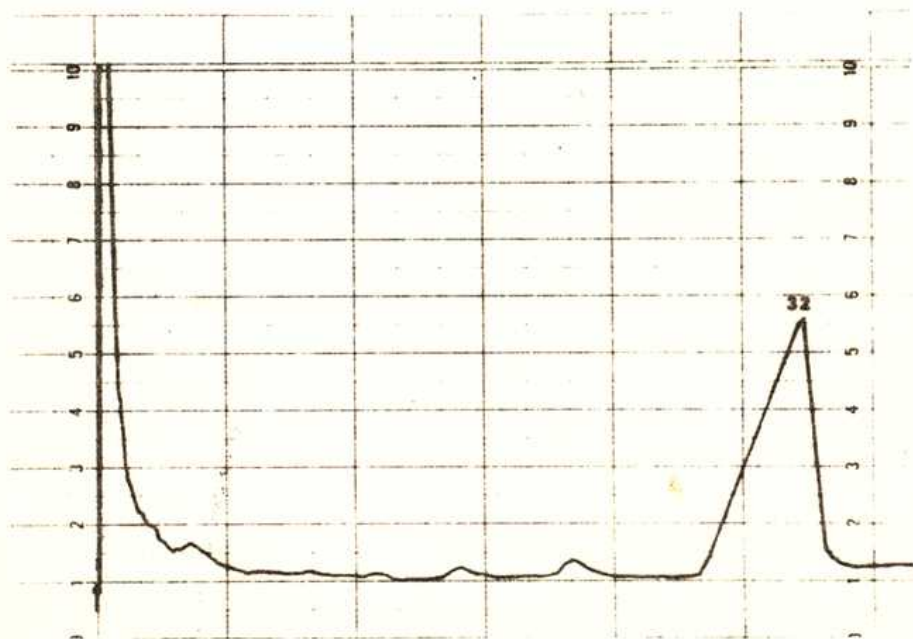


Figura 10:  $n\text{-C}_{32}\text{H}_{66}$ , cromatograma gaseoso

**ALCOHOLES DE PLANTAS**

Como había sido expresado anteriormente, las ceras que recubren la superficie de las partes tiernas de los vegetales son mezclas complejas de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, aldehidos, ésteres, ácidos, etc, que se cree cumplen funciones de reguladoras de humedad como así también de protección de las células que forman la cutícula.

En la sección anterior ya fue discutido lo concerniente a los hidrocarburos mientras que en la presente sección serán considerados los alcoholes normales.

Fue previamente señalado que entre las parafinas constituyentes de las ceras existe un marcado predominio de compuestos hidrocarbonados con número impar de carbonos; por el contrario, los alcoholes primarios que forman parte de las ceras se caracterizan por poseer principal aunque no exclusivamente cadenas con número par de átomos de carbono<sup>2</sup>. Estos alcoholes pueden estar presentes en las ceras en forma libre o combinados como en el caso de los ésteres.

Dado que los alcoholes se presentan conjuntamente con otros tipos de compuestos, la cromatografía ya sea en capa delgada o en columna constituye una técnica adecuada para separar los mismos de los restantes componentes que se encuentran en las ceras.

La fracción alcohólica al igual que la de hidrocarburos, es susceptible de ser analizada por cromatografía en fase gaseosa ya sea como alcoholes libres o como acetatos, aunque los mejores derivados son los trimetilsilil éteres ( $\text{ROSi}(\text{CH}_3)_3$ ), dada su mayor volatilidad y el importante hecho de presentar una fragmentación característica por espectrometría de masas.

Relativamente escaso es el trabajo realizado con los alcoholes de cadena larga provenientes de ceras y en gran parte se puede deber a la pequeña proporción en que se encuentran en plantas en comparación con los hidrocarburos y los ácidos.

Ha sido comprobado que los componentes de ceras presentes en muy bajas concentraciones, y dentro de éstos incluimos a los n-alcoholes, muestran actividad de tipo hormonal tanto en plantas como en animales,<sup>19</sup> pero poco se conoce acerca del significado o el mecanismo por el cual tales efectos son producidos.

Por otra parte, la mayoría de los trabajos de biosíntesis de los elementos componentes de las ceras, se orientó a la comprensión del origen de los hidrocarburos, probablemente porque mucho más era lo que se conocía sobre la distribución de alcanos en plantas que lo concerniente a los otros diversos

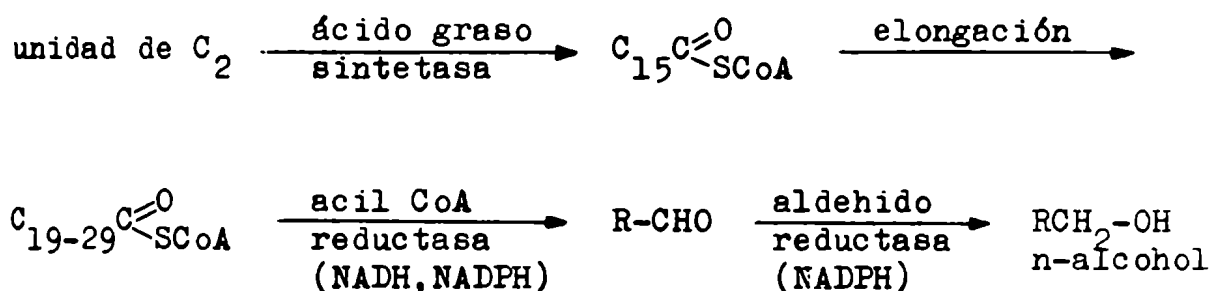
componentes.

Ya se había indicado que existe una perfecta concordancia entre los datos químicos y bioquímicos que sustentan la hipótesis de elongación-descarboxilación para la biosíntesis de los compuestos de ceras, en especial de hidrocarburos.

Teniendo en cuenta ese mecanismo, podrían existir intermediarios producidos por el sistema de elongación que dieran lugar a los alcoholes primarios, es decir, que el complejo enzimático podría generar ácidos a partir de los cuales se obtendrían los alcoholes por reducción mientras que la descarboxilación conduciría a hidrocarburos.

Estudios "in vivo" y con extractos enzimáticos<sup>19</sup> realizados con el objeto de conocer el origen de los compuestos mencionados, han permitido describir sistemas capaces de alargar la cadena de los ácidos más comunes para obtener ácidos de mayor número de átomos de carbono.

Recientemente se ha demostrado<sup>20</sup> la conversión enzimática de un derivado de acil coenzima A en un alcohol, catalizada por una acil coenzima A reductasa y una aldehído reductasa. El esquema que representa el proceso sería el siguiente:



En general, son escasos los datos extraídos de la literatura acerca de los alcoholes normales de cadena larga presentes en plantas y desde el punto de vista taxonómico no han sido encarados estudios como lo fueron con referencia a los n-alcanos.

Purdy y Truter<sup>21</sup> han estudiado las ceras de las hojas de Brassica olerácea (Cruciferae) y entre los diversos productos hallados figuran los n-alcoholes libres y esterificados, siendo el alcohol más abundante el n-hexacosanol.

Los componentes de la cutícula de los frutos de Vitis vinifera<sup>22</sup> (Vitaceae), han sido examinados por cromatografía gas-líquido. Se observó que la distribución de alcoholes era bastante similar en ceras de frutos secos, maduros y frescos, teniendo el n-hexacosanol como componente predominante. Por otra parte, las ceras de las hojas, de la misma planta, poseían n-octacosanol como principal alcohol.

La estructura de los alcoholes de cadena larga fue también investigada en cuatro especies de la familia Euphorbiaceae<sup>23</sup>:

Euphorbia cyparissias y E. essula contenían n-hexacosanol como el elemento en mayor proporción, mientras que en E. polygonifolia y E. supina el mayor componente era n-octacosanol.

Los alcoholes obtenidos de las ceras de superficie de Lolium perenne<sup>24</sup> (Gramineae) consisten principalmente en n-tetracosanol, n-hexacosanol y n-octacosanol.

Kalanchoe pinnata<sup>25</sup> (Crassulaceae) contiene n-alcoholes de C<sub>26</sub> a C<sub>34</sub>; Rosa damascena<sup>26</sup> (Rosaceae) posee n-alcoholes de 15 a 33 átomos de carbono; Gleditschia triacanthos<sup>27</sup> (Leguminosae) contiene los n-alcoholes de C<sub>11</sub> a C<sub>32</sub>.

Por su parte, Vernonia anthelmintica<sup>13</sup> (Compositae), contiene alcoholes de C<sub>17</sub> a C<sub>28</sub> siendo los más abundantes los de 18, 20, 24 y 26 átomos de carbono predominando el de 18 carbonos.

En general, se observa que en la mayoría de las pocas plantas estudiadas, los alcoholes libres tienen un máximo en su curva de distribución entre C<sub>26</sub> y C<sub>28</sub>, salvo en el caso de Vernonia anthelmintica (Compositae) que tiene su máximo en C<sub>18</sub>.

n-ALCOHOLES EN LA SCHKURIA PINNATA



Como había sido indicado en la sección anterior referente a los hidrocarburos de Schkuria pinnata, estos habían sido aislados mediante cromatografía en columna por elución con éter de petróleo y mezclas de éter de petróleo-benceno.

Sucesivas eluciones de la misma columna cromatográfica con éter de petróleo y benceno permitieron obtener una nueva fracción cristalina; la misma presentaba absorción en el espectro infrarrojo a  $3300\text{ cm}^{-1}$  indicando la existencia de un hidroxilo alcohólico.

Para confirmar la presencia del grupo hidroxilo, el producto fue tratado con anhídrido acético en piridina obteniéndose su derivado acetilado.

El espectro de resonancia magnética (Figura 11) conjuntamente con el espectro infrarrojo (Figura 12) y el bajo punto de fusión del derivado acetilado, indicaban que estábamos frente a un compuesto alifático.

Previa desacetilación, la composición de la fracción alcohólica fue determinada por análisis mediante cromatografía en fase gaseosa (Figura 13); los componentes fueron asignados como en el caso de los hidrocarburos por co-cromatografía con alcoholes patrones, tales como n-tetradecanol, n-hexadecanol y n-octadecanol.

El método de representar el log. del tiempo de retención versus el número de átomos de carbono fue nuevamente empleado<sup>17</sup> para la asignación de aquellos picos de alcoholes que no podían ser asignados por co-cromatografía con standards (Figura 14).

De esta manera se determinó que los componentes de la mezcla eran: n-tridecanol, n-tetradecanol, n-pentadecanol, n-hexadecanol, n-heptadecanol, n-octadecanol, n-nonadecanol, n-eicosanol, n-heneicosanol y n-docosanol, siendo el alcohol más abundante el de 20 átomos de carbono.

Se observa por lo tanto que, como en todas las otras plantas antes mencionadas, en la Schkuria pinnata predominan los alcoholes con número par de átomos de carbono; la diferencia con los demás reside principalmente en que el máximo de distribución no aparece en la zona de  $C_{26}$  ó  $C_{28}$ , que era el hecho más común en los casos citados anteriormente, aunque similar desviación también se observaba en V. anthelmintica<sup>13</sup> que coincidentemente pertenece a la familia de las Compuestas. Sin embargo, no debe tomarse tal desviación como un hecho característico en la familia de las Compuestas, ya que existen ejemplos en otras plantas de la misma familia (Sonchus leptcephalus y S. ortunoi<sup>28</sup>) donde el alcohol predominante

era el n-hexacosanol.

Respecto al cromatograma obtenido por cromatografía gaseosa de la fracción alcohólica (Figura 13), podía observarse que junto a los picos de los componentes normales aparecían otras señales.

En un principio tales picos fueron asignados a alcoholes no saturados, pero el espectro infrarrojo y el espectro de resonancia magnética nuclear no indicaban la presencia de insaturaciones.

Posteriormente se pensó, en la existencia de ramificaciones en la cadena hidrocarbonada. Esto era bastante lógico pues existían antecedentes en otras plantas, como por ejemplo, Brassica olerácea<sup>29</sup>, que presentaba como parte de los constituyentes de las ceras, alcoholes pertenecientes a ambas series, normal y ramificada.

La existencia del grupo ramificado estaba de acuerdo con cierto hecho experimental: la representación del log. del tiempo de retención correspondiente a las señales anteriormente mencionadas versus el número de átomos de carbono, daba una recta paralela a la obtenida al representar el log. del tiempo de retención versus el número de átomos de carbono para la serie normal (Figura 14).

La nueva recta pasaba inmediatamente por debajo de la primera, lo que concuerda con el hecho general de que los alcoholes ramificados aparecen a tiempos de retención menores que los correspondientes de la serie normal<sup>30</sup>.

Dado que no se contaba con las sustancias patrones adecuadas, no se pudo confirmar que las señales indicadas pertenecieran a alcoholes ramificados.

ALCOHOLES EN LA SCHKURIA PINNATA

PARTE EXPERIMENTAL

## General

Los puntos de fusión, así como los espectros de absorción en el infrarrojo y los espectros de resonancia magnética nuclear fueron llevados a cabo en los mismos equipos mencionados en la sección de hidrocarburos (página 21) y en condiciones semejantes.

La cromatografía gas-líquido fue realizada con un cromatógrafo gaseoso Perkin-Elmer modelo 800, de dos columnas, equipado con un detector de llama.

Las cromatografías en capa delgada fueron llevadas a cabo en óxido de aluminio G (Merck) como fase fija; las sustancias fueron detectadas con vapores de yodo.

### Aislamiento de los alcoholes

A partir de la columna cromatográfica mencionada en la sección anterior (página 22), por elución con mezclas de éter de petróleo-benceno (25:75) y (20:80), fueron recogidas las fracciones 753 a 1045, todas semejantes por cromatografía en capa delgada, las cuales fueron reunidas dando un producto de aspecto cristalino. El mismo presentaba en el espectro infrarrojo una banda a  $3300\text{ cm}^{-1}$ .

### Acetilación de la fracción de alcoholes

La fracción obtenida (20 mg), fue acetilada con anhídrido acético en piridina en la forma usual; el acetil derivado fue recristalizado de etanol; p.f.  $65-70^{\circ}$ ; homogéneo por cromatografía en capa delgada.

Espectro i.r.: bandas a  $2800\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ),  $1730\text{ cm}^{-1}$  y  $1240\text{ cm}^{-1}$  (grupo éster) y doblete a  $720-730\text{ cm}^{-1}$  ( $(\text{CH}_2)_n$ ).

Figura 12.

Espectro de r.m.n.: Figura 11.

### Desacetilación del acetato de la fracción alcohólica

El acetato anterior fue tratado con metanol anhidro (20 ml)

y Na metálico (30 mg) y calentado a reflujo durante 1 hora. Se agregó luego hidróxido de sodio (300 mg) y agua (2,5 ml) y se calentó durante 30 minutos en baño de vapor. Posteriormente se agregó agua (20 ml) y se extrajo con éter etílico (5 x 15 ml).

El extracto etéreo fue lavado con ácido clorhídrico diluido, solución acuosa de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  y agua y fue secado con  $\text{SO}_4\text{Mg}$ .

La evaporación del solvente dejó un residuo cristalino (15 mg) con idénticas características físicas al producto inicial.

#### Análisis mediante cromatografía gaseosa de la fracción alcohólica

Una muestra pesada del producto fue analizada por cromatografía gas-líquido. Esta experiencia se llevó a cabo utilizando programación de temperatura, entre 100 y 240°, variando la temperatura a una velocidad de 10°/minuto.

Se usaron idénticas columnas a las utilizadas para los hidrocarburos (página 23); se usó  $\text{N}_2$  como gas portador a una velocidad de flujo de 40 ml/minuto. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Simultáneamente se llevó a cabo co-cromatografía con sustancias patrones (n-tetradecanol, n-hexadecanol y n-octa-



decanol).

La representación del log. del tiempo de retención versus el número de átomos de carbono, está dada en la figura 14.

Tabla 4- Valores de tiempos de retención y número de átomos de carbono para la serie normal y la posible serie ramificada obtenidos del cromatograma. (Figura 13).

<u>nº de carbonos</u>	<u>tpo de retención(seg)</u>	<u>log.tpo de retención</u>
n-13	360	2,56
n-14	420	2,62
n-15	480	2,68
n-16	540	2,73
n-17	600	2,78
n-18	660	2,82
n-19	756	2,88
n-20	852	2,93
n-21	960	2,98
n-22	1116	3,04
r-14	396	2,60
r-16	504	2,70
r-18	624	2,80
r-19	708	2,85
r-20	804	2,91
r-21	900	2,95
r-22	1032	3,01

Datos de los tiempos de retención correspondientes a las sustancias patrones, extraídos de los respectivos cromatogramas (Figuras 15, 16 y 17) utilizados en la representación de la Figura 14.

<u>nº de carbonos</u>	<u>tpo de retención(seg)</u>	<u>log.tpo de retención</u>
n-C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> OH	420	2,62
n-C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> OH	530	2,72
n-C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> OH	660	2,82

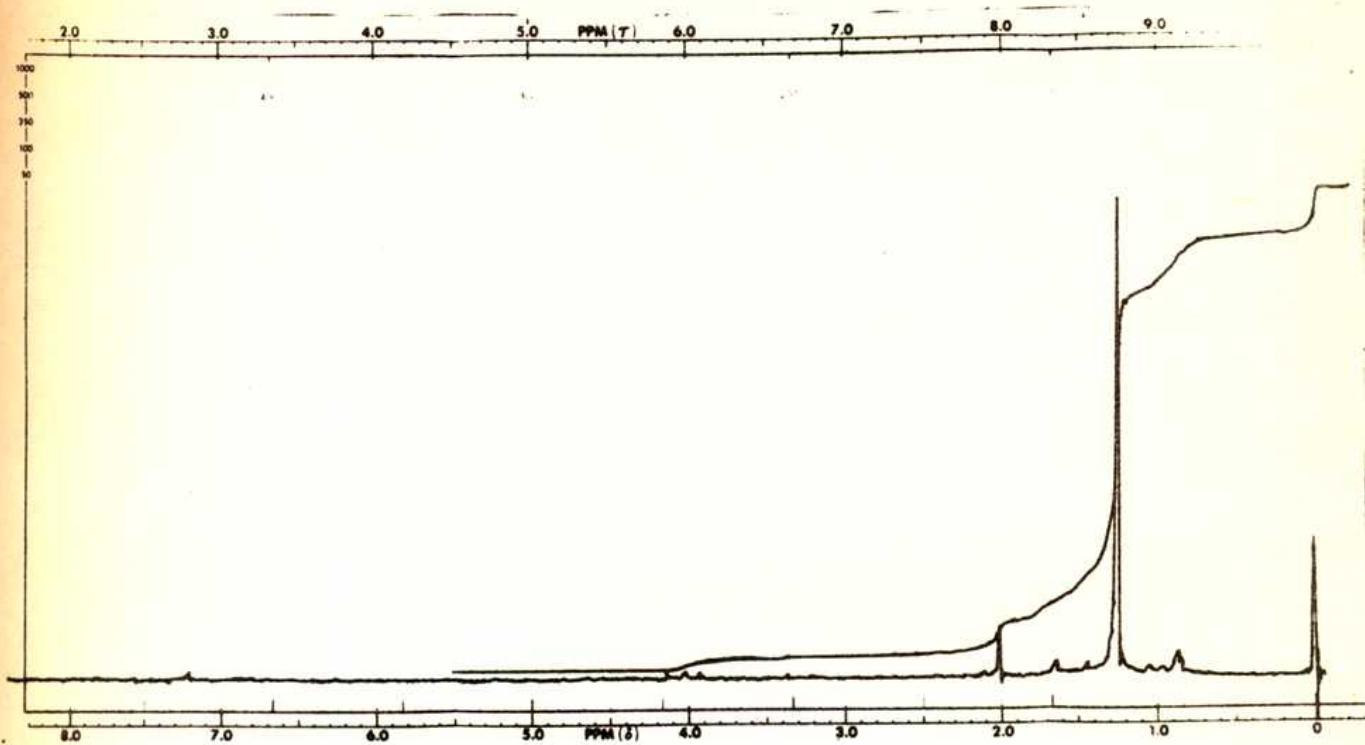


Figura 11: Espectro de r.m.n. de la fracción alcohólica acetilada

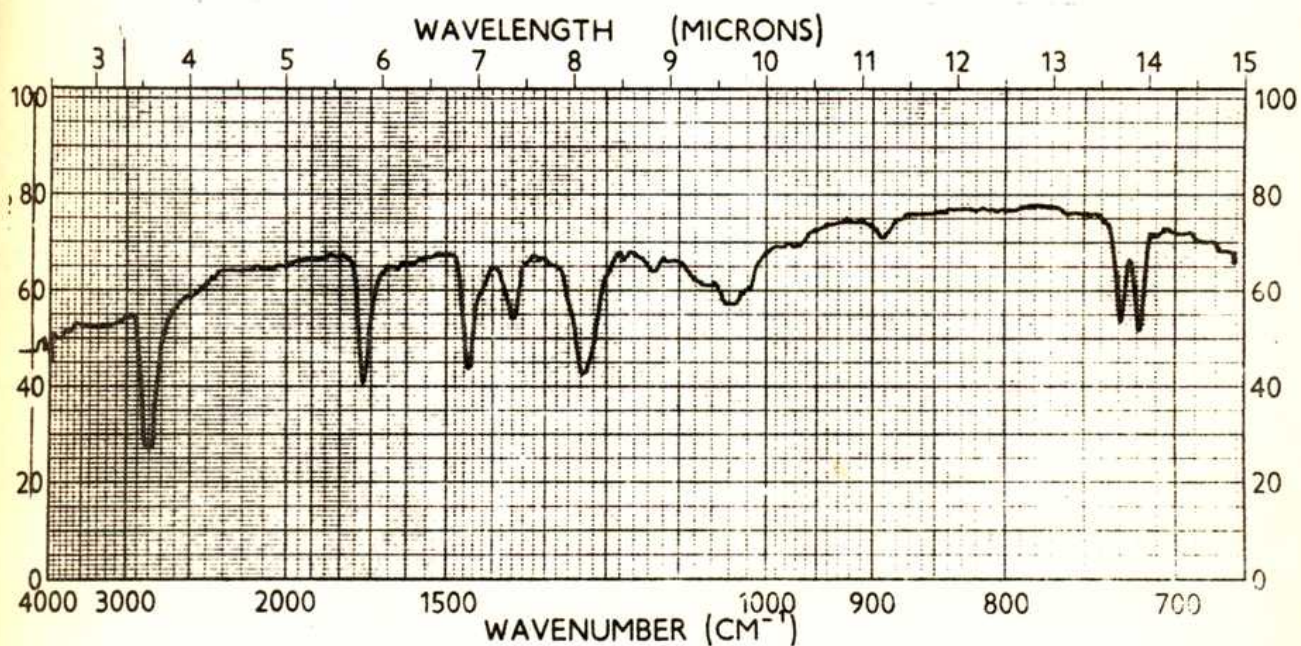


Figura 12: Espectro i.r. de la fracción alcohólica acetilada



Figura 13: Fracción alcohólica, cromatogr

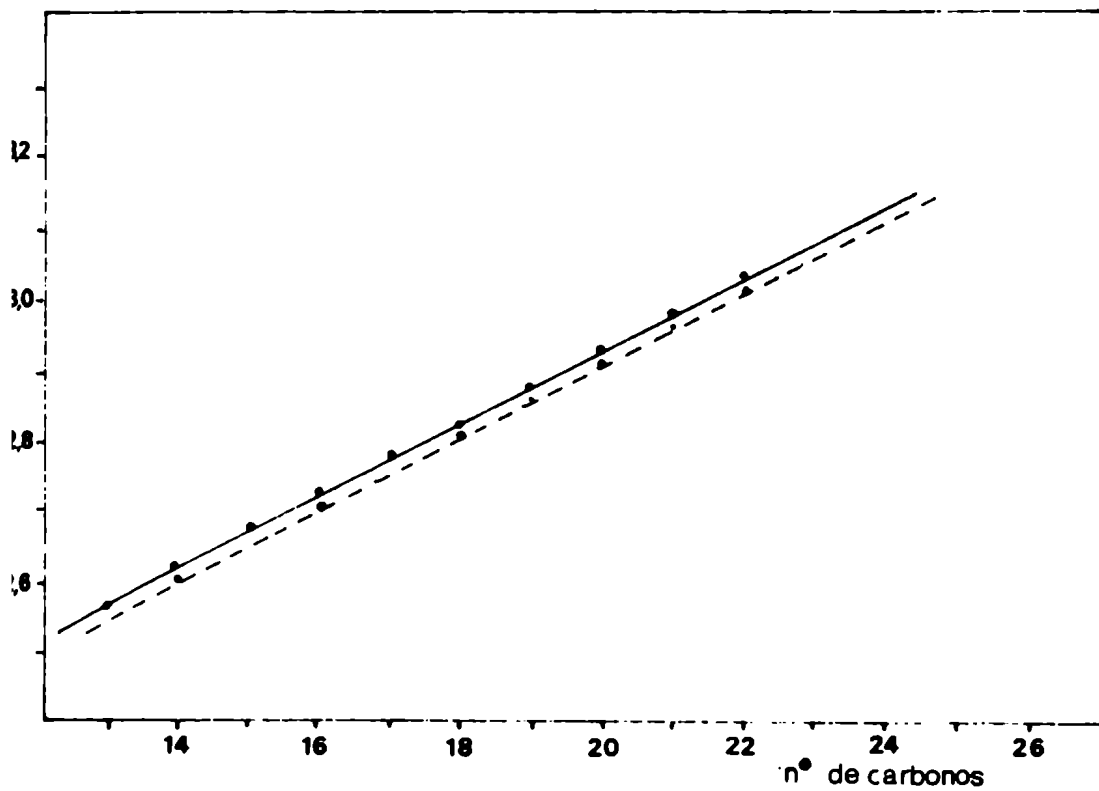


Figura 14: Fracción alcohólica. Representación del log. del tiempo de retención en función del n° de carbonos.

— serie normal

--- serie ramificada

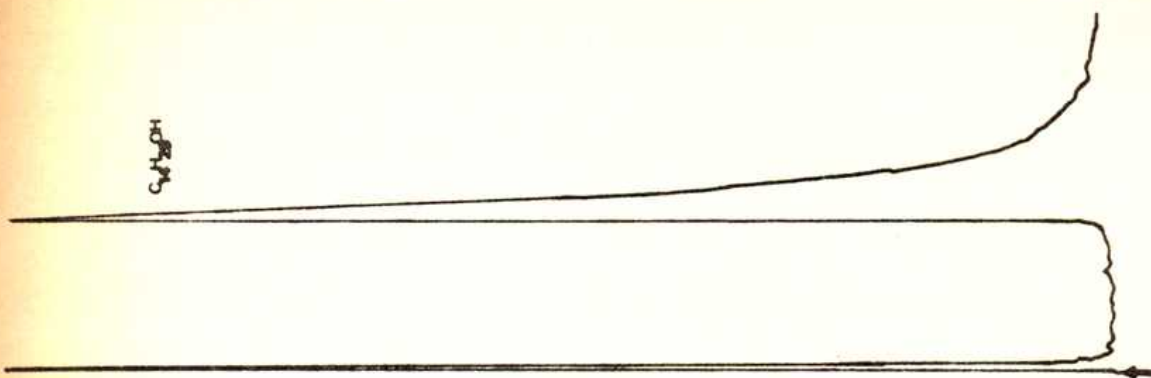


Figura 15:  $n-C_{14}H_{29}OH$ , cromatograma gaseoso

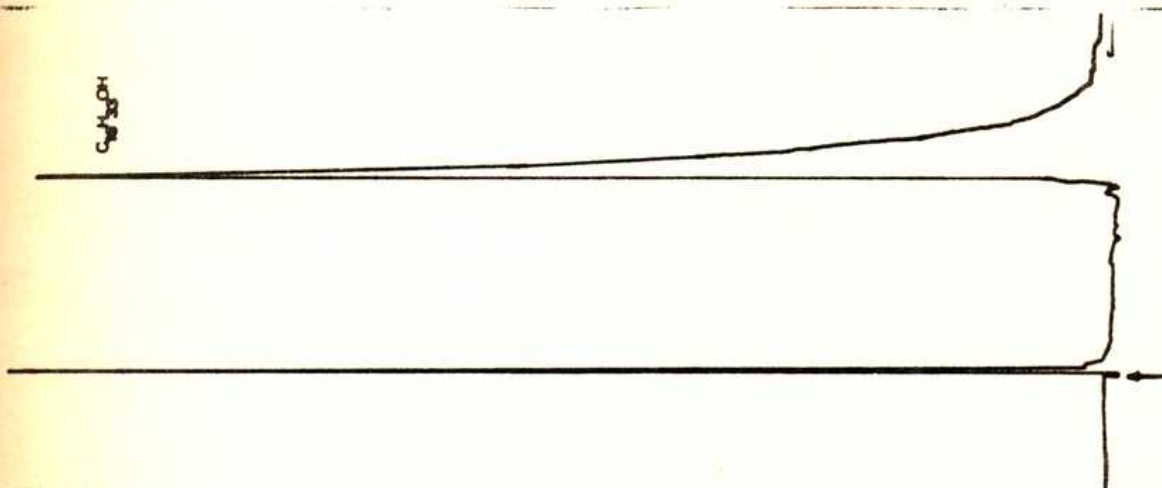


Figura 16:  $n-C_{16}H_{33}OH$ , cromatograma gaseoso

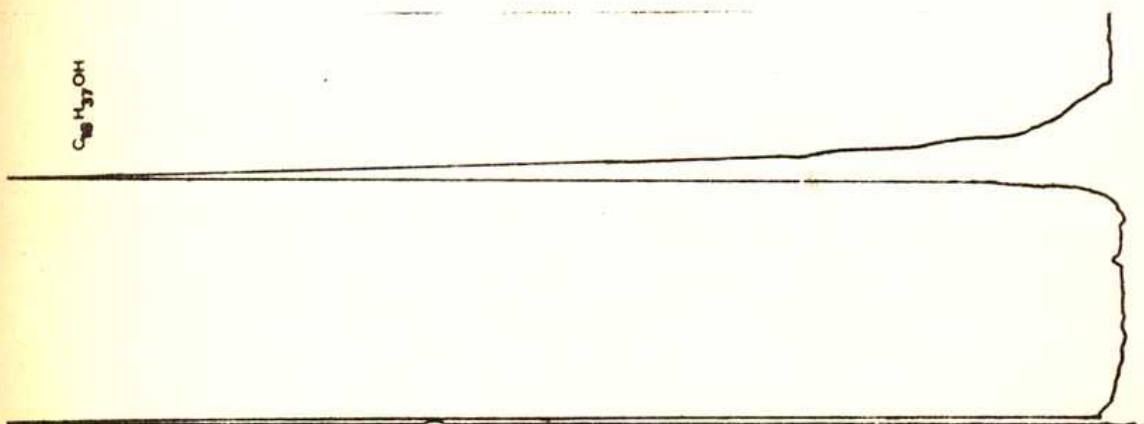


Figura 17:  $n-C_{18}H_{37}OH$ , cromatograma gaseoso

TRITERPENOS PENTACICLICOS EN PLANTAS

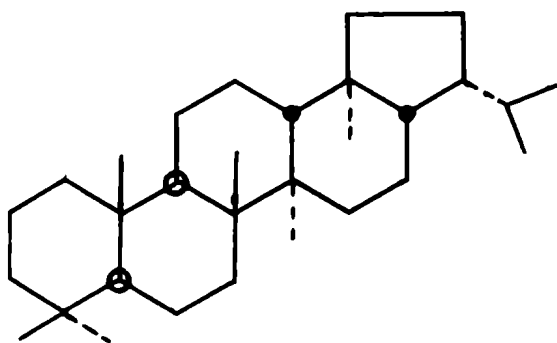
DE LA FAMILIA DE LAS COMPUESTAS



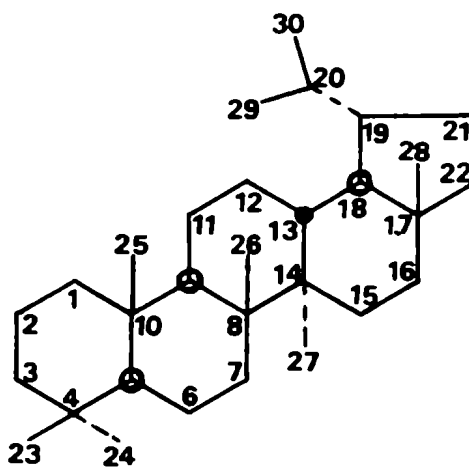
El hecho de haber aislado de una planta argentina perteneciente a la familia de las Compuestas, monoalcoholes triterpénicos pentacíclicos, determina que hagamos un resumen de este tipo de productos obtenidos de ejemplares pertenecientes a la mencionada familia.

