

Tesis de Posgrado

Estudio químico de *Nierembergia hippomanica* Miers (Familia Solanaceae)

Gonzalez, María Dolores

1982

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

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

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

Cita tipo APA:

Gonzalez, María Dolores. (1982). Estudio químico de *Nierembergia hippomanica* Miers (Familia Solanaceae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1695_Gonzalez.pdf

Cita tipo Chicago:

Gonzalez, María Dolores. "Estudio químico de *Nierembergia hippomanica* Miers (Familia Solanaceae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1695_Gonzalez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCENBA



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FAULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Estudio químico de Nierembergia hippomanica Miers.

(Familia: Solanaceae)

MARIA DOLORES GONZALEZ

1695
Ej-2

Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Ciencias Químicas

1982

1695

A mis padres y a mi hermana.

A mi esposo.

Agradezco profundamente a la Dra. Alicia Beatriz Pomilio, directora de esta Tesis, por su fe, su capacidad científica y preocupación en mi formación, por su incansable dedicación al trabajo y por su amistad.

Agradezco tambien ;

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme concedido Becas de Iniciación y de Perfeccionamiento, que me permitieron llevar a cabo el presente trabajo.

Al CEFAPRIN, por cuyo intermedio recibí esas Becas, y por el apoyo y cordialidad que siempre demostraron.

Al Ing. Guillermo Covas (INTA-La Pampa) por el material vegetal suministrado y por identificarlo.

Al Dr. Juan Carlos Oberti (Universidad de Córdoba) por el material vegetal suministrado .

Al INTA de Catamarca, por el material vegetal suministrado.

Al Dr. J. A. Izquierdo por los ensayos farmacológicos con esta planta.

Al Dr. A. Viale por los ensayos de actividad bacteriostática y fungicida realizados.

Al Dr. A.G. González (Universidad de La Laguna, Tenerife, España) por las muestras auténticas de acetyl oleanato y acetyl ursolato de metilo y por la de uvaol, gentilmente enviadas.

Al Dr. J. G. Woolley por las muestras auténticas de picratos de 3α - y 3β -tigloiloxitropina.

Al Dr. K. Weinges por la realización de los espectros de ^1H -RMN de 300 MHz y los de ^{13}C -RMN de 75,45 MHz.

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

Al Dr. Gabriel Bukovits por la realización de espectros de ^1H -RMN.

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

A la Lic. Mary Rivero de Aznarez por la realización de las cromatografías gas-líquido, al Sr. J. A. Aznarez por la realización de los espectros de masas y al Sr. C.G. Arabehty por la realización de espectros de masas , de ^1H -RMN de 100 MHz y de ^{13}C -RMN.

A la Srta. A. Arenaza por los espectros de ^1H -RMN de 60 MHz y espectros infrarrojos de alta resolución realizados.

A la Dra. A. M. Seldes por la realización de espectros de $^1\text{H-RMN}$.

A la Dra. B. B. Deferrari y a la Lic. Z. M. Marcote por los microanálisis realizados.

A los Lic. C. A. Buschi, A. M. Iribarren, C. D. Schteingart, J. F. Groisman y R. D. Rofi, por su cariño, estímulo y ayuda, con los que siempre conté a lo largo de este trabajo.

A todo el personal del Departamento de Química Orgánica, profesores, compañeros y no docentes, por su cordialidad y apoyo permanente.

Al Dr. Jorge René Lorenzón, por su invalorable cooperación y paciencia durante la concreción de esta Tesis.

INDICE GENERAL

pág.

CAPITULO I : LAS SOLANACEAS

Taxonomía de las Solanáceas americanas.....	1
Características fitoquímicas de la Familia.....	3
El género <u>Nierembergia</u>	8

CAPITULO II : COMPUESTOS TERPENICOS

PARTE 1: TRITERPENOS PENTACICLICOS

Esqueletos básicos.....	10
Métodos espectroscópicos aplicados a la elucidación estructural de los triterpenos pentacíclicos.	
a) Espectrometría de masas.....	13
b) Espectroscopía de ^1H -RMN.....	19
c) Espectroscopía de ^{13}C -RMN.....	28
Actividad farmacológica de los triterpenos pentacíclicos.....	31

PARTE 2: ECDISTEROIDES

Hormonas de muda de insectos aisladas de fuente vegetal.....	32
Métodos espectroscópicos aplicados a la elucidación estructural de ecdisteroides.	
a) Espectroscopía ultravioleta.....	39
b) Espectroscopía infrarroja.....	40
c) Espectrometría de masas.....	40
d) Espectroscopía de ^1H -RMN.....	43
e) Espectroscopía de ^{13}C -RMN.....	45

CAPITULO III : GLICOSIDOS ACILADOS DE FLAVONOIDES

Ejemplos de este grupo de productos naturales.....	46
Métodos espectroscópicos aplicados a la elucidación estructural de glicósidos acilados de flavonoides.	
a) Espectroscopía ultravioleta.....	50
b) Espectrometría de masas.....	50
c) Espectroscopía de ^1H -RMN.....	57
d) Espectroscopía de ^{13}C -RMN.....	63
Métodos químicos aplicados a la elucidación estructural de glicósidos de flavonoides.	
a) Hidrólisis ácida.....	73
b) Hidrólisis enzimática.....	74
c) Hidrólisis alcalina.....	75
d) Hidrólisis del oligosacárido como tal a partir de un glicósido de flavonoide.....	77
e) Análisis por metilación.....	78
f) Estudio de los productos de hidrólisis del glicósido y derivados.....	84

CAPITULO IV : ALCALOIDES

PARTE 1: FENETILAMINAS

Introducción a la familia de compuestos.....	86
Métodos espectroscópicos aplicados a la elucidación estructural de fenetilaminas.	
a) Espectrometría de masas.....	90
b) Espectroscopía de ^1H -RMN.....	94

PARTE 2: ALCALOIDES DEL TROPANO

Introducción a la familia de compuestos.....	95
Métodos espectroscópicos aplicados a la elucidación estructural de alcaloides del tropano.	
a) Espectrometría de masas.....	98
b) Espectroscopía de ^1H -RMN.....	101
c) Espectroscopía de ^{13}C -RMN.....	102

PARTE 3: ACCION FARMACOLOGICA DE LOS ALCALOIDES DESCRIPTOS

Sistema nervioso autónomo y neurotransmisores.....	104
Acción farmacológica de las fenetilaminas.....	106
Acción farmacológica de los alcaloides del tropano.....	108

CAPITULO V : DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTA TESIS

Objeto del trabajo realizado.....	109
Discusión de los resultados obtenidos.	
a) Criterios seguidos en el fraccionamiento del material vegetal.....	109
b) Estudio del Precipitado 1.....	110
b.1) Hidrocarburos y alcoholes superiores.....	111
b.2) Triterpenos pentacíclicos.....	114
b.3) Compuestos fenólicos.	
b.3.1) Cumarina.....	123
b.3.2) Flavonoide principal.....	124
b.3.3) Flavonoides minoritarios.....	142
b.4) Polialcohol.....	146
c) Estudio del extracto de acetato de etilo.	
c.1) Flavonoides acilados.....	148
c.2) Compuestos esteroideos.....	169

d) Marcha separativa de alcaloides.	
d.1) Extracto etéreo a pH 10.....	180
d.2) Extracto clorofórmico a pH 10.....	188
d.3) Alcaloides cuaternarios.....	190

CAPITULO VI : PARTE EXPERIMENTAL

Parte experimental.....	192
RESUMEN.....	229
Bibliografía.....	232

CAPITULO I

LAS SOLANACEAS

TAXONOMIA DE LAS SOLANACEAS AMERICANAS

La familia Solanaceae comprende gran cantidad de plantas superiores, dicotiledóneas, leñosas y herbáceas, distribuidas por todo el mundo. El mayor número de géneros provienen de zonas tropicales o subtropicales y sólo unos pocos de zonas templadas y frías. Esta familia incluye plantas alimenticias como papa, tomate y ají, o de interés comercial como el tabaco, medicinales como la belladona, ornamentales como la petunia o tóxicas como el estramonio, el beleño y otras daturas.

Ha sido objeto de varias clasificaciones taxonómicas de las cuales la de Wettstein, de 1891 (1), es la base de los modernos estudios botánicos.

En 1979, Hunziker (2) presentó una sistemática de las Solanáceas sudamericanas remarcando la diversidad de especies en este continente, dato que, entre otras razones, hacen pensar a la mayoría de los botánicos que esta familia se originó en esta región y se distribuyó a otros continentes, probablemente antes de la fragmentación del continente de Gondwana.

En Sudamérica se encuentran 60 géneros con aproximadamente 1800 especies que actualmente se subdividen del siguiente modo (2):

- | | | | |
|-------------------------------------|-----------|-------------|-----------------------|
| I- <u>Subfamilia Solanoideae</u> : | 7 tribus, | 36 géneros, | aprox. 1400 especies. |
| Tribu 1: <u>Solaneae</u> | | 18 géneros, | aprox. 1250 especies. |
| Tribu 2: <u>Datureae</u> | | 2 géneros, | aprox. 8 especies. |
| Tribu 3: <u>Jaboroseae</u> | | 3 géneros, | aprox. 36 especies. |
| Tribu 4: <u>Lycieae</u> | | 3 géneros, | aprox. 43 especies. |
| Tribu 5: <u>Nicandreae</u> | | 1 género | 1 especie. |
| Tribu 6: <u>Solandrae</u> | | 2 géneros, | aprox. 14 especies. |
| Tribu 7: <u>Juanulloae</u> | | 7 géneros, | aprox. 33 especies. |
| II- <u>Subfamilia Cestroideae</u> : | 5 tribus, | 24 géneros, | aprox. 413 especies. |
| Tribu 8: <u>Cestreae</u> | | 4 géneros, | aprox. 176 especies. |
| Tribu 9: <u>Nicotianeae</u> | | 9 géneros, | aprox. 130 especies. |
| Tribu 10: <u>Schwenckieae</u> | | 3 géneros, | aprox. 34 especies. |

Tribu 11: <u>Parabouchetieae</u>	1 género,	1 especie.
Tribu 12: <u>Salpiglossideae</u>	7 géneros,	aprox.72 especies.

De estos 60 géneros de Solanáceas nativas de Sudamérica, 32 se encuentran sólo en este territorio y las restantes 28 aparecen también en otros continentes. Algunos géneros son endémicos de ciertas regiones fitogeográficas, mientras otros más cosmopolitas, se hallan ampliamente distribuidos en América del Sur y las zonas vecinas, por ejemplo, América Central, Méjico y América del Norte, Africa y Australia. Sólo los géneros Grabowskia, Petunia y Nierembergia son disjuntos, por encontrarse en Sur y Norte América.

Dentro del reino vegetal, esta familia pertenece al orden de las Tubiflorae. Según Wettstein, las Solanáceas presentan una posición especial dentro de ese orden, debido a sus características metabólicas. Se relacionan íntimamente con la familia Convolvulaceae, por presentar flavonoles y almacenar almidón en los órganos vegetativos (3), formando así ambas familias un único grupo dentro de las Tubifloras. Es característico de las Solanáceas el metabolismo de los esteroides (espirostanoles, espirosolanoles, witanólidos, etc.) y en este sentido se relacionan con la familia Scrophulariaceae, cuyo género Digitalis forma los mismos espirostanoles y muchos autores afirman que ambas familias están emparentadas. Pero de mayor valor es el hecho que, según las investigaciones realizadas hasta ahora (3), las Solanáceas no poseen iridoides y sus alcaloides característicos, las bases del tropano y de la nicotina, no están relacionados con los de las plantas que tienen iridoides y secoiridoides. Justamente la presencia de estos compuestos, junto a la formación de flavonas y el almacenaje de estaquiosa, caracteriza un grupo distinto entre las Tubifloras, al que pertenecen, entre otras, las familias Verbenaceae, Scrophulariaceae, Labiatae, Acanthaceae, Bignoniaceae, Plantaginaceae, etc. Existe, por último, un tercer grupo dentro de las Tubifloras, formado por la familia Boraginaceae, caracterizada por sus flavonoles, naftoquinonas, alcaloides de la necina y almacenaje de almidón y/o fructano.

CARACTERISTICAS FITOQUIMICAS DE LA FAMILIA

Las Solanáceas representan un grupo muy interesante de vegetales, con metabolitos secundarios activos, muchos de los cuales se conocían desde la antigüedad.

Los alcaloides se encuentran muy difundidos en la familia y ésta ha sido la causa del estudio intensivo de muchas de sus especies. Pero también son ricas en otros compuestos, que se consignarán a continuación según grandes grupos de productos naturales.

Compuestos terpénicos.

a) Triterpenos pentacíclicos.

Se ha observado hasta ahora la presencia de los triterpenos pentacíclicos en las Solanáceas leñosas que provienen de zonas cálidas y no en las herbáceas de zonas templadas (3).

Los más frecuentemente aislados son el ácido ursólico (4) y el ácido olea-nólico (5), que presumiblemente pertenecen a las ceras cuticulares. (Fig. 1)

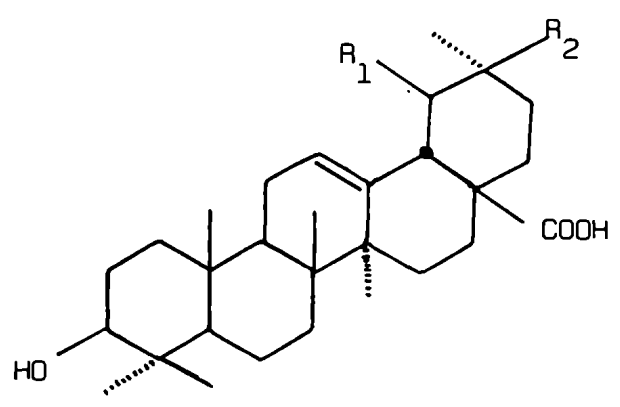
b) Fitosteroles y compuestos relacionados.

Se encuentran distribuidos en general entre las Solanáceas, los fitosteroles y los triterpenos tetracíclicos que siempre los acompañan. De varias Solanáceas comerciales se han aislado estigmasterol, sitosterol, colesterol, campesterol y sus glicósidos, cicloartanol y mezclas de 4 alfa-metilfitosteroles, (6,7).

c) Saponinas.

Las plantas del género Solanum son ricas en saponinas básicas, conocidas como alcaloides esteroidales, y neutras, entre las que se cuentan saponinas esteroidales de C_{27} y lactonas esteroidales de C_{28} (3).

Algunos Cestrum contienen espirostanoles tipo digitálicos que son las principales toxinas (8); Cestrum parqui, por ejemplo, que es una especie tóxica

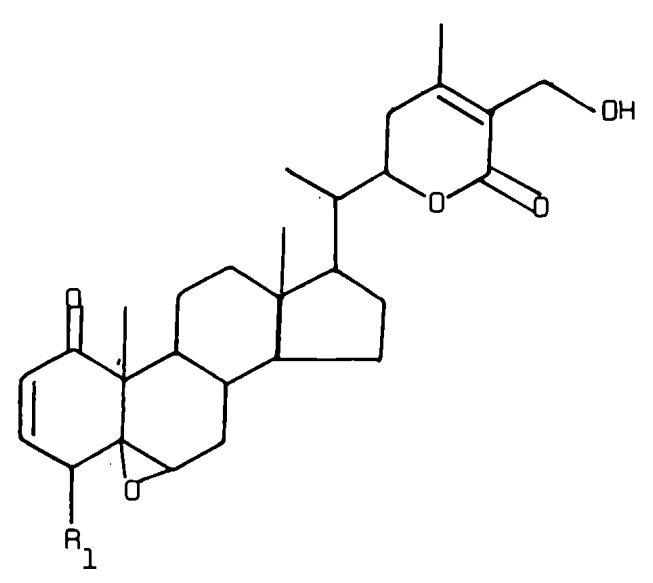


R₁=H, R₂=CH₃

ácido oleanólico

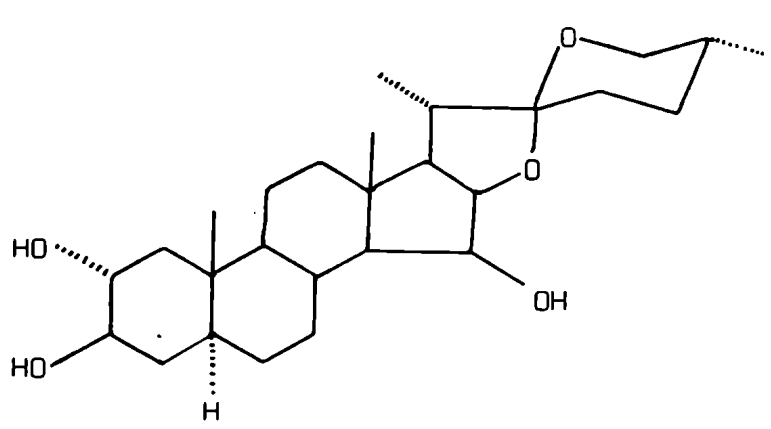
R₁=CH₃, R₂=H

ácido ursólico

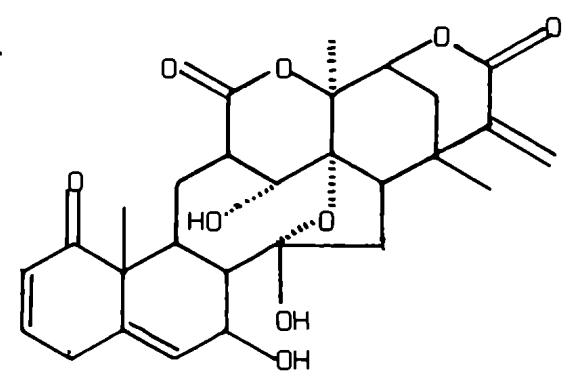


R₁=OH, witaferina A

R₁=H, jaborosalactona A



digitogenina



fisalina

Fig. 1: Algunos compuestos terpénicos aislados de Solanáceas.

de Argentina y Chile, tiene glicósidos de digitogenina (9) (Fig 1).

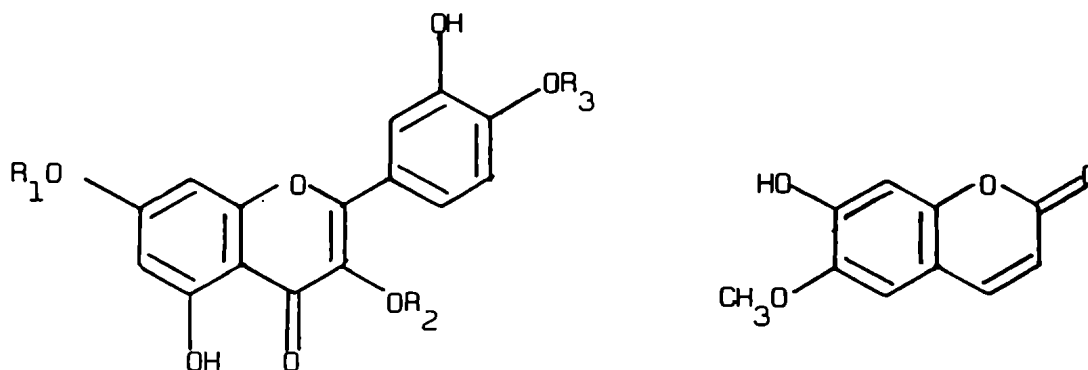
También en semillas de Capsicum annum existen saponinas, de acción antibiótica (10). Una vieja planta medicinal de la India, Withania somnifera, cuyas hojas se usan para el tratamiento local de tumores, posee witanólidos (11), lactonas esteroidales con acción antibiótica e inhibidora de la mitosis (12), que también se encuentran en especies del género Acnistus y Jaborosa (13, 14). Algunos compuestos representativos de este grupo son witaferina A y jaborosalactona A (Fig. 1).

El género Physalis, por otra parte, posee lactonas esteroidales características denominadas fisalinas (3, 15) (Fig. 1).

Compuestos fenólicos.

Como se indicó anteriormente, las Solanáceas se caracterizan por la presencia de flavonoles (3). En casi todas las especies estudiadas se han aislado glicósidos de quercetina y canferol (16) (Fig. 2). Por otra parte, carecen de taninos y fragmentos de taninos (3).

De muchas Solanáceas se aislaron derivados del ácido benzoico, fenoles del tipo del ácido cumárico, cafeico y sus glicósidos (17). También cumarinas, entre las cuales el ejemplo más representativo es la escopoletina (Fig. 2), cuya presencia, así como la de sus glicósidos y metil éteres, es característica de la familia (18).



R_1 y/o R_2 y/o R_3 = azúcares
Glicósidos de quercetina

Escopoletina

Fig. 2: Algunos compuestos fenólicos presentes en Solanáceas.

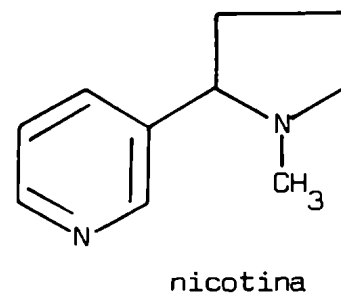
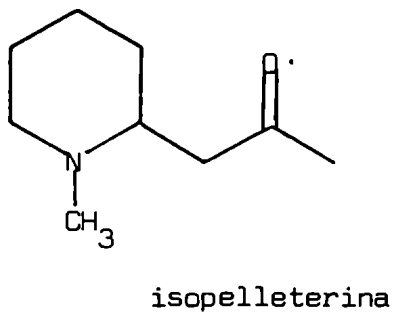
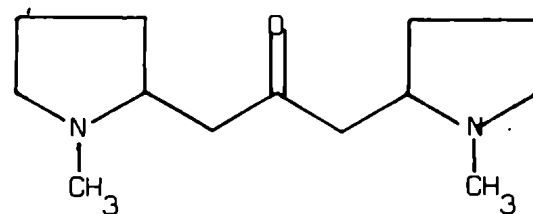
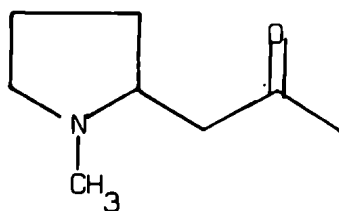
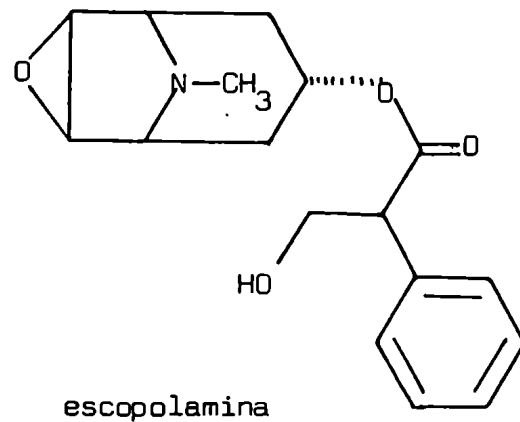
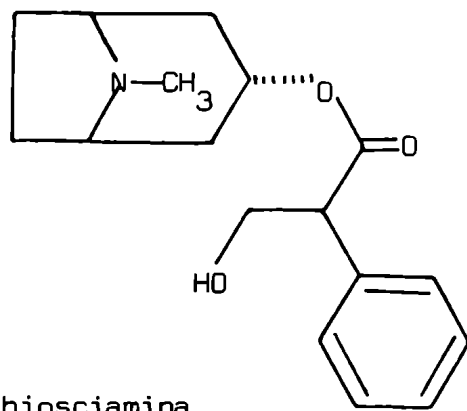
Alcaloides.

Las bases del tropano son características de esta familia, se las encuentra en todas las tribus y en casi todas las subtribus (19, 20), al igual que las bases pirrolidínicas (por ejemplo higrina y cuscohigrina, Fig. 3), con las que tienen origen biogénico común, perteneciendo en conjunto a los metabolitos secundarios derivados de la ornitina (3).

Hace siglos que se conocen y utilizan las actividades farmacológicas o tóxicas de la especie Atropa belladonna o de las plantas del género Datura, que poseen alcaloides del tropano en abundancia, usadas para fines medicinales, narcóticos o criminales. Cada especie posee alcaloides característicos y por ello se diferencian en su acción. Existen numerosos trabajos botánicos (21), farmacognósticos (22) y químicos (23), siendo estos géneros algunos de los más estudiados de las Solanáceas. Otros géneros con alcaloides del tropano son: Dunalia (24), Hyoscyamus (25), Latua (26), Mandragora (27), Nicandra (28), Physochlaina (29), Scopolia (30), Anthocercis (31) y Anthotroche (32). Los alcaloides más representativos de este grupo son hiosciamina y escopolamina, (Fig 3).

Otro grupo de alcaloides difundido en la familia son los derivados de la lisina (3). Lo constituyen compuestos piperidínicos y piridínicos, como isope- lleterina (33) y anabasina (34)(Fig. 3). El grupo de alcaloides del tabaco (Nicotiana tabacum), cuyo compuesto más representativo es la nicotina (Fig. 3), posee un núcleo piridínico y otro pirrolidínico.

Como se mencionó anteriormente, las plantas pertenecientes a la tribu Solaneae, tienden a la síntesis y almacenamiento de saponinas esteroidales, las que, cuando presentan propiedades básicas, se denominan alcaloides esteroidales. Estos compuestos presentan un amplio espectro de actividad biológica y son material de partida para la síntesis de hormonas esteroidales de uso terapéutico. Todas las partes de especies del género Solanum que poseen alto contenido de alcaloides esteroidales son tóxicas (3). Por otra parte, las saponinas básicas presentan propiedades antibióticas (35) y principalmente antimicóticas (36) (Fig. 3).



R= H, solanidina
(sapogenina básica)

R= azúcares
saponinas básicas

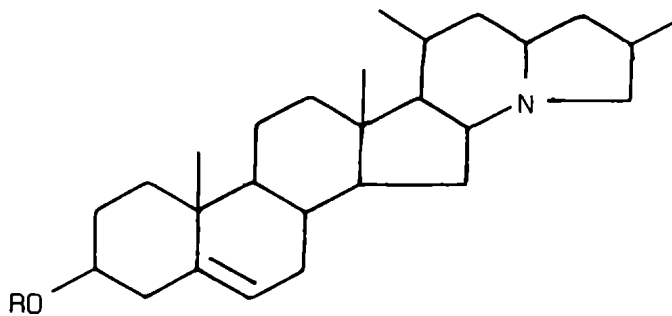


Fig. 3: Algunos ejemplos de alcaloides aislados de Solanáceas.

EL GENERO NIEREMBERGIA

Este género pertenece a la tribu Nicotianeae, en conjunto con los géneros Nicotiana, Petunia, Fabiana, Anthotroche, Latua, Combera, Pantacantha, Benthamiella y Bouchetia (2).

De las 25 especies del género Nierembergia, 21 crecen en Argentina y se han descrito diversas variedades (2).

La especie Nierembergia hippomanica Miers. (nombres vulgares: chucho, chuscho, chuschu o chuscmo) ha sido objeto de nuestro estudio debido a que se trata de una planta argentina tóxica para el ganado. Por otra parte, pese a ser una especie bien conocida e identificada, a la que se le habían hecho estudios toxicológicos y químicos a principios de siglo, no se habían identificado sus compuestos, así como tampoco se encontraban en la literatura, estudios fitoquímicos sobre ninguna otra especie del género Nierembergia.

Esta planta es una hierba perenne, de hojas lineales, flores violáceas y cápsula multiseeminada, originaria de Argentina, que crece en las provincias de Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero, San Luis, Córdoba, Mendoza, La Pampa, Buenos Aires, Río Negro, Corrientes y Entre Ríos.

El estudio químico de Nierembergia hippomanica se inicia en 1879, año en que Echegaray (37) aisló un glicósido de color blanco al que designó con el nombre de hipomanina.

Lavenir y Sánchez la estudiaron en 1906 (38) no encontrando ningún glicósido, pero sí un alcaloide al que denominaron nierembergina y además un colorante amarillo y dos resinas.

En 1915, Doering (39) retomó la investigación de esta especie, deseando aclarar la divergencia existente entre los dos estudios químicos anteriores, y llegó a la conclusión que Nierembergia hippomanica poseía tanto la hipomanina de Echegaray como la nierembergina de Lavenir y Sánchez, agregando que mientras la hipomanina era un componente específico y característico de la planta, la nierembergina pertenecía probablemente al grupo colino-betaínico.