Hasta el momento son conocidos diez triterpenoles que reúnen esas condiciones, es decir, que han sido aislados de plantas que pertenecen a la familia de las Compuestas.

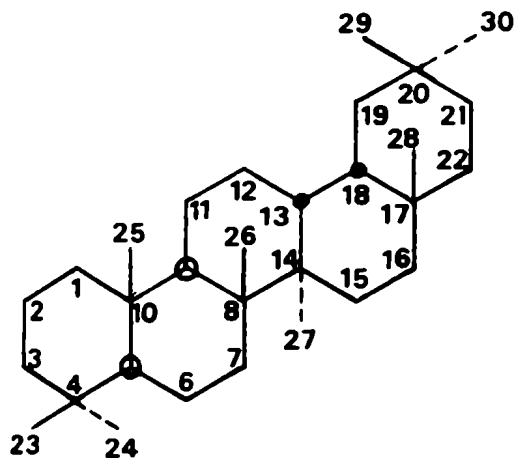
Los mismos pueden considerarse derivados de los siguientes esqueletos hidrocarbonados:



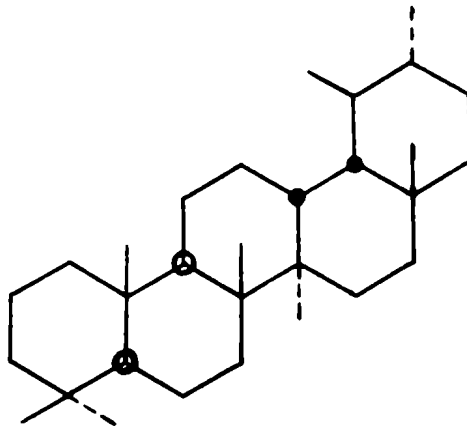
Hopano



Lupano



Oleanano

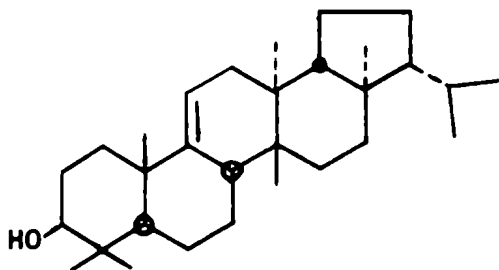


Ursano

A continuación se resumen los siguientes datos de cada uno de los triterpenoles: nombre derivado del esqueleto fundamental, fórmula estructural, punto de fusión, poder rotatorio, lo propio para el derivado acetilado y además género y especie de la planta perteneciente a la familia de las Compuestas donde se lo encontró.

Fernenol: compuesto con esqueleto de hopano reordenado, derivado de E:C-friedo (comprende productos derivados de esqueletos normales por migración de los grupos metilos angulares de 18 a 17, de 14 a 13 y de 8 a 14).

3 $\beta$ -Hidroxi-E:C-friedo-hop-9(11)-eno.



p.f. 194°;  $[\alpha]_D -24,0^\circ$ ;

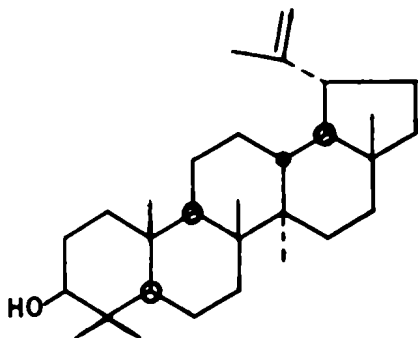
acetato: p.f. 215-216°;

$[\alpha]_D -10,0^\circ$

Se lo ha aislado de Artemisia vulgaris<sup>31</sup>.

Lupeol: compuesto con esqueleto de lupano.

3 $\beta$ -Hidroxi-lup-20(29)-eno.



p.f. 215°;  $[\alpha]_D + 27,0^\circ$ ;

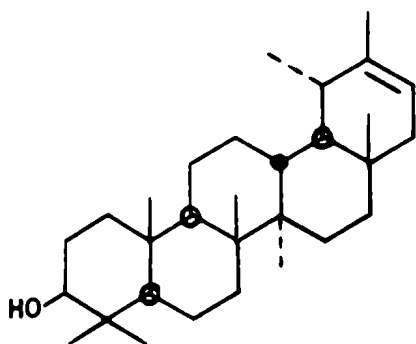
acetato: p.f. 220°;

$[\alpha]_D + 47,0^\circ$

Ha sido aislado de Cirsium oleraceum<sup>32</sup> y de Vernonia cinerea<sup>33</sup>.

$\Psi$ -taraxasterol: compuesto con esqueleto de lupano reordenado.

3 $\beta$ -Hidroxi-taraxast-20-eno.



p.f. 219-221°;  $[\alpha]_D + 45,0^\circ$ ;

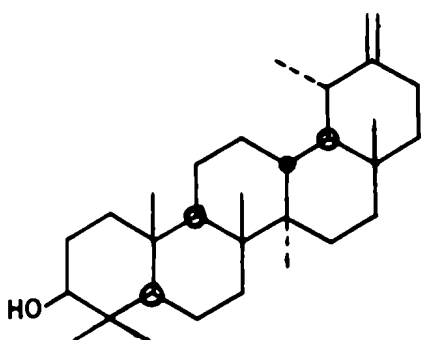
acetato: p.f. 238-240°;

$[\alpha]_D + 56,0^\circ$

Ha sido aislado de Taraxacum officinale<sup>34</sup>, Andryala canariensis<sup>35</sup>  
Cynara scolymus<sup>36</sup>, Cirsium oleraceum<sup>32</sup>, Sonchus ortunoi<sup>28</sup> y  
Sonchus leptcephalus<sup>28</sup>.

Taraxasterol: compuesto con esqueleto de lupano reordenado.

3 $\beta$ -Hidroxi-taraxast-20(30)-eno.



p.f. 226-227°;  $[\alpha]_D + 108^\circ$ ;

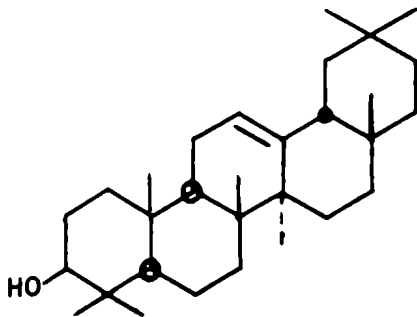
acetato: p.f. 255-256°;

$[\alpha]_D + 100^\circ$

Se lo ha aislado de numerosos géneros (ver página 91).

$\beta$ -amirina: compuesto con esqueleto de oleanano.

3 $\beta$ -Hidroxi-olean-12-eno.

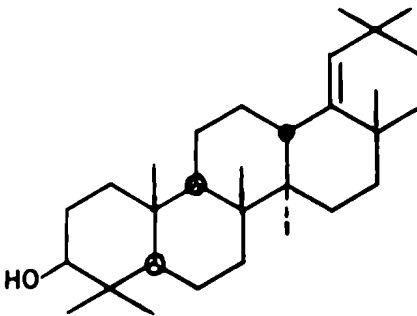


p.f. 197-197,5°;  $[\alpha]_D + 88,4^\circ$ ;  
 acetato: p.f. 241°;  
 $[\alpha]_D + 81,4^\circ$

Ha sido aislado de Aster baccharoides<sup>37</sup>, Cirsium oleraceum<sup>32</sup>,  
Sonchus ortunoi<sup>38</sup> y Sonchus leptcephalus<sup>38</sup>.

Germanicol: compuesto con esqueleto de oleanano.

3 $\beta$ -Hidroxi-olean-18-eno.



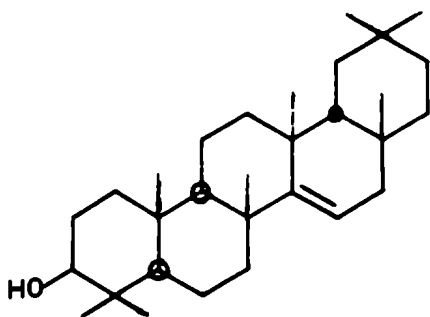
p.f. 175°;  $[\alpha]_D + 23,0^\circ$   
 acetato: p.f. 274-275°;  
 $[\alpha]_D + 20,0^\circ$

Ha sido aislado de Lactuca virosa<sup>39</sup>, Sonchus ortunoi<sup>38</sup>.

Taraxerol: compuesto con esqueleto de oleanano reordenado

derivado de la serie D-friedo (migración del grupo metilo de 14 a 13).

3 $\beta$ -Hidroxi-D-friedo-olean-14-eno.

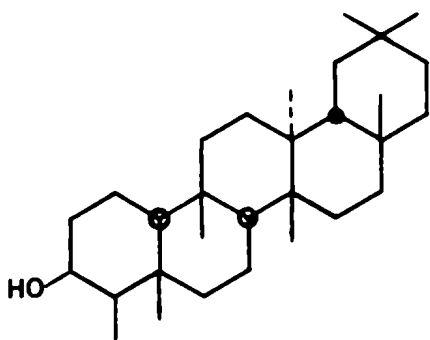


p.f. 282-285°;  $[\alpha]_D + 0^\circ$ ;  
 acetato: p.f. 304-305°;  
 $[\alpha]_D + 9,0^\circ$

Ha sido aislado de Sonchus gummifer<sup>40</sup> y Taraxacum officinale<sup>34</sup>.

Epifriedelinol: compuesto con esqueleto de oleanano reordenado derivado de la serie D:A-friedo (migración de metilo de 14 a 13, de 8 a 14, de 10 a 9 y de 4 (grupo 24) a 5).

3 $\beta$ -Hidroxi-D:A-friedo-oleanano.

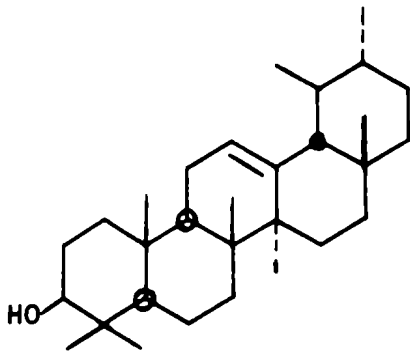


p.f. 279-283°;  $[\alpha]_D + 24,0^\circ$ ;  
 acetato: p.f. 290-294°;  
 $[\alpha]_D + 45,0^\circ$

Ha sido aislado de Olearia paniculata<sup>41</sup>.

$\alpha$ -amirina: compuesto con esqueleto de ursano inalterado.

3 $\beta$ -Hidroxi-ursa-12-eno.



p.f. 186°;  $[\alpha]_D + 83,0^\circ$ ;

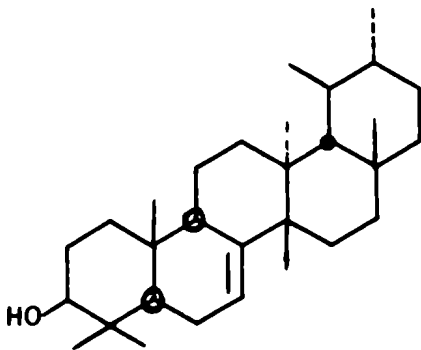
acetato: p.f. 225-226°;

$[\alpha]_D + 77,0^\circ$

Ha sido aislado de Calendula officinalis<sup>42</sup>, Schkurgia pinnata  
(este trabajo).

Baueranol: compuesto con esqueleto de ursano reordenado derivado de D:C-friedo.

3(β-Hidroxi-D:C-friedo-ursa-7-eno).



p.f. 207-208°;  $[\alpha]_D - 30,0^\circ$ ;

acetato: p.f. 293-294°;

$[\alpha]_D - 3,7^\circ$

Ha sido aislado de Petasites officinalis<sup>43</sup>.

TRITERPENOS PENTACICLICOS EN LA SCHKURIA PINNATA



En esta parte del presente trabajo se describe el aislamiento y caracterización de los triterpenoles aislados de la planta en estudio.

Como fue descrito en secciones anteriores, el extracto de éter de petróleo de Schkuria pinnata entera fue saponificado y la porción insaponificable fue cromatografiada en una columna de alúmina, utilizando éter de petróleo, benceno, cloroformo y metanol como solventes de elución.

Como fue previamente indicado, de las fracciones 1-675 fueron aislados hidrocarburos normales<sup>44</sup>, mientras que de las fracciones 753-1045 se obtuvieron n-alcanoles.

De las fracciones 3881-4390 se logró obtener un producto cristalino el cual fue caracterizado tentativamente como un triterpeno mediante la reacción con ácido tricloroacético<sup>45</sup>.

La sustancia era ópticamente activa,  $[\alpha]_D + 53,1^\circ$  y el espectro de absorción en el infrarrojo presentaba una banda a  $3350 \text{ cm}^{-1}$  que indicaba la presencia de hidroxilo alcohólico (Figura 18).

El punto de fusión, relativamente alto ( $168-170^\circ$  en la primera cristalización,  $202-203^\circ$  luego de cuatro recristalizaciones) y el aspecto general de su espectro de resonancia magnética nuclear (Figura 19) apoyaba la suposición de que

se trataba de un triterpenol y no de un esteroi.

Como por sucesivas recristalizaciones el producto presentaba un incremento continuo en el valor de su punto de fusión, se pensó en la existencia de una mezcla de triterpenos, a pesar del hecho de ser homogéneo en varios sistemas de cromatografía en capa delgada.

Por acetilación se obtuvo un derivado acetilado cuyo punto de fusión fue variando también, después de varias recristalizaciones.

La aplicación de espectrometría de masa al producto acetilado, permitió conocer su peso molecular (Figura 20). El valor del mismo, 468, podría corresponder al acetil derivado de un alcohol triterpénico pentacíclico.

El espectro de resonancia magnética nuclear del derivado acetilado (Figura 21), estaba de acuerdo con esta última asignación. De acuerdo con los datos del mismo, el anillo A era normal (hexatómico) y tenía un grupo hidroxilo ecuatorial en posición 3. Esto último se dedujo del análisis de la señal del protón unido al C-3 que en el espectro del alcohol aparece a  $\delta$  3,25 y en el acetato a  $\delta$  4,65.

En los mismos espectros son también destacables, una señal a  $\delta$  4,70 que corresponde a protones olefínicos del

tipo  $-C=CH_2$  y otra a  $\delta$  1,65 correspondiente a un metilo ubicado sobre doble ligadura ( $-C=C-CH_3$ ).

Como primera aproximación fue también factible hacer una comparación de los puntos de fusión y poderes rotatorios del producto obtenido de Schkuria pinnata y de su acetato, con compuestos conocidos de fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$  cuyos puntos de fusión y poderes rotatorios fueran aproximados a los valores encontrados para el producto incógnita; las sustancias consideradas como posibles se muestran en la Tabla 5.

De la consideración de esta Tabla surge que podrían descartarse algunos triterpenoles como taraxerol, germanicol, isocarborinol y otros, pero en general era difícil de discernir claramente, dado lo incierto de nuestros valores, los que según se indicó anteriormente no habían llegado a mostrar constancia por cristalizaciones sucesivas.

Por otra parte, teniendo en cuenta los datos del espectro de resonancia magnética nuclear (presencia de agrupaciones  $CH_2=C-$  y  $CH_3-C=C-$ ), quedarían como estructuras más probables:  $\Psi$ -taraxasterol, taraxasterol, lupeol y moretenol, pero sin poder descartar que se tratara de mezclas de ellos con algunos de los triterpenoles indicados en la Tabla 5 o con algún

Tabla 5

<u>Compuesto</u>	<u>Punto de fusión</u>		<u><math>[\alpha]_D</math></u>	
	<u>Alcohol</u>	<u>Acetato</u>	<u>Alcohol</u>	<u>Acetato</u>
Producto incógnita	202-203°	220-222°	+ 53,1°	+ 83,3°
Isobauerenol	168-170°	212-213°	+ 45,0°	+ 44,0°
$\alpha$ -amirina	186°	225-226°	+ 83,0°	+ 77,0°
Glutinol	205-207°	188-190°	+ 60,0°	+ 81,0°
Taraxerol	282-285°	304-305°	+ 0°	+ 9,0°
Germanicol	175°	274-275°	+ 23,0°	+ 20,0°
$\beta$ -amirina	197-197,5°	241°	+ 88,4°	+ 81,4°
$\psi$ -taraxasterol	219-221°	238-240°	+ 45,0°	+ 56,0°
Taraxasterol	226-227°	255-256°	+ 108°	+ 100°
Lupeol	215°	220°	+ 27,0°	+ 47,0°
Simiarenol	209-210°	209°	+ 50,8°	+ 73,9°
Moretenol	236-236,5°	284-285°	+ 27,0°	+ 24,0°
Isoarborinol	294-294,5°	287-288°	+ 47,0°	+ 56,0°

otro triterpenol de estructura desconocida.

Como la supuesta mezcla de triterpenoles obtenida de la planta, no pudo ser resuelta por los métodos convencionales de cromatografía en capa delgada, fue sometida a un análisis por cromatografía en fase gaseosa, detectándose mediante este último método la presencia de tres componentes.

Simultáneamente se llevaron a cabo co-cromatografías con sustancias patrones y los resultados de las mismas permitieron señalar que el componente de la mezcla que se encontraba en mayor proporción podría ser taraxasterol o  $\Psi$ -taraxasterol, dado que los tiempos de retención respectivos eran similares.

Los otros productos que formaban parte de la mezcla podrían posiblemente encontrarse entre los restantes triterpenoles de la Tabla 5.

Por cromatografía en fase gaseosa sólo pudieron compararse lupeol, moretenol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina; los tres primeros tenían tiempos de retención semejantes al segundo constituyente de la mezcla, mientras que  $\beta$ -amirina podía con seguridad descartarse por tener un valor no comparable con ninguna de las señales de la mezcla en estudio.

Isobauerenol, glutinol, taraxerol, germanicol, simiarenol e isocarborinol fueron eliminados posteriormente porque sus

espectros de masa no eran concordantes con los espectros de masa de cada uno de los productos obtenidos de Schkuria pinnata (ver páginas 68,75).

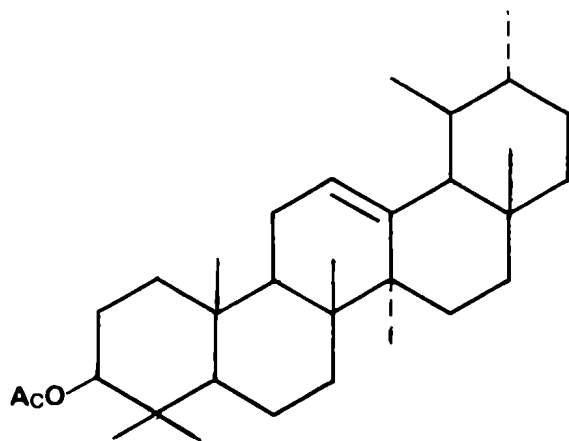
Por la misma razón y como se verá más adelante, fueron eliminados como posibles constituyentes de la mezcla lupeol, moretenol y  $\Psi$ -taraxasterol.

Una combinación de los dos métodos, cromatografía en fase gaseosa y espectrometría de masa, fue utilizada para conocer la composición de la mezcla. El análisis se llevó a cabo con los derivados acetilados y trimetilsililados de los triterpenoles incógnitas.

En cada caso, el espectro de masa de cada componente que abandonaba la columna de cromatografía gaseosa, fue comparado con el de la muestra auténtica que se sospechaba formaba parte de la mezcla. Mediante este procedimiento se logró identificar taraxasterol (I) y  $\alpha$ -amirina (II); el tercer producto no pudo ser identificado con seguridad debido a que estaba presente en muy pequeña cantidad

Observando los espectros de masa de los triterpenoles acetilados que componían la mezcla y los espectros de masa de acetato de taraxasterol (III) y acetato de  $\alpha$ -amirina (IV), es apreciable que presentan gran similitud (ver parte experi-

Tabla 6- Picos característicos del espectro de masa del acetato de  $\alpha$ -amirina auténtica.



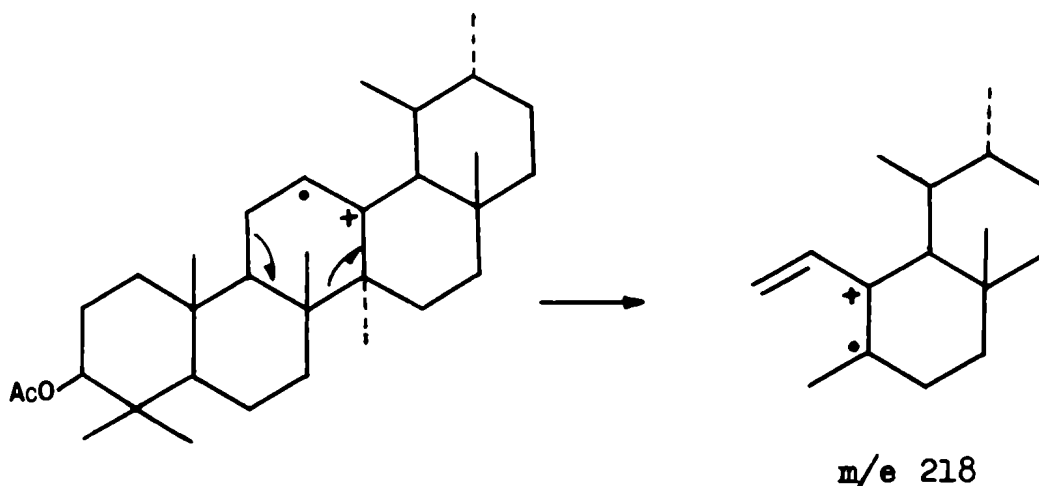
IV

m/e	% relativo al pico base
469 ( $M^+ + 1$ )	2
468 ( $M^+$ )	5
453 ( $M - CH_3$ )	1,5
408 ( $M - AcOH$ )	1,2
393 ( $M - AcOH - CH_3$ )	0,8
257	2
249	3
218	100
203	12
189	16
43 ( $CH_3CO$ )	58

mental).

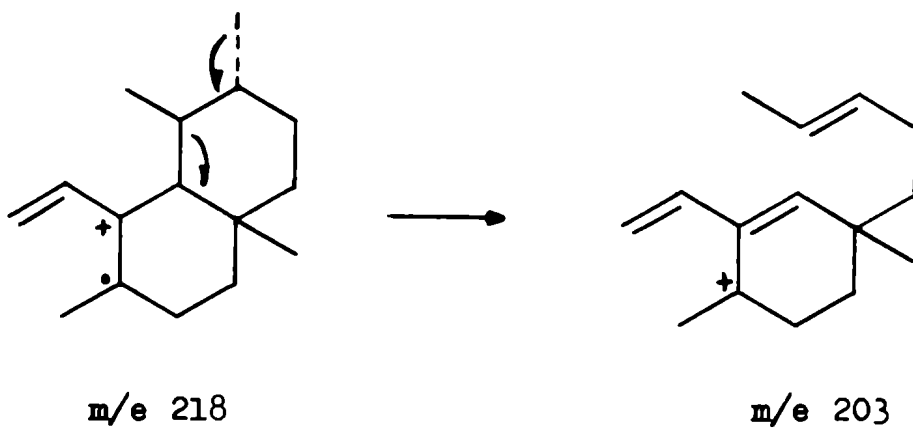
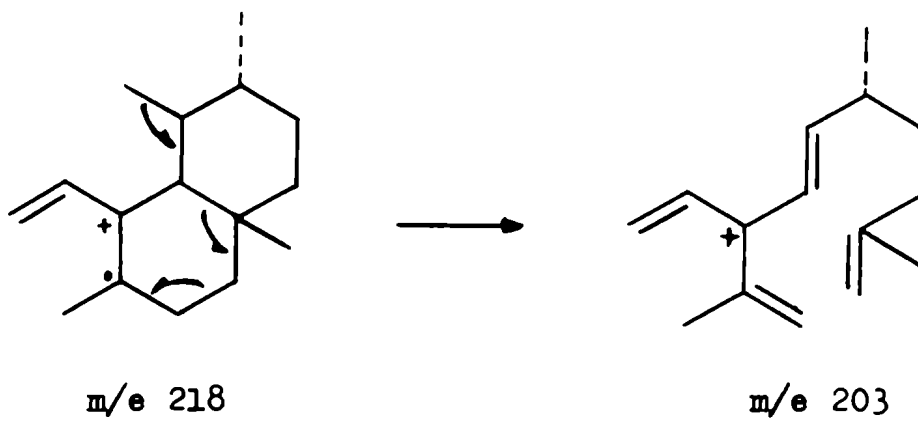
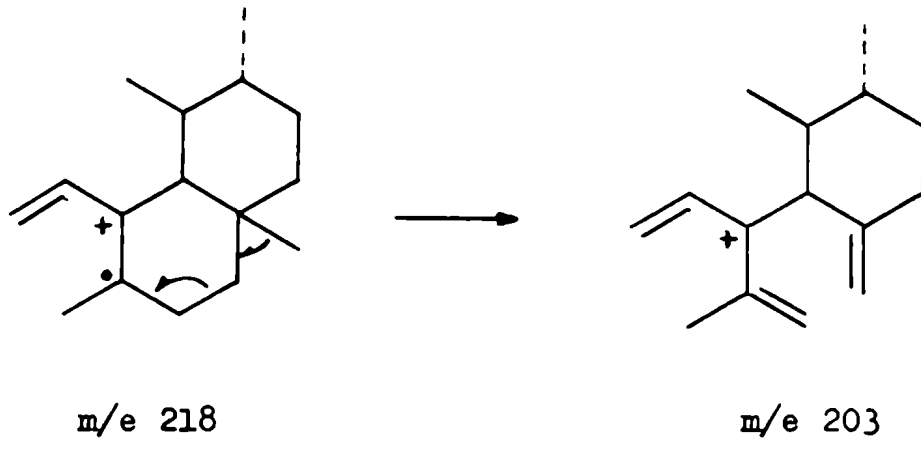
El espectro de masa del acetato de  $\alpha$ -amirina muestra los picos importantes indicados en la Tabla 6, los cuales pueden ser adjudicados a las siguientes fragmentaciones:<sup>46,47</sup> El pico de  $m/e$  468 es el pico molecular y el de  $m/e$  453 corresponde a la pérdida de un radical  $\text{CH}_3$  a partir del ión molecular. Por otra parte, la pérdida de ácido acético a partir del ión molecular da lugar al fragmento de  $m/e$  408.

La fragmentación más característica de los compuestos de este tipo es la reacción de retro Diels-Alder, en el anillo C por la presencia de la doble unión entre  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{13}$ , dando origen al pico base,  $m/e$  218.

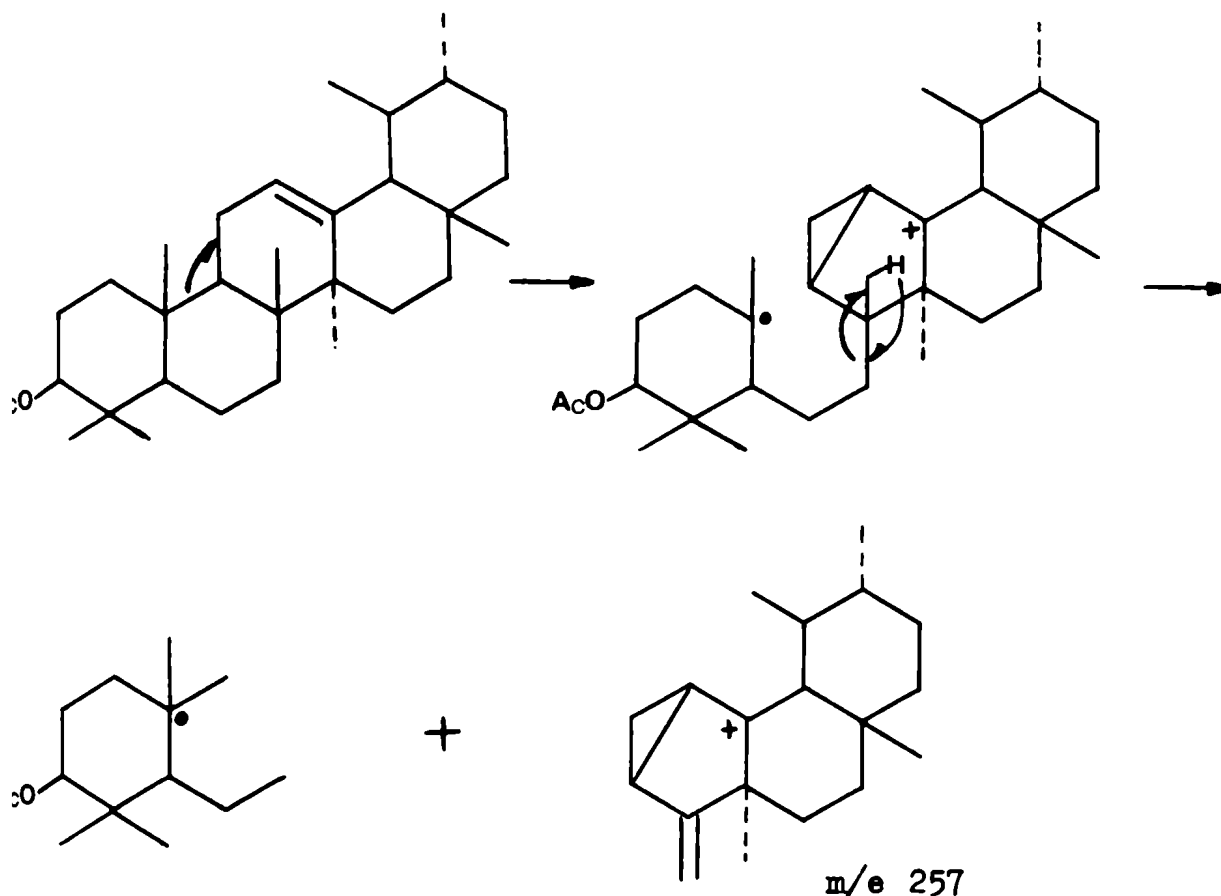


A partir de este pico se origina el de  $m/e$  203, existiendo tres formas distintas de contribución al mismo.



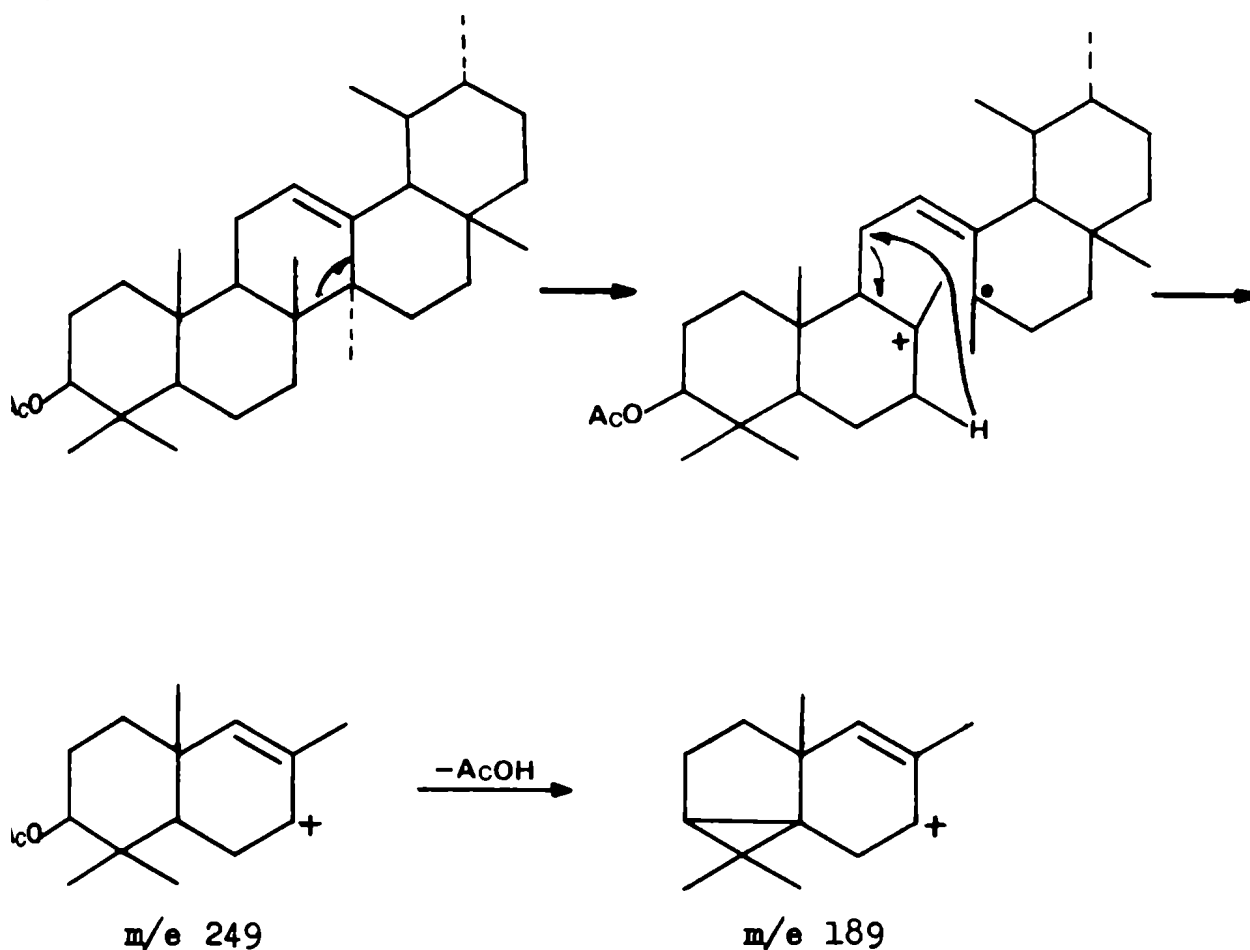


Existe otro fragmento que incluye los anillos C y D que se forma por ruptura homolítica de la unión  $C_9-C_{10}$  seguida de transferencia de hidrógeno de  $C_{26}$  a  $C_7$  con ruptura homolítica simultánea de la unión  $C_7-C_8$  para dar el pico de  $m/e$  257<sup>47</sup>.



Otro fragmento que puede ser identificado aunque no es muy abundante en el espectro de triterpenos  $\Delta^{12}$ -no saturados, es el de  $m/e$  249<sup>46,47</sup>. Este ión se puede generar por ruptura heterolítica de la unión  $C_8-C_{14}$  para formar un ión carbonio terciario y un radical alílico. Posteriormente ocurre ruptura

de la unión  $C_9-C_{11}$  para dar el ión de  $m/e$  249, el cual sufre luego la pérdida de ácido acético produciéndose un pico a  $m/e$  189.



El fragmento de  $m/e$  43 corresponde al grupo  $CH_3CO$ .

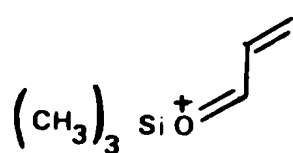
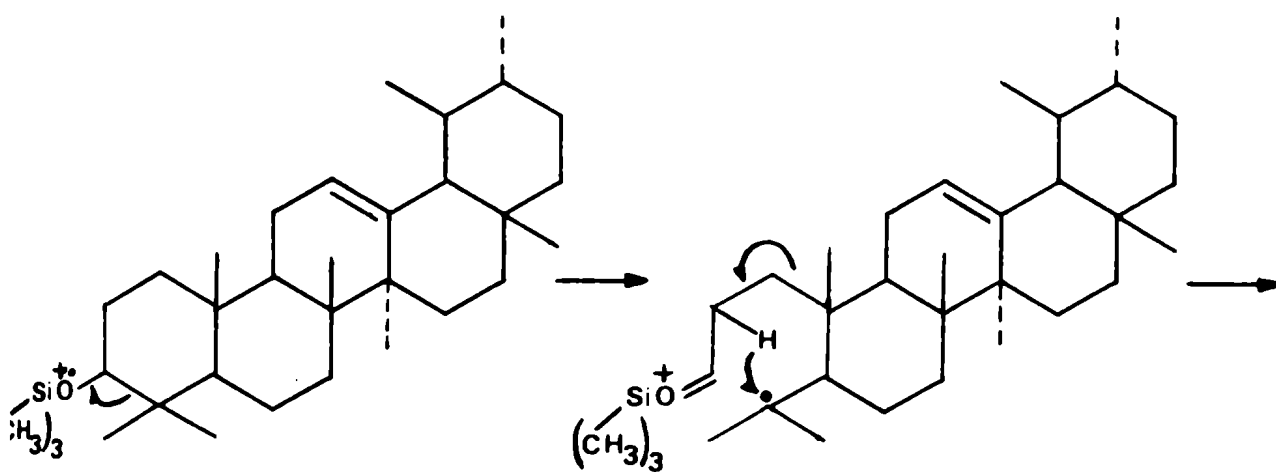
En la Tabla 7 se presentan los principales picos del espectro de masa del acetato de la supuesta  $\alpha$ -amirina(IV) obtenida de la planta Schkuria pinnata, notándose que muestra las mismas características que la del acetato de  $\alpha$ -amirina auténtica.

Tabla 7- Picos característicos del espectro de masa del supuesto acetato de  $\alpha$ -amirina obtenida de la Schkuria pinnata.

m/e	% relativo al pico base
469 ( $M^+ + 1$ )	1,5
468 ( $M^+$ )	5,3
453 ( $M - CH_3$ )	1,3
408 ( $M - AcOH$ )	3,6
393 ( $M - AcOH - CH_3$ )	1,2
257	3,0
249	2,4
218	100
203	18
189	22
43 ( $CH_3CO$ )	98

Posterior confirmación fue lograda con el espectro de masa del trimetilsilil derivado (Tabla 8), el cual sufre los mismos tipos de fragmentación que el producto acetilado.

Es notorio que en este último espectro aparecen todos los fragmentos que contienen los anillos C, D y E que no fueron alterados; además el espectro presenta un pico a  $m/e$  369 que corresponde a la pérdida de un ión de  $m/e$  129 a partir del ión molecular.

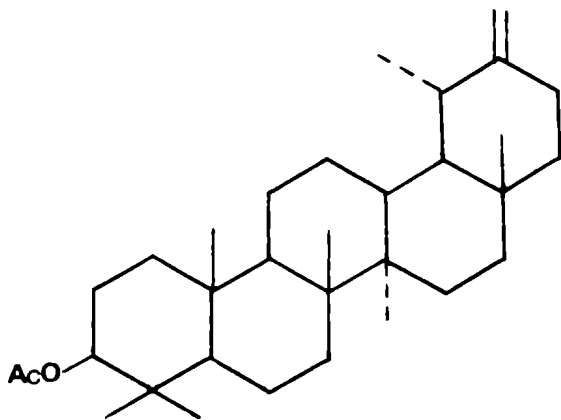


$m/e$  129

Tabla 8- Picos característicos del espectro de masa del trimetilsilil derivado de la supuesta  $\alpha$ -amirina obtenida de la Schkuria pinnata.

m/e	% relativo al pico base
499 ( $M^+ + 1$ )	1,3
498 ( $M^+$ )	6,3
483 ( $M - CH_3$ )	1
369 ( $M - 129$ )	1
279	5
218	100
203	10
189	17,5
129	7,5
73 ( $(CH_3)_3Si$ )	64

Tabla 9- Picos característicos del espectro de masa del acetato de taraxasterol auténtico.



III

m/e	% relativo al pico base
469 ( $M^+ + 1$ )	0,5
468 ( $M^+$ )	18,5
453 ( $M - CH_3$ )	0,8
408 ( $M - AcOH$ )	6
393	3
249	11
218	5
205	9
204	13
203	11
189	70
43	100

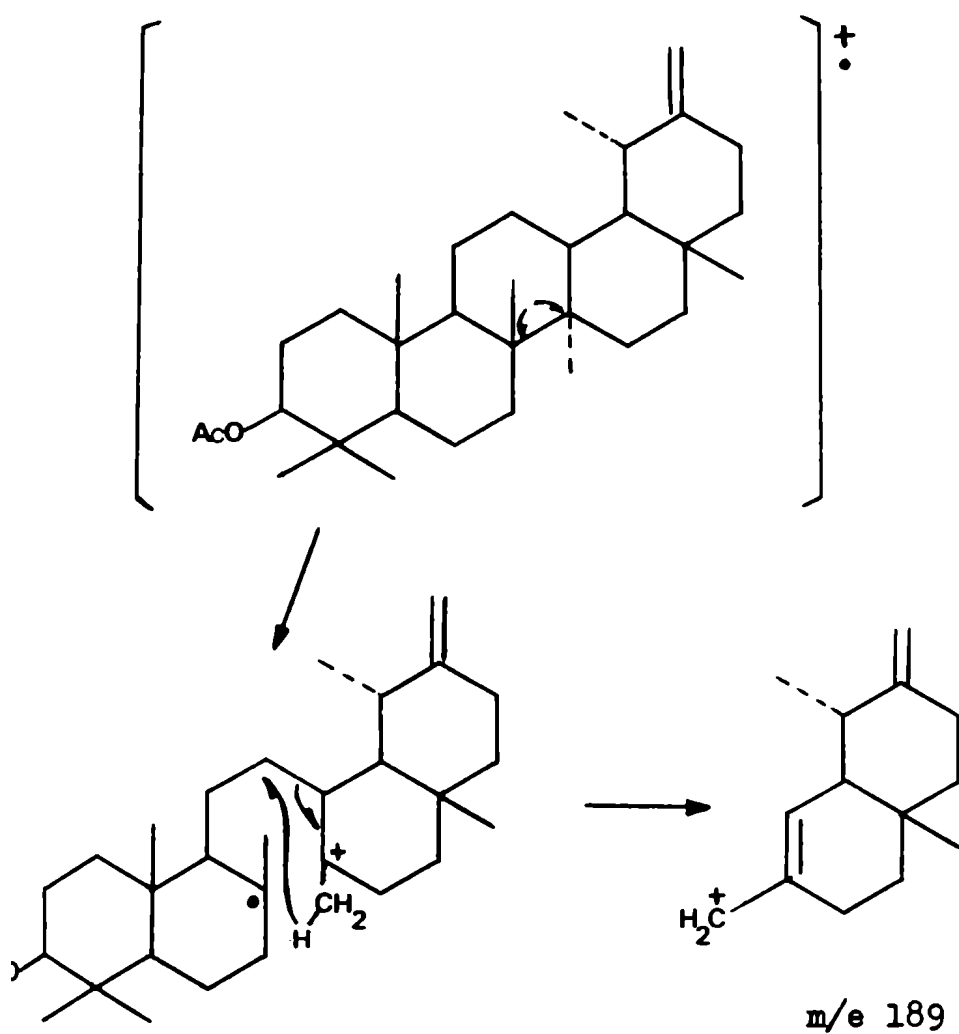
Metaestable: m/e 355,69 ( $M \rightarrow M - AcOH$ )

En el caso del segundo componente de la mezcla se pudo efectuar una comparación análoga.

El espectro de masa del acetato de taraxasterol auténtico presenta los picos indicados en la Tabla 9.

El ión molecular corresponde a  $m/e$  468 y nuevamente se observan los picos  $m/e$  453 y  $m/e$  408 debidos a la pérdida de metilo y ácido acético respectivamente.

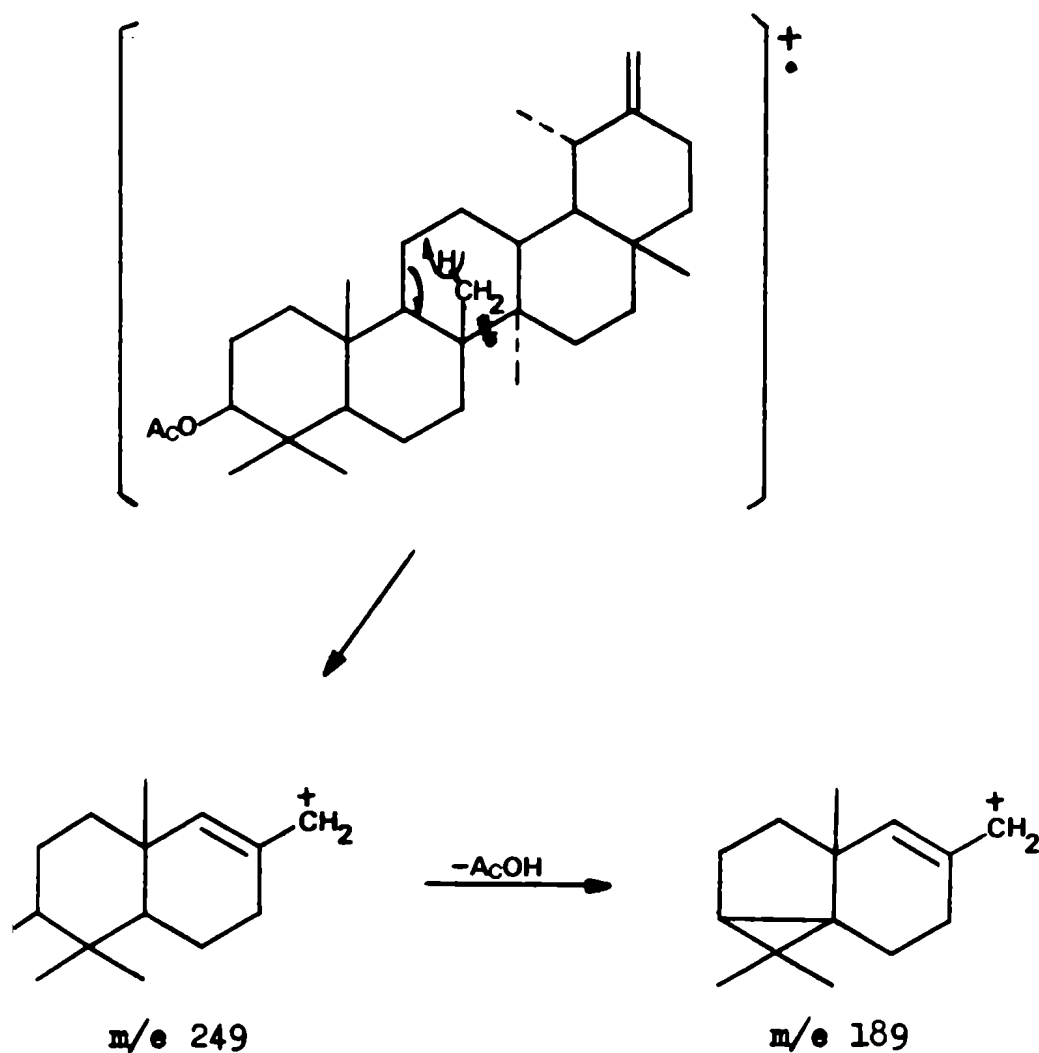
Los fragmentos principales provienen de dos tipos de rupturas<sup>46</sup> que ocurren en el anillo C.



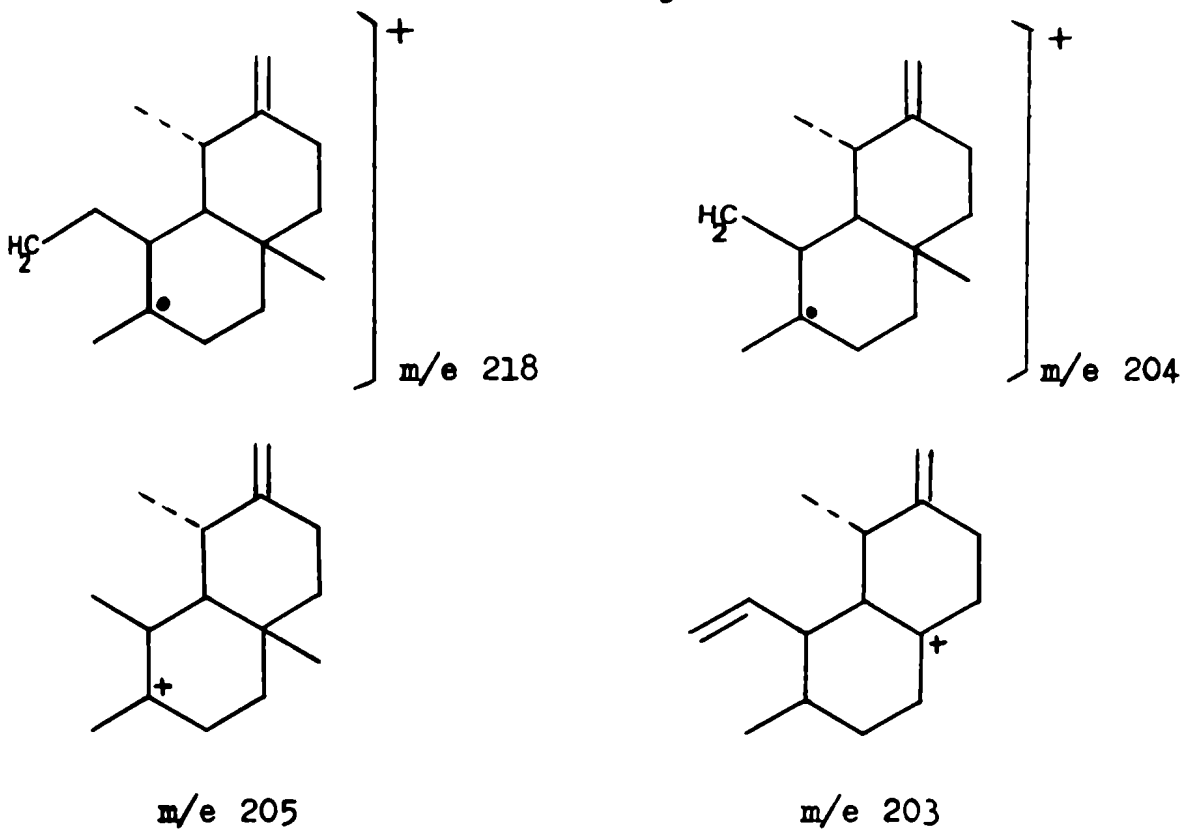


Este primer mecanismo involucra la ruptura de la unión 8-14 acompañada de transferencia de hidrógeno para dar la estabilización por resonancia del ión con número impar de electrones de  $m/e$  189.

El segundo tipo de ruptura involucra la unión 9-11, acompañada de transferencia de hidrógeno para producir el ión impar estabilizado por resonancia a  $m/e$  249, el cual pierde ácido acético para dar el ión a  $m/e$  189 que se superpone al producido por el primer mecanismo.



Junto con el ión de m/e 249, este segundo mecanismo produce otro fragmento de m/e 218 a partir del cual se obtienen los de m/e 203 (por pérdida de  $\text{CH}_3$ ), 204 y 205.



El pico base del espectro es el de m/e 43 correspondiente al grupo  $\text{CH}_3\text{CO}$ .

Comparando los espectros de masa del acetato de taraxasterol auténtico (recién discutido) y el que proviene de la planta (Tabla 10), se aprecia que son semejantes.

Ocurre exactamente lo mismo al comparar los espectros de masa de los trimetilsilil derivados de ambos productos (Tabla 11 y Tabla 12).

Tabla 10- Picos característicos del espectro de masa del  
supuesto acetato de taraxasterol obtenido de la  
Schkuria pinnata.

m/e	% relativo al pico base
469 ( $M^+ + 1$ )	8
468 ( $M^+$ )	14
453 ( $M - CH_3$ )	0,9
408 ( $M - AcOH$ )	7
393 ( $M - AcOH - CH_3$ )	3
249	10
218	6
205	9
204	12,5
203	10,6
189	72
43	100

Metaestable: m/e 355,69 ( $M \rightarrow M - AcOH$ )

Tabla 11- Picos característicos del espectro de masa del trimetilsilil derivado de taraxasterol auténtico

m/e	% relativo al pico base
499 ( $M^+ + 1$ )	6,5
498 ( $M^+$ )	14
483 ( $M - CH_3$ )	2,7
408 ( $M - 90$ )	10
393 ( $M - 90 - CH_3$ )	5,5
369 ( $M - 129$ )	17,5
279	9
190	55
189	100
129	37,5
73	93
Metaestable: m/e 334,26 ( $M \rightarrow (M - 90)$ )	

Tabla 12- Picos característicos del espectro de masa del trimetilsilil derivado del supuesto taraxasterol obtenido de la Schkuria pinnata.

m/e	% relativo al pico base
499 ( $M^+ + 1$ )	7
498 ( $M^+$ )	15
483 ( $M - CH_3$ )	3
408 ( $M - 90$ )	11,5
393 ( $M - 90 - CH_3$ )	6
369 ( $M - 129$ )	16,5
279	8
190	47
189	100
129	30
73	83

Metaestable: m/e 334,26 ( $M \rightarrow (M - 90)$ )

Por lo tanto, y de acuerdo con los resultados obtenidos por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa, dos de los componentes de la mezcla de triterpenoles podrían ser  $\alpha$ -amirina (II) y taraxasterol (I). En cuanto al tercer componente no pudo ser fehacientemente caracterizado por estar presente en muy pequeña cantidad en la muestra sometida al método físico descripto.

Una posterior confirmación de estas asignaciones se llevó a cabo por epoxidación de la mezcla de triterpenoles con ácido p-nitro-perbenzoico y separación cromatográfica de los epoxi- y ceto-derivados obtenidos por cromatografía en capa delgada preparativa<sup>48</sup>.

El método de separación de triterpenos mediante previa epoxidación de los mismos, proviene de cierto tiempo atrás<sup>49</sup>. Consiste en esencia, en transformar una mezcla de productos muy semejantes en otra mezcla de productos ahora no tan semejantes entre sí.

No todos los triterpenos producen idénticos derivados por reacción con un agente epoxidante. En algunos casos se obtienen los epoxi derivados reales, mientras que en otros se obtienen productos carbonílicos. Así, tanto  $\alpha$ -amirina como  $\beta$ -amirina producen el 12-ceto derivado por tratamiento con perácidos;

lanosterol produce el 8,9-24,25-diepoxi derivado, mientras que el euforbol da lugar al 24,28-epoxi derivado, etc.

Por lo tanto, si existe una mezcla de terpenos que es aparentemente homogénea por los métodos usuales de cromatografía en capa delgada y se la trata con un agente epoxidante (perácido), pueden formarse cetonas, epóxidos, aldehidos, etc, dependiendo del tipo de producto que forma parte de la mezcla. Estos productos de oxidación poseen luego diferencias suficientes como para ser separados mediante métodos cromatográficos.

En nuestro caso, los triterpenoles peroxidados obtenidos resultaron ser tres coincidentemente con los picos que se habían detectado mediante cromatografía gaseosa. Los productos de oxidación fueron separados utilizando cromatografía preparativa y comparados individualmente (p.f., i.r., c.c.d.) con varios epoxi- y ceto-derivados de acetatos de triterpenoles conocidos como:  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, lupeol, moretenol,  $\psi$ -taraxasterol, los que a su vez habían sido preparados a partir de muestras auténticas por tratamiento con el mismo agente epoxidante.

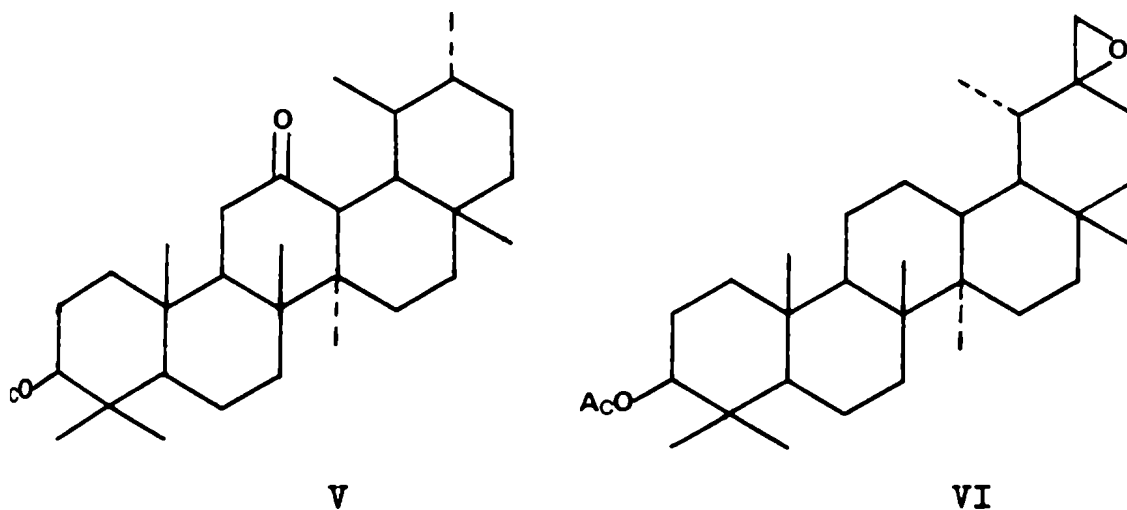
De esta manera, dos de los productos obtenidos por epoxidación de la mezcla fueron identificados como el 12-ceto

Tabla 13- Picos característicos del espectro de masa del acetato de epoxi-taraxasterol proveniente de la Schkurgia pinnata.

m/e	% relativo al pico base
485 (M <sup>+</sup> + 1)	1,64
484 (M <sup>+</sup> )	14
469 (M - CH <sub>3</sub> )	1,6
424 (M - AcOH)	9
409 (M - AcOH - CH <sub>3</sub> )	8,2
249	10,6
234	5
221	3,2
220	4,23
219	5
205	14
190	28,7
189	83,6
136	50,02
69	50,02
43	100

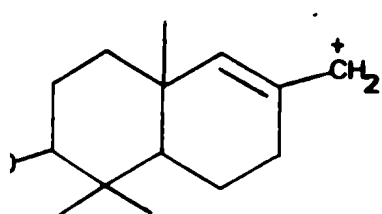


derivado del acetato de  $\alpha$ -amirina (V) y el acetato de epoxi-taraxasterol (VI) respectivamente.

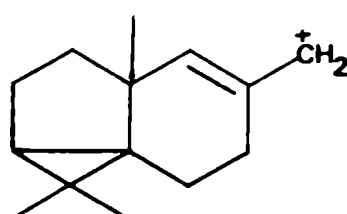


El espectro de masa de uno de los productos de oxidación aislado de la mezcla e identificado como el acetato de epoxi-taraxasterol, presenta los picos principales indicados en la Tabla 13.

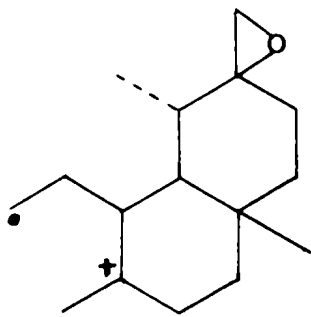
Estos iones se originan por los mecanismos descritos previamente (página 72) y las estructuras correspondientes para el caso del compuesto (VI) se muestran a continuación:



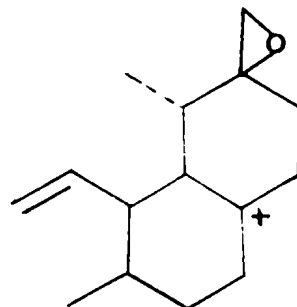
m/e 249



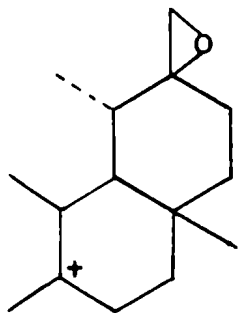
m/e 189



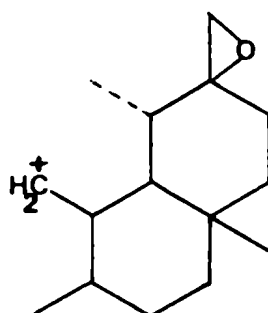
m/e 234



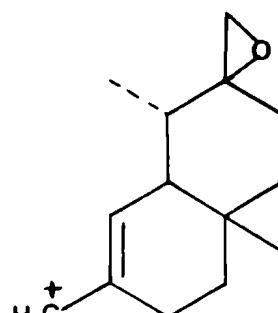
m/e 219



m/e 221



m/e 220



m/e 205

Es interesante destacar la relación existente entre los picos del espectro de masa del acetato de taraxasterol, provenientes de los anillos C, D y E con los correspondientes al espectro de masa del acetato de epoxi-taraxasterol, notándose que todos estos últimos se hallan incrementados en 16 unidades de masa. En los casos de los iones provenientes de los anillos A y B es factible apreciar que se repiten en ambos espectros.

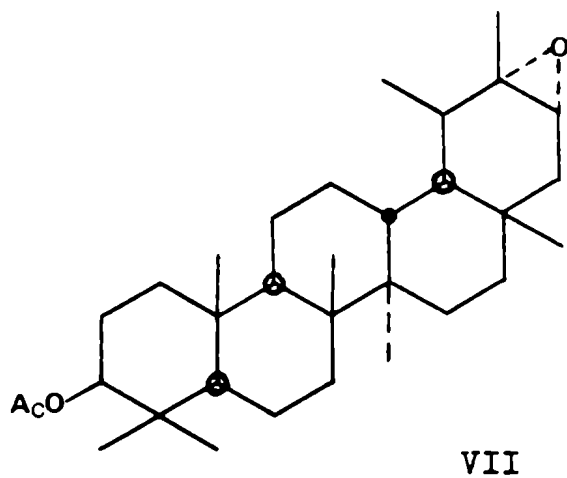
<u>Acetato de taraxasterol</u>	<u>Acetato de epoxi-taraxasterol</u>
m/e	m/e
189	205
203	219
204	220
205	221
218	234
408	424
453	469

El tercer producto peroxidado era distinto (p.f., c.c.d.) del obtenido a partir del taraxasterol, aunque su espectro de masa (Tabla 14) presentaba fragmentos similares a los del acetato de epoxi-taraxasterol.

Mediante comparación con valores de punto de fusión, obtenidos de la literatura se sospechó que el tercer producto fuera el acetato de epoxi-lupenol-I (VII).

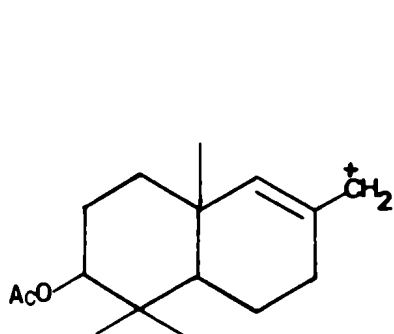
Tabla 14- Picos característicos del espectro de masa del  
supuesto acetato de epoxi-lupenol-I (VII).

m/e	% relativo al pico base
485 ( $M^+ + 1$ )	32,5
484 ( $M^+$ )	87,3
469 ( $M - CH_3$ )	5,5
424 ( $M - AcOH$ )	44,83
409 ( $M - AcOH - CH_3$ )	24,8
249	23,6
234	5
221	10,6
220	14,1
219	10,6
205	32,5
190	65,0
189	100
136	99,7
69	81,0
43	99,7

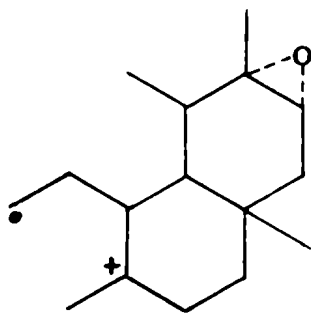


Su espectro de masa (Tabla 14) concuerda con la estructura propuesta.

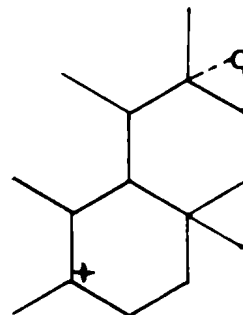
Los principales picos provienen de los siguientes fragmentos:



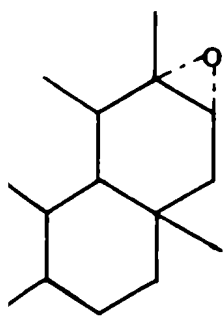
m/e 249



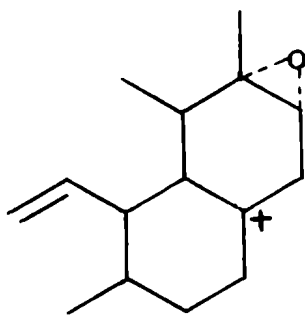
m/e 234



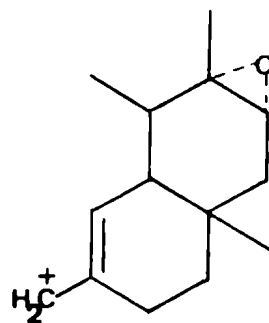
m/e 221



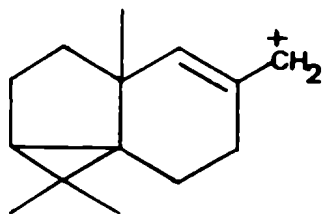
m/e 220



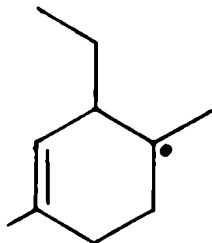
m/e 219



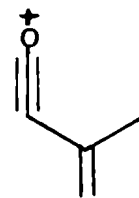
m/e 205



m/e 189



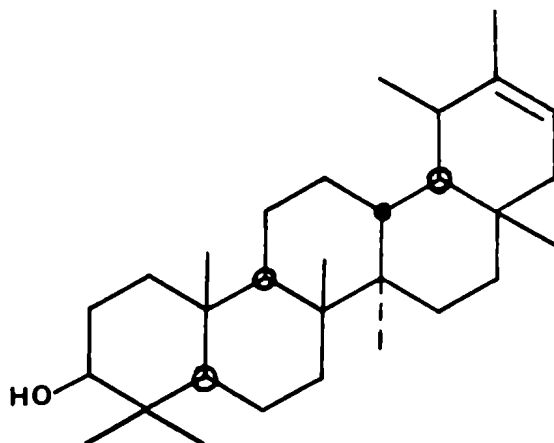
m/e 136



m/e 69

Aunque el espectro de masa del producto (VII) estaba de acuerdo con la estructura propuesta, su identificación no fue segura ya que no fue factible compararlo con una muestra auténtica.