Desde entonces, la única otra referencia química acerca de Nierembergia hippomanica, corresponde a los Dres. Comín y Gros, que en 1967 informaron la presencia del alcaloide hordenina en esta planta (40).

En cuanto a su actividad, ya en el año 1898, el botánico Spegazzini sostenía que las especies del género eran venenosas, especialmente para el ganado que las desconocía (41). Pero el primer investigador que realizó pruebas toxicológicas de la planta en cobayos, es Morgante en 1935 (42) describiendo desórdenes digestivos, disnea, decaimiento y desórdenes nerviosos, como por ejemplo espasmos tónicos, parálisis del tren posterior, rigidez en la nuca, prostración, hipotermia y muerte, presentando en la necropsia congestión y hemorragias en la mucosa gastrointestinal, y cerebro y meninges hiperhemiados.

En 1938, Sonzini Astudillo (43) estudió los efectos de la planta en conejos y perros observando disnea, bradicardia, orina y defecación abundantes, a veces pupila midriática, contracciones fibrilares de los músculos con temblores en todo el cuerpo y movimiento incoordinados y dificultosos, luego contracciones, convulsiones y muerte. También administró infusiones de la planta a gasterópodos, palomas y sapos, observando decoloración en estos últimos.

Ragonese en 1955, publicó, por último, una revisión de los datos químicos y toxicológicos sobre Nierembergia hippomanica (41) hasta ese momento, exponiendo algunas ideas sobre la profilaxis y el tratamiento (meramente sintomático) de esta intoxicación.

La toxicidad máxima correspondería al comienzo de la brotación hasta el momento de la floración (43).

CAPITULO II

COMPUESTOS TERPENICOS

PARTE 1 : TRITERPENOS PENTACICLICOS

ESQUELETOS BASICOS

Los triterpenos pentacíclicos son un amplio grupo de productos naturales derivados de la ciclación del escualeno, con distintas distribuciones de sus treinta carbonos en cinco ciclos y variadas funcionalizaciones, que se han aislado de las más diversas fuentes vegetales (44, 45) (Fig.4).

Con el transcurso de los años, a medida que aparecían nuevas estructuras que correspondían a las propiedades de los triterpenos pentacíclicos, se hicieron muchos intentos de racionalizarlos en grupos de compuestos relacionados, que permitieran el estudio y ubicación de futuros miembros del grupo.

Una primera distinción los separa claramente de los triterpenos tetracíclicos, compuestos terpénicos también de treinta carbonos, pero con un esqueleto tipo ciclopentanoperhidrofenantreno y cadena lateral, con propiedades similares a las de los esteroides.

Un modo simple pero superficial de clasificarlos, que responde a su comportamiento físico y químico, se basa en el grado de funcionalización y oxidación de la molécula, por ejemplo, triterpenos pentacíclicos saturados, Δ^n -insaturados, monohidroxilados, dihidroxilados, ácidos, etc.

Otra manera más interesante y lógica de clasificarlos es según sus esqueletos básicos, originados por la migración biosintética de los metilos del núcleo y/o contracción del anillo E. Este esquema útil y muy difundido, asigna a cada esqueleto nombres convencionales, derivados de la especie donde un compuesto de ese grupo fue aislado por primera vez, por ejemplo ursano, proviene de ácido ursólico, aislado de Arctostaphylos uva-ursi (46), y la nomenclatura de los compuestos pertenecientes a ese grupo tiene la raíz urs-.

A medida que se aislaban estructuras nuevas, se les asignaban nombres vulgares, lo que hacía más compleja la introducción en la familia. Por ello, fue necesario, distinguiendo las cualidades accidentales de las esenciales, crear para ellos un sistema de clasificación y nomenclatura (47).

Este sistema (47) aplica el prefijo neo para la serie análoga de compuestos con el anillo A contraído a cinco carbonos y el prefijo friedo a los esqueletos con base oleanano o ursano, con migración de metilos.

Así, (Fig. 4), el D: friedo oleanano (migración del metilo de C-14 a C-13) es el esqueleto llamado taraxerano, el D:C friedo oleanano (migración anterior y además migración de metilo de C-8 a C-14) es el multiflorano, mientras el resultado de igual migración sobre el esqueleto ursano (D:C friedo ursano) es el bauerano. El D:B friedo oleanano (migraciones anteriores y además migración del metilo de C-10 a C-9) es el llamado glutano y el D:A friedo oleanano (migraciones anteriores y además migración de metilo de C-4 a C-5) es el friedelano. Otros esqueletos, como el gammacerano y el taraxastano, son nombres base de sus correspondientes series.

Entre los compuestos con el anillo E contraído, los esqueletos base son hopano, lupano y arborano. Estos también forman series friedo por migraciones, por ejemplo, E: friedo hopano, E:C friedo hopano (esqueleto conocido como fernano), E:B friedo hopano, etc. (Fig. 4).

Esta nomenclatura incluye estructuras donde aun no se han hallado ejemplos de productos naturales. Las estructuras conocidas de triterpenos pentacíclicos naturales han sido recopiladas en varias publicaciones (44, 45, 48).

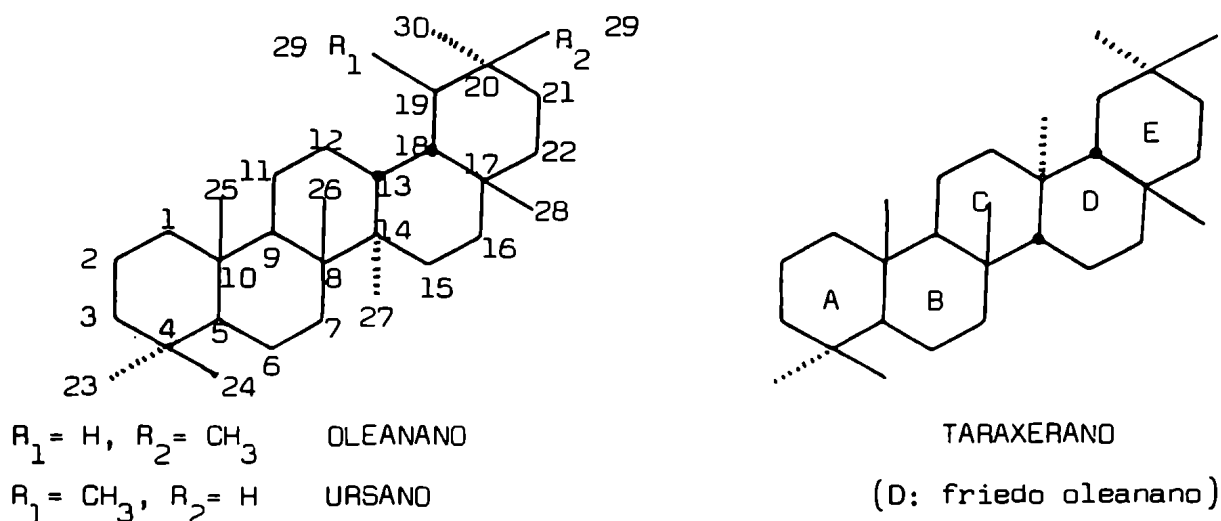


Fig 4: Principales esqueletos básicos de triterpenos pentacíclicos (continúa)

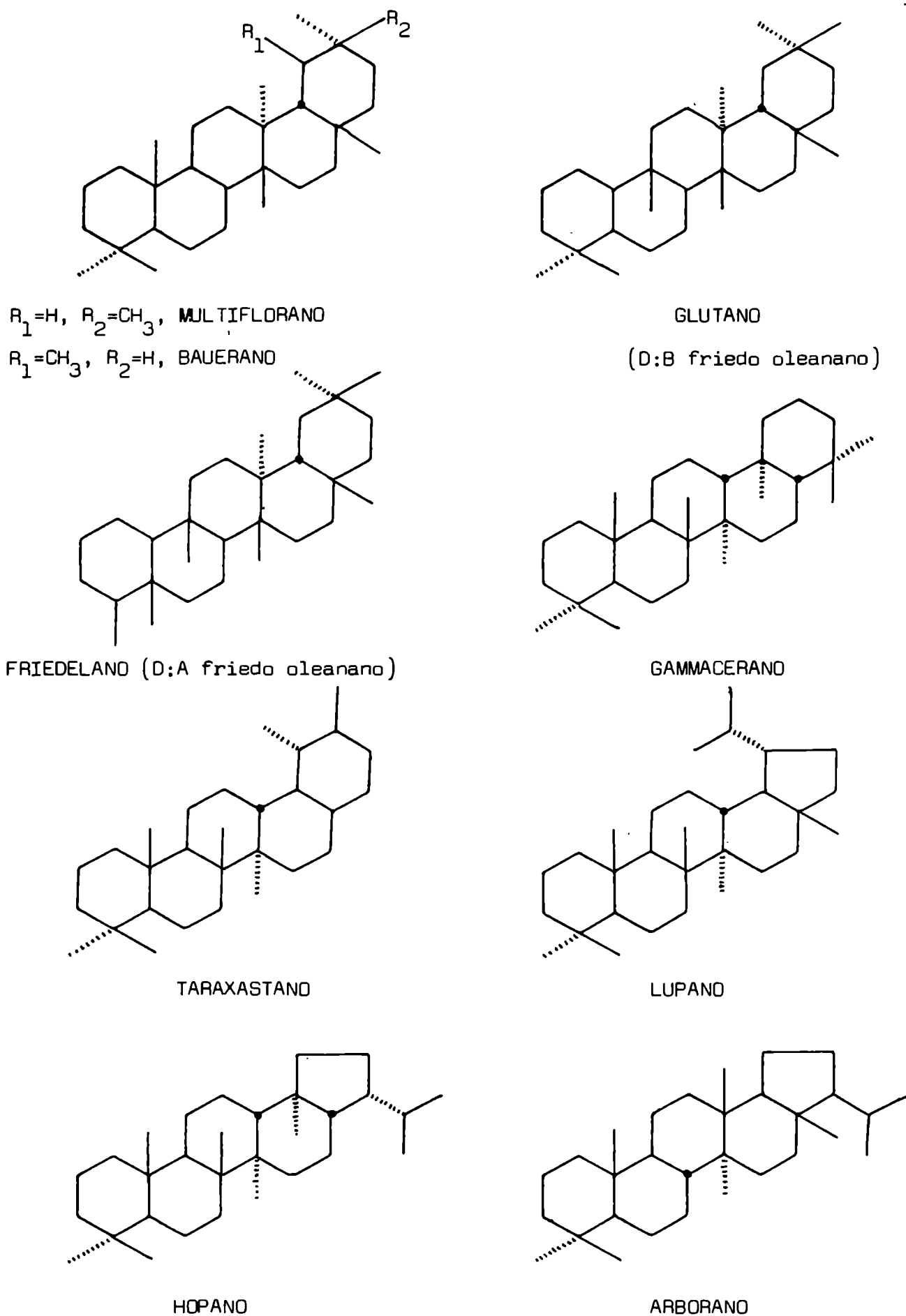


Fig. 4: Esqueletos de triterpenos pentacíclicos (continuación)

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS APLICADOS A LA ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS

a) Espectrometría de masas.

Esta técnica espectroscópica tiene una enorme importancia en la elucidación estructural de los triterpenos pentacíclicos. Como ocurre en otros sistemas policíclicos, la funcionalización de los anillos dirige las rupturas dando fragmentos con valor de diagnóstico ya que, la presencia de un grupo funcional en determinado punto de la molécula, altera drásticamente el esquema de fragmentación. Las masas de los iones indican la sustitución de los anillos implicados. Con el dato del M^+ , del pico base y de algún otro ión importante, se puede acotar, en la mayoría de los casos, el esqueleto más probable, la ubicación de un doble enlace u otro grupo funcional en los anillos y la sustitución con, por ejemplo, hidroxilo, metilo, hidroximetilo, carboxilo, éster o lactona, en distintas posiciones de la molécula.

Budzikiewicz y Djerassi publicaron en 1963 (49) un estudio sistemático de las rupturas de los compuestos conocidos hasta ese momento, donde demostraban lo dicho anteriormente, agrupando los mismos según el esqueleto y/o la funcionalización que les daba comportamientos comunes en la espectrometría de masas. A partir de ese trabajo, esta técnica se convirtió en un arma poderosa para la elucidación de estas estructuras.

No hubo hasta 1981, otros intentos de correlacionar los datos de espectrometría de masas de las nuevas sustancias aisladas. En este año, Ogunkoya (50) revisó los datos del trabajo de 1963 y a la luz de muchos más espectros de masas registrados en 16 años, intentó presentar generalizaciones para la rápida identificación de los tipos estructurales y completar el trabajo de Budzikiewicz y Djerassi, esencialmente correcto, con los nuevos ejemplos disponibles.

Se describirá a continuación cómo afecta al espectro de masas de los triterpenos pentacíclicos la presencia de ciertas funcionalizaciones características

Esqueleto de oleaneno o urseno sin reordenamiento.

Δ^{12} -oleanenos y ursenos.

Budzikiewicz y Djerassi (49) establecieron fehacientemente la naturaleza de la principal fragmentación de estos compuestos, característica e indicativa de esa estructura.

Consiste en la reacción de retro Diels Alder del anillo C permaneciendo la carga en la porción del dieno (Fig. 5). La exactitud de la asignación surge del hecho que distintas sustituciones de los anillos A y B no cambian la masa del fragmento, mientras que alteraciones de los anillos D y E, dan los correspondientes desplazamientos de la masa del pico (ión I).

La siguiente fragmentación de este ión es la pérdida del sustituyente angular de C-17, que si es distinto de metilo origina el pico base (ión II).

En la siguiente tabla se consignan ejemplos de los iones I y II:

	R_1 (C-17)	Ión I	Ión II
α -amirina	$-\dot{\text{C}}\text{H}_3$	218 (PB)	203
uvaol	$-\text{CH}_2\text{OH}$	234	203 (PB)
triacetato de 2 α -hidroxiuvaol	$-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$	276	203 (PB)
ursolato de metilo	$-\text{COOCH}_3$	262	203 (PB)
diacetato de 30-hidroxi- β -amirina	$-\text{CH}_3$	276 (PB)	261 5%
21-ceto oleanato de metilo	$-\text{COOCH}_3$	278	217

Tabla I: Iones I y II (Fig. 5) en algunos triterpenos pentacíclicos.