Por lo tanto, por este proceso de epoxidación y estudio de los productos oxidados, taraxasterol y  $\alpha$ -amirina pudieron ser confirmados como componentes de la mezcla, mientras que el tercer componente podría ser lupenol-I (VIII).



VIII

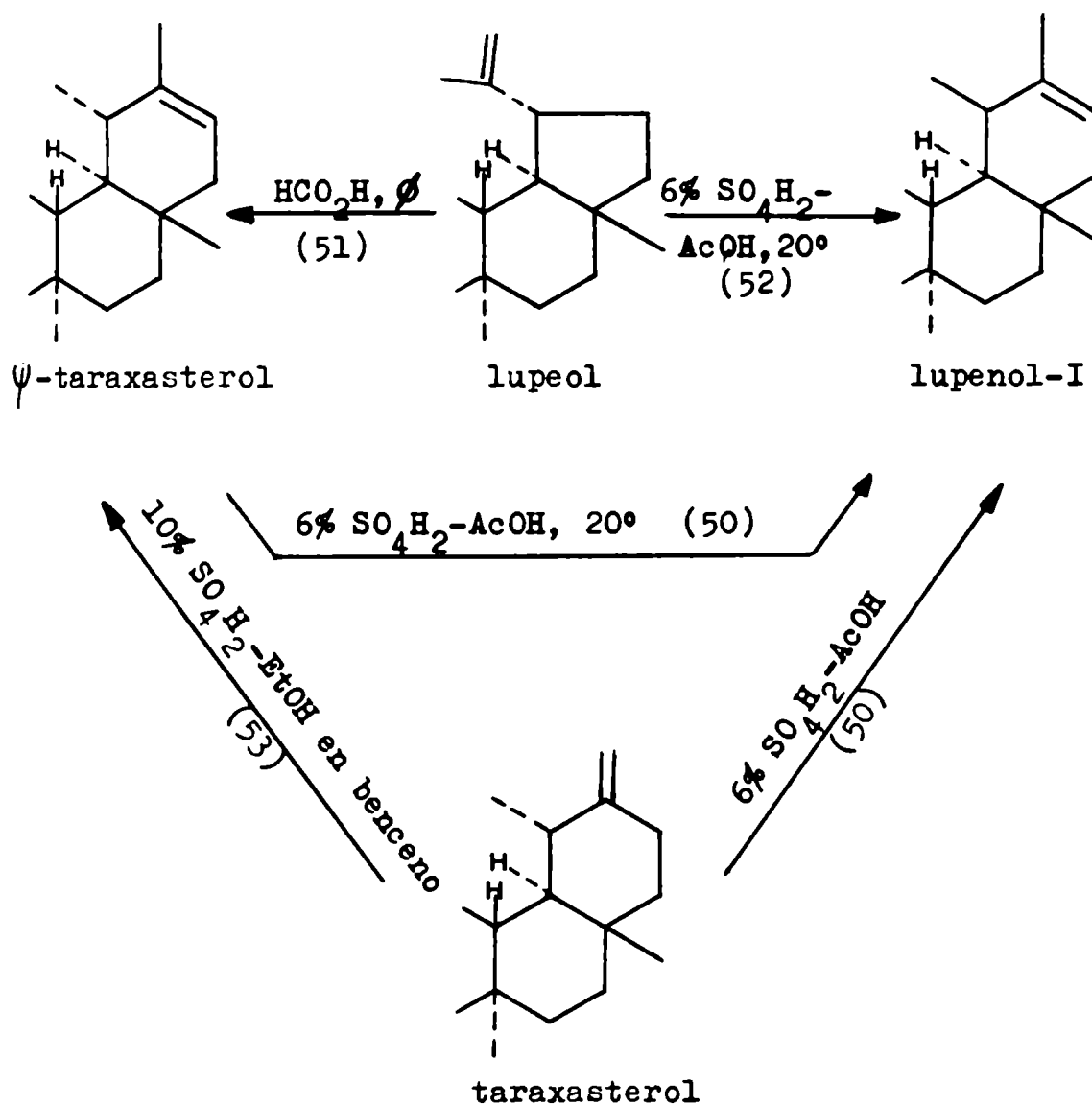
Hasta el momento no se conoce que lupenol-I haya sido detectado en plantas o animales. Aunque no podemos asegurar su identidad, lo cual requeriría posterior trabajo, en caso de que esta asignación fuese confirmada sería la primera vez que lupenol-I es obtenido de plantas.

Como acotación interesante puede señalarse que lupenol-I había sido anteriormente obtenido por isomerización ácida de taraxasterol, lupeol o  $\psi$ -taraxasterol<sup>50</sup> según se muestra en el esquema 15.

Puede ser posible hacer una discusión racional de la isomerización de lupeol y sus semejantes ya que los productos obtenidos son de estructuras conocidas.

Una probable explicación del mecanismo de isomerización se presenta en el esquema 16.

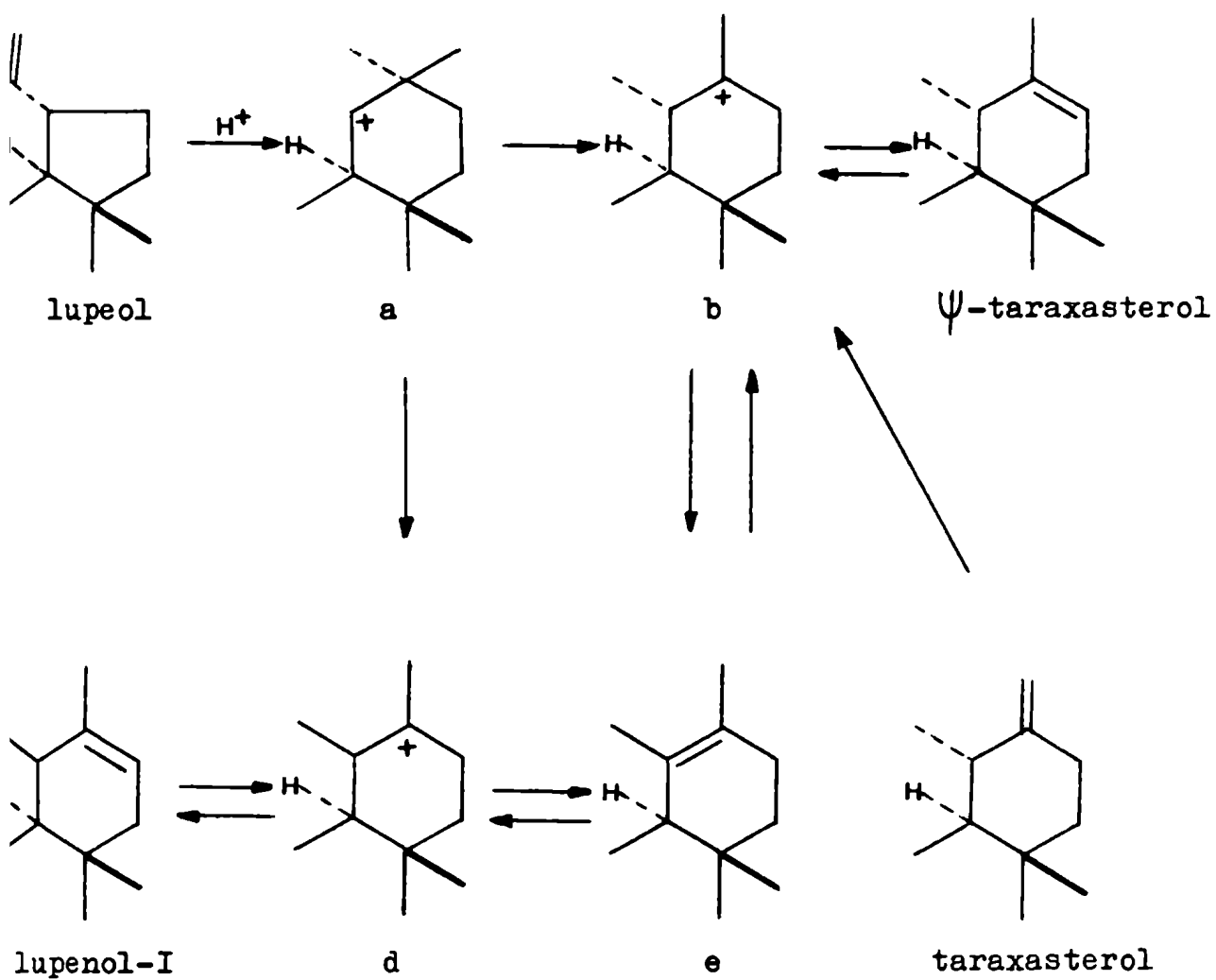
Esquema 15- Obtención de lupenol-I por isomerización ácida de lupeol, taraxasterol ó  $\Psi$ -taraxasterol.<sup>51</sup>



Los números entre paréntesis responden a las citas bibliográficas correspondientes).



Esquema 16- Probable mecanismo de la isomerización ácida  
de lupeol y sus semejantes.



En el caso del lupeol, la primera etapa sería la extensión del anillo para formar el ión carbonio a; bajo condiciones acídicas el grupo metilo  $\alpha$ -axial unido al C<sub>20</sub> participaría en un reordenamiento concertado y estereoespecífico, llegándose al compuesto c,  $\psi$ -taraxasterol, pasando por el ión intermedio b.

Por otra parte, si el grupo metilo que migra es el  $\beta$ -ecuatorial, se llegaría al intermediario d, el que conduciría al lupenol-I.

La estructura c es menos estable termodinámicamente que la correspondiente a lupenol-I a la cual se isomerizaría pasando probablemente por el intermediario e.

Los pasos propuestos no involucran la formación de un ión carbonio secundario ni la ruptura de ningún enlace carbono-carbono.

Es interesante hacer notar que el intermediario a fue postulado por Ruzicka, Eschenmoser y Heusser<sup>54</sup> como un paso clave en su esquema para la biosíntesis de triterpenos pentacíclicos (ver página 98).

EXISTENCIA DE TARAXASTEROL EN OTROS GENEROS

DE LA FAMILIA DE LAS COMPUESTAS

---

Ya que taraxasterol (I) es el principal componente de la mezcla de triterpenos en Schkurgia pinnata, se podría hacer una revisión de la presencia de tal compuesto en otros géneros de la familia de las Compuestas.

Los datos recopilados con tal objeto figuran a continuación.

<u>tribu</u>	<u>Género y especie</u>	<u>Productos que acompañan a taraxasterol</u>
calendulae	Calendula officinalis <sup>42</sup>	$\alpha$ -amirina, $\beta$ -amirina, lupeol, $\psi$ -taraxasterol, acetato de $\psi$ -taraxasterol, estigmasterol, sitosterol, isofucosterol.
lchorieae	Lactuca virosa <sup>39</sup>	
	Lactuca sativa <sup>55</sup>	campesterol, estigmasterol, sitosterol, $\Delta^5$ -avenasterol, $\Delta^7$ -avenasterol.
	Taraxacum officinale <sup>34</sup>	$\psi$ -taraxasterol, $\beta$ -amirina

	Taraxacum Kok-Saghyz <sup>56</sup>	taraxerol, homotaraxas- terol, $\beta$ -amirina.
	Launsea pinnatifidia <sup>57</sup>	acetato de taraxasterol
	Andryala canariensis <sup>35</sup>	heterolupeol
	Lactuca denticulata <sup>58</sup>	estigmasterol, $\beta$ -sitosterol.
	Lactuca indica <sup>58</sup>	$\beta$ -amirina, acetato de $\beta$ -amirina
themidae	Anthemis nobilis <sup>34</sup>	estigmasterol, sitosterol
	Chrysanthemum cineariaefolium <sup>59</sup>	lupeol, $\alpha$ -amirina, $\beta$ -amirina.
ynareae	Cirsium arvense <sup>60</sup>	acetato de taraxasterol, estigmasterol, acetato de estigmasterol.
	Cirsium oleraceum <sup>32</sup>	$\psi$ -taraxasterol, $\beta$ -amiri- na, lupeol, $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, n-nonacosano, n-heptacosano, n-tetracosano.

	Saussurea lapa 61	acetato de taraxasterol.
	Saussurea frolowii 62	
	Centaurea arbutifolia 63	$\beta$ -amirina, sitosterol.
	Centaurea behen 64	acetato de taraxasterol.
	Cynara scolymus 65	$\psi$ -taraxasterol, estigmasterol, sitosterol, n-dotriacontano, n-tetratriacontano.
Eupatoriae	Eupatorium cannabinum 66	
Senecioneae	Arnica montana 14	$\psi$ -taraxasterol, $\beta$ -lactucero, sitosterol.
	Tussilago farfara 67	$\beta$ -amirina, $\beta$ -sitosterol.
Inulae	Inula chinensis 68	
	Sonchus ortunoi 28	$\psi$ -taraxasterol, $\beta$ -lactucero, sitosterol.

	Sonchus leptocephalus <sup>28</sup>	$\Psi$ -taraxasterol, $\beta$ -lactuce- rol, n-hexacosanol.
	Sonchus oleraceus <sup>69</sup>	
	Sonchus spinosus <sup>70</sup>	sitosterol.
	Youngia denticulata <sup>71</sup>	acetato de taraxasterol, germanicol, acetato de germanicol, n-hexacosanol.
	Pluchea lanceolata <sup>72</sup>	
	Jurinea anat6lica <sup>73</sup>	$\Psi$ -taraxasterol, $\beta$ -amirina, $\alpha$ -amirina, lupeol.
	Jurinea consanguinea <sup>73</sup>	$\Psi$ -taraxasterol, $\alpha$ -amirina, $\beta$ -amirina, lupeol.
Helenieae	Schkuria pinnata	$\alpha$ -amirina, $\beta$ -sitosterol, estigmasterol.

De la observación de la tabla se nota que taraxasterol y sus derivados están ampliamente distribuidos en varias especies pertenecientes a la familia de las Compuestas.

Existen algunas referencias aisladas de su existencia en otras especies de distintas familias tales como Euphorbiaceae<sup>74</sup>, Fagacea<sup>75</sup>, Apocynacea<sup>76</sup>, etc.

Esta forma de distribución en la familia de las Compuestas indicaría que estas plantas muy posiblemente contienen sistemas específicos de enzimas que son los responsables de la elaboración de tales tipos de compuestos.



BIOGENESIS DE TRITERPENOS PENTACICLICOS

PROBABLE PROCESO BIOLÓGICO DE FORMACION DEL LUPENOL-I

Sobre la base de numerosos datos experimentales se ha determinado que el escualeno es un importante precursor biológico de los triterpenos policíclicos en plantas y animales.

Para la elaboración de las hipótesis de formación biológica de los compuestos mencionados, se tuvo muy en cuenta las diversas conformaciones posibles de la cadena del escualeno y los distintos reordenamientos que debían producirse para la formación de los productos finales.

El papel principal de la enzima que cataliza la ciclación del escualeno debe ser el de imponer la conformación apropiada a la cadena del mismo.

Experiencias llevadas a cabo por Nicholas<sup>77</sup> y por Nes<sup>78</sup> permitieron demostrar que el acetato y el mevalonato eran precursores anteriores al escualeno; estudios realizados por Arigoni<sup>79</sup> y luego por Bloch<sup>80</sup>, pusieron de manifiesto que la ciclación del mismo era estereoespecífica y concertada.

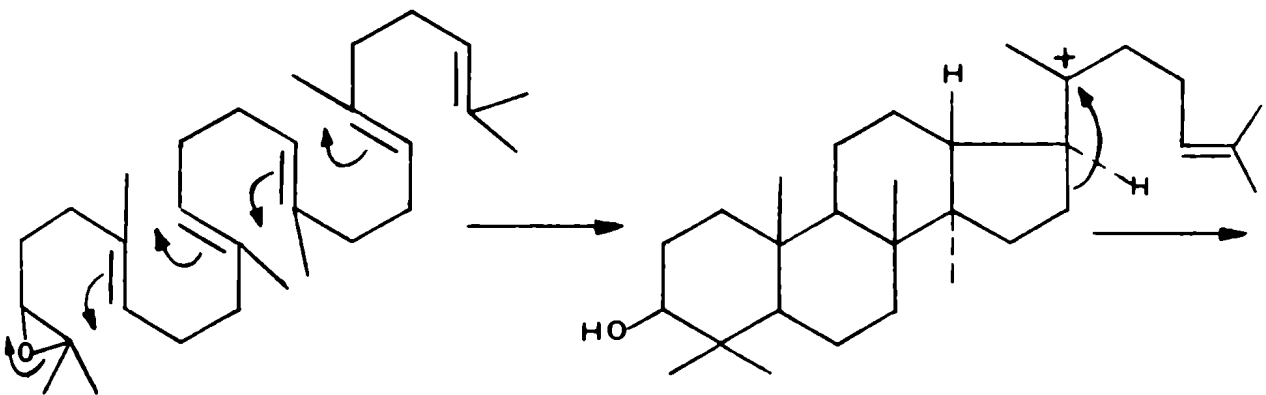
Durante los primeros tiempos de estas investigaciones, el papel del oxígeno en este proceso no había sido totalmente aclarado, aunque se sabía que el oxígeno atmosférico era el que participaba en tal mecanismo.

Pudo observarse posteriormente que el 2,3-óxido de escua-

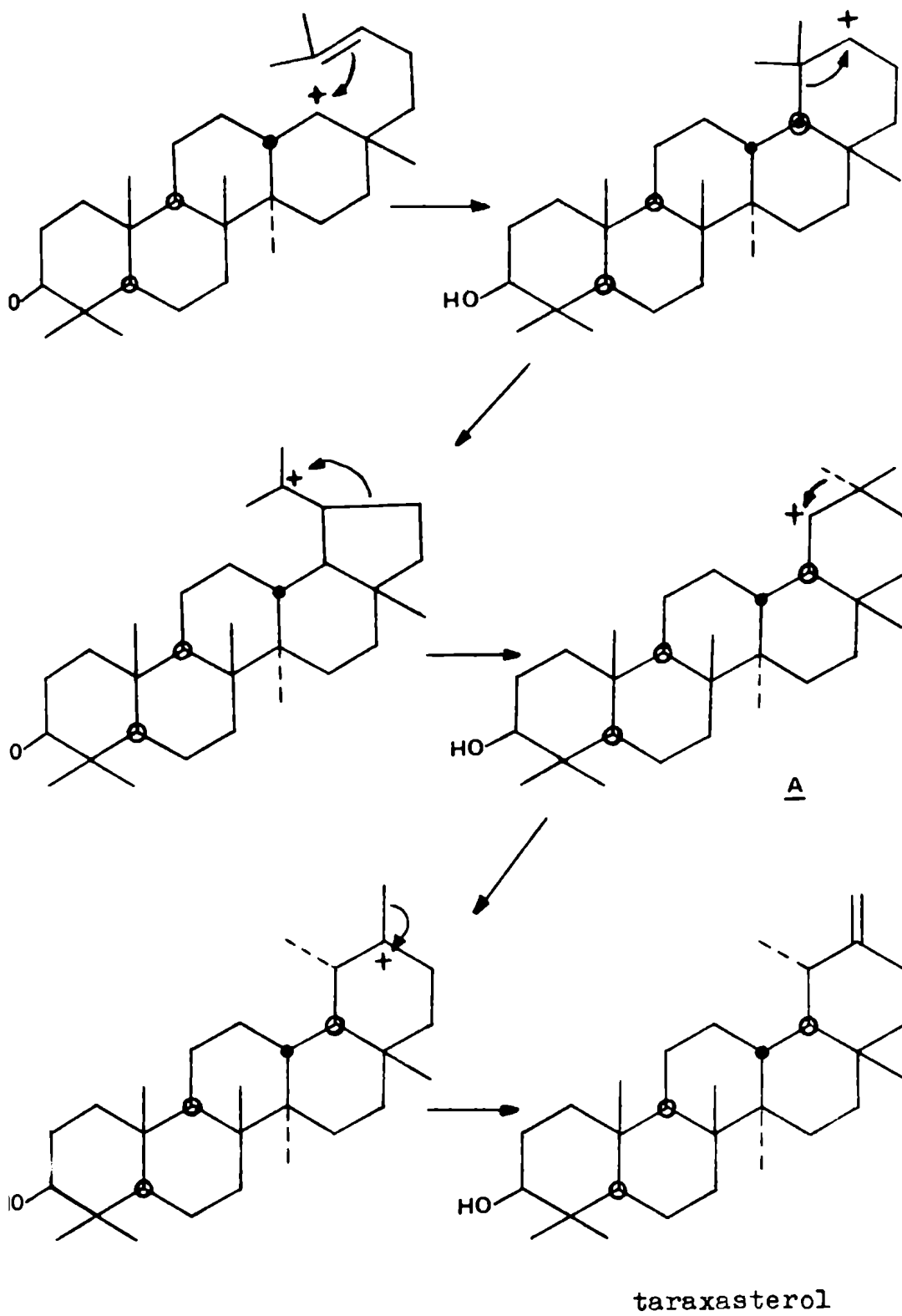
eno<sup>81-83</sup> era también un precursor de los triterpenos pentacíclicos, pero no se conocen todavía los posibles intermediarios de biosíntesis entre el escualeno y los citados terpenos.

Trabajos realizados por Ourisson<sup>84-85</sup> parecían indicar que el ciclo artenol y 24-metilen-ciclo artenol serían equivalentes al lanosterol en la biosíntesis de triterpenos tetracíclicos en las plantas superiores, pero esta suposición no ha sido definitivamente aclarada.

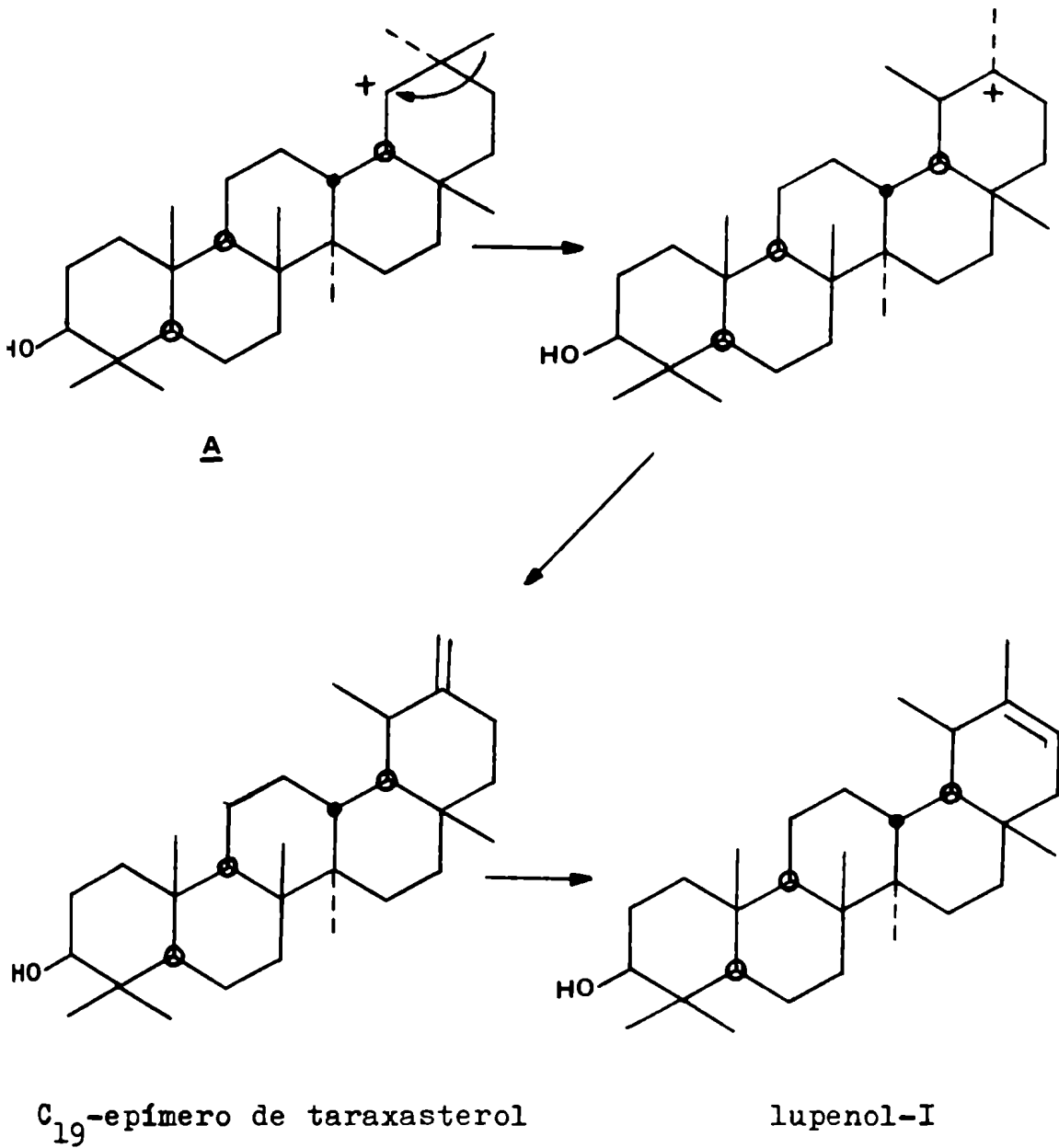
Partiendo de la base que el 2,3-óxido de escualeno es un precursor probado, un posible esquema de ciclación del derivado del escualeno y los subsiguientes reordenamientos para el caso del taraxasterol (I) podría plantearse en la siguiente forma:



2,3-óxido de escualeno



En el caso del lupenol-I (VIII) un mecanismo probable que podríamos postular sería el que sigue, partiendo del supuesto intermediario A del esquema anterior.



TRITERPENOS PENTACICLICOS EN LA SCHKURIA PINNATA

PARTE EXPERIMENTAL

## General

Los aparatos utilizados en esta parte del trabajo son los mismos que fueron indicados en la sección de hidrocarburos (página 21) para la determinación de los puntos de fusión, espectros de absorción en el infrarrojo y espectros de resonancia magnética nuclear.

La cromatografía gas-líquido fue realizada en el cromatógrafo gaseoso mencionado en la sección de alcoholes (página 40).

Los poderes rotatorios fueron determinados en un polarímetro O. C. Rudolph and Sons, modelo 70, en soluciones de cloroformo.

El proceso de cromatografía gaseosa-espectrometría de masa fue llevado a cabo con un instrumento LKB 9000.

Los espectros de masa individuales (epoxi-derivados), fueron determinados por Morgan-Schaffer, Corp., Montreal, Canadá; el espectro de masa de la mezcla de acetatos se realizó en un espectrómetro Thomson-CSF THN-208.

Las cromatografías analíticas en capa delgada se realizaron sobre óxido de aluminio (Merck) como fase fija. Las sustancias fueron detectadas con vapores de yodo.

Los solventes fueron evaporados a presión reducida por debajo de 50°.

Aislamiento e identificación de taraxasterol y  $\alpha$ -amirina

La columna cromatográfica de óxido de aluminio mediante la cual se habían aislado los hidrocarburos (página 22) y los alcoholes (página 22), fue posteriormente eluída con benceno obteniéndose de las fracciones 3780-4380 un producto cristalino (400 mg); éste fue recrystalizado de etanol y su punto de fusión era 168-170°.

Espectro i.r.: presenta bandas a 3350  $\text{cm}^{-1}$  (-OH), 970  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3\text{-C=C-}$ ) y 880  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{-C=CH}_2$ ). Figura 18.

Espectro de r.m.n. ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ ): 0,75 (Me-C<sub>17</sub>); 0,77 (Me-C<sub>4</sub>);  
0,87 (Me-C<sub>4</sub>); 0,96 (Me-C<sub>10</sub>);  
0,98 (Me-C<sub>14</sub>); 1,04 (Me-C<sub>8</sub>);  
1,33-1,46 ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ); 1,65 (Me-C=C-);  
3,25 (H-C<sub>3</sub>); 4,70 ( $\text{-C=CH}_2$ ).

Figura 19.

Luego de cuatro recrystalizaciones del mismo solvente el producto tenía p.f. 202-203°, con  $[\alpha]_D + 53,1^\circ$  (c,1), mientras que los espectros i.r. y de r.m.n. no presentaban ningún cambio.

El color (violeta) de la reacción con ácido tricloroacético<sup>45</sup> indicaba que el producto era un triterpeno y no un esteroide.



Una porción del producto (100 mg) fue acetilada con anhídrido acético (2 ml) en piridina (2 ml) dando el acetil derivado, el cual fue recristalizado tres veces de etanol. Primera recristalización, p.f. 195-197°; segunda recristalización, p.f. 210-211°; tercera recristalización, p.f. 220-222°. El producto de la última recristalización tenía  $[\alpha]_D + 83,3^\circ$  (c,1).

Los espectros i.r. (Figura 22) y de r.m.n. (Figura 21) presentaban muy leves diferencias con respecto al producto inicial, excepto por el grupo  $-O-CO-CH_3$  (acetato).

El espectro de masa correspondiente se muestra en la Figura 20.

Cromatografía en fase gaseosa de derivados del triterpenol.

Estudios mediante cromatografía gaseosa-espectrometría de masa.

La cromatografía en fase gaseosa se llevó a cabo con columnas de acero inoxidable (12 pies x 1/8 pulg.) conteniendo 1,5% SE-30 sobre Chromosorb W silanizado, en forma isotérmica a 260°; los cromatogramas mostraban la presencia de tres componentes.

Una muestra de la mezcla fue analizada, como acetatos, usando un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro

de masa. En esta oportunidad se utilizaron columnas (6 pies x 1/8 pulgada) con 3% de Dexil 300 operando isotérmicamente a 250°. Lo propio fue efectuado con los trimetilsilil éteres obtenidos por tratamiento de la mezcla con hexametil-disilasano-trimetilclorosilano.

Tanto la mezcla de acetatos como la de los trimetilsilil éteres fue cromatografiada además en columnas (6 pies x 1/8 pulgada) rellenas con 3% de OV-17 sobre Chromosorb silanizado, trabajando en condiciones isotérmicas a 250°.

A continuación se reseñan los datos extraídos de los cromatogramas anteriormente mencionados (Tabla 17).

Los cromatogramas correspondientes a la mezcla de acetatos y trimetilsilil éteres, trabajando con columnas de OV-17 se muestran en las Figuras 23 y 24 respectivamente. De los mismos se han obtenido los valores de los índices de retención, tomando como base los correspondientes valores de n-alcános utilizados como standards.

Tabla 17- Valores de índices de retención

Producto	Dexil 300 (250°)	OV-17 (250°)
Muestra incógnita (acetatos)	3430 3520 3640	- - 3765
Acetato de paraxasterol	3635	3765
Acetato de $\alpha$ -amirina	3530	3645
Muestra incógnita (TMS éter)	3350 3420 3520	- - 3575
TMS éter de paraxasterol	3530	3570
TMS éter de $\alpha$ -amirina	3425	3460

La comparación de los espectros de masa obtenidos de los efluentes de la columna, como acetatos y trimetilsilil éteres, (Figuras 26, 28, 30 y 31), con espectros similares obtenidos a partir de muestras auténticas (Figuras 25, 27 y 29), permitió identificar taraxasterol (I) y  $\alpha$ -amirina (II), mientras que el tercer componente de la mezcla no pudo ser identificado.

Epoxidación de la mezcla de triterpenoles. Separación e identificación de los productos de oxidación resultantes.

a) preparación del ácido p-nitro-perbenzoico<sup>86</sup>.

A una solución de 13,4 gr de  $\text{Na}_2\text{O}_2$  en 52 ml de tetrahidrofurano, enfriada en un baño de acetona-anhídrido carbónico, se agregó poco a poco 1/5 de solución de cloruro de p-nitro benzoílo en tetrahidrofurano (24 gr de cloruro de ácido en 65 ml de tetrahidrofurano) y luego 2,5 ml de agua helada.

Cuando la temperatura de la mezcla hubo cesado de subir (no debe de pasar de  $-5^\circ$ ), se agregó el resto de la solución del cloruro de ácido en 20 minutos con agitación vigorosa y manteniendo la temperatura entre  $-10^\circ$  y  $-5^\circ$ . Luego se adicionó agua helada (250 ml) a gotas en un lapso de 30 minutos.

Se trasvasó la masa amarilla obtenida, a una ampolla previamente enfriada, se lavó el balón con 150 ml de agua helada que se añadieron a la solución contenida en la ampolla y luego se lavó ésta con cloroformo para eliminar el peróxido de p-nitro benzoílo que se forma en muy pequeña cantidad.

Se volcó rápidamente la solución acuosa de p-nitro perbenzoato de sodio en 100 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  20%, se agitó y extrajo con éter etílico dos veces (400 + 100 ml).

Se lavó la solución etérea una vez con agua helada (100 ml) y tres veces con una solución reguladora (200 + 200 + 100) de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  (35,5 gr) y  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  (34 gr) en agua (1 litro), que disuelve la mayor parte del ácido p-nitro benzoico que se formó y muy poco al perácido.

Se secó la solución etérea con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  y el solvente se evaporó.

El perácido cristalino se obtuvo con 94-96% de pureza.

b) epoxidación de la mezcla de triterpenoles obtenida de

Schkuria pinnata

En una experiencia tipo, una solución del acetato del triterpenol (50 mg) en éter etílico (10 ml) fue tratada con ácido p-nitro perbenzoico (52 mg) y la mezcla fue dejada a

temperatura ambiente durante 24 horas.

Una nueva porción de ácido p-nitro perbenzoico (40 mg) fue agregada y después de 10 horas, la solución fue lavada con HONa 5% y secada con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ .

Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo (59 mg) que presentaba tres manchas por cromatografía en capa delgada de Rf 0,18, 0,24 y 0,76 (solvente: benceno).

c) epoxidación de muestras auténticas.

Siguiendo el procedimiento indicado en la sección anterior y a partir de los acetatos de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, lupeol, moretenol y  $\psi$ -taraxasterol auténticos, se obtuvieron los respectivos productos de la reacción con ácido p-nitro perbenzoico.

Estos resultaron ser respectivamente:

- a) acetato de 12-ceto-derivado de  $\alpha$ -amirina, p.f. 215-220°; lit.<sup>48,87,88</sup>, p.f. 198-200°; 210-211°; 259-260°.
- b) acetato de 12-ceto-derivado de  $\beta$ -amirina, p.f. 232-240°; lit.<sup>89</sup>, p.f. 264-265°, (idéntico a un patrón auténtico).
- c) acetato de epoxi-moretenol, p.f. 243-245°.
- d) acetato de epoxi-lupeol, p.f. 224-227°; lit.<sup>90</sup>, p.f. 226-230°.
- e) acetato de epoxi- $\psi$ -taraxasterol, p.f. 242-245°; lit.<sup>91</sup>, p.f. 265-267°.

Separación e identificación de los productos resultantes de la oxidación

La mezcla obtenida en sección b fue resuelta por cromatografía en capa delgada preparativa (placas de 20 x 40 cm, óxido de aluminio Merck, PF<sub>254</sub>, espesor: 2 mm; solvente de desarrollo: benceno). Por elución de las respectivas bandas se obtuvieron tres productos homogéneos, los cuales, después de ser recristalizados de etanol tenían respectivamente p.f. 233-235°, 195-198° y 279-281°.

El primero fue identificado como el 12-ceto derivado del acetato de  $\alpha$ -amirina (V) por la comparación de su p.f., su espectro i.r. y su Rf en c.c.d. con los de una muestra auténtica; el segundo, como el acetato del epoxi-taraxasterol (VI)<sup>92</sup>, mientras que el tercer componente fue tentativamente identificado como el acetato de epoxi-lupenol-I (VII)(lit.<sup>50</sup> p.f. 279-281°).

Los espectros de masa de VI y VII se muestran en las Figuras 32 y 33 respectivamente.

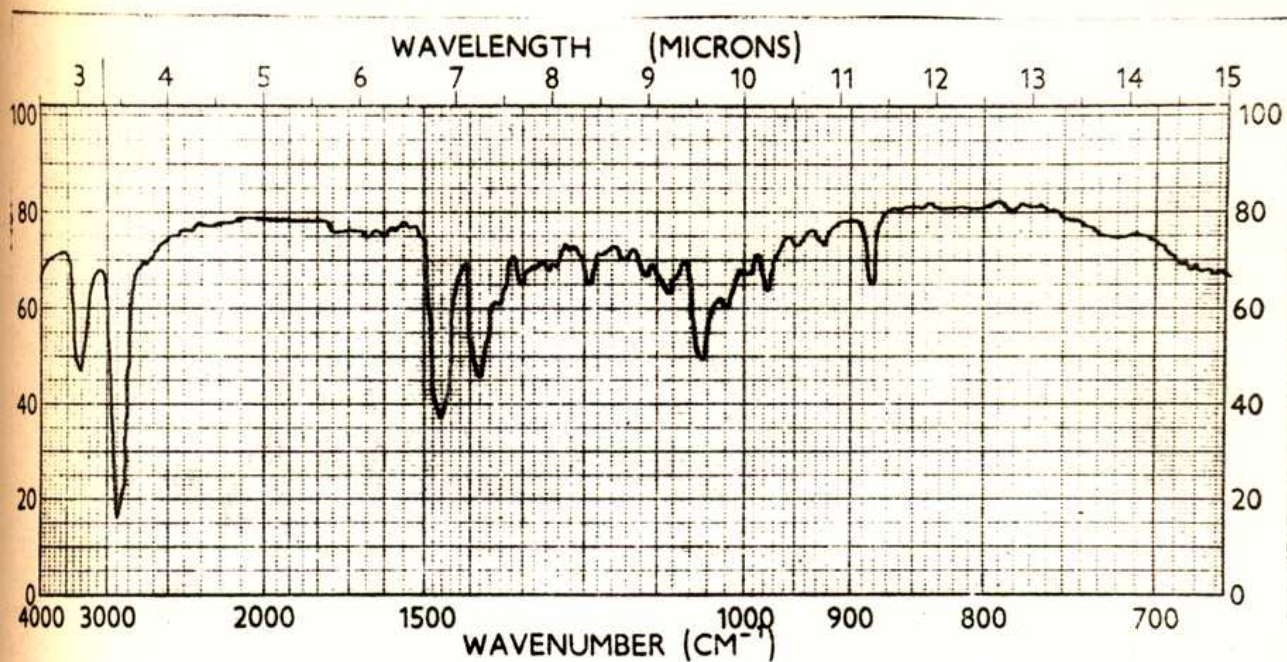


Figura 18: Espectro i.r. del triterpenol obtenido de la  
Schkurgia pinnata

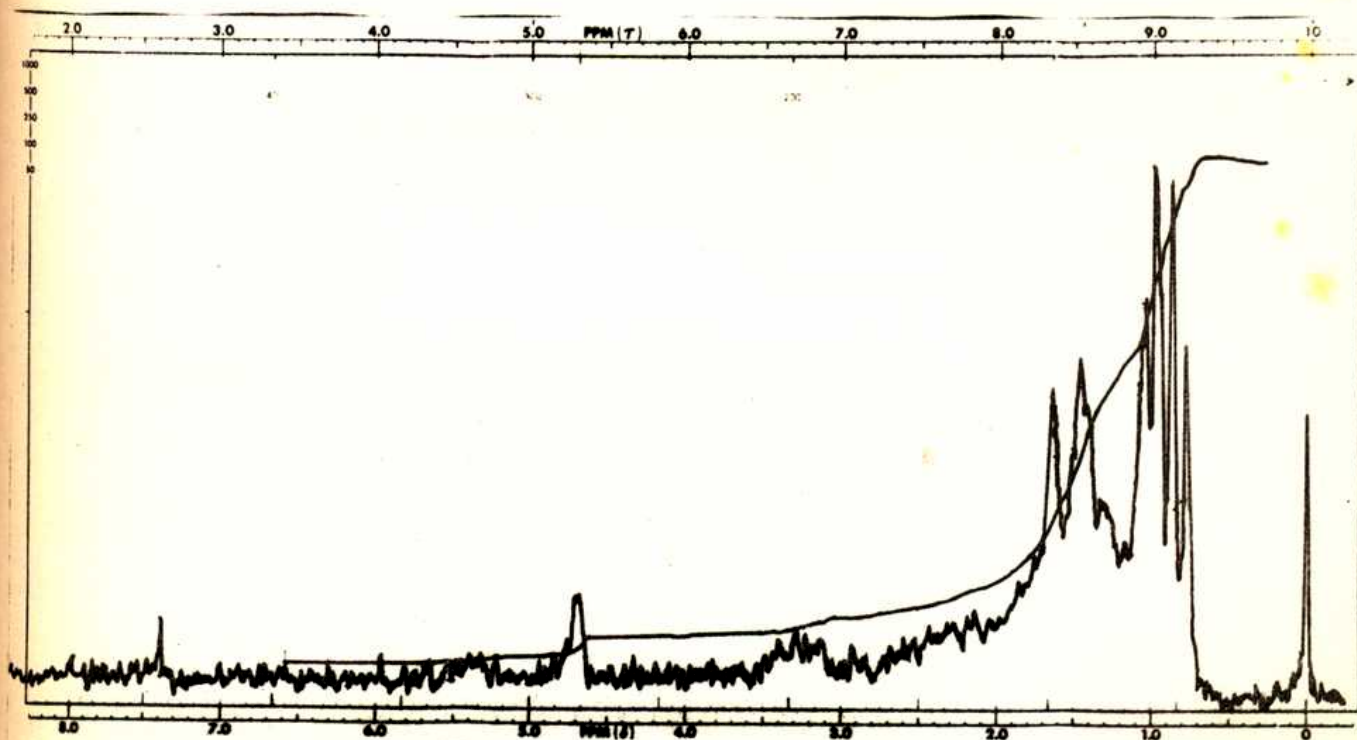


Figura 19: Espectro de r.m.n. del triterpenol obtenido de la  
Schkurgia pinnata



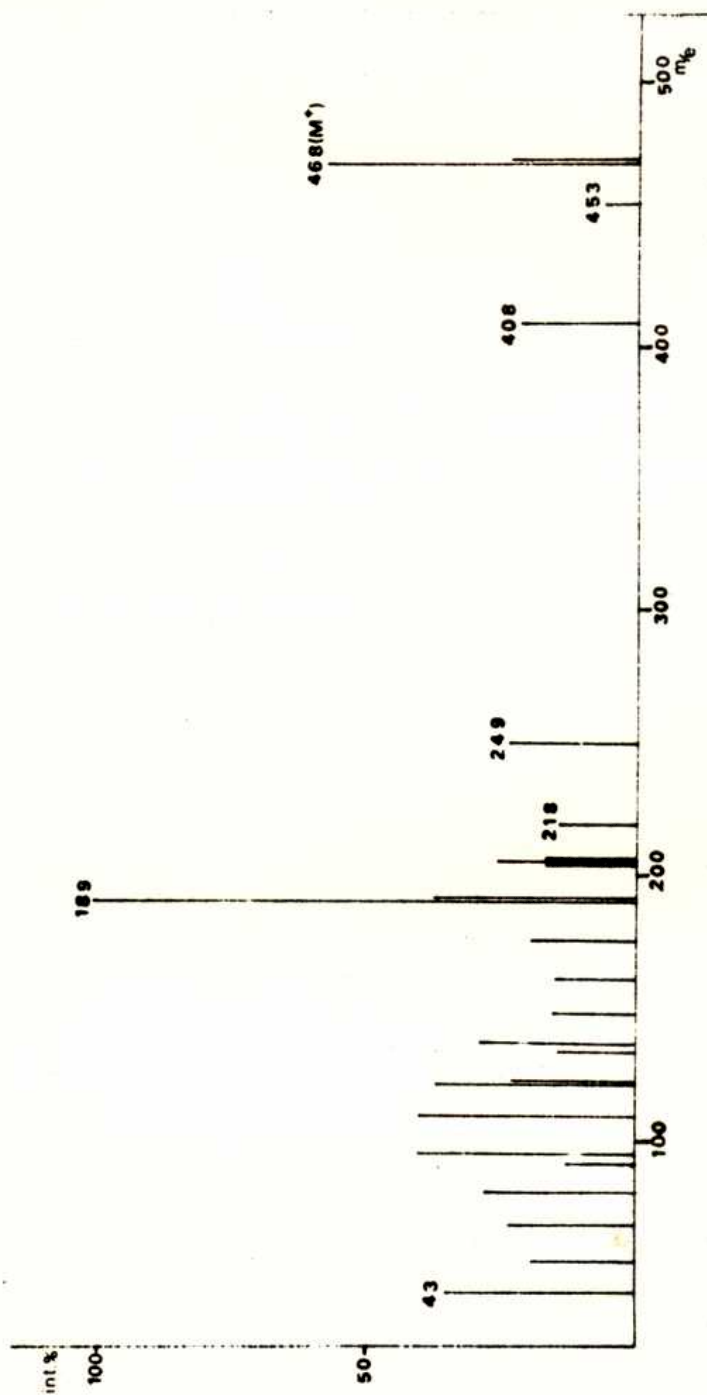


Figura 20: Espectro de masa del triterpenol obtenido de la Schkuria pinnata

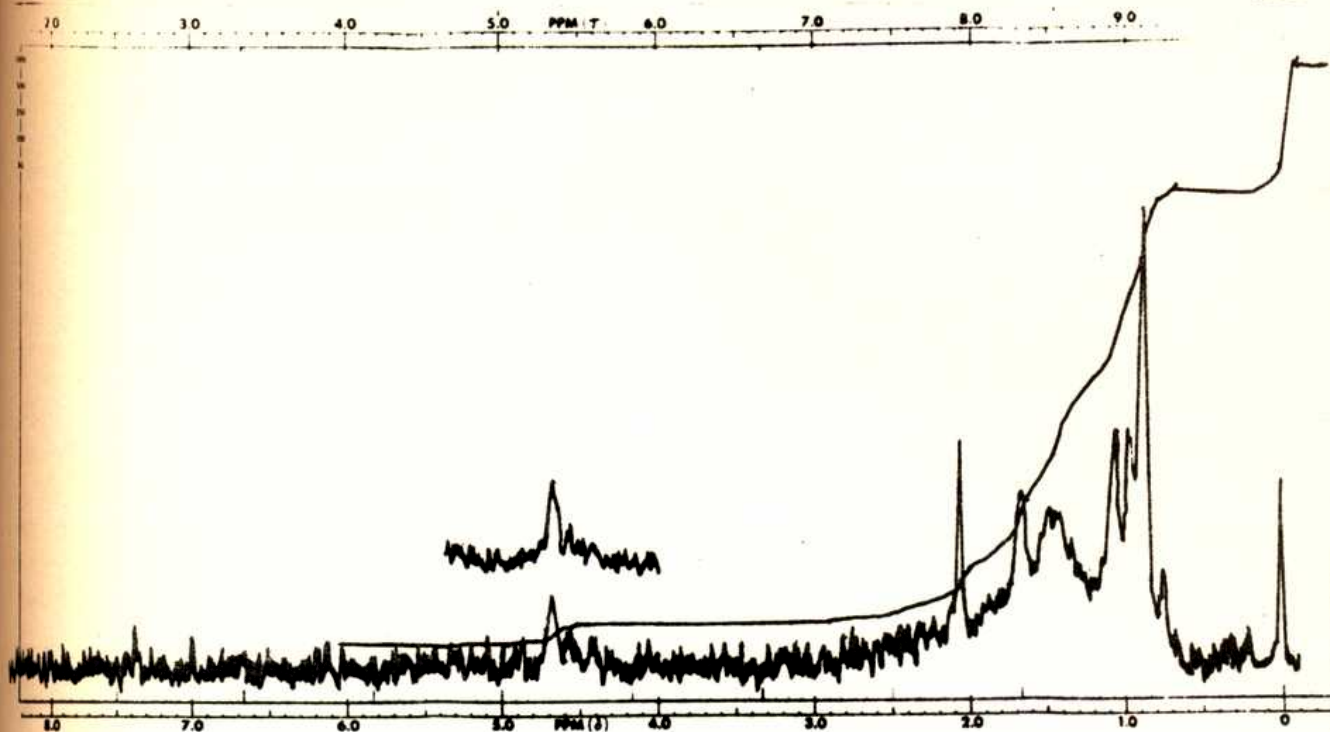


Figura 21: Espectro de r.m.n. del triterpenol acetilado

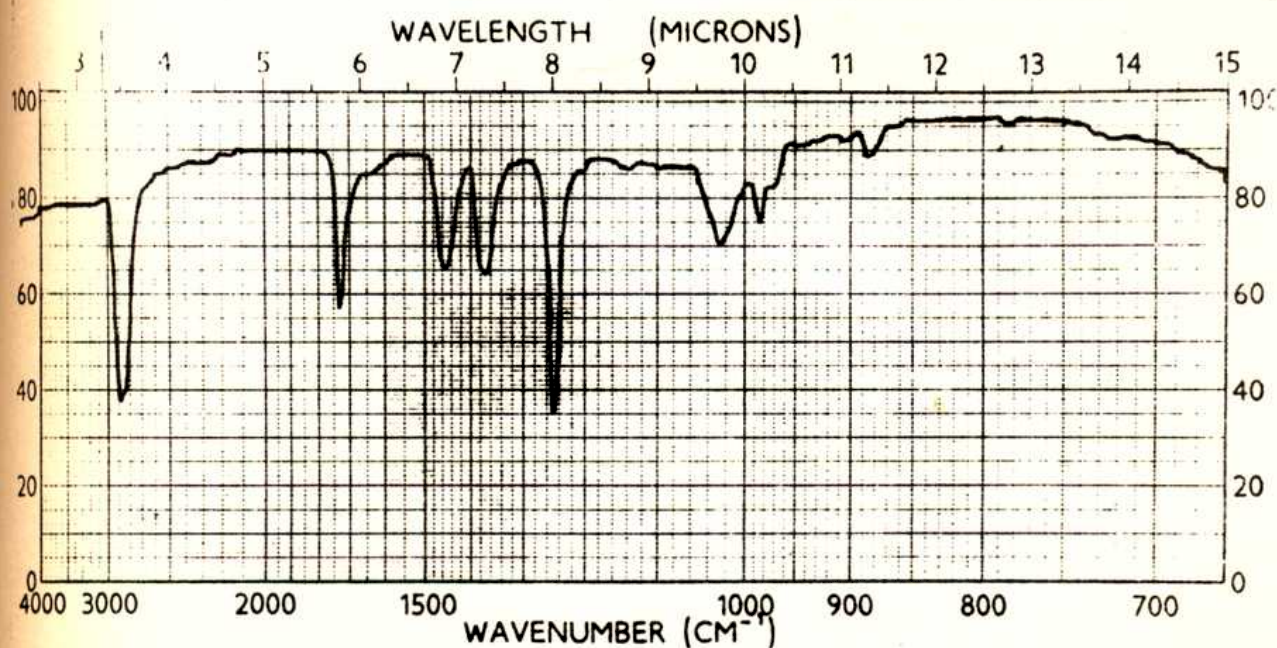


Figura 22: Espectro i.r. del triterpenol acetilado

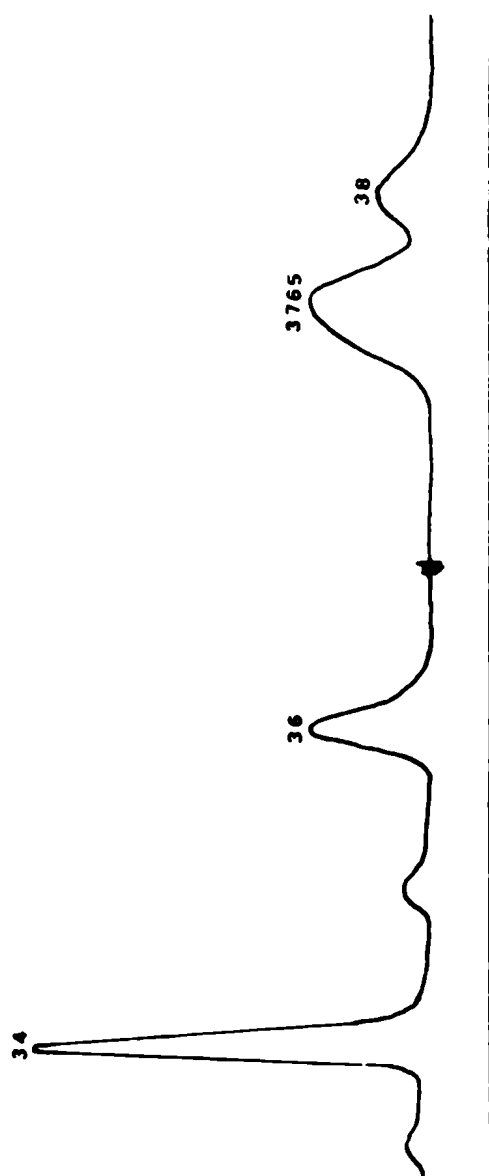


Figura 23: Triterpenol acetilado. Cromatograma gaseoso obtenido en columnas de OV-17

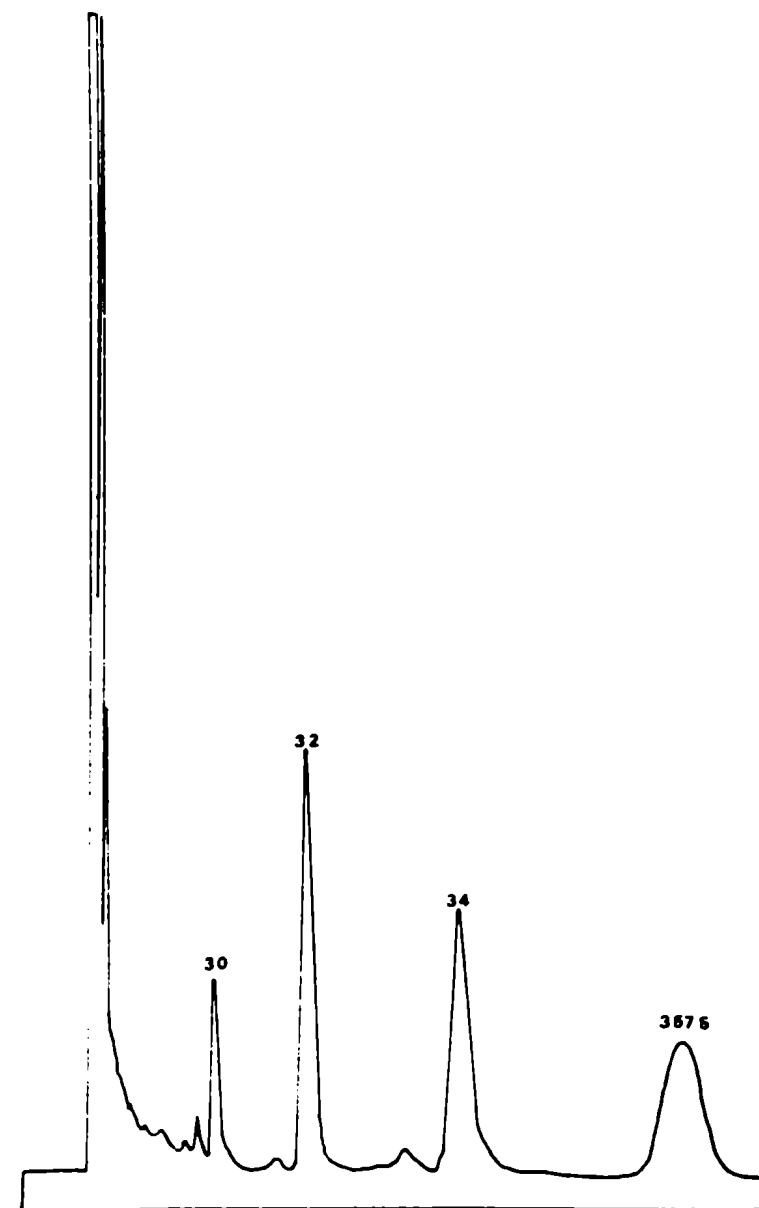


Figura 24: Trimetilsilil derivado del triterpenol. Cromatograma gaseoso obtenido en columnas de OV-17

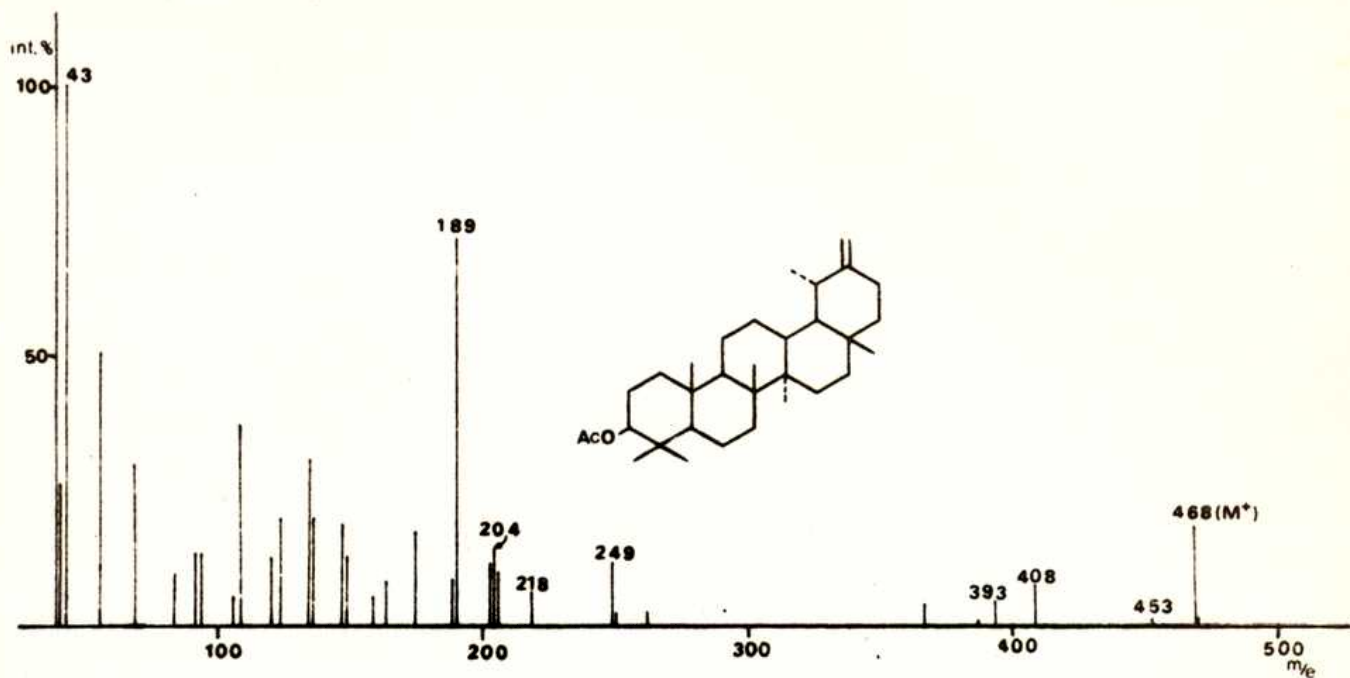


Figura 25: Espectro de masa del acetato de taraxasterol auténtico

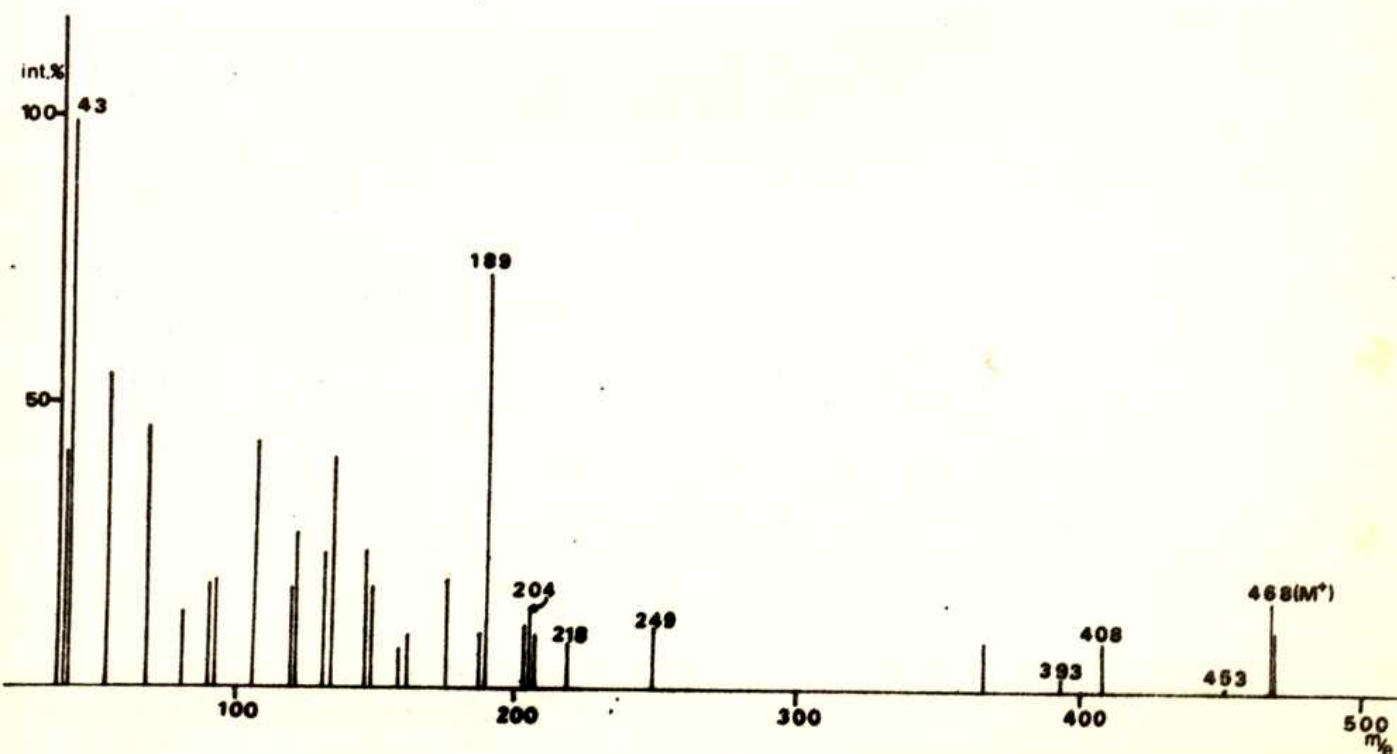


Figura 26: Espectro de masa del acetato de taraxasterol obtenido de la Schkurgia pinnata