Los mismos autores (49) propusieron mecanismos para el origen de varios iones de estos compuestos (Fig. 5), pero los fragmentos claves para determinar que un triterpeno pentacíclico pertenece al grupo de los Δ^{12} -oleanenos o ursenos, corresponden a m/e 218 (o este valor adicionado a las masas de los grupos funcionales simples que pueden estar sustituyendo los anillos D y E) y el ión originado por la pérdida del sustituyente de C-17, el cual aparece a m/e 203 si no existe otro sustituyente en los anillos D y E.

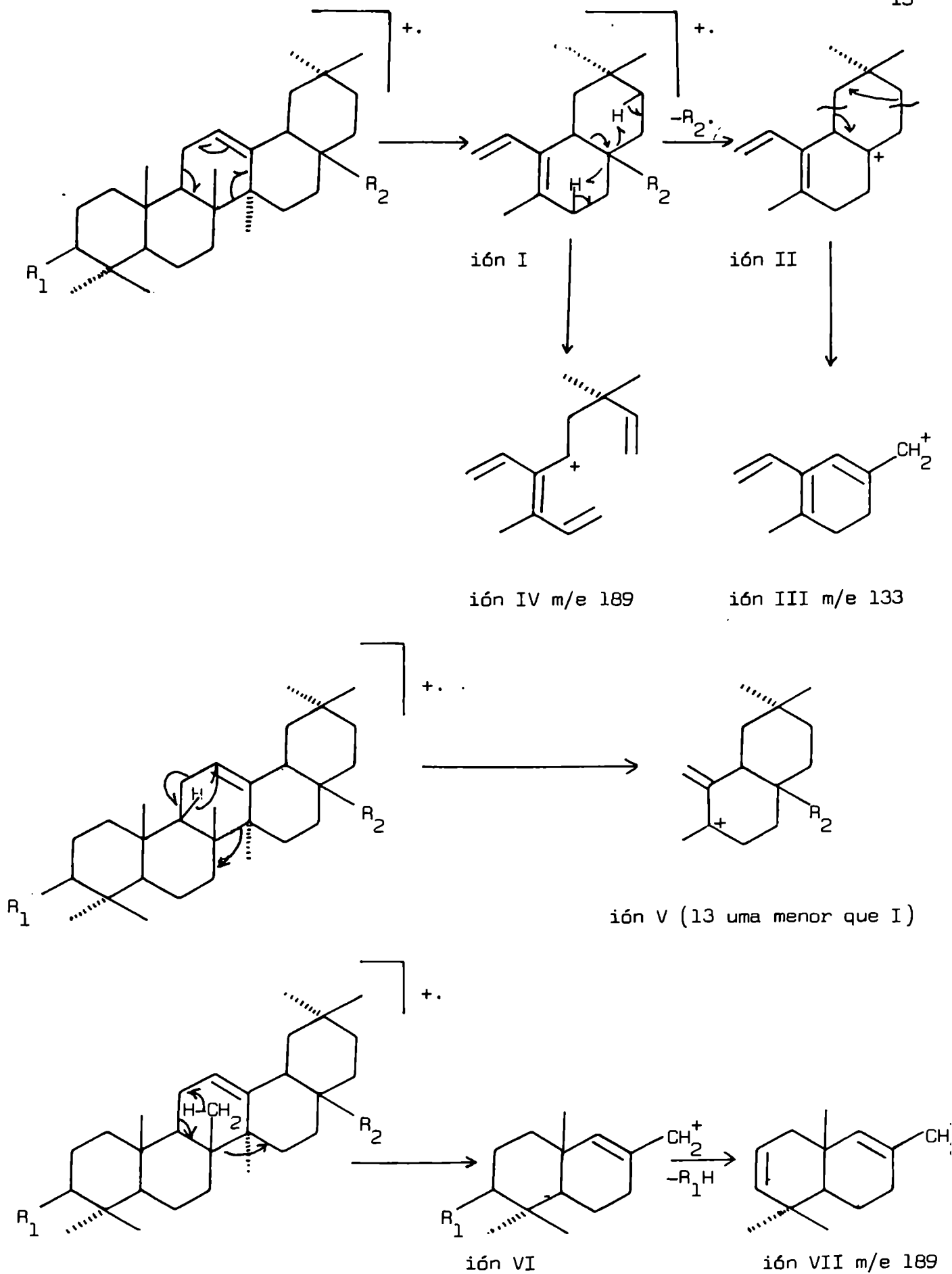


Fig. 5: Fragmentaciones principales de Δ^{12} -oleanenos y ursenos.

Este esquema de rupturas se mantiene aunque cambie la sustitución de los anillos, siempre y cuando el cambio tenga lugar lejos de la zona central de la molécula que dirige la fragmentación principal. Por ejemplo, no afectan las rupturas anteriormente discutidas las sustituciones en el C-3, en los metilos de C-4 o C-20, en los C-6 y C-7 o el cambio de sustituyente en C-17.

Tampoco afecta la presencia de un carbonilo en posiciones 21, 16 o 19, pero un carbonilo en C-15 o en C-11, domina de tal modo las rupturas que estas prevalecen a la reacción de retro Diels Alder, como se observa en la Fig. 6, para 15-ceto eritrodíol y glicirretato de metilo (11-ceto-30-carbometoxi- β -amirina).

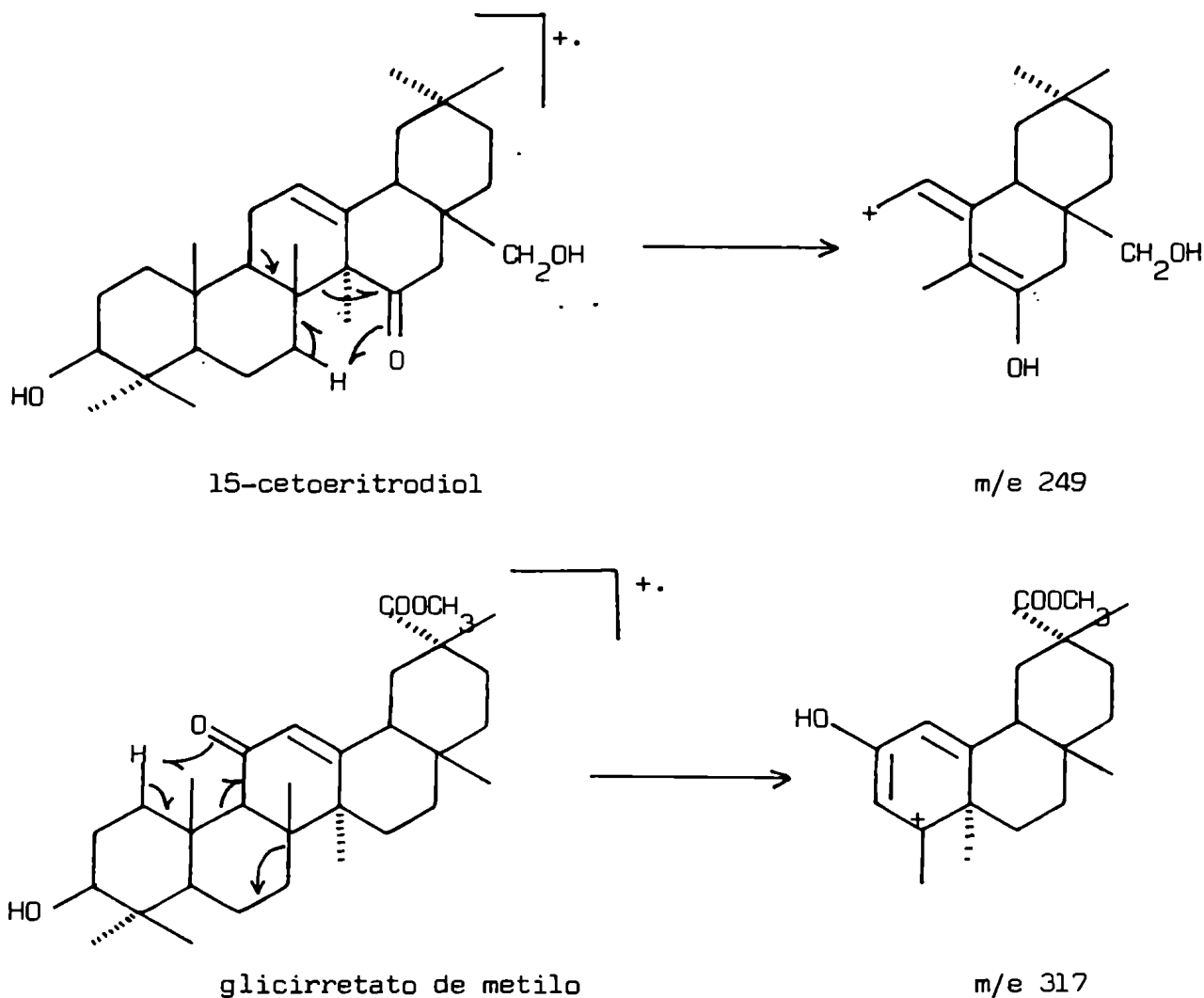


Fig. 6: Efecto de la presencia de carbonilo en C-11 o C-15 en la fragmentación de Δ^{12} -oleanenos y ursenos.

Esqueletos de oleaneno o urseno con el doble enlace en otras posiciones.

El doble enlace tiene importancia en la dirección de la fragmentación principal sólo en la medida en que se encuentra en las cercanías del anillo C. En caso contrario, aun produciendo algún fragmento característico, las rupturas originadas por el doble enlace no son las más importantes, y si faltan otros grupos funcionales que dirijan la fragmentación, la molécula se rompe análogamente a las de los triterpenos saturados (49, 50).

Son ejemplos característicos los compuestos del tipo Δ^{18} -oleaneno (49), Δ^5 -D:8 friedo oleaneno (50), los $\Delta^{20(21)}$ -taraxasterenos, etc. (Fig. 7).

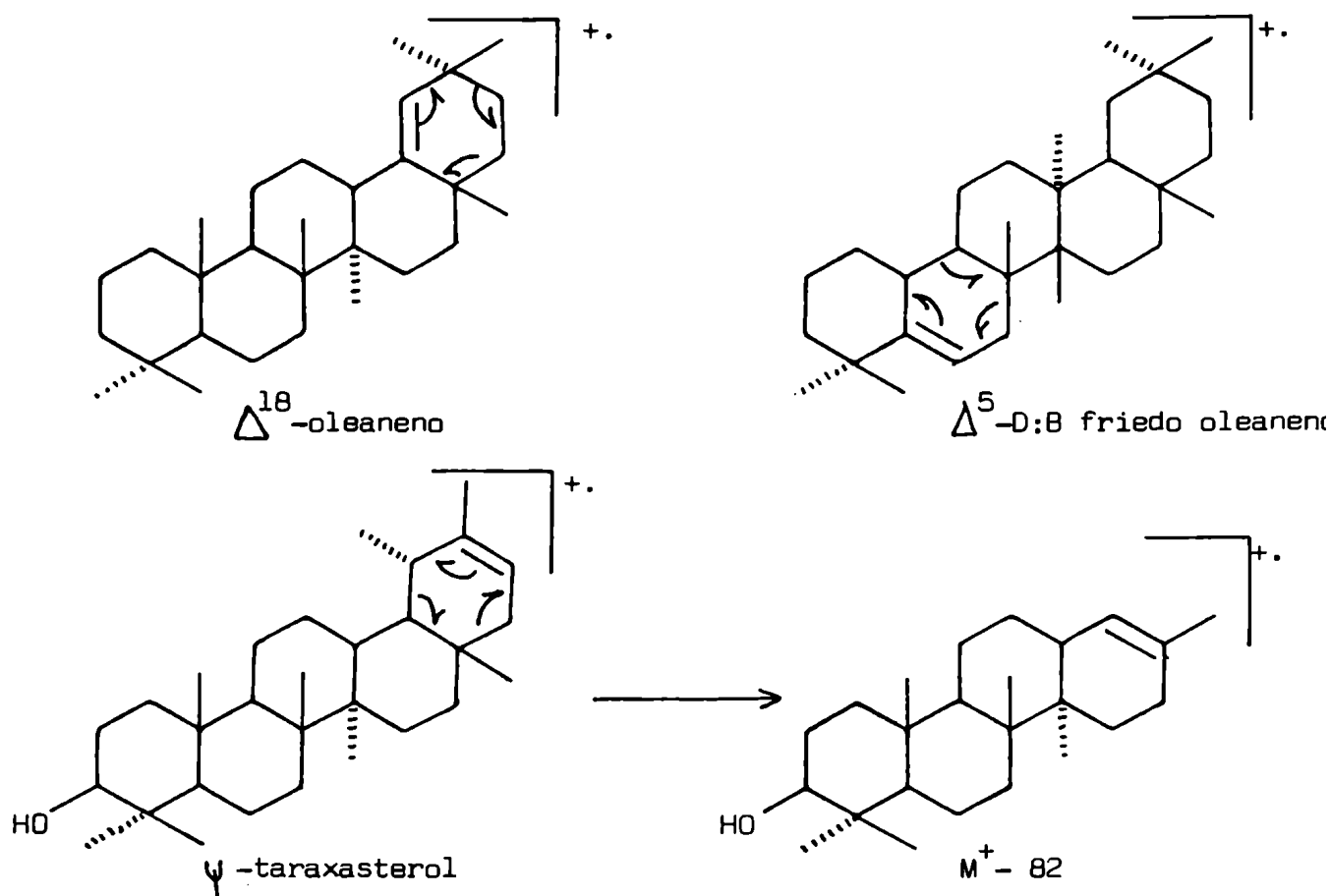


Fig. 7

Para el doble enlace en cualquier posición puede generalizarse que, en su espectro de masas, estará favorecida la eliminación de los metilos activados alílicamente y, siempre que sea posible, ocurrirá una reacción de retro Diels Alder (49, 50).

Efecto de las transposiciones de esqueleto en la espectrometría de masas.

El caso que vale la pena remarcar, es el de los esqueletos D:C frito olea-
nanos y ursanos, en los que la presencia de metilos en C-13 y C-14, en la unión
de los anillos C y D, influye tan característicamente en el esquema de fragmen-
tación, que distintas ubicaciones del doble enlace sólo cambian las abundancias
relativas de los fragmentos.