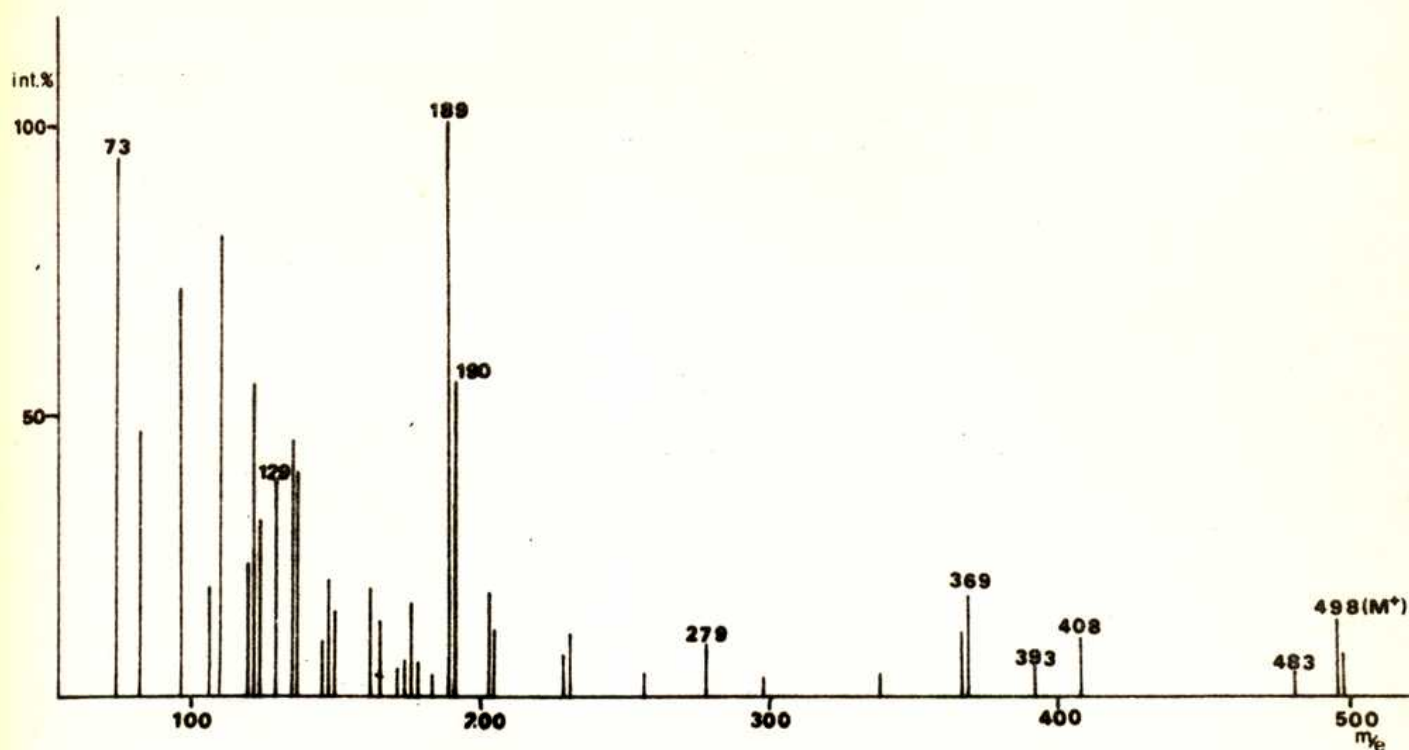


Figura 27: Espectro de masa del trimetilsilil derivado de taraxasterol auténtico

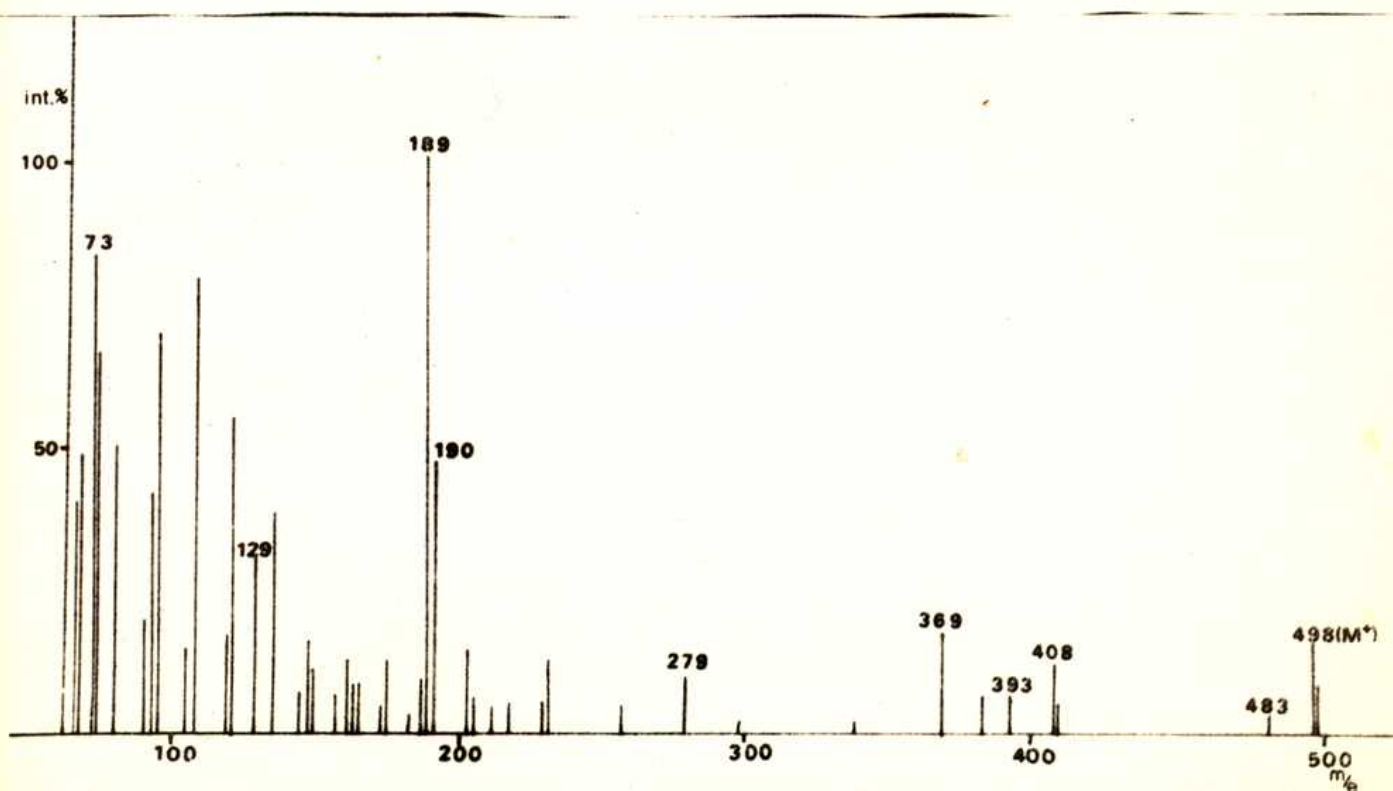


Figura 28: Espectro de masa del trimetilsilil derivado de taraxasterol obtenido de la Schkurgia pinnata

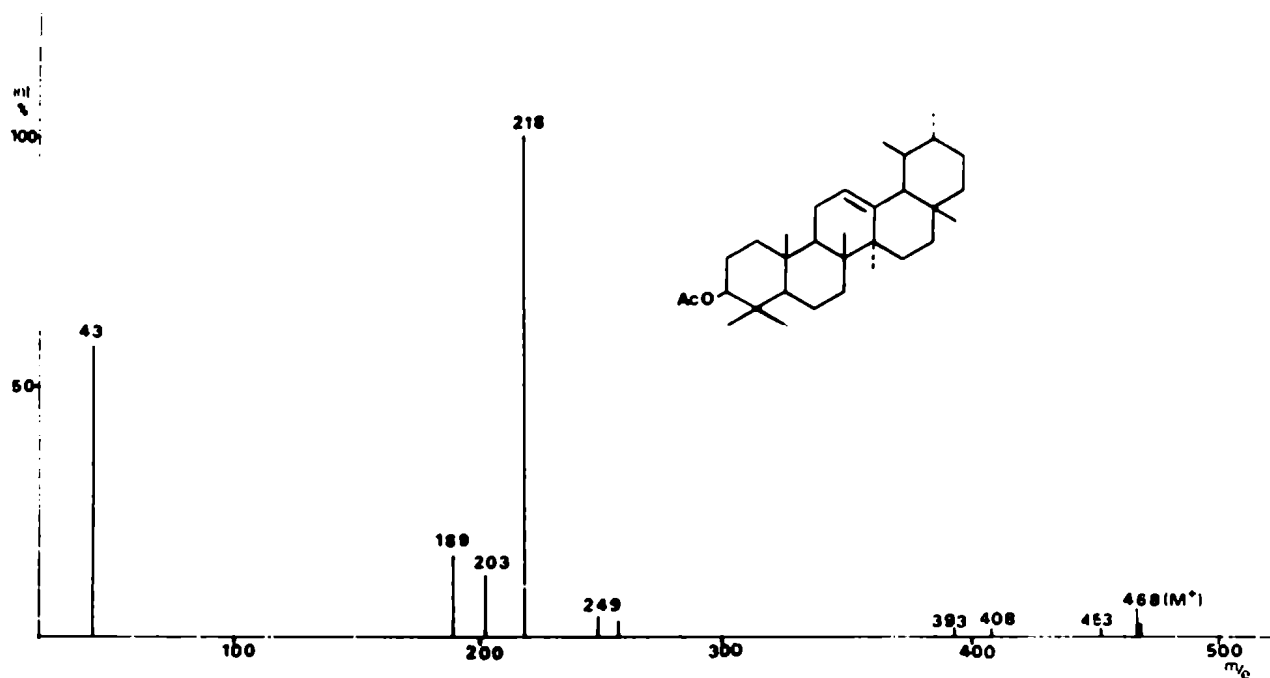


Figura 29: Espectro de masa del acetato de  $\alpha$ -amirina auténtica

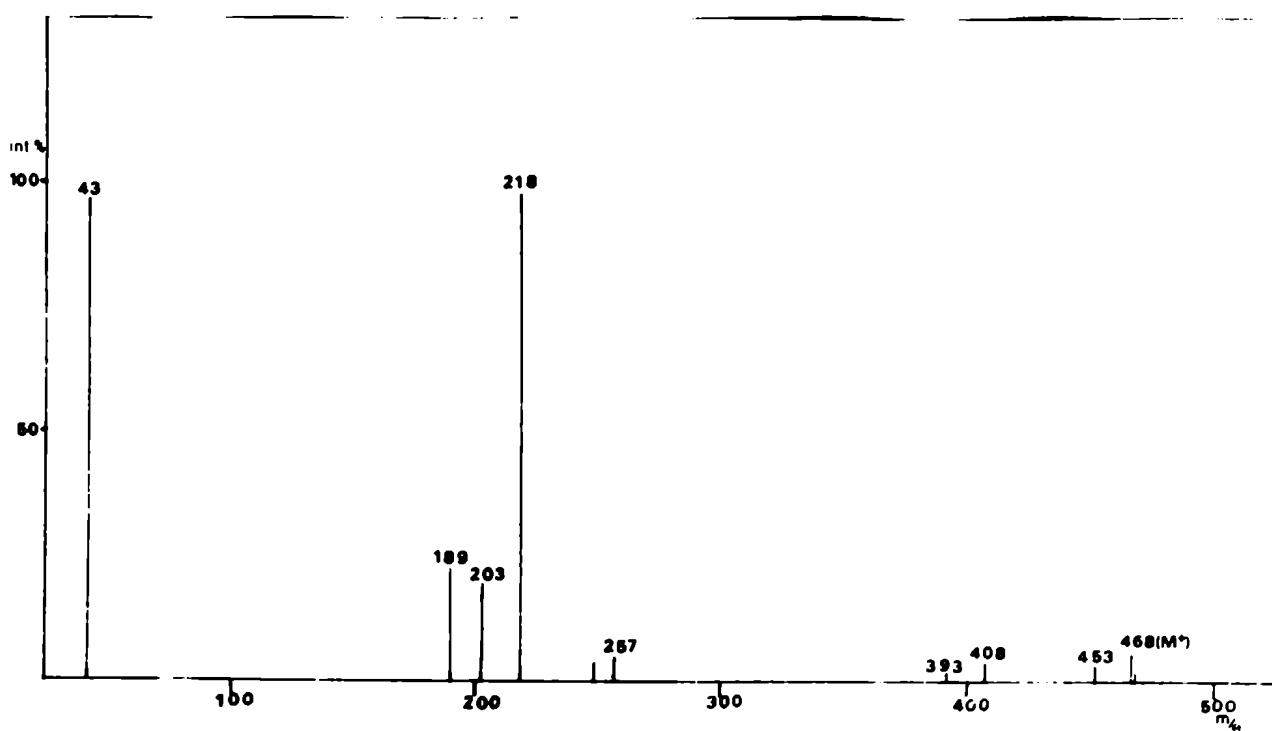


Figura 30: Espectro de masa del acetato de  $\alpha$ -amirina obtenida de la Schkurgia pinnata

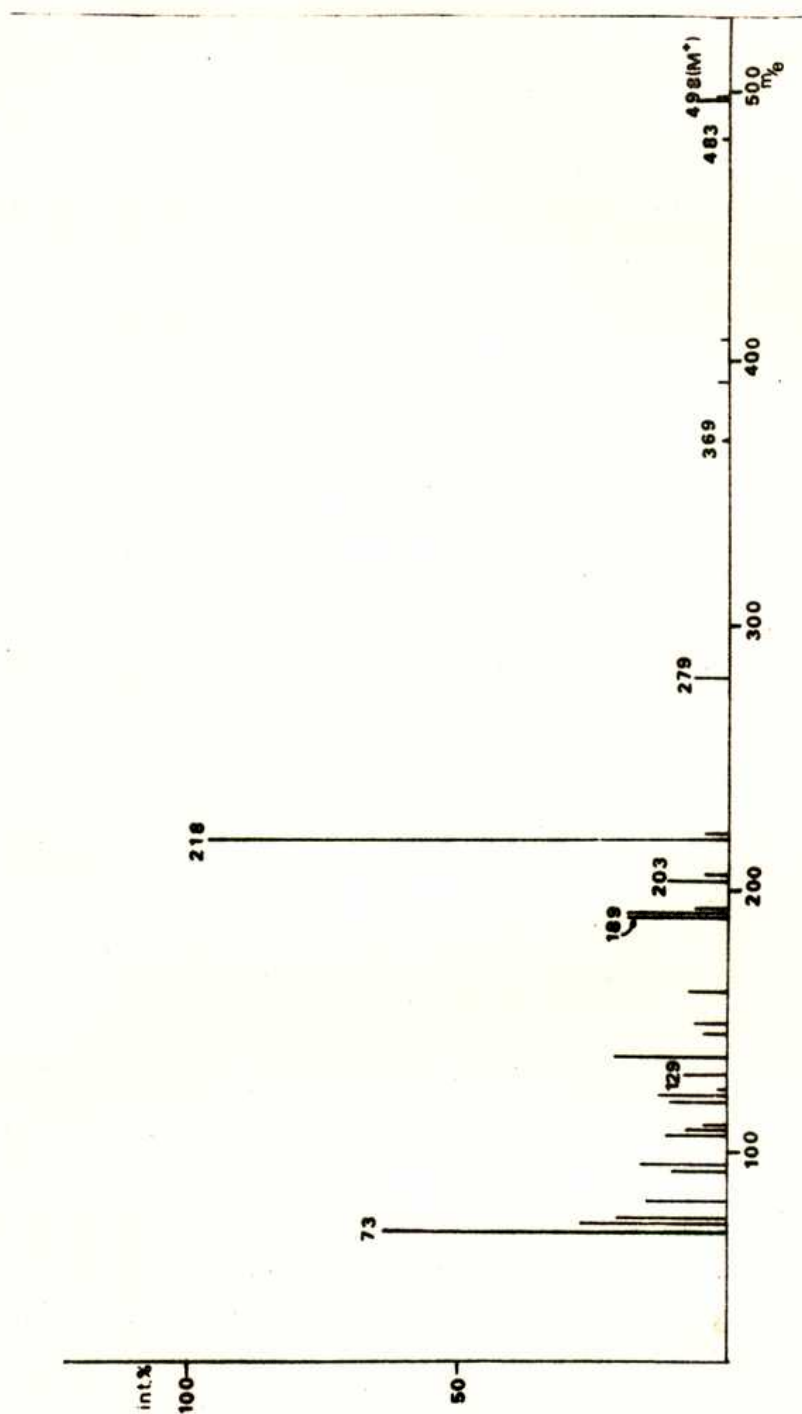


Figura 31: Espectro de masa del trimetilsilil derivado de  $\alpha$ -amirina obtenida de la Schkuria pinnata



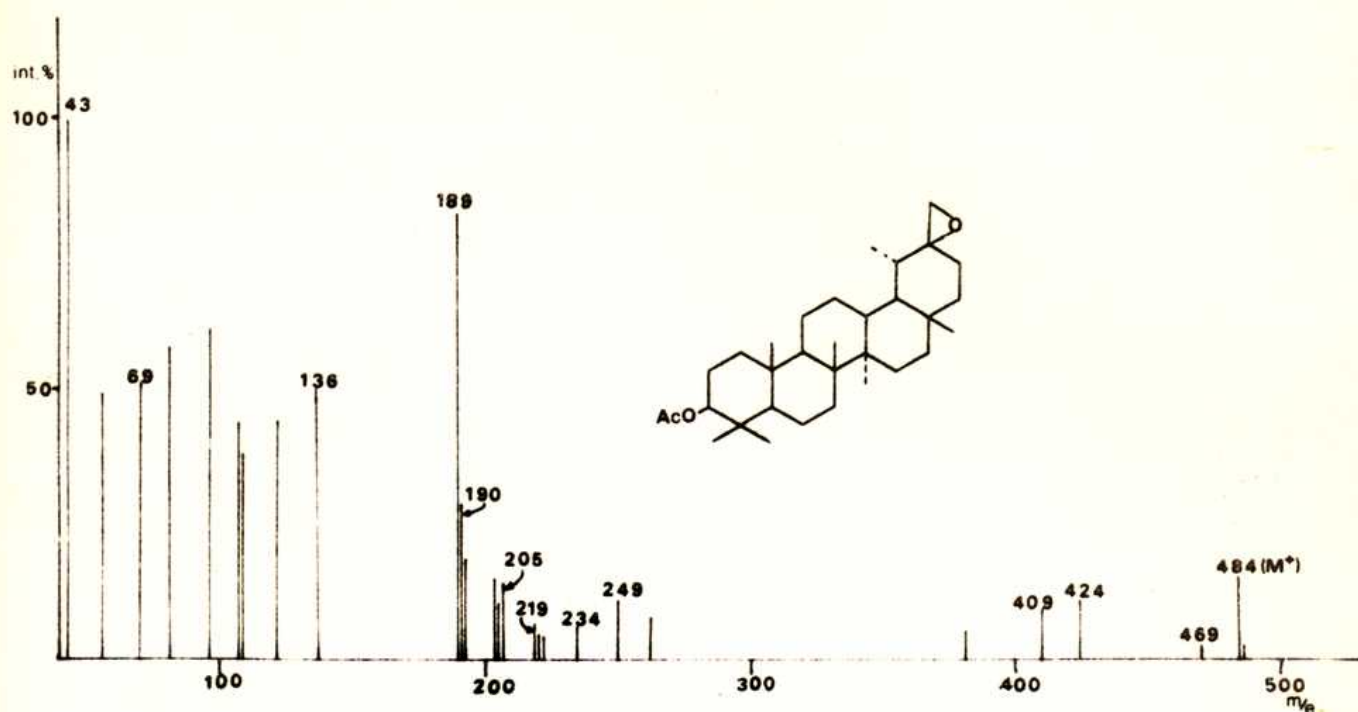


Figura 32: Espectro de masa del acetato de epoxi-taraxasterol proveniente de la Schkuria pinnata

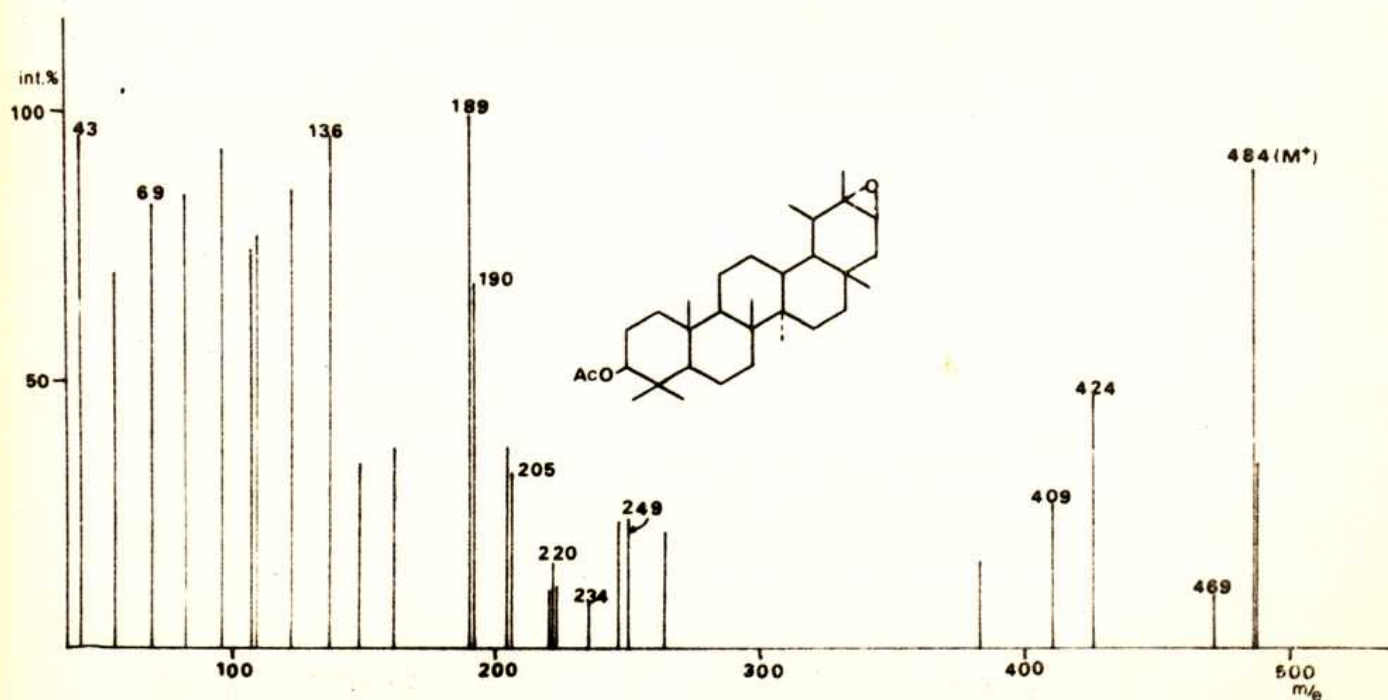


Figura 33: Espectro de masa del supuesto acetato de epoxi-lupenol-I proveniente de la Schkuria pinnata

ESTEROLES EN LA SCHKURIA PINNATA

Los esteroides son considerados como metabolitos primarios comunes a todas las plantas y presentes durante el crecimiento en todos los órganos de las mismas.

Los estudios de esteroides en plantas han girado en general alrededor de su biosíntesis, y poca atención se ha dedicado a las funciones que los mismos cumplen en las plantas.

Por analogía con los esteroides presentes en animales, en los vegetales tales compuestos pueden tener una función estructural, posiblemente como parte integral de la capa de lípidos de las membranas de las células; tal función, que sería semejante a la del colesterol en los tejidos animales, no ha sido totalmente aclarada.

Por otra parte, no puede descartarse "a priori" que los esteroides tengan un comportamiento dual, esto es, que además de sus funciones estructurales actúen como precursores de metabolitos esteroideos esenciales o como reguladores de tales hormonas.

Los esteroides representan un bien definido tipo de compuestos que pueden ser aislados como un grupo y son susceptibles de análisis por cromatografía en fase gaseosa y espectrometría de masa.

Mediante el análisis de los componentes esteroideos de

varias plantas de la familia de las Compuestas, como Cynara scolymus<sup>65</sup>, Anthemis nobilis<sup>34</sup>, Cirsium oleraceum<sup>32</sup>, Lactuca denticulata<sup>58</sup> y otras, se ha demostrado que es un hecho muy común encontrar en las mismas el par de esteroides  $\beta$ -sitosterol-estigmasterol.

Este también sería el caso de Schkuria pinnata ya que los mismos fueron aislados de dicha planta.

Siguiendo con el estudio de la porción insaponificable del extracto de éter de petróleo de la planta mencionada, la columna cromatográfica citada en secciones anteriores fue eluída con benceno-cloroformo en diversas proporciones obteniéndose una nueva fracción cristalina. Dicha fracción resultó ser una mezcla de triterpenos y esteroides detectados mediante la reacción de color con tricloruro de antimonio previo análisis por medio de cromatografía analítica.

La mezcla fue resuelta en dos fracciones, la triterpénica y la esteroideal por medio de cromatografía en capa preparativa.

Los datos del espectro infrarrojo y punto de fusión de la fracción esteroideal, libre y acetilada, concordaban respectivamente con los datos correspondientes a  $\beta$ -sitosterol y su derivado acetilado.

El producto, homogéneo en todo tipo de cromatografía en

capa delgada, fue analizado por cromatografía en fase gaseosa mostrando la presencia de dos componentes que fueron identificados como  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol por co-cromatografía con patrones auténticos.

ESTEROLES EN LA SCHKURIA PINNATA

PARTE EXPERIMENTAL

## General

Los aparatos utilizados son los mismos que los empleados en la sección de alcoholes (página 40).

Las cromatografías analíticas fueron realizadas con óxido de aluminio G (Merck) y las cromatografías preparativas con sílica gel G (Merck) como fase fija. La fase móvil fue en ambos casos éter de petróleo-acetato de etilo (4:1). Los productos fueron revelados con vapores de iodo y con el reactivo de  $\text{Cl}_3\text{Sb}$ . Este último consiste en una solución al 10% de  $\text{Cl}_3\text{Sb}$  en ácido clorhídrico-etanol (50:50).

### Aislamiento e identificación de los esteroides

La columna cromatográfica original fue eluida con benceno-cloroformo (98:2), (97:3), (95:5), (7:3) y (1:1), y reunidas las fracciones 4390 a 6300 para obtener un producto cristalino (330 mg).

Esta nueva fracción no era homogénea por cromatografía en capa delgada, sino que consistía en una mezcla de triterpenos y esteroides; la presencia de esteroides fue demostrada por la reacción con  $\text{Cl}_3\text{Sb}$ .

Esta mezcla de triterpenos y esteroides fue separada mediante el empleo de cromatografía en capa preparativa, usando las fases fija y móvil indicadas anteriormente.

La fracción esteroideal fue recristalizada de etanol obteniéndose 150 mg de producto de p.f. 138-140°, homogénea por cromatografía en capa delgada. El espectro i.r. presenta una banda correspondiente al hidroxilo alcohólico a  $3300\text{ cm}^{-1}$ . (Figura 34).

### Acetilación de la fracción esteroideal

El producto anterior (40 mg) fue acetilado con anhídrido acético (1 ml) y piridina (1 ml) en la forma usual. El deriva-



do acetilado se recristalizó de etanol obteniéndose 35 mg de producto de p.f. 124-126°, homogéneo por cromatografía en capa delgada. Espectro i.r.: Figura 35.

Tanto el punto de fusión como el espectro i.r. del esteroil libre y acetilado, son similares a los respectivos de  $\beta$ -sitosterol y de su acetato.

$\beta$ -sitosterol patrón: p.f. 140°; espectro i.r., Figura 36.

Acetato de  $\beta$ -sitosterol patrón: p.f. 127°; espectro i.r.,  
Figura 37.

Análisis de la fracción esteroilal mediante cromatografía gaseosa.

La fracción esteroilal fue analizada por cromatografía en fase gaseosa, usándose como en los otros casos columnas de acero inoxidable (6 pies x 1/8 pulgada) rellenas con 1,5% de SE-30 sobre Chromosorb W silanizado, a una velocidad de flujo del gas portador ( $N_2$ ) de 40 ml/minuto y a una temperatura constante de 270°.

El cromatograma mostró la presencia de dos componentes que fueron identificados como  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol por co-cromatografía con auténticos  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol (Figuras 38, 39 y 40).

Los tiempos de retención para las sustancias standards  
y las provenientes de Schkuria pinnata se dan a continuación:

$\beta$ -sitosterol de Schkuria pinnata: tpo de retención, 290 seg.  
 $\beta$ -sitosterol patrón: tpo de retención, 289 seg.  
estigmasterol de Schkuria pinnata: tpo de retención, 256 seg.  
estigmasterol patrón: tpo de retención, 256 seg.

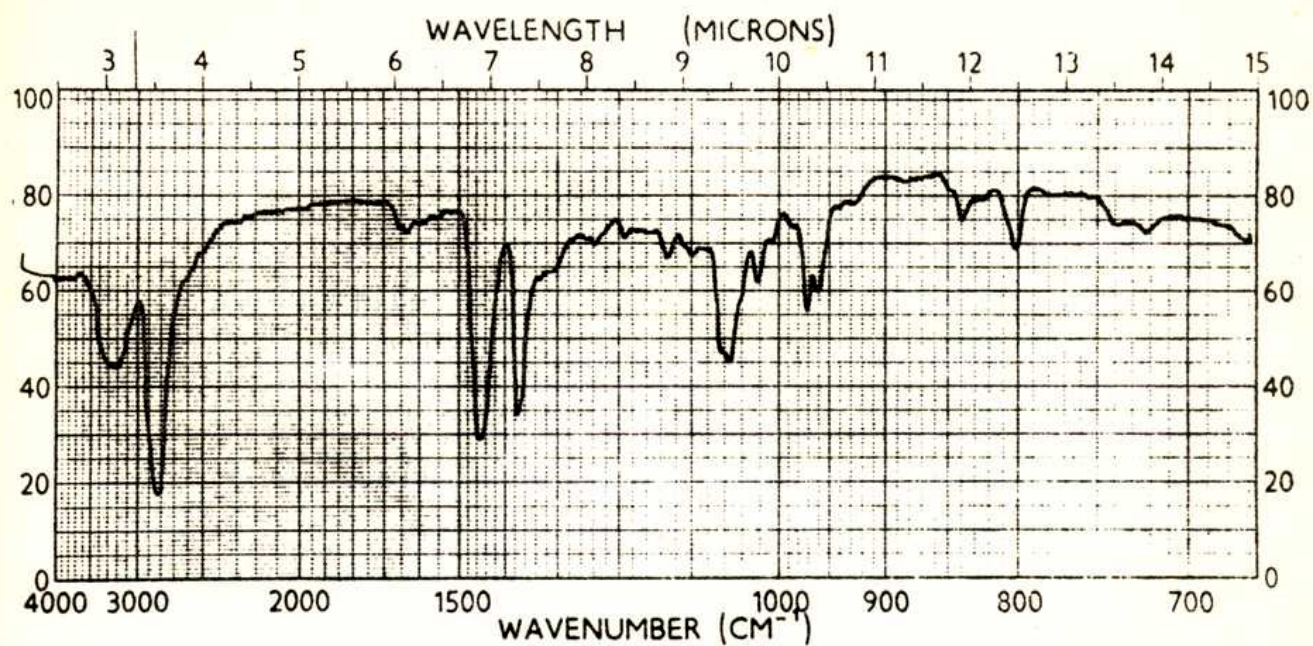


Figura 34: Espectro i.r. de la fracción esteroïdal

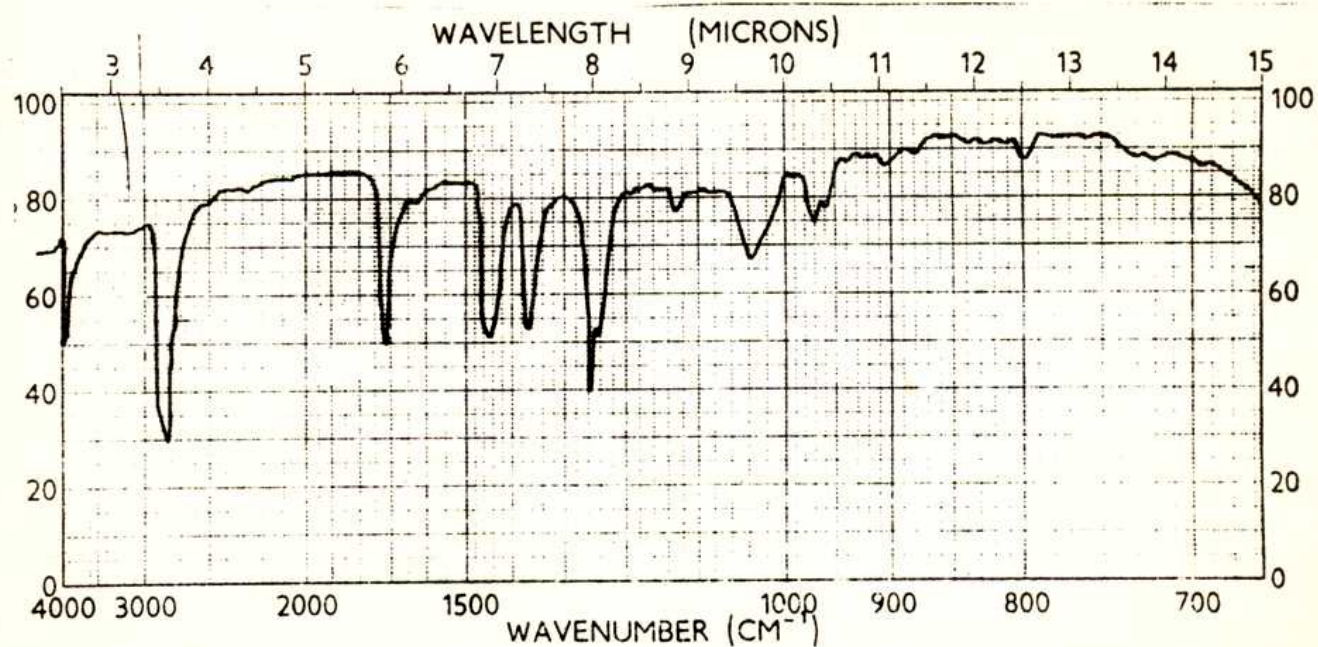


Figura 35: Espectro i.r. de la fracción esteroïdal acetilada



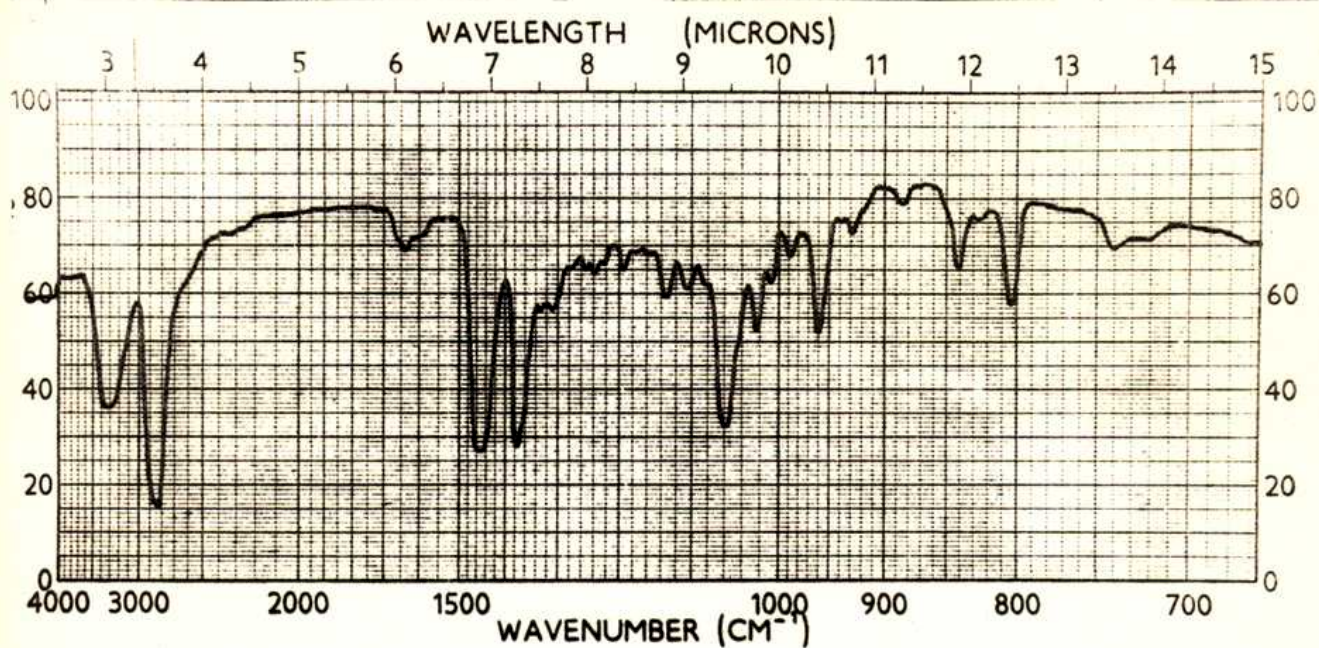


Figura 36: Espectro i.r. de  $\beta$ -sitosterol auténtico

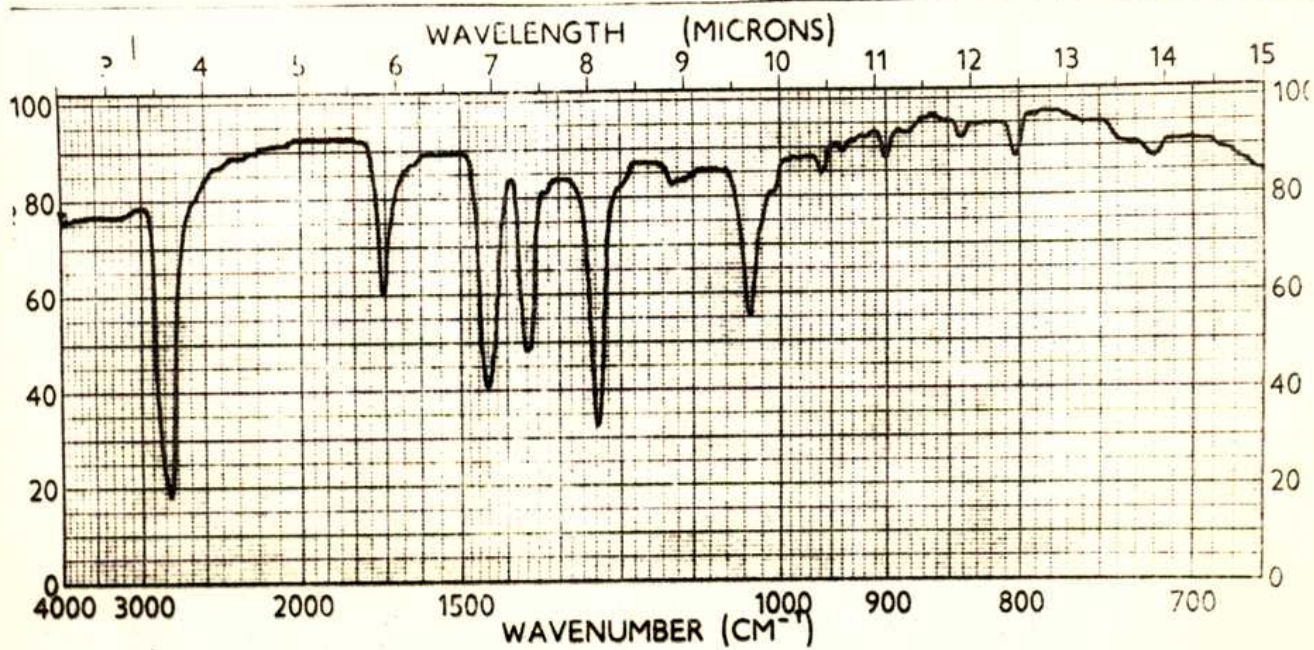


Figura 37: Espectro i.r. del acetato de  $\beta$ -sitosterol auténtico

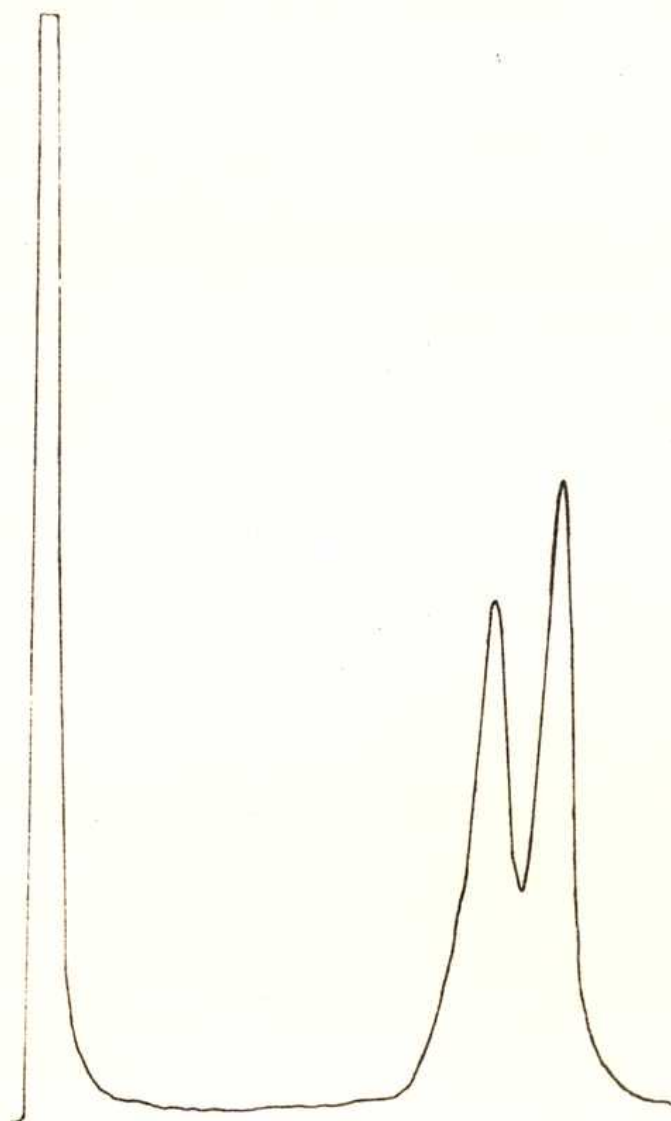


Figura 38: Fracción esteroideal. Cromatograma gaseoso

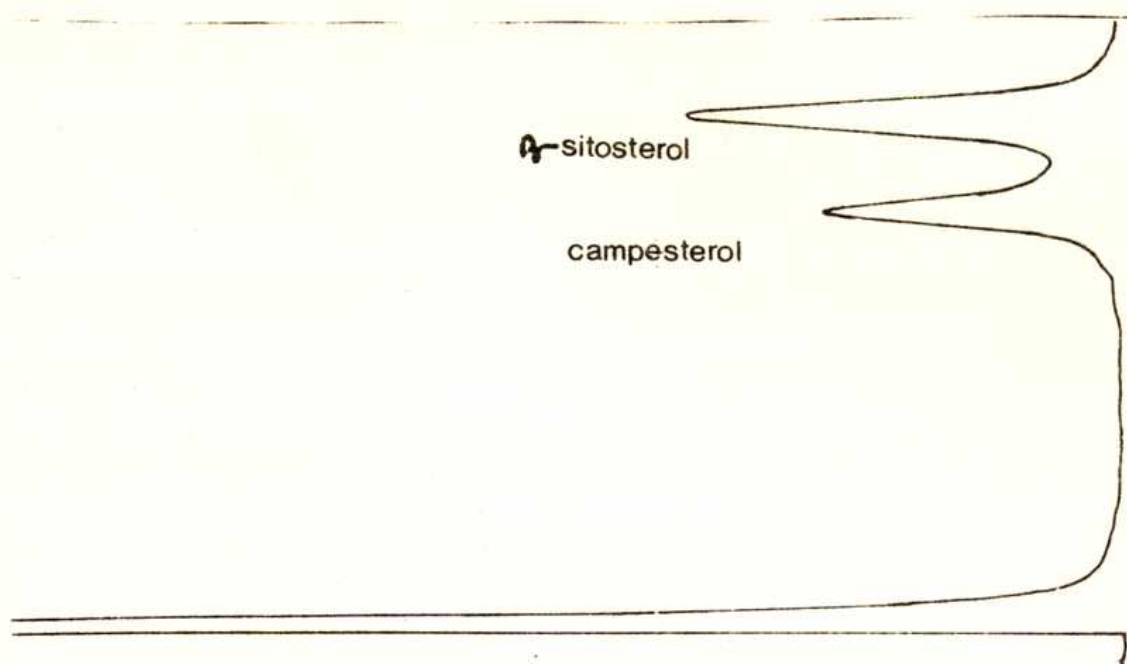


Figura 39: Acetato de  $\beta$ -sitosterol auténtico. Cromatograma gaseoso

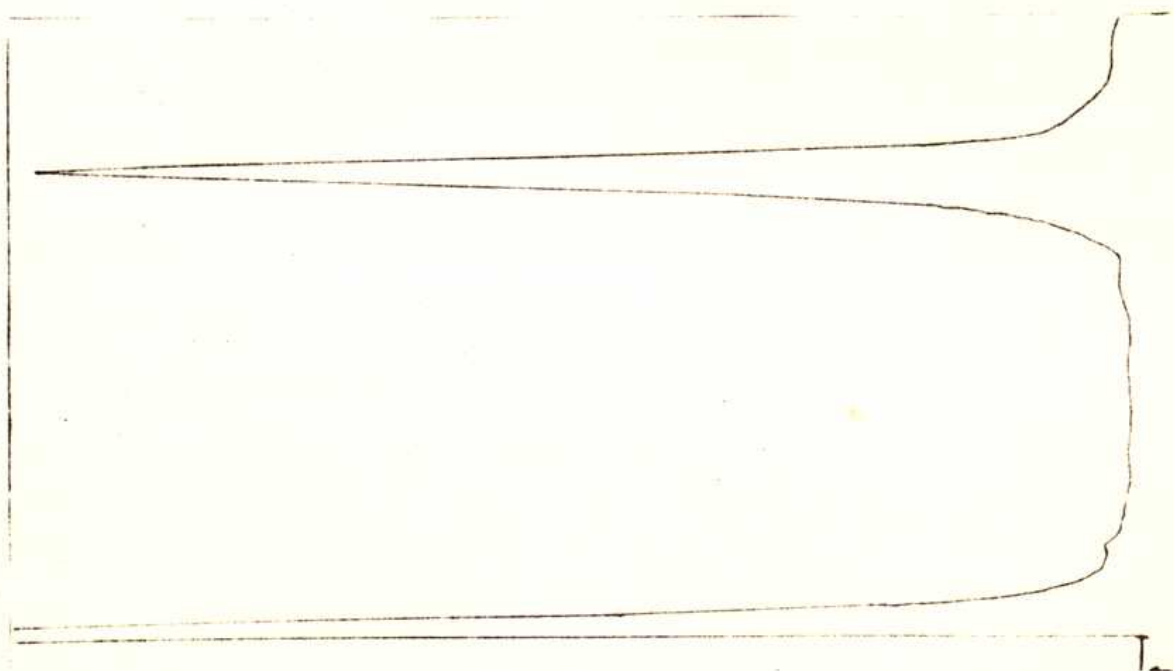


Figura 40: Acetato de estigmasterol auténtico. Cromatograma gaseoso

ENSAYOS REALIZADOS CON FINES DE AISLAR

OTROS PRODUCTOS DE LA PLANTA SCHKURIA PINNATA



ENSAYO 1- (para sustancias con reacción de Kedde positiva)

Como parte del estudio de la planta Schkuria pinnata, se había tratado de aislar para luego caracterizar las sustancias responsables de las reacciones de Kedde y de Raymond positivas, que daban los extractos de dicha planta.

La reacción de Kedde<sup>93</sup> y la reacción de Raymond<sup>94</sup> son utilizadas para detectar la presencia de anillo butenólido, y el interés surgió del hecho que los glicósidos cardiotónicos son sustancias que dan reacción positiva con los citados reactivos, dado que poseen la mencionada agrupación  $\gamma$ -lactona- $\alpha$ - $\beta$ -no saturada.

Más tarde se comprobó, aunque no había referencias que así lo indicaban, que los sesquiterpenos lactónicos conteniendo anillos butenólidos también producían reacción positiva con los reactivos señalados.

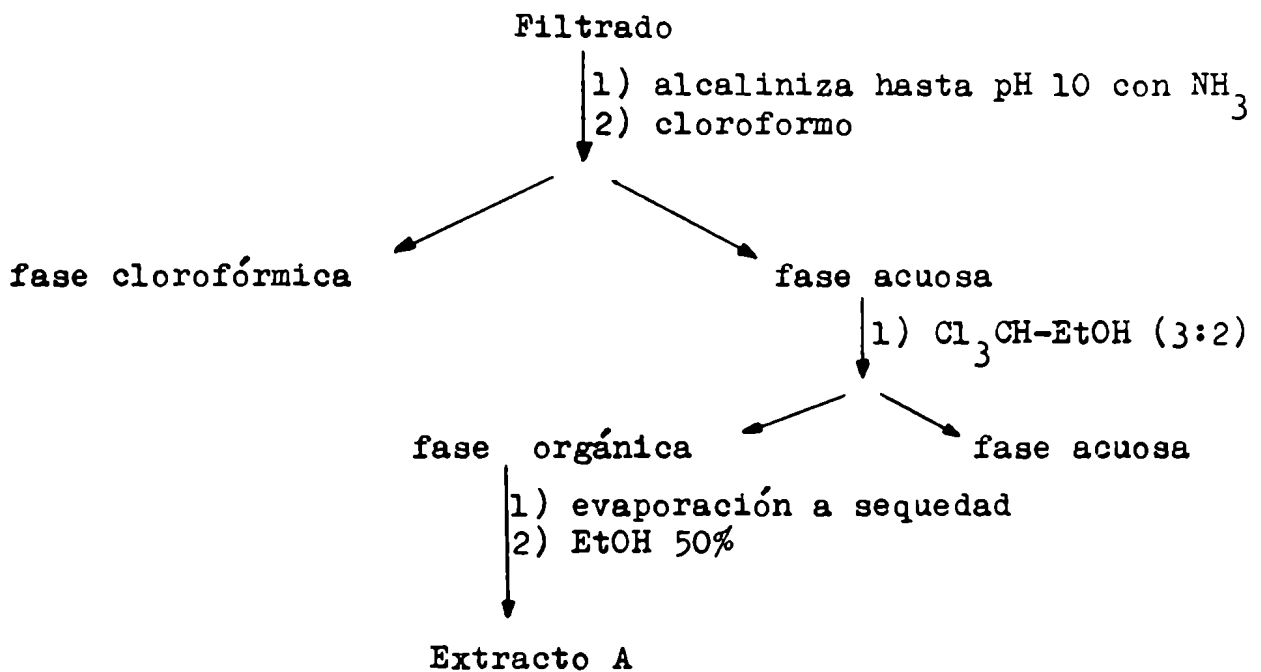
Para aislar los glicósidos supuestamente contenidos en la planta, se ensayaron distintos métodos de extracción que se reseñan a continuación.

Método A<sup>95</sup>

Este método consistió en extraer con metanol a temperatura de ebullición el material vegetal seco y molido. El residuo del



extracto metanólico se tomó con ClH 1% y se separó un insoluble que se descartó. El filtrado se procesó según el siguiente esquema:



En el extracto A se encontraban las sustancias Kedde positivas y se procesaron como se indica más adelante.

### Método B<sup>96</sup>

Planta seca y molida fue homogeneizada con agua y luego cubierta con tolueno; la mezcla se mantuvo a 25° durante 24 horas para permitir la hidrólisis de las enzimas de la planta.

Después de adicionar EtOH, la mezcla fue calentada a 60° durante una hora y luego filtrada. El sólido fue posteriormen-

te extraído con EtOH 60% y luego con EtOH 70%.

El primer extracto etanólico se unió a estos dos últimos y el total se concentró hasta un determinado volumen.

El extracto concentrado fue tratado con una suspensión etanólica de hidróxido de plomo durante 10 minutos. La mezcla fue filtrada y el filtrado se concentró; el nuevo precipitado de sales de plomo fue eliminado por filtración y el filtrado se diluyó con etanol para ser posteriormente extraído con éter de petróleo.

El extracto de éter de petróleo fue lavado con agua y luego de secado con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  se evaporó a sequedad. Se obtuvo así el residuo 1 (éter de petróleo).

La solución acuosa-alcohólica se concentró y se extrajo con cloroformo. Los extractos fueron lavados con agua,  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  2N, nuevamente con agua, secados con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  y evaporados hasta sequedad. Se obtuvo de esta manera el residuo 2 (cloroformo). La solución acuosa restante fue extraída con cloroformo-etanol (2:1). Los extractos obtenidos fueron lavados, secados y evaporados en la misma forma que los extractos clorofórmicos. Se obtuvo el residuo 3 (cloroformo-etanol (2:1)).

En los residuos 2 y 3 se encontraron las sustancias que daban reacción de Kedde positiva.

Método C<sup>97</sup>

Este método es prácticamente similar al anterior. Las diferencias residen en:

- a) mayor número de extracciones del sólido con EtOH-H<sub>2</sub>O (las proporciones utilizadas fueron EtOH-H<sub>2</sub>O 1:1; 3:2; 3:1; y 9:1);
- b) el tratamiento con (HO)<sub>2</sub>Pb (se elimina el exceso de (HO)<sub>2</sub>Pb por precipitación como SO<sub>4</sub>Pb);
- c) la obtención de un nuevo extracto cloroformo-etanólico (extracción de la fase acuosa con cloroformo-etanol 3:2).

De esta manera se llegaron a obtener cuatro residuos, los cuales corresponden a: 1) extracto de éter de petróleo; 2) extracto cloroformo; 3) extracto cloroformo-etanol (2:1) y 4) extracto cloroformo-etanol (3:2).

Los residuos 2, 3 y 4 daban reacción de Kedde positiva.

Método D

En este método se llevó a cabo la extracción de la planta con solventes de polaridad creciente.

Se extrajo la misma con: 1°) éter de petróleo, 2°) benceno, 3°) cloroformo y 4°) metanol. Dieron reacción de Kedde positiva los tres últimos extractos; la reacción del extracto bencénico era fuerte mientras que los restantes daban una reacción apenas detectable; por tal razón se decidió trabajar con dicho

extracto.

El extracto bencénico se llevó a sequedad; el residuo se disolvió en la mínima cantidad de etanol, se agregó igual cantidad de agua y el precipitado formado fue filtrado y descartado.

El filtrado contiene los glicósidos. Se lo evaporó a sequedad y se obtuvo el residuo 1.

Estudio de los extractos que daban reacción positiva con el reactivo de Kedde.

De todos los métodos probados y reseñados más arriba se adoptó el último debido a que se obtuvieron mejores resultados en cuanto a la concentración de productos Kedde positivos.

Para estudiar la composición de los extractos Kedde positivos, se utilizaron las técnicas de cromatografía en papel y en capa delgada.

Para la primera de ellas se utilizó papel Whatman N° 1 y se ensayaron los siguientes reactivos:

- a) Xanthidrol<sup>98</sup> (xanthidrol 10% en metanol; ácido acético glacial; ácido clorhídrico concentrado);
- b) Cloramina T<sup>99</sup> (cloramina T 3% en agua; ácido tricloroacético 1,5% en etanol);

- c) Periodato-Bencidina<sup>100</sup> (solución saturada de periodato de potasio; bencidina 0,1 M en metanol, acetona y ácido clorhídrico 0,2N);
- d) Periodato-MnO<sub>4</sub>K-Bencidina (periodato de sodio 1% en agua; MnO<sub>4</sub>K 1% en agua; bencidina en ácido tricloroacético, ácido acético, agua y etanol);
- e) reactivo de Kedde<sup>93</sup> (1 gr de ácido 3,5-dinitro benzoico en 100 ml de una solución 0,5 N de HOK en metanol-agua (1:1)).

Los cuatro primeros reactivos permitían detectar los distintos tipos de azúcares presentes en los glicósidos.

En el caso de cromatografía en capa delgada, se trabajó con placas de sílica gel, utilizando los siguientes reactivos:

- a) Cl<sub>3</sub>Sb<sup>101,102</sup>;
- b) ácido clorosulfónico en ácido acético.

Estos últimos reactivos reaccionan con otros compuestos además de los cardenólidos y no se pueden distinguir específicamente estos últimos.

De acuerdo con los resultados obtenidos se optó por la cromatografía en papel pues permitía utilizar reactivos específicos para cardenólidos, hecho que no podía ser realizado con la cromatografía en capa delgada.

Luego que los ensayos preliminares mostraron que los

extractos Kedde positivos poseían no menos de cuatro sustancias que daban reacción con el reactivo, se trató de separar éstas mediante cromatografía en columna; para ello se preparó una columna cromatográfica de alúmina neutra con el residuo 1 obtenido por el Método D.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en papel Whatman N° 1, saturado con formamida y reveladas con el reactivo de Kedde. Las mismas constituían mezclas de dos ó tres de los supuestos glicósidos, junto a otras sustancias Kedde negativas.

Dado que los productos buscados no pudieron ser separados utilizando distintas técnicas cromatográficas, se trató de simplificar las complejas mezclas obtenidas, para lo cual se procedió a hacer la hidrólisis ácida de los productos crudos.

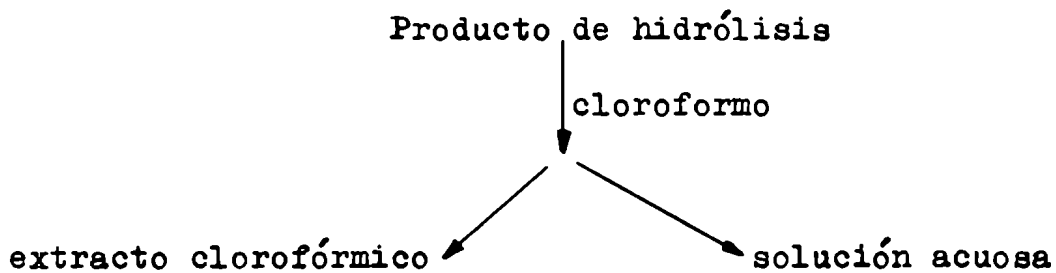
#### Hidrólisis ácida de productos crudos

La elección de este proceso se justificó por la sospecha de que se estaba en presencia de glicósidos de difícil separación como tal, pero que por hidrólisis ácida podían ser eliminados los restos azúcares liberando las agliconas, cuya separación podría llegar a ser algo más sencilla que el caso de glicósidos inalterados.

A continuación se detallan los métodos empleados.

### Método 1

Una porción del residuo 1 (Método D), fue sometida a hidrólisis ácida en  $\text{MeOH-SO}_4\text{H}_2$  0,1 N (1:1), para lo cual se reflujo 30 minutos la mezcla y luego se eliminó el MeOH.



El extracto clorofórmico se llevó a sequedad; el residuo era Kedde positivo. La solución acuosa se neutralizó con resina básica (Dowex I) y se probó la reacción con:

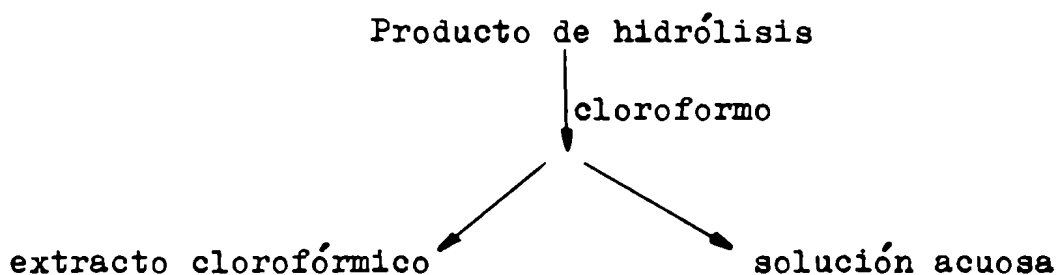
- a) ftalato de anilina: reacción positiva.
- b) xanthidrol: reacción positiva.
- c) Kedde: reacción positiva.

De este último resultado podía deducirse que la hidrólisis no había sido completa o que existían agliconas parcialmente solubles en agua.

## Método 2

Una nueva porción del residuo 1 (Método D), se sometió a hidrólisis ácida con mezcla de Kiliiani<sup>103</sup> (ácido acético, ácido clorhídrico, agua).

La solución se mantuvo una hora a 100°, se agregó agua y luego se concentró a un volumen determinado.



La solución acuosa se neutralizó con resina básica (Dowex I).

Tanto el extracto clorofórmico como la solución acuosa dieron reacción positiva con el reactivo de Kedde. Por ende, las conclusiones son idénticas a las obtenidas por el método de hidrólisis anterior.

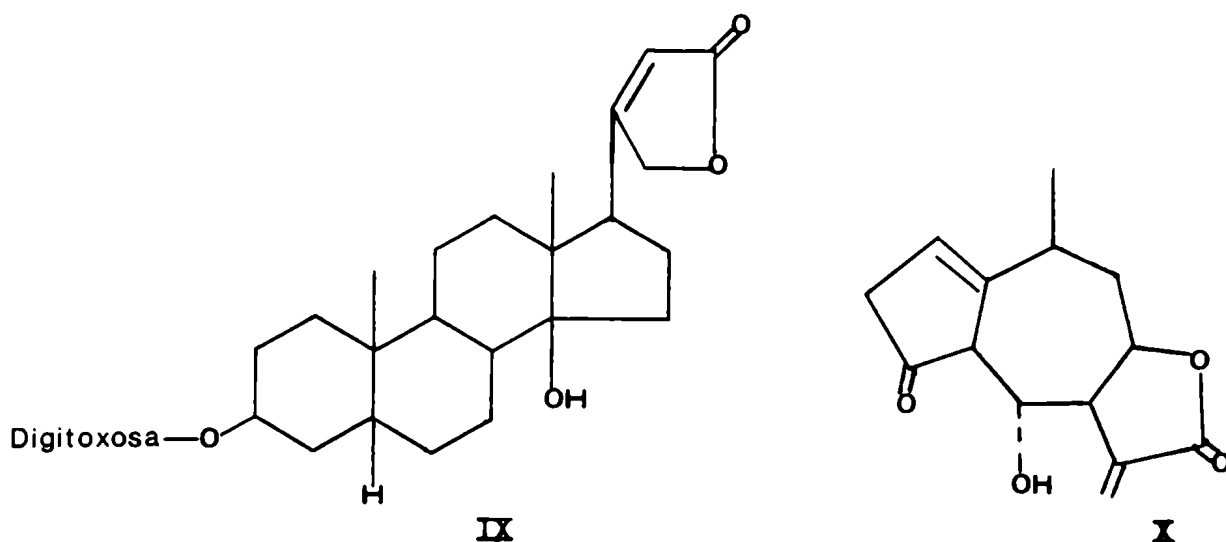
La cromatografía en papel de los productos de hidrólisis demostró la presencia de más de un producto Kedde positivo y la cromatografía en capa delgada mostró, mediante la revelación con vapores de iodo, la existencia de varias sustancias Kedde negativas.



Por tanto, debido a la compleja mezcla que se obtuvo hidrolizando el extracto crudo, se optó por hidrolizar producto eluído de la columna cromatográfica mencionada en la página 136 . En este caso se utilizó el método 1 de hidrólisis; los resultados fueron similares a los que se obtuvieron hidrolizando directamente extractos sin purificación cromatográfica.

Las hidrólisis efectuadas, por lo tanto, condujeron a hechos bastante extraños ya que al realizar la partición del producto hidrolizado entre agua y cloroformo era de esperar que las agliconas Kedde positivas permanecieran en la fase clorofórmica, mientras que los azúcares deberían pasar a la fase acuosa; sin embargo ambas fases daban reacción Kedde positiva.

Este resultado hizo sospechar que se estaba en presencia de glicósidos de muy difícil hidrólisis, lo cual es un hecho muy poco común en el campo de los glicósidos cardiotónicos ya que los mismos se hidrolizan rápidamente en las condiciones ensayadas. Esto se pudo corroborar en un ensayo con digitoxina (IX).



La otra posibilidad que quedaba era que los productos que se estaban tratando de aislar y caracterizar no fueran glicósidos sino otro tipo de compuestos.

Como es sabido, la agrupación responsable de la reacción Kedde positiva es el anillo  $\Delta^1$ -butenólido que se halla presente en las agliconas de los cardenólidos.

Además de encontrarse en dichos glicósidos, el anillo  $\Delta^1$ -butenólido se presenta en otros productos naturales, principalmente en sesquiterpenos del tipo lactónico perhidro azulénico.

Aunque en la literatura no se hacía mención al hecho que este tipo de productos dieran reacción Kedde positiva, pudimos comprobar que efectivamente así era ensayando con una muestra de mexicanina A (X).

Continuando con los intentos de aislar las sustancias con agrupación de anillo butenólido, el extracto clorofórmico proveniente de la hidrólisis (Método 1) que contenía los productos Kedde positivos, fue cromatografiado en una columna de sílica gel, aislándose una sustancia Kedde positiva, homogénea por cromatografía en capa delgada pero que no pudo ser cristalizada.

Intentos posteriores para lograr mayor cantidad de producto, a fin de continuar con los ensayos tendientes a aclarar la estructura del mismo, fracasaron.

Los métodos cromatográficos analíticos empleados hasta ese momento consistían en cromatografía en papel y en capa delgada de sílica gel o alúmina; el revelado de los cromatogramas con reactivo de Kedde había sido posible sólo en el caso de cromatografía en papel dado que el reactivo no era útil con los otros absorbentes utilizados en capa delgada.

Se pensó entonces en la posibilidad de utilizar placas de celulosa microcristalina (Avicel) con las cuales es posible usar el reactivo de Kedde como revelador.