Las rupturas ocurren como era de esperar, alrededor de la unión de los ani-
llos C y D, por ser la zona de mayor tensión estérica.

Las masas correlacionadas de los ejemplos encontrados en literatura para es-
te tipo de compuestos, muestran que todos ellos poseen picos importantes a
M-179, M-167, 205 y 218, con abundancias variables, en sus espectros de masas
(50). Se observa en la siguiente figura (Fig. 8) el origen de los dos últimos.

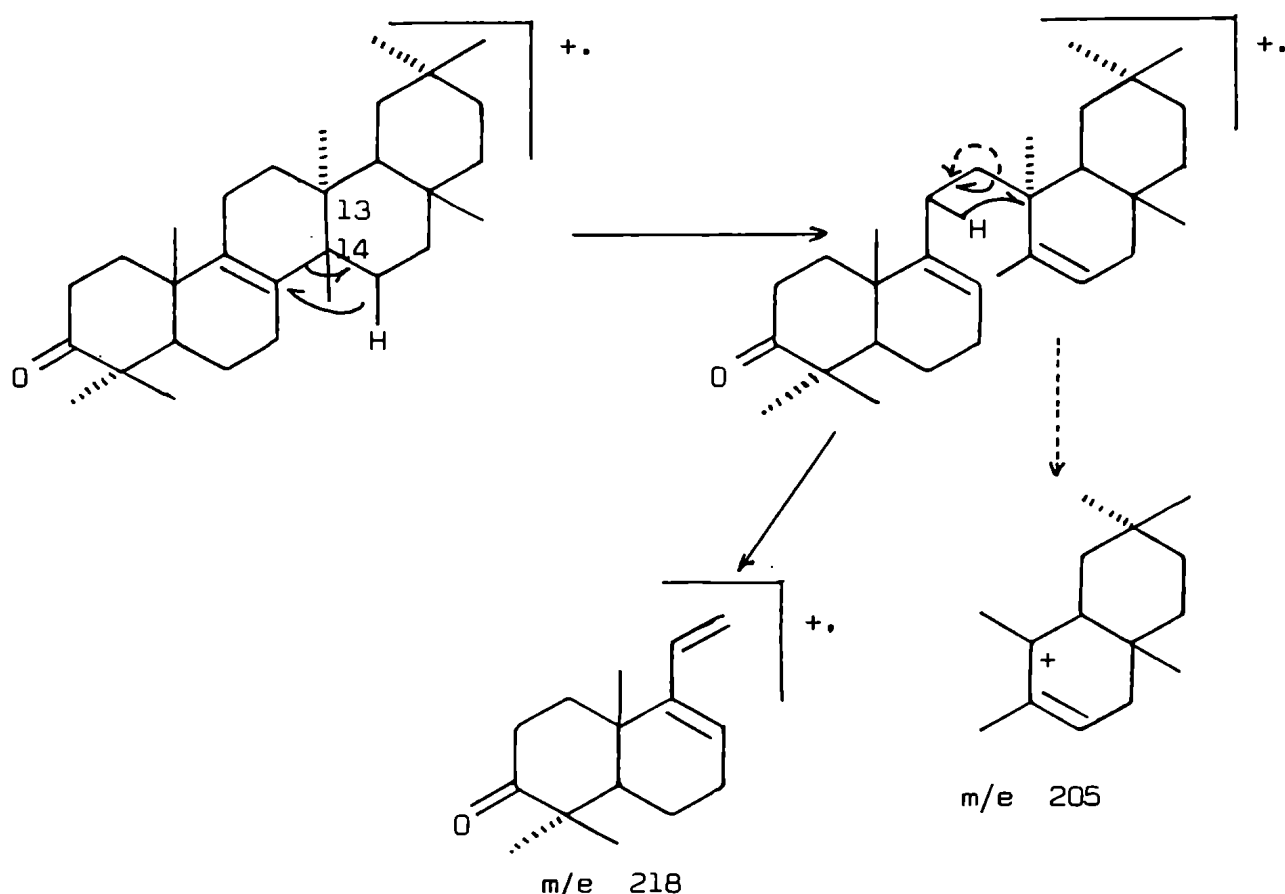


Fig.8: Mecanismos de algunas rupturas en isomultiflorenona (esqueleto D:C frito olea-
naneno).

b) Espectroscopía de ^1H -RMN de triterpenos pentacíclicos.

Las características generales del espectro de ^1H -RMN de un triterpeno pentacíclico se asemejan a las de un esteroide. En ambos casos, un gran número de protones de la molécula, que corresponden a los metilenos y metinos que forman los ciclos de estos compuestos, resuenan a frecuencias muy semejantes y por no ser equivalentes se acoplan entre sí, dando una señal compleja, sin valor elucidatorio pero característica, entre 1,5 y 2,5 ppm aproximadamente.

Cuando la funcionalización de los ciclos hace que algún metino o metileno se desproteja y resuene a campos más bajos, se puede identificar su señal separada del resto y tiene valor para la elucidación estructural. Los protones olefínicos también se distinguen claramente.

Otro tipo de protones de estas moléculas son los ocho metilos o sus equivalentes biogénicos. En general son angulares (terciarios) y aparecen como singuletes. En el esqueleto ursano, que tiene dos metilos secundarios, la señal de los mismos es un multiplete complejo tipo AB_3 , por perturbaciones de segundo orden. El grupo isopropilo de los esqueletos lupano, hopano y arborano, se distingue claramente en ciertas moléculas como dos dobletes. Los metilos sobre doble enlace aparecen desplazados a campos más bajos y al igual que otros metilos de ésteres metílicos, metil éteres, metil cetonas y acetilos naturales o derivados, se localizan fácilmente por su desplazamiento químico característico (51).

La asignación de las resonancias de todos los metilos tiene valor elucidatorio porque al estar ubicados a través de todo el esqueleto de la molécula, cualquier modificación en la sustitución, causa los correspondientes cambios en los desplazamientos químicos de los metilos de su entorno, tal como se había observado en el caso de los esteroides (52).

Para la asignación de las señales se han usado, entre otros recursos, los desplazamientos debidos al uso de un solvente anisotrópico en la realización del espectro (52) o el uso de reactivos de desplazamiento como los compuestos del europio (53). Consideraremos a continuación la aplicación de estos recursos en la asignación de los metilos de un triterpeno pentacíclico.

Correlación de las señales de los metilos.

Varios autores, que lograron por diversas técnicas la asignación total de los metilos de distintas series de triterpenos pentacíclicos, encontraron correlacionando esos valores, una aceptable constancia en la influencia de determinado sustituyente en una dada posición, sobre los metilos de su entorno y que estos desplazamientos eran aditivos en primera aproximación.

Por otra parte, la sustitución de los anillos A y B no tenía prácticamente influencia sobre los valores de resonancia de los metilos de los anillos D y E, y viceversa, por lo que los valores podían extrapolarse a otras estructuras parcialmente semejantes.

Karliner y Djerassi (54) estudiaron la asignación de los metilos del hidrocarburo Δ^{12} -oleaneno, recurriendo a la deuteración de algunos de ellos y haciendo especulaciones sobre los restantes. Tursch, Savoie y Chiurdoglu (55), revisaron y completaron esa asignación por examen de una nueva serie de derivados y comparación crítica con los datos de literatura para el anillo A en 4,4'-dimetilesteroides. En el mismo trabajo, se presentaban tablas de correlación sobre el efecto de cada sustituyente en los metilos del Δ^{12} -oleaneno, tomado como esqueleto base, que se podían aplicar en la predicción de nuevos espectros (Tabla 2). En el mismo año, Kodama y Surogawa (56), corroboraron los resultados de Tursch, por medio de la deuteración selectiva de los metilos 23 y 24.

Cheung y Williamson (57) estudiaron los valores de las señales de los metilos en triterpenos pentacíclicos oxigenados en las posiciones 2, 3 y 23, con varios ejemplos de esqueletos ursano, oleanano y lupano. Hallaron que, aparte de diferencias menores, los efectos de un sustituyente dado en determinada posición, son iguales para Δ^{12} -ursenos y Δ^{12} -oleanenos, y mutuamente intercambiables. En cambio, para el lupano y derivados, estructuralmente diferentes, corresponde un nuevo grupo de valores, que ellos dedujeron en varios derivados basándose en la asignación parcial previa que habían realizado Lehn y Ourisson (58) sobre lupano y $\Delta^{22(30)}$ -lupeno.

Tabla 2: Incrementos sobre los valores de resonancias de los metilos de Δ^{12} -oleaneno, por diferentes sustituciones (frec. en cps referidas a 60 MHz.)

Sustituyente	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27	C-28	C-29	C-30
3 β -OH	+7,0	-2,0	+0,5	+1,0	0,0	+0,5	0,0	0,0
3 β -OAc	0,0	+3,0	+1,0	0,0	0,0	0,0	+0,5	+0,5
3-ceto	+13,0	+13,0	+8,5	+5,5	+0,5	+0,5	0,0	0,0
19 α -OH	-0,5	0,0	-0,5	0,0	+6,5	?	+2,5	+2,5
28-COOCH ₃	-0,5	-0,5	-1,0	-15,5	0,0	-	+2,5	+3,0
28-COOH	-1,0	-0,5	-1,5	-14,0	0,0	-	+2,5	+2,5
29-COOH	-0,5	0,0	-0,5	0,0	0,0	?	-	+22,0
29-OH	0,0	-0,5	0,0	+0,5	0,0	?	-	+2,0
Δ^{12} -oleaneno	53,0	50,5	56,5	59,0	69,0	50,5	53,0	53,0

Si se quiere predecir el espectro de un compuesto dado, se hace uso de la aditividad de los efectos de los sustituyentes sobre el esqueleto base.

Veamos, por ejemplo, el cálculo de los desplazamientos químicos de los metilos en el metil éster del ácido oleanólico (3 β -hidroxi-28-carbometoxi- Δ^{12} -oleaneno).

	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27	C-28	C-29	C-30
Δ^{12} -oleaneno	53,0	50,5	56,5	59,0	69,0	50,5	53,0	53,0
3 β -OH	+7,0	-2,0	+0,5	+1,0	0,0	+0,5	0,0	0,0
28-COOCH ₃	-0,5	-0,5	-1,0	-15,5	0,0	-	+2,5	+3,0
calc. en cps	59,5	48,0	56,0	44,5	69,0	-	55,5	56,0
calc. en deltas	0,99	0,80	0,93	0,74	1,15	-	0,92	0,93
observ.(deltas)	1,00	0,79	0,93	0,74	1,15	-	0,93	0,93

Como se observa, la predicción es muy buena.

Asignación de las señales por desplazamientos inducidos.

i) Por cambio de solvente:

Se conoce perfectamente (52) el efecto anisotrópico de un solvente aromático como benceno o piridina en el espectro de ^1H -RMN de un compuesto, por la protección o desprotección que produce sobre los protones vecinos a grupos polares, según la disposición que adopte el anillo aromático al solvatar ese grupo.

Este efecto ya había sido usado en esteroides (59, 60), mostrando su valor en la resolución de problemas estructurales, estereoquímicos y conformacionales.

Wilson y Williams, en 1969 (61), extendieron la aplicación de los desplazamientos por solvente al campo de la ^1H -RMN de triterpenos pentacíclicos. Con la asignación de los metilos del espectro en deuterocloroformo, discutida anteriormente, hicieron estudios de dilución, es decir, una serie de espectros con mezclas de cloroformo y benceno deuterados como solvente, para determinar los desplazamientos de los metilos por efecto del solvente. Estudiaron además, los desplazamientos de otros protones más desprotegidos, basándose en los criterios de asignación establecidos en modelos similares en esteroides.

Se usó entonces, la anisotropía del benceno, para probar las polarizaciones locales que existían en una molécula, porque en general, las nubes de electrones del solvente, tienden a evitar las zonas ricas en electrones y a buscar las áreas deficientes, indicando de este modo la proximidad de los protones a uno o más grupos polares. Los efectos observados se pueden racionalizar con el uso de modelos e hipótesis sobre la conformación más probable.

Por ejemplo, en presencia del grupo $3\beta\text{-OH}$, el $\text{H-}3\alpha$ sufre un desplazamiento a campos más altos en el espectro en benceno. Sin embargo en el espectro en benceno del derivado acetilado, el $\text{H-}3\alpha$ aparece desapantallado respecto al espectro en cloroformo. Esto sugiere que la función acetato, se encuentra con el $\text{H-}3\alpha$ axial, eclipsado por el carbonilo de ese grupo, en la conformación más probable. En esa situación, los protones del $\text{CH}_3\text{-}24$ muestran un apreciable desplazamiento a campos más altos, por encontrarse detrás del plano del carbonilo, siendo apantallados por las moléculas que lo solvatan (61).

En los compuestos investigados que poseen el sistema γ -lactona, el protón del grupo $=\text{CH}-\text{O}-\text{CO}-$, muestra un desplazamiento a campos más altos en benceno, en consecuencia, estos protones ecuatoriales unidos al puente lactónico, se distinguen fácilmente de los axiales unidos al mismo carbono que el acetato por su desplazamiento opuesto por solvente. Este efecto puede aplicarse sistemáticamente para resolver la zona entre 4,0 y 5,7 ppm cuando hay superposición de protones metínicos de acetato y de lactona (Fig. 9).

En presencia del 3-ceto, los metilos 24 y 25 son apantallados por benceno y el metilo 23 prácticamente no se afecta. Estos desplazamientos inducidos ayudan a distinguir entre los tres metilos, cuyas resonancias en deuteriocloroformo son muy similares.

El metilo 27, homoalílico en compuestos Δ^{12} -insaturados, presenta un desplazamiento a campos más altos cuando en las cercanías existen sustituyentes polares, por ejemplo en compuestos con 11-ceto, 16-ceto, lactona C-21 β C-28, lactona C-15 β C-28, etc. En otros casos se desplaza muy poco (61).

Los protones más desprotegidos en el espectro en benceno, pueden indicar la vecindad a dos grupos polares, porque estos aumentan el impedimento estérico y la densidad electrónica de su entorno, de modo que la nube de electrones del benceno evita la región.

Se ejemplifica en la siguiente molécula los efectos discutidos anteriormente

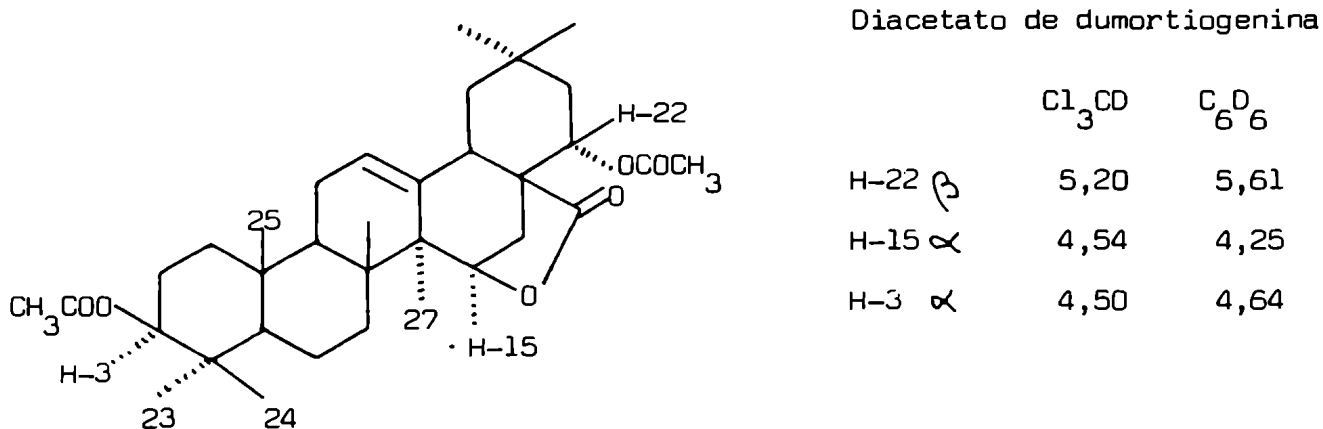


Fig. 9: Desplazamientos inducidos por benceno en ^1H -RMN de diacetato de dumortigenina.

Podemos apreciar en el diacetato de dumortigenina cómo el metino 15α , geminal a un hidroxilo lactonizado, se desplaza a campos más altos en C_6D_6 , mientras que el metino 3α , geminal a un hidroxilo acetilado, sufre un desplazamiento a campos bajos en el mismo solvente. Además, el H-22, cercano a dos grupos polares voluminosos, presenta un mayor desapantallamiento en benceno.

En derivados del lupano con grupo funcional en C-20, los metilos 29 y 30 son los que aparecen a campos más bajos en el espectro en Cl_3CD . En consecuencia se observan con facilidad los desplazamientos a campos más altos de estos metilos por efecto de solvente. Se observó que en presencia de un grupo lactónico, probablemente por asociación del benceno al carbonilo, son de magnitud considerable (0,3 a 0,6 ppm) (61). Así, por ejemplo, en diacetato de betulina y acetato de turberogenina (Fig. 10), ambos con metileno en C-30 pero el segundo con lactona C-21 β C-28, los protones del metilo de C-29 se protegen en benceno, pero más intensamente en el compuesto que posee el anillo lactónico.

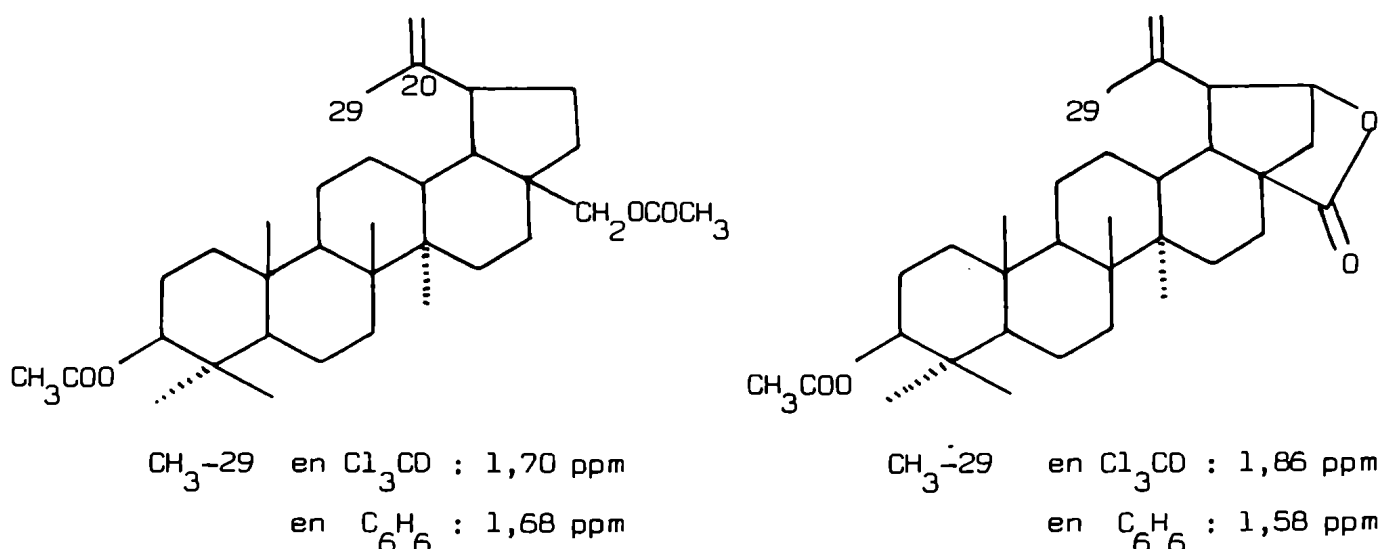


Fig. 10: Comparación entre los desplazamientos en benceno del metilo 29 en diacetato de betulina y acetato de turberogenina.

ii) Por uso de reactivos de desplazamiento para ^1H -RMN.

Es bien conocida la habilidad de los lantánidos para producir la dispersión de señales en ^1H -RMN de alcoholes (62). Los derivados de europio demostraron además ser particularmente valiosos en el campo de los triterpenos pentacíclicos, sobre todo en la asignación de sus metilos.

Previamente había quedado demostrada, la relación directamente proporcional que existe entre los desplazamientos químicos del colesterol y la concentración de tris(dipivalometanato) de europio, $(\text{Eu}(\text{DPM})_3)$, con dos moléculas de piridina, en la solución con la que se realiza el espectro (63). La asociación del complejo metálico con el hidroxilo del colesterol y el desplazamiento paramagnético de los protones distantes hasta 13 Å del complejo coordinado, sin ensanchamiento de señales, lo hacían conveniente para su uso como reactivo de desplazamiento.

Trabajos posteriores (64), demostraron que el espectro realizado con el reactivo sin el aducto de piridina, mostraba un efecto cuatro veces mayor para iguales concentraciones en el caso del colesterol. Otros grupos funcionales como cetonas y ésteres, daban complejos más débiles con el reactivo (64), pero las aminas eran tan fuertemente afectadas como los alcoholes. En el mismo trabajo se demostraba cómo los metilos de C-4 del lupeol, cercanos al punto de coordinación, resultaban intensamente desprotegidos (64).

Demarco y Lewis (65) aplicaron el $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ al estudio de friedelan-3 β -ol. En su espectro normal en Cl_3CD , este compuesto no ofrecía ninguna información, pues sus ocho metilos resonaban entre 0,4 y 1,2 ppm. La adición de $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ producía una distribución de señales en un rango de 20 ppm, que se asignaron desde campos bajos hacia campos altos, según su proximidad a la función alcohólica complejada. El H-3 α estaba a más de 20 ppm del TMS y excepto su señal, ninguna presentaba ensanchamiento significativo y se asignaron sin dificultad.

Buckley, Green y Taylor (53) generalizaron el estudio de los desplazamientos con $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ en triterpenos pentacíclicos, estableciendo las pautas de trabajo con el propósito de facilitar la comparación. Ellos normalizaron los resultados de los desplazamientos obtenidos con soluciones 0,1 M del triterpeno y

del $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ en Cl_3CD a $28,5^\circ$, tomando como δ 10,0 el desplazamiento químico "normalizado" de la señal a campos más bajos y las restantes, respecto a ella. Los estudios demostraron además que en una concentración del triterpeno entre 0,025 y 0,1 M, y del reactivo entre 0,05 y 0,1 M, con temperaturas entre 20 y 50° , los valores normalizados obtenidos aun eran aceptables con fines comparativos.

Los resultados indican que, como las diferencias estructurales de los distintos esqueletos de triterpenos pentacíclicos residen sobre todo en la posición de los metilos que se sitúan más o menos alejados del punto de coordinación en posición 3, cada tipo presenta características definidas y reproducibles en el conjunto de los valores normalizados de resonancia de sus metilos.

Se pueden diferenciar además los alcoholes 3α o 3β por producir distintos esquemas de señales para los metilos 4α , 4β y 10β . Igualmente se evidencia la configuración del metilo de C-8, mientras que el rango de valores para el metilo de C-14 es tal que, hasta este punto de las investigaciones, no permite establecer si es α o es β .

En la Tabla 3, se presentan algunos valores que ejemplifican lo discutido hasta ahora y muestran las diferencias observadas en los valores normalizados según el tipo de esqueleto y a la serie, $3\alpha\text{-OH}$ o $3\beta\text{-OH}$ a la que pertenezca.

Con estos valores puede determinarse rápidamente el número de metilos y la distancia en que se encuentran del OH-3, pero para estudios más detallados, se recomienda la realización de estudios a distintas concentraciones para eliminar la posibilidad de solapamiento de las señales.

Los resultados de la Tabla 3 muestran que mediante este método pueden distinguirse los esqueletos de triterpenos pentacíclicos que presentan diferencias en los metilos de los anillos A y B principalmente, o sea en la región cercana al punto de unión del reactivo de europio. Así, por ejemplo, los valores normalizados de los metilos son diferentes en friedelanos, glutanos y oleananos y se observa la ausencia de metilo en C-8 para bauerananos y multifloranos (esqueletos Fig. 4). La mayor influencia está dada por la configuración del OH de C-3 ya que ésta determinará la estereoquímica del complejo con él formado.

Tabla 3: Valores normalizados de desplazamientos químicos en ppm respecto al TMS, en espectros registrados a 100 MHz para soluciones 0,1 M del triterpeno y del Eu(DPM)₃ en Cl₃CD a 28,5°C (53).

<u>Triterpenos de la serie 3 β-OH</u>									
	4 β -CH ₃	4 α -CH ₃	10 β -CH ₃	9 β -CH ₃	8 β -CH ₃	14-CH ₃			
Lupeol	10,0	9,4	4,8	—	2,7	1,9			
Taraxasterol	10,0	9,5	4,6	—	2,7	1,9			
Germanicol	10,0	9,5	4,8	—	2,7	1,6			
β -amirina	10,0	9,5	4,7	—	2,6	1,9			
α -amirina	10,0	9,5	4,6	—	2,5	1,8			
Multiflorenol	10,0	9,4	4,4	—	—	1,9			
Epiglutinol	10,0	9,8	—	3,0	—	2,3			
Oleanato de metilo	10,0	9,6	4,6	—	2,8	2,3			
<u>Triterpenos de la serie 3 α-OH</u>									
	4 α -CH ₃	4 β -CH ₃	5 β -CH ₃	10 β -CH ₃	9 β -CH ₃	8 β -CH ₃	14-CH ₃		
Epilupeol	10,0	5,2	—	4,1	—	2,5	1,6		
Epi- β -amirina	10,0	5,4	—	4,4	—	2,7	2,2		
Epi-germanicol	10,0	5,3	—	4,2	—	2,7	1,5		
Glutinol	10,0	6,1	—	—	4,0	—	2,5		
Friedelanol	10,0	—	9,7	—	3,6	—	2,5		

c) Espectroscopía de ^{13}C -RMN de triterpenos pentacíclicos.

Como en los restantes tipos de compuestos, el espectro de ^{13}C -RMN, una vez asignado, se convierte en un elemento importantísimo para la elucidación estructural. En el caso de los triterpenos pentacíclicos, la asignación de por lo menos treinta carbonos, en su mayoría semejantes, resultaba un problema difícil pero era muy importante resolverlo no sólo desde el punto de vista estructural sino también desde el biosintético.

Doddrell et al. (66) en 1974, en un primer estudio sobre esqueletos de Δ^{12} -oleanenos y ursenos, llegaron a la conclusión que la espectroscopía de ^{13}C -RMN era el mejor método para distinguir entre estos dos esqueletos isoméricos y detectar en un producto natural de una serie, la contaminación con el correspondiente de la otra. Primeramente, surge que en la serie Δ^{12} -oleaneno hay siete carbonos cuaternarios mientras que en la serie del Δ^{12} -urseno hay seis, por lo tanto, con cualquier técnica de desacople, se obtienen distintos espectros (esqueletos, Fig.4, pág. 11).

Además se halló que los desplazamientos químicos de los carbonos olefínicos 12 y en especial el 13, servían de diagnóstico ya que, en general, en los Δ^{12} -ursenos, el C-12 está desapantallado alrededor de 2 ppm y el C-13, apantallado aproximadamente 5 ppm respecto del correspondiente Δ^{12} -oleaneno. Se puede generalizar que el C-13 aparece alrededor de 140 ppm en Δ^{12} -ursenos y en 144-145 ppm en Δ^{12} -oleanenos excepto en los casos en que existe sustitución en las cercanías del doble enlace 12(13). Los autores (66) lo explican por la proximidad del metilo 19 β (ecuatorial) al doble enlace en los Δ^{12} -ursenos con unión D/E cis y conformación normal silla-silla en estos anillos, dando así lugar a un efecto γ sobre C-13 y δ sobre C-12, aumentado por la rigidez del sistema (Fig. 11).

La fuerte dependencia estereoquímica se manifiesta en compuestos que tienen 19 α -OH (axial) o 19 β -OH (ecuatorial). Mientras el primer grupo prácticamente no influye en los valores de C-12 y C-13, los efectos del segundo son análogos a los de Δ^{12} -urseno respecto a Δ^{12} -oleaneno.