De acuerdo con el Método C de extracción ya descrito (página 133), fueron obtenidos cuatro residuos de los cuales los numerados 2, 3 y 4 daban reacción positiva con el reactivo

con el reactivo de Kedde. Se comenzó a trabajar con el residuo 4 de la extracción con cloroformo-etanol (3:2).

Ya que los productos buscados estaban acompañados por sustancias Kedde negativas, se intentó purificarlas de distintas maneras:

- a) extracción con éter;
- b) columnas cromatográficas de sílica gel;
- c) columnas cromatográficas de Avicel preparadas en tubos de pared de celulosa a fin de poder cortar las bandas luego de desarrollar los cromatogramas con un solvente adecuado;
- d) cromatografía en capa delgada preparativa;
- e) columna cromatográfica de celulosa cuyas fracciones fueron controladas por cromatografía en capa delgada de Avicel.

Ninguno de los métodos mencionados dió resultados efectivos, ni permitió eliminar las sustancias indeseables y el estudio de los productos Kedde positivos fue detenido a esta altura.

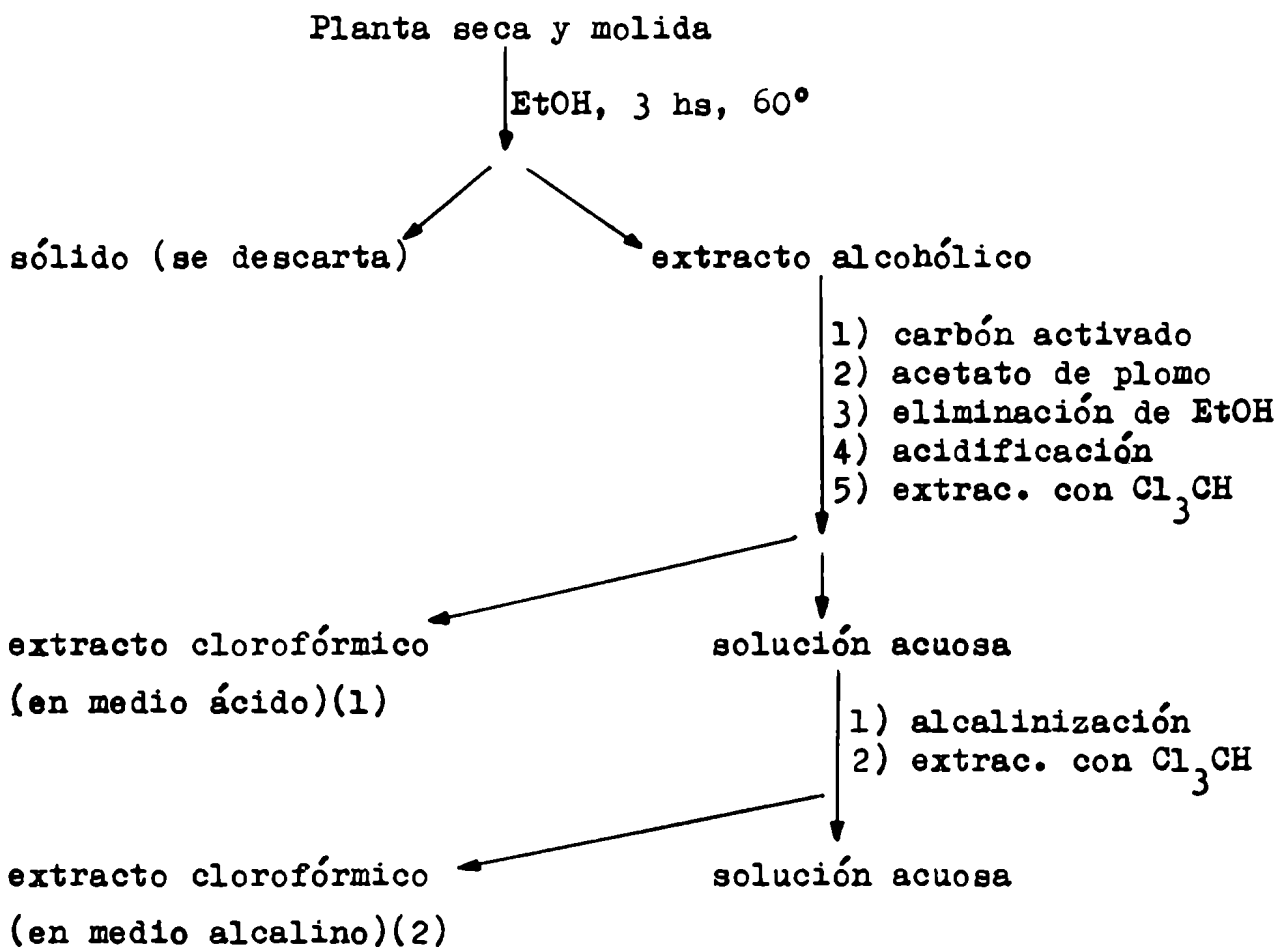
Por otra parte, es digno de mencionar que cuando se procesó el extracto clorofórmico de la planta en estudio, obtenido por el método D, mediante una columna cromatográfica de alúmina neutra, se obtuvieron de la misma tres fracciones I, II y III que fueron eluidas con benceno, cloroformo y metanol respectivamente.

Dichas fracciones consistían en mezclas de productos, aceitosas y de compleja resolución que daban reacción positiva con el reactivo de Kedde, pero que además tenían reacción positiva con el reactivo de Draggendorff.

De ahí surgió el interés en estudiar las sustancias Draggendorff positivas.

ENSAYO 2- (para sustancias con reacción de Dragendorff positiva)

Una porción de la planta seca y molida fue extraída con EtOH, a 60°, trabajándose de acuerdo con el siguiente esquema:



Tanto el extracto 1 como el extracto 2 dieron reacción positiva con el reactivo de Dragendorff, pero este último dejó muy poco residuo.

El extracto 1 fue cromatografiado en capa delgada y en vista de los resultados (no menos de cuatro productos) se

decidió hacer una cromatografía preparativa en sílica gel, con el objeto de separar los citados productos.

De esta manera fueron obtenidas distintas fracciones Dragendorff positivas eligiéndose entre ellas la que mayor cantidad de residuo dejaba.

Según nuestro parecer, dadas las condiciones de extracción, la sustancia responsable de la reacción positiva con el reactivo de Dragendorff, podría ser una amida; teniendo en cuenta esta suposición se trató de determinar el ácido y la amina que constituirían la supuesta amida, para lo cual la fracción Dragendorff positiva antes mencionada fue sometida a los siguientes ensayos de hidrólisis:

- a) hidrólisis ácida en EtOH/ClH a 100°, 120 horas;
- b) hidrólisis con ClH 4 N, 6 horas, alcalinización de la solución y extracción continua con éter etílico 48 horas.

Ninguno de los dos métodos permitió identificar el ácido y la amina ya que en ambos casos se obtuvieron mezclas complejas.

Por otra parte, el producto Dragendorff positivo fue sometido a distintos ensayos físicos.

El análisis elemental y la determinación del peso molecular dieron los siguientes valores: PM 392; C: 61,58%; H: 7,08%. El espectro de resonancia magnética nuclear indicó la presencia

de diversos protones olefínicos y el análisis del mismo resultó complejo (Figura 41). Los resultados del análisis elemental y del peso molecular estaban de acuerdo con una fórmula molecular  $C_{20}H_{28}O_8$ .

Ya que la ausencia de nitrógeno permitió descartar la existencia de una amida, se inició la búsqueda de un producto oxigenado que diera reacción positiva con el reactivo de Dragendorff.

La fracción Dragendorff positiva dió reacción de ácidos hidroxámicos ( $Cl_3Fe$ , clorhidrato de hidroxilamina) y este resultado llevó a considerar la posibilidad de estar en presencia de un éster alifático no saturado.

Teniendo en cuenta esta suposición se llevaron a cabo otra clase de ensayos:

- a) se hizo un índice de iodo por el método de Rosenmund, pero el valor obtenido no aportó mayores soluciones al problema;
- b) el equivalente de saponificación de la sustancia original dió un valor aparentemente bajo (129,8 gr de sustancia/equiv. alcali consumidos);
- c) el producto no presentó ningún tipo de absorción en el ultravioleta, pero el espectro infrarrojo mostraba la existencia de la agrupación carbonilo; (Figura 42)



- d) el producto fue hidrogenado en solución etanólica sobre catalizador de Pt, obteniéndose una sustancia cuyo espectro de resonancia magnética nuclear presentaba muy pequeñas variaciones respecto al compuesto de partida (Figura 43);
- e) una pequeña porción del producto fue tratada con  $\text{NH}_3$ , separándose una sustancia amorfa; el análisis elemental de la misma no pudo llevarse a cabo ya que el producto obtenido se descompuso en el proceso de secado y no fue posible completar el dato de nitrógeno;
- f) dado que podíamos estar en presencia de un éster, se realizaron diversos intentos de saponificación en caliente, en medio acuoso y alcohólico, pero nuevamente se obtuvieron mezclas complejas difíciles de resolver por cromatografía en capa delgada;
- g) se intentó preparar el 3,5-dinitro benzoato del alcohol que supuestamente constituiría el éster, pero este ensayo también fracasó;
- h) el tratamiento del producto Dragendorff positivo con piridina-anhídrido acético permitió obtener una sustancia que aparentemente se acetiló, de acuerdo con los datos de los espectros infrarrojo y de resonancia magnética nuclear; el compuesto acetilado no era cristalino y no pudo ser crista-

lizado.

El fracaso de la mayor parte de los ensayos realizados y la falta de mayor cantidad de sustancia nos hizo abandonar en esta etapa el estudio de los productos Dragendorff positivos.

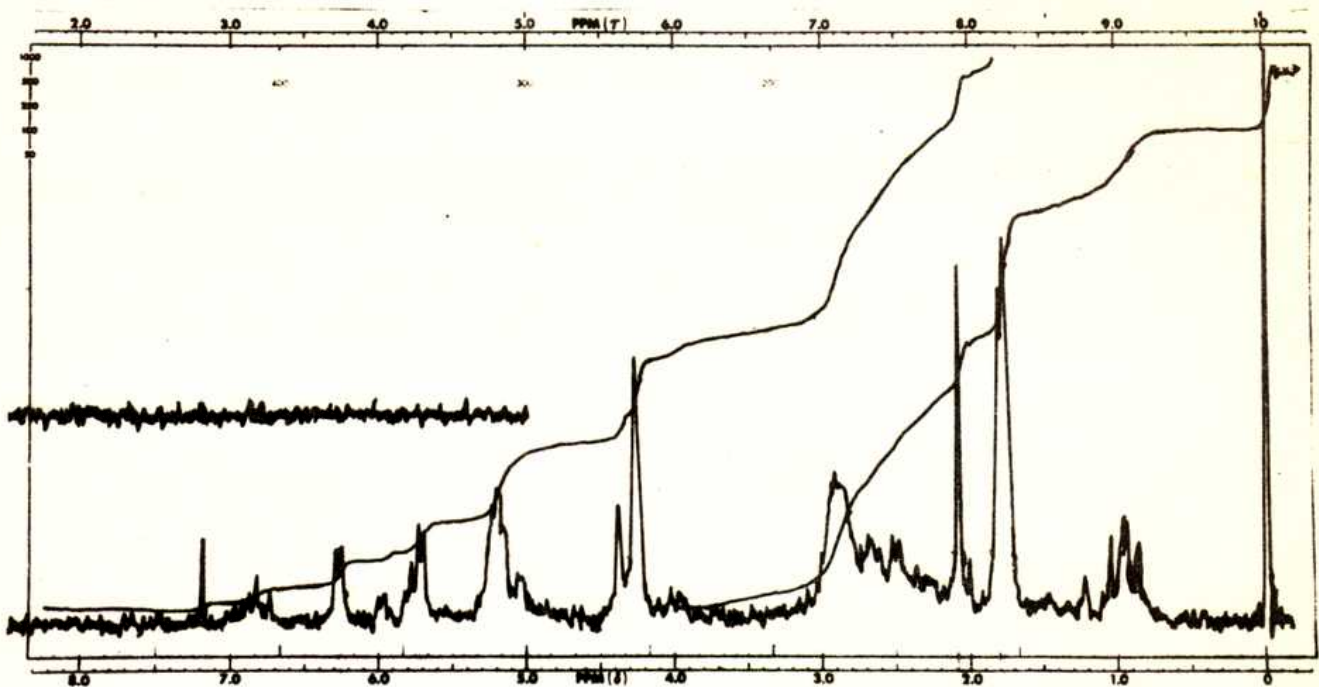


Figura 41: Espectro de r.m.n. del producto Dragendorff positivo

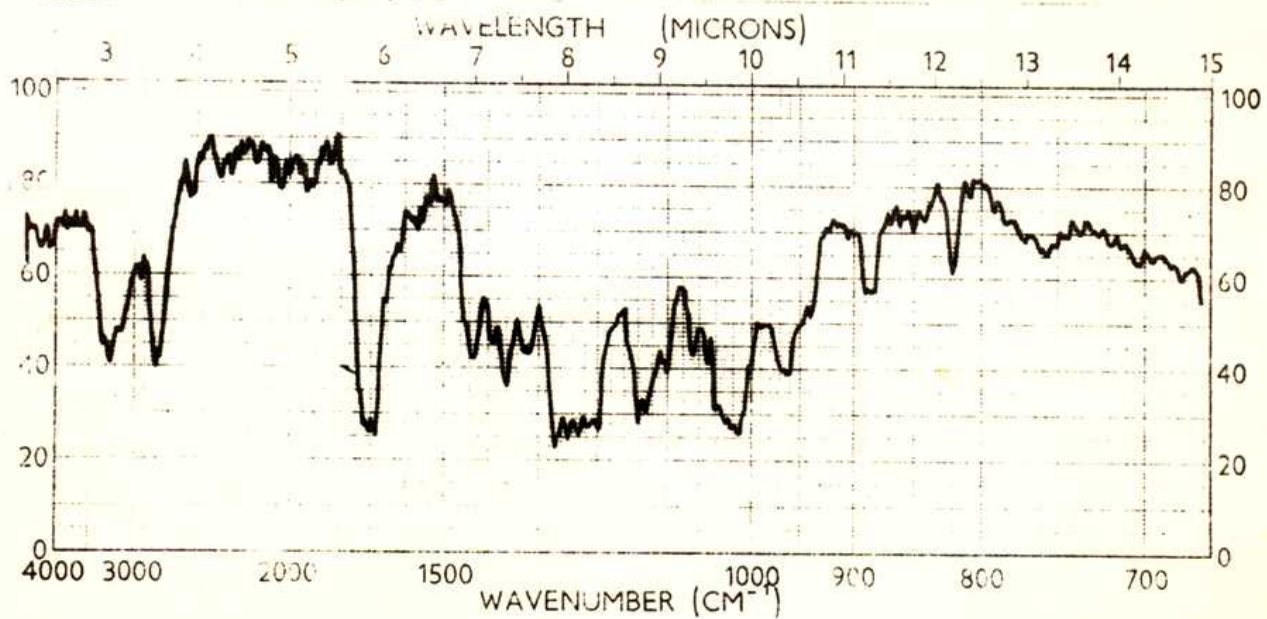


Figura 42: Espectro i.r. del producto Dragendorff positivo

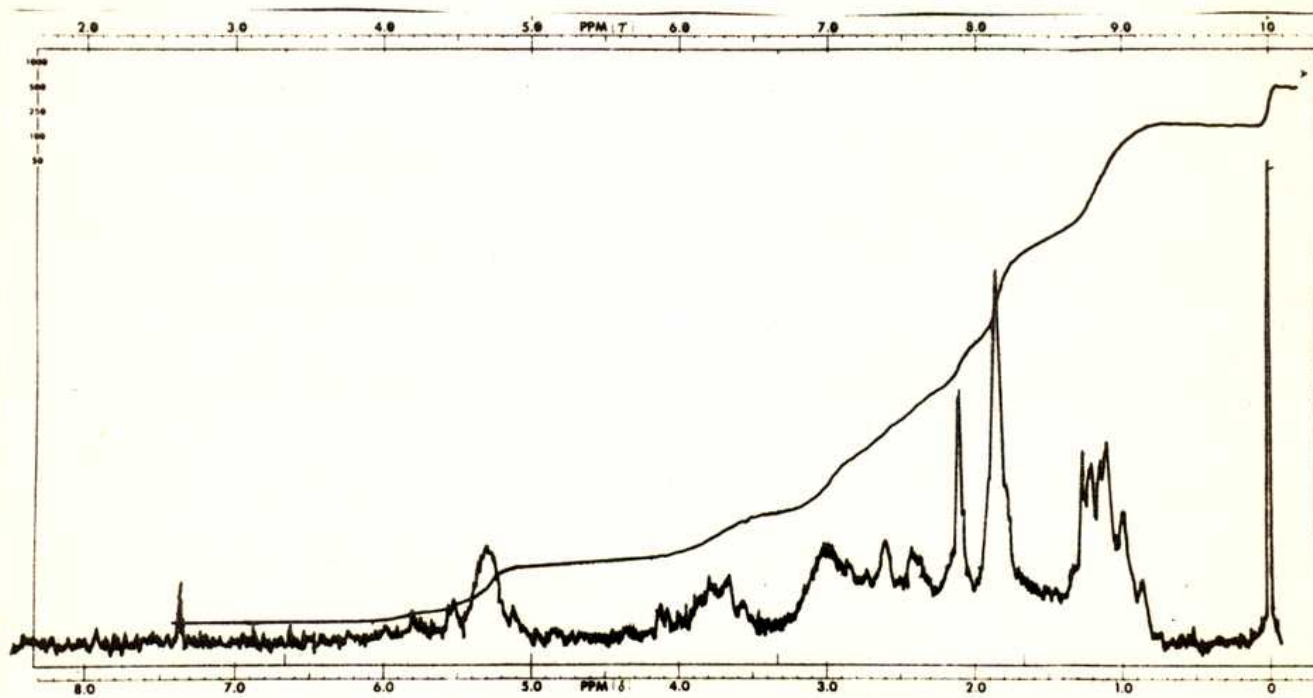


Figura 43: Espectro de r.m.n. del producto Dragendorff positivo hidrogenado

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objeto el estudio de los compuestos aislados de la planta Schkuria pinnata.

En el mismo se describen:

- a) los hidrocarburos presentes en plantas de la familia de las Compuestas, haciendo mención de sus funciones y su origen biogénético; también se comenta su forma de distribución en las distintas tribus de la mencionada familia y su aplicación en la taxonomía química;
- b) los hidrocarburos aislados de la planta Schkuria pinnata, considerando los métodos físicos utilizados en la identificación de los mismos y la relación, desde el punto de vista taxonómico, entre dicha planta y otras de la familia de las Compuestas;
- c) los alcoholes de plantas en general, sus funciones, su origen biogénético y su forma de distribución en las mismas; en particular se consideran los alcoholes aislados de Schkuria pinnata y los métodos empleados en la identificación de los mismos;
- d) los triterpenos presentes en plantas de la familia de las Compuestas; se hace una revisión de todos los mono alcoholes triterpénicos pentacíclicos conocidos y aislados de plantas de la familia de las Compuestas;

- e) los triterpenos pentacíclicos aislados de la Schkuria pinnata; en base a los valores de las constantes físicas y a los resultados de los métodos espectroscópicos y químicos, se proponen estructuras para los alcoholes triterpénicos hallados; se hace además un breve comentario sobre la biogénesis de tales productos en plantas;
- f) los esteroides presentes en plantas de la familia de las Compuestas; se comenta brevemente las funciones de los esteroides en plantas y la existencia de algunos de ellos en plantas de la familia de las Compuestas;
- g) los esteroides aislados de la Schkuria pinnata; se discuten los métodos utilizados para la identificación de los mismos.

Se presenta además, un resumen del trabajo realizado con el objeto de aislar e identificar otros productos existentes en la planta Schkuria pinnata; los mismos no pudieron ser caracterizados por no encontrarse métodos adecuados para la purificación de tales sustancias.

BIBLIOGRAFIA

- 1- H. Erdtman, "Perspectives in Organic Chemistry", Interscience, New York, (1956), pag. 473.
- 2- G. Eglinton y R.J. Hamilton, Science, 156, 1322 (1967).
- 3- G. Eglinton y R.J. Hamilton, "Chemical Plant Taxonomy", Academic Press, New York, (1963), pag. 187.
- 4- D.R. Kreger, "Handbuch der Pflanzen-physiologie", Springer, Berlín, (1958), pag. 249.
- 5- P.E. Kolattukudy, Science, 159, 498 (1968).
- 6- P.E. Kolattukudy, Phytochemistry, 6, 963 (1967).
- 7- G. Eglinton, A.G. González, R.J. Hamilton y R.A. Raphael, Phytochemistry, 1, 89 (1962).
- 8- G.A. Herbin y P.A. Robins, Phytochemistry, 7, 239 (1968).
- 9- G. Eglinton, R.J. Hamilton y M.M. Smith, Phytochemistry, 1, 137 (1962).
- 10- G.A. Herbin y P.A. Robins, Phytochemistry, 8, 1985 (1969).
- 11- G.A. Herbin y P.A. Robins, Phytochemistry, 7, 257 (1968).
- 12- H. Chivers, R.E. Corbett y R.E.M. Mitchell, J.Chem.Soc., 1814 (1966).
- 13- J.A. Fioriti, M.J. Kanuk y R.J. Sims, J.Am.Oil Chem.Soc., 48, 240 (1971).



- 14- K.E. Schulte y G. Rücker, Arch. Pharm., 299, 468 (1966).
- 15- F.W. Bachelor, A.B. Paralikar y S.A. Telang, Phytochemistry, 11, 442 (1972).
- 16- G.G. Wanless, W.H. King y J.J. Ritter, Biochem. J., 59, 684 (1955).
- 17- H.M. McNair y E.J. Bonelli, "Basic Gas Chromatography", 5th edition, Varian Aerograph, Walnut Creek, (1969), pag. 127.
- 18- A.L. Cabrera, "Flora de la Provincia de Buenos Aires", Parte VI, Compuestas, Edición del I.N.T.A., Buenos Aires, (1963).
- 19- P.E. Kolattukudy, Lipids, 5, 259 (1970).
- 20- P.E. Kolattukudy, resultados no publicados, (ver cita 19).
- 21- S.J. Purdy y E.V. Truter, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, 158, 536 (1963).
- 22- F. Radler, Aust.J.Biol.Sci., 18, 1045 (1965).
- 23- A.N. Starratt, Phytochemistry, 11, 293 (1972).
- 24- R.J. Hamilton y D.M. Power, Phytochemistry, 8, 1771 (1969).
- 25- K.N. Gaind y R.L. Gupta, Phytochemistry, 11, 1500 (1972).
- 26- B. Stoyanova-Ivanova, P. Khadzhieva y S. Gerova, Riv.Ital. Essenze, Profumi, Piante Offic., Aromi, Saponi, Cosmet., Aerosol, 52, 637 (1970). Chem. Abstr., 75,1224 m (1971).

- 27- D. Panova, E. Georgieva y E. Stanoeva, *Pharmazie*, 26, 493 (1971). *Chem. Abstr.*, 75, 126651 (1971).
- 28- J. Bermejo Barrera, J.L. Breton y A.G. González, *Anal.Real Soc.Espan.Fis.Quim.*, 59, 595 (1963).
- 29- A.G. Netting, M.J.K. Macey y H.N. Barber, *Phytochemistry*, 11, 579 (1972).
- 30- D.T. Downing, Z.H. Kranz y K.E. Murray, *Aust.J.Chem.*, 13, 80 (1960).
- 31- S.K. Kundu y A. Chatterjee, *Tetrahedron Letters*, 1043 (1966).
- 32- K. Bromislava y R.S. Ludwiczak, *Roczniki Chem.*, 45, 355 (1971). *Chem. Abstr.*, 75, 72522 t (1971).
- 33- K. Venkateswara Rao, *J.Indian Chem.Soc.*, 39, 749 (1962).
- 34- S. Burrows y J.C.E. Simpson, *J.Chem.Soc.*, 2042 (1938).
- 35- M. Vilkas, *Compt.Rend.*, 235, 179 (1952).
- 36- W. Fruhstorfer, *Chem.Ber.*, 87, 423 (1954).
- 37- W.H. Hui, W.K. Lam y S.M. Tye, *Phytochemistry*, 10, 903 (1971).
- 38- J. Bermejo Barrera, J.L. Breton Funes y A.G. González, *Anal.Real Soc.Espan.Fis.Quim.*, Ser.B, 62, 355 (1966).
- 39- J.C.E. Simpson, *J.Chem.Soc.*, 283 (1944).
- 40- A.G. González y A. Rodríguez de León, *Anal.Real Soc.Espan.Fis.Quim.*, Ser.B, 59, 615 (1963).

- 41- R.C. Cambie y J.C. Parnell, N.Z.J.Sci., 12, 453 (1969).  
Chem. Abstr., 72, 705 v (1970).
- 42- Z. Kasprzykz y J. Pyrek, Phytochemistry, 7, 1631 (1968).
- 43- L. Novotny, J. Jizba, V. Herout y F. Sorm, Coll. Czech.  
Chem.Comm., 27, 1393 (1962). Chem. Abstr., 57, 9886 e  
(1962).
- 44- S.M. Flematti y E.G. Gros, An.Asoc.Quim.Argent., 59,  
405 (1971).
- 45- Y. Hashimoto, An.Acad.Brasil.Cienc., 42 (Supl.), 95 (1970).
- 46- H. Budzikiewicz, J.M. Wilson y C. Djerassi, J.Am.Chem.Soc.,  
85, 3688 (1963).
- 47- J. Karlirner y C. Djerassi, J.Org.Chem., 31, 1945 (1966).
- 48- G. Ponsinet, G. Ourisson y G. Charles, Bull.Soc.Chim.  
France, 4453 (1967).
- 49- G. Ponsinet y G. Ourisson, Phytochemistry, 4, 799 (1965).
- 50- T.R. Ames, T.G. Halsall y E.R.H. Jones, J.Chem.Soc.,  
1905 (1954).
- 51- T.G. Halsall, E.R.H. Jones y R.E.H. Swayne, J.Chem.Soc.,  
1902 (1954).
- 52- T.R. Ames, T.G. Halsall y E.R.H. Jones, J.Chem.Soc.,  
450 (1951).
- 53- G. Lardelli, K. Krüsi, O. Jeger y L. Ruzicka, Helv.Chim.  
Acta, 31, 1815 (1948).

- 54- L. Ruzicka y A. Eschenmoser, *Experientia*, 9, 357 (1953).
- 55- B.A. Knights y B.S. Middleditch, *Phytochemistry*, 11, 1177 (1972).
- 56- J. Jimenzherrera, E. Rodríguez, T. Horche, J.L. Linaza y W. de Rafols, *Anal.Inst.Nac.Invest.Agron.*, Madrid, 4, 145 (1945).
- 57- K.R. Prabhu y V. Venkateswalu, *J.Indian Chem.Soc.*, 46, 174 (1969).
- 58- W.H. Hui y W.K. Lee, *Phytochemistry*, 10, 899 (1971).
- 59- A. Castille, *Acad.Farm.*, 32, 121 (1966).
- 60- C.P. Dutta y L.P.K.Ray, *Phytochemistry*, 11, 2267 (1972).
- 61- C.P. Namboodiripad, G.H. Kulkarni y G.R. Kelkar, *Current Sci.*, 37, 550 (1968).
- 62- A.T. Torshchenko y A. Juodvirsis, *Khim.Prir.Soeden*, 4, 252 (1968).
- 63- B. Funes, L. Gose, A.G. González, A. Rodríguez y M. Rincónes, *An.Quim.*, 65, 297 (1969).
- 64- N. Ahmed y G. Hahn, *Pakistan J.Sci.Ind.Res.*, 2, 55 (1959).
- 65- A.E. Atherinos y I. El-Sayed El Kholy, *J.Chem.Soc.*, 1700 (1962).
- 66- J. Grzybowzka, Z. Jermanowska y H. Witkowski, *Roczniki Chem.*, 28, 1971 (1954).

- 67- Z. Kasprzyk, Z. Grzelczak y J. Pyrek, Bull.Acad.Pol.Sci., Ser.Sci.Biol., 13, 661 (1965).
- 68- Jen-Hung Chu y Pao-Chin Yang, Hua Hsüeh Hsüeh Pao, 25, 179 (1959). Chem. Abstr., 54, 6027 (1960).
- 69- M.S.Y. Khan y I.P. Varshney, J.Indian Chem.Soc., 47, 923 (1970).
- 70- J.B. Barrera, J.L.B. Funes, C. Hernándezcalzadiva y A. G. González, Anal.Real Soc.Espan.Fis.Quim., Ser.B, 62, 635 (1966).
- 71- T. Takemoto, G. Hikino y H. Hikino, Yakugokuzasshi, 86, 1160 (1966).
- 72- B. Dasgupta, Experientia, 23, 989 (1967).
- 73- K.L. Mikolajczak y C.R. Smith, Lipids, 2, 127 (1967).
- 74- D.W. Haines y F.L. Warren, J.Chem.Soc., 2554 (1949).
- 75- H.R. Arthur y P.D.S. Ko, Aust.J.Chem., 22, 597 (1969).
- 76- P. Boiteau, B. Paisch, y A. Rakota Ratsimamanga, "Les triterpenoids en physiologie vegetale et animale", Gauthier-Veillars, Paris, (1964), pag. 192.
- 77- H.J. Nicholas, J.Biol.Chem., 237, 1485 (1962).
- 78- D.J. Baisted y W.R. Nes, J.Biol.Chem., 238, 1947 (1963).
- 79- D. Arigoni, Experientia, 14, 153 (1958).
- 80- T.T. Tchen y K. Bloch, J.Biol.Chem., 226, 931 (1957).

- 81- E.J. Corey y P.R. Ortiz de Montellano, *J.Am.Chem.Soc.*, 89, 3362 (1967).
- 82- E.E. van Tamelen, J.D. Willet, R.B. Clayton y K.E. Lord, *J.Am.Chem.Soc.*, 88, 4752 (1966).
- 83- E.E. van Tamelen, K.B. Sharples, J.D. Willet, R.B. Clayton y A.L. Burlingame, *J.Am.Chem.Soc.*, 89, 3920 (1967).
- 84- P. Benveniste, L.Hirth y G. Ourisson, *Phytochemistry*, 5, 45 (1966).
- 85- J.D. Ehrhardt, L. Hirth y G. Ourisson, *Phytochemistry*, 6, 815 (1967).
- 86- M. Vilkas, *Bull.Soc.Chim.France*, 1401 (1959).
- 87- L. Ruzicka, O. Jeger, J. Redel y E. Volli, *Helv.Chim.Acta*, 28, 199 (1945).
- 88- G.G. Allan, F.S. Spring y R. Steveson, *J.Chem.Soc.*, 3052 (1955).
- 89- L. Ruzicka, G. Muller y H. Schellenberg, *Helv.Chim.Acta*, 22, 758 (1939).
- 90- L. Ruzicka y G. Rosenkranz, *Helv.Chim.Acta*, 22, 778 (1939).
- 91- I.M. Morice y J.C.E. Simpson, *J.Chem.Soc.*, 181 (1941).
- 92- K.H. Bauer y K. Brunner, *Arch.Pharm.*, 276, 605 (1938).
- 93- I.E. Bush y D.A.H. Taylor, *Biochem.J.*, 52, 643 (1952).
- 94- O. Schindler y T. Reichstein, *Helv.Chim.Acta*, 34, 108 (1951).

- 95- J. Comín, M. Vernengo, A. Frasca, S. Gerszberg y A.M. Kuck,  
"Investigación Química de Vegetales", Dpto de Química  
Orgánica, F.C.E. y N., U.B.A., (1964).
- 96- H.H. Sauer, R.D. Bennett y E. Heftmann, Phytochemistry,  
6, 1521 (1967).
- 97- J. van Euw y T. Reichstein, Helv.Chim.Acta, 47, 711 (1964).
- 98- M. Pesez , Ann.Pharm.Franc., 10, 104 (1952).
- 99- K.B. Jensen, Acta Pharmacol.Toxicol., 2, 99 (1953).
- 100- J.A. Cifonelli y F. Smith, Anal.Chem., 26, 1132 (1954).
- 101- D. Lawday, Nature, 170, 415 (1952).
- 102- R. Neher y A. Wettstein, Helv.Chim.Acta, 34, 2278 (1951).
- 103- H. Kiliani, Ber., 63, 2866 (1936).

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "J. Comín", with a long horizontal line drawn underneath it.A handwritten signature in cursive script, appearing to read "A. Wettstein", with a horizontal line drawn underneath it.