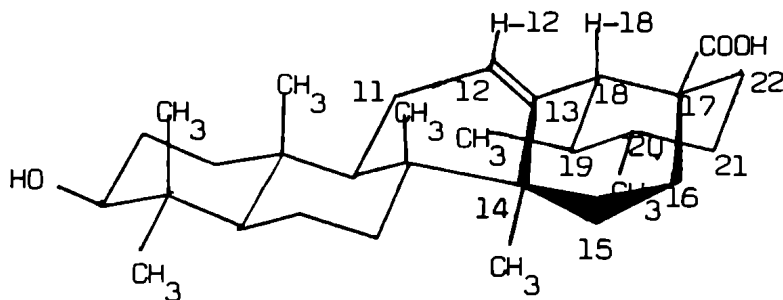


Fig. 11: Conformación de los anillos en ácido ursólico donde se observa la cercanía del metilo de C-19 (ecuatorial) a los C-12 y C-13.

. Otros carbonos que se pueden asignar con relativa facilidad, son los hidroxilados; se advierte la utilidad de esta técnica para determinar la posición y estereoquímica de la hidroxilación, problema que resulta difícil de solucionar por $^1\text{H-RMN}$ en moléculas muy hidroxiladas. La comparación entre distintos compuestos (Tabla 4) permite hacer asignaciones tentativas. Por ejemplo, respecto a la controversia sobre la configuración del OH-16, que aparece en muchos triterpenos, la espectroscopía de $^{13}\text{C-RMN}$, parece apoyar la asignación inicial de $16\ \alpha\text{-OH}$, que había sido realizada por métodos químicos y $^1\text{H-RMN}$. Con la configuración $16\ \alpha\text{-OH}$, la resonancia de C-16 se encuentra a campos considerablemente más bajos que en el epímero. Similarmente, se observa un desplazamiento notable a campos más bajos en la resonancia de C-19 cuando el OH-19 es α (axial) que cuando es β (ecuatorial) (66).

Un concepto que surge rápidamente del estudio de los espectros de estos compuestos es la fuerte dependencia estérica, con efectos γ y δ que pueden tener un valor considerable dada la rigidez de los anillos.

Tabla 4: Valores de resonancias de algunos carbonos, en espectros de $^{13}\text{C-RMN}$ de Δ^{12} -ursenos y oleanenos (δ_{C} , ppm respecto a TMS)

Serie Δ^{12} -urseno	C-12	C-13	Carbonos hidroxilados en el orden nombrado.		
3 β -ol	124,9	140,1	79,2		
3 β ,28-diol	125,3	139,9	78,5	69,4	
3 β , 2 α ,28-triol	124,8	139,5	83,6	68,5	68,5

Tabla 4: (continuación).

Serie Δ^{12} -oleaneno	C-12	C-13	Carbonos hidroxilados en el orden nombrado.		
3 β -ol	122,7	145,6	78,5		
3 β ,28-diol	122,7	145,1	78,5		69,3
3 β ,16 α ,28-triol	122,7	145,4	78,5	74,5	70,5
3 β ,16 β ,28-triol	122,6	143,9	77,9	66,6	68,9
3 β ,19 α -diol,17-COOCH ₃	123,8	144,3	78,1	81,0	
3 β ,19 β -diol,17-COOCH ₃	126,9	138,7	78,1	74,9	
3 β , 2 α ,28-triol	122,2	144,9	83,6	68,5	68,5

La asignación completa de los esqueletos de Δ^{12} -oleanenos y Δ^{12} -ursenos, para distintas sustituciones, fue publicada posteriormente por Tori *et al.* (67, 68). Fue lograda haciendo uso de las reglas conocidas de desplazamientos por sustitución, los efectos γ y δ (69), así como los acoplamiento indirectos $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ a larga distancia que exhibían algunos carbonos cuaternarios en experimentos de desacople parcial (técnica conocida como SFORD) que permitió su identificación. Por ejemplo, el C-14 presenta acoplamiento a larga distancia con el protón olefínico de C-12 y se observa como un doblete en un espectro de desacople parcial.

Otros elementos usados en la asignación total fueron la comparación compuesto a compuesto y el fenómeno de ensanchamiento de bandas de $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}=\text{}$ por asociación molecular, como resultado de la oscilación molecular más lenta y la relajación dipolar inducida aumentada, mientras que las señales de los carbonos cuaternarios y las de los metilos permanecían agudas. De este modo se determinó el número de hidrógenos unidos a cada carbono en la molécula (67, 68).

Luego de la asignación total, la comparación entre los compuestos de la serie oleaneno y urseno, revela interesantes diferencias adicionales a las enumeradas por Doddrell (66), que se consignan a continuación en una tabla comparativa (Tabla 5).

Tabla 5: Diferencias en los valores de resonancias de algunos carbonos entre dos compuestos de las series Δ^{12} -urseno y Δ^{12} -oleaneno respectivamente (δ_c , ppm respecto al TMS).

	C-11	C-12	C-13	C-18	C-19	C-20	C-27
Ursolato de metilo	16,9	125,5	138,0	52,8	39,1	38,8	23,3
Oleanato de metilo	23,1	122,1	143,4	41,3	45,8	30,6	26,0

En la serie Δ^{12} -urseno se advierte un cambio conformacional en el anillo E debido a la proximidad espacial del metilo de C-19 con C-12, C-13 y C-27 (Fig.11) Estos cambios están acompañados por cambios en los anillos C y D, que pueden ser responsables de ciertas diferencias no esperadas en las resonancias de algunos carbonos entre ambas series.

ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DE LOS TRITERPENOS PENTACICLICOS

Los triterpenos pentacíclicos no parecen mostrar una notable acción farmacológica, aunque sus glicósidos, que constituyen el grupo de las saponinas triterpénicas, tienen un amplio espectro de actividades tóxicas, hemolíticas, antibióticas y antimicóticas (48).

En cuanto a las agliconas más difundidas, algunos autores estudiaron su acción sobre el metabolismo, dada su relación estructural con los esteroides.

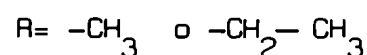
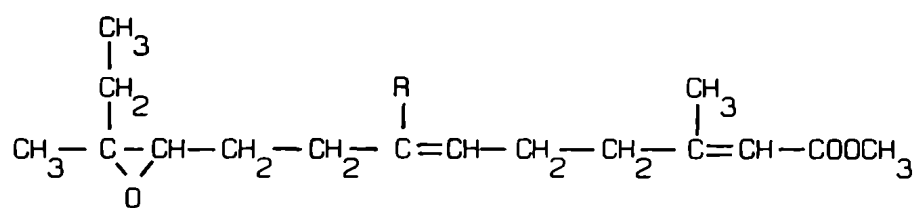
Wenzel y Koff (70) informaron que entre todos los triterpenos pentacíclicos estudiados por ellos, el ácido ursólico mostraba un marcado efecto en el balance electrolítico de ratas adrenalectomizadas, con acción similar a un mineralocorticoide. Los resultados no eran siempre reproducibles debido a problemas de absorción de los triterpenos.

PARTE 2 : ECDISTEROIDES

HORMONAS DE MUDA DE INSECTOS AISLADAS DE FUENTE VEGETAL

Los insectos sufren distintas transformaciones hasta llegar al estado adulto (larva-pupa-adulto) y este desarrollo discontinuo está perfectamente regulado por el balance de concentración de dos hormonas denominadas juvenil y de muda. Se ha logrado en gran parte conocer este proceso e identificar a los agentes.

La hormona juvenil es secretada por el órgano llamado "corpora allata" y promueve el desarrollo larval. Su estructura química corresponde a la siguiente fórmula (71):



La hormona mutante es secretada por las glándulas protorácicas del insecto ante el estímulo de la neurosecreción del cerebro. La naturaleza química de la hormona cerebral no ha sido aclarada aun, pero sí la naturaleza de la hormona mutante, que corresponde a una estructura esteroidal. Por ejemplo, la siguiente es la estructura de ecdisona, la primera hormona mutante conocida (72):

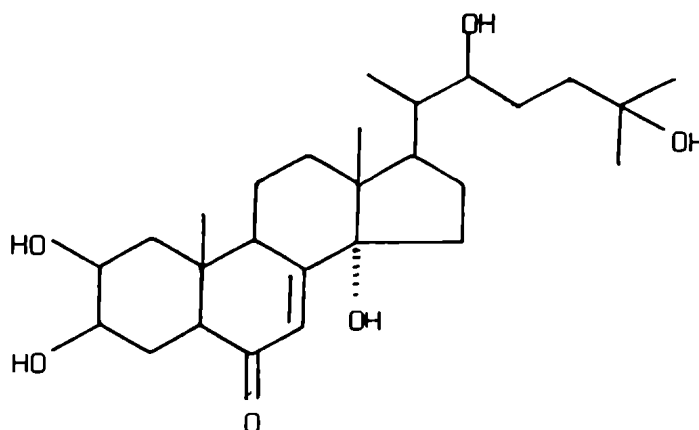


Fig. 12: Ecdisona, primera hormona de muda identificada.

El mecanismo de acción ha sido bien establecido para ecdisona y hay fuertes evidencias de que otras hormonas mutantes relacionadas actuarían del mismo modo: induciendo la expresión de loci específicos en los cromosomas del insecto, permitiendo así la síntesis de las enzimas específicas del proceso. En la larva de Calliphora erythrocephala, la ecdisona induce la síntesis de dopa-descarboxilasa, enzima de la biosíntesis de N-acetildopamina (71), responsable de la esclerotización de la cutícula del insecto. Esta hormona y 20-hidroxiectdisona (ecdisterona) fueron aisladas en pequeñísimas cantidades de toneladas de insectos y crustáceos y su estructura laboriosamente elucidada (73,74).

Pero, tiempo después, se encontró que también existían en cantidades considerablemente mayores en diversos vegetales. Además se identificaron un gran número de estructuras relacionadas, también con actividad mutante, con el esqueleto básico de ecdisona y diversas funcionalizaciones que se denominaron en conjunto ecdisteroides o bien fitoecdisteroides para remarcar su origen de fuentes vegetales.

Su función en las plantas vasculares se desconoce, pero también estarían implicadas en la morfogénesis (75). Se demostró que inhibidores de la biosíntesis de esteroides, interfieren en la reproducción de hongos y en la floración de las plantas superiores. Se ignora además si las hormonas de muda presentes en plantas tienen acción benéfica o adversa sobre insectos que se alimentan de ellas en su habitat natural.

La característica común de las hormonas de muda es el grupo Δ^7 -6-ceto-14-hidroxicoprostano, con sustitución con hidroxilos. Las estructuras conocidas varían en cuanto al número de carbonos, entre C_{27} y C_{29} , y además en el grado de hidroxilación, la configuración de los hidroxilos del núcleo y la cadena lateral.

Ecdisona:

Fue la primera hormona de muda identificada (72), y posteriormente su estructura fue totalmente estudiada por Hoffmeister(73) en una serie de trabajos.

Ha sido la hormona más estudiada en cuanto a su función, mecanismo de acción, biosíntesis y metabolismo, pero no es la más distribuída en el reino vegetal.

Su estructura fue confirmada por síntesis (76).

Ecdisterona (20-hidroxiecdisona) :

Aislada por primera vez de un crustáceo, se la denominó inicialmente crustecdisona (77) y fue estudiada espectroscópicamente (74, 77). Luego se la aisló de la pupa de la polilla del roble Antherea pernyi (78), del gusano de seda Bombix mori (79) y del gusano del tabaco Manduca sexta (80).

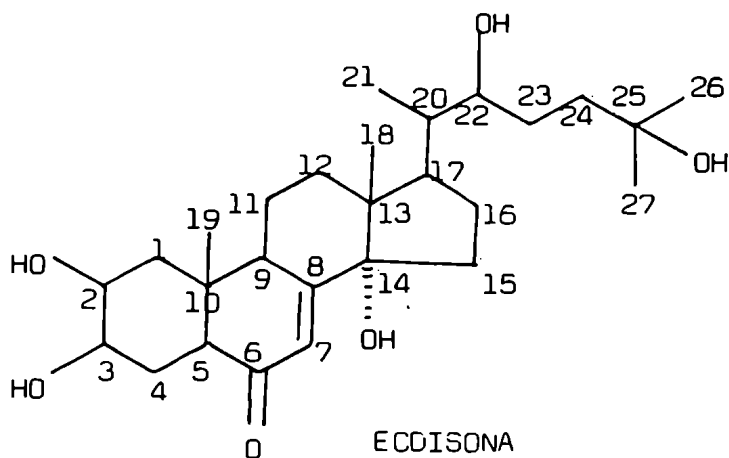
De fuente vegetal se la aisló de especies de Podocarpus (81, 82), de hojas de Ajuga japonica Miq. (83) y de otras especies de Ajuga, del helecho Polipodium vulgare (84), de semillas de "kaladana", una Convolvulácea clasificada como Ipomoea calonyction (85), de corteza de Stachyrus praecox (86), etc.

Parece estar mucho más distribuída entre los vegetales que ecdisona. Ha sido denominada β -ecdisona (79), crustecdisona (77), polipodina A (84), etc.

Es dos veces más activa que ecdisona en el test de Calliphora (87).

Otras estructuras de fitoecdisteroides:

Compuestos de C₂₇: se observa la numeración de los ecdisteroides en la estructura de ecdisona.



Ecdisterona: 20-hidroxiecdisona (74, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86).

Ponasterona A: 20, 22-dihidroxi-25-desoxiecdisona.

Ponasterona B: 2 α , 3 α -dihidroxi ponasterona A.

Ponasterona C: 2 α , 3 α , 5 β , 24 β -tetrahidroxi ponasterona A.

Estas ponasteronas han sido aisladas de Podocarpus nakaii (81, 88, 89).

Inocosterona : 2 β , 3 β , 14 α , 20(R), 22(R), 26-hexahidroxi-25(R)-coprost-7-en-6-ona y el epímero 25 (S) (90).

20, 26-dihidroxiecdisona (91).

5 β -hidroxiecdisterona (92).

Ajugasterona A= Polipodina B= 5 β -hidroxiecdisterona (93).

Ajugasterona C= 11 α -hidroxiponasterona A (83).

Estaquisterona C: Δ^{24} -ponasterona A (86).

Estaquisterona D: Con un éter cíclico de cinco miembros entre C-22 y C-25 (86).

Caladasterona: $\Delta^{9(11)}$ -ponasterona A (85).

Calonisterona: $\Delta^{5(6)}$, $\Delta^{8(9)}$, $\Delta^{14(15)}$ -7-ceto-6-hidroxiecdisterona (85).

Muristerona A: 5 β , 11 α -dihidroxi ponasterona A (85, 94).

7,8-dihidroecdisteroides:

Cheilantona A: 7,8-dihidroecdisona (95).

Cheilantona B: 7,8-dihidro-25-desoxiecdisona (95).

Compuestos de C₂₈:

Maquisterona A: 24-metilecdisterona (96).

Maquisterona B: 26-hidroxi-24-metilponasterona A o 24-metilinocosterona (97).

Compuestos de C₂₉:

Maquisterona C: 24-etilecdisterona= lamasterona (97, 98).

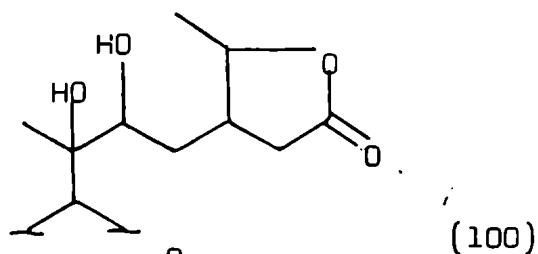
Maquisterona D: 24-(1-hidroxietil) ponasterona A (97, 98).

Ajugasterona B: 24-etil- $\Delta^{25(27)}$ -26-hidroxi ponasterona A (99).

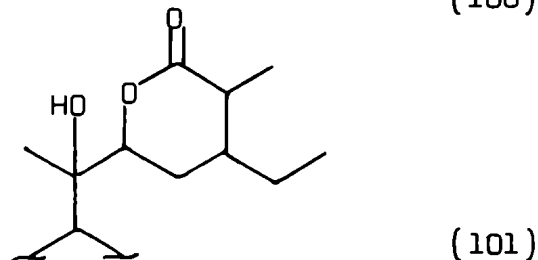
Amarasterona A: 24-etilinocosterona (71).

Amarasterona B: 24-(2-hidroxietil) ponasterona A (71).

Ciasterona : cadena lateral =



Capitasterona : cadena lateral =



Buscando nuevas fuentes de fitoecdisteroides, se diseñó un test rápido que consiste en sumergir larvas de Chilo suppressalis en el último estado larval, entre 5 a 10 segundos, en los extractos que se deseen probar y observar la esclerotización luego de 48 horas (102). Se probaron de este modo, más de mil especies tratando de abarcar una muestra representativa en una amplia distribución taxonómica (102).

De los resultados surge que es más fácil hallar fitoecdisonas activas en las Pteridófilas y las Gimnospermas que en las Angiospermas y dentro de esta última subdivisión, más probablemente en las Dicotiledóneas que en las Monocotiledóneas.

Entre las Dicotiledóneas, las plantas pertenecientes o relacionadas a las familias Amarantáceas y Verbenáceas, parecen ser buenas fuentes de estos compuestos. Entre las especies estudiadas, se menciona una Solanácea, Withania furtescens, mostró una buena actividad (102).

Es notable que entre las plantas activas sólo se encuentran las hierbas y árboles perennes y nunca las plantas herbáceas anuales (102).

Se probó además, cuando fue posible, la actividad en distintas partes de la misma planta, observándose que no está localizada.

En cuanto a su biosíntesis, se demostró en la planta Sesuvium portulacastrum (103) la incorporación de ácido mevalónico y colesterol en ecdisona y ecdisterona y la conversión de ecdisona en ecdisterona en el mismo vegetal. En plantas del género Podocarpus (104) también se demostró la incorporación de colesterol en ecdisterona. Entonces, se probó en esta especie, la incorporación de colest-

4-en-3-ona-4-¹⁴C (Fig. 13), ya que se conocía que, en animales, el pasaje de un Δ^5 -colesteno a un 5 β -colestano tenía como intermediario una Δ^4 -3-cetona. Sin embargo, en esta especie, no se halló incorporación, lo que indicaba que en la planta la biosíntesis de ecdisterona ocurriría por otro camino.

Acerca del mismo paso biosintético, se comparó posteriormente (105), el comportamiento de insectos del género Calliphora y de helechos del género Polypodium, respecto a la retención de la marca de (4 α -³H)- y (4 β -³H)-colesterol, como precursor de ecdisona y ecdisterona. Se observó que en insectos se retenía el H-4 α del colesterol en el producto de biosíntesis, mientras que en el experimento con (4 β -³H)-colesterol, los ecdisteroides no aparecían marcados. Se podía deducir entonces, que en el proceso que ocurría en estos insectos existía un intermediario Δ^4 -insaturado.

En helechos se obtuvieron ecdisteroides marcados a partir de los dos precursores y esta retención de ambas marcas demostró que en esta especie no hay intermediación de un compuesto Δ^4 -insaturado (Fig. 13).

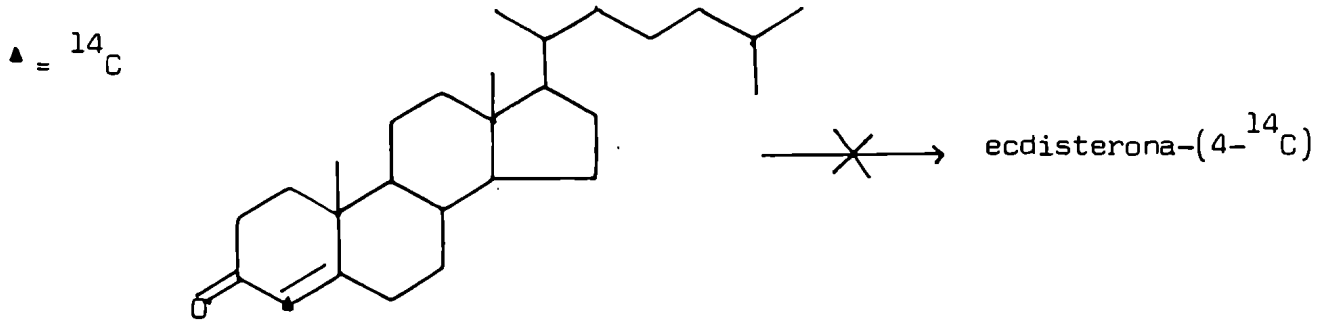
Otro aspecto estudiado de la biosíntesis de ecdisteroides fue la secuencia en que tenía lugar la funcionalización de los mismos. En insectos del género Calliphora (106) se halló que 3 β , 14 α -dihidroxi-5 β -(3 α -³H)-colest-7-en-6-ona (Fig. 13) era precursor de ecdisterona y ecdisona, es decir que esos grupos funcionales se formarían inicialmente. En Achyranthes fauriei (107) se probó que la hidroxilación de la cadena lateral de los ecdisteroides ocurriría en un paso posterior a la formación del sistema de los anillos A, B y C, ya que, el compuesto 2 β , 3 β , 14 α -trihidroxi-5 β -(3 α -³H)-colest-7-en-6-ona se incorporaba en igual magnitud en ecdisterona que en inocosterona, cuya cadena lateral está más hidroxilada (Fig. 13).

-En Sesuvium portulacastrum (103):

Acido mevalónico → → → colesterol → → → ecdisona → → → ecdisterona

-En especies del género Podocarpus (104);

colesterol → → → ecdisterona

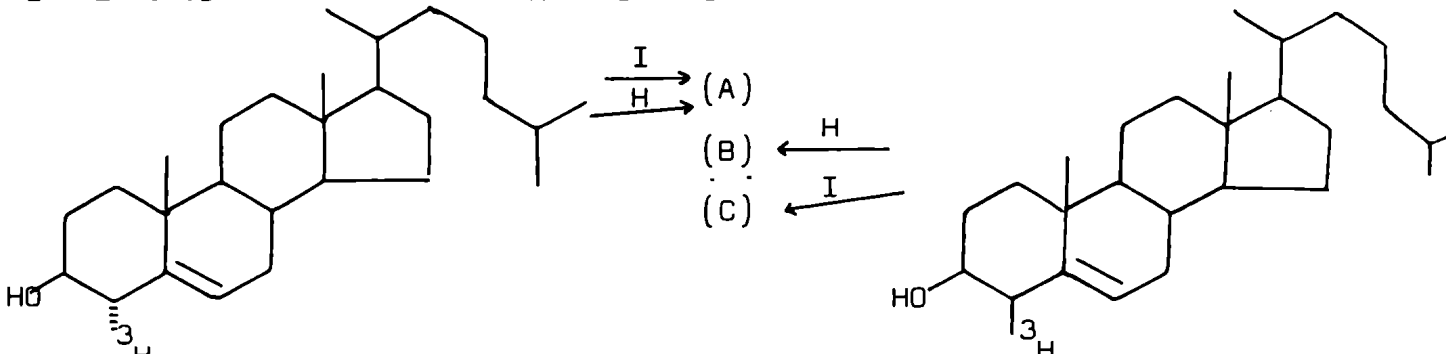


-En experimentos acerca del destino de los H-4 del colesterol (105):

(A) = (4α - ³H) ecdisterona (B) = (4β - ³H) - ecdisterona (C) = ecdisterona

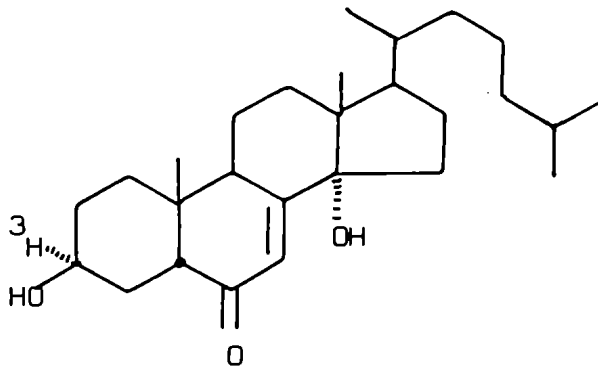
I = insecto

H = helecho

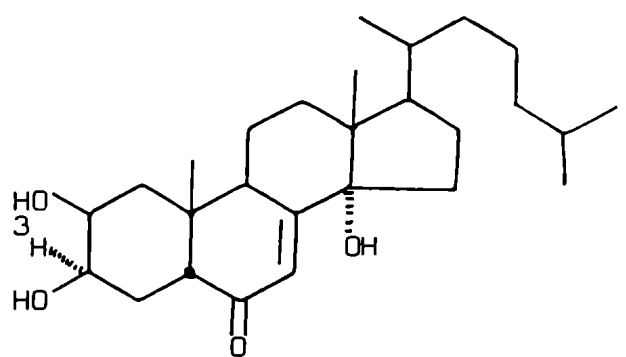


-En insectos del género Calliphora:

-En plantas del género Achyranthes:



(precursor de ecdisona y ecdisterona)



(precursor de ecdisterona e inocosterona)

Fig. 13: Algunas conclusiones acerca de la biosíntesis de ecdisteroides.

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS APLICADOS A LA ELUCIDACION ESTRUCTURAL
DE ECDISTEROIDES

a) Espectroscopía ultravioleta (UV)

Por su sistema Δ^7 -6-ceto (cetona α, β -no saturada), los ecdisteroides absorben la luz ultravioleta con un máximo entre 241 y 244 nm en metanol. Pero el sistema característico de estos compuestos, que es el grupo Δ^7 -6-ceto-14 hidroxí, se pone de manifiesto en el espectro ultravioleta realizado luego del calentamiento en etanol-ClH a 70°C durante 15 minutos, con la aparición de dos nuevos máximos a 248 y 295 nm, demostrándose por cromatografía en capa delgada la existencia de dos nuevos productos menos polares que el de partida (73). Este fenómeno se explica porque en medio ácido ocurre fácilmente la deshidratación del OH-14, terciario, con la formación de dos dienonas isoméricas (Fig.14

La absorción alrededor de 204 nm se asigna al sistema 8, 14-dieno (I) y la de 295 nm al sistema 7, 14-dien-6-ona (II). La absorción a 240 nm aumenta proporcionalmente al tiempo de calentamiento en ClH alcohólico y la reacción es característica de este grupo.

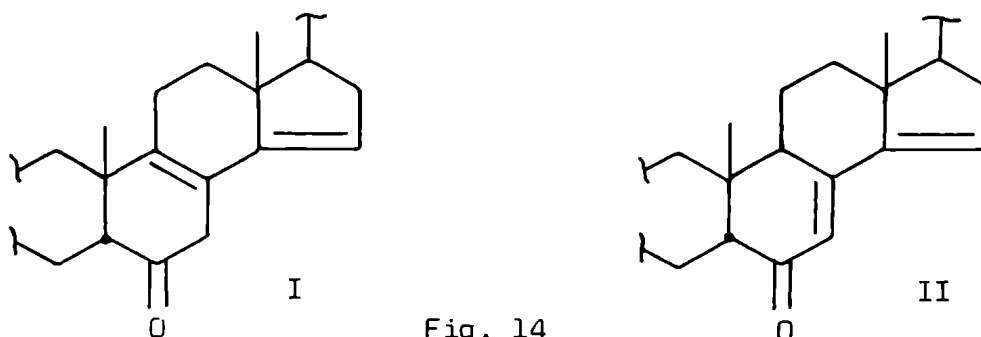


Fig. 14

Los compuestos cheilantonas A y B (95) que son 7,8-dihidroecdisteroides, no presentan, en consecuencia, absorción al UV. Otras ecdisonas con otros cromóforos además del 7-en-6-ona-14 α -hidroxí, presentan las correspondientes absorciones. Así en caladasterona (7,9-dien-6-ona) esta es 298 nm y en calonisterona (5(6), 8, 14-trien-6-hidroxí-7-ona) son 222, 244 y 294 nm (85).

b) Espectroscopía infrarroja (IR)

El espectro infrarrojo de los ecdisteroides se caracteriza por una intensa absorción debida a la tensión O-H, aproximadamente a 3500 cm^{-1} , de sus hidroxilos y una absorción a 1655 cm^{-1} , debida al carbonilo α , β -no saturado que resulta de la ν C=O más la ν C=C, no resuelta (73).

En el caso de 7,8-dihidroecdisona el carbonilo aislado absorbe a 1685 cm^{-1} . (95). El IR puede proveer información sobre otros grupos funcionales presentes en la molécula del ecdisteroide, por ejemplo, lactonas de 5 y 6 miembros, en capitasterona y ciasterona (100, 101).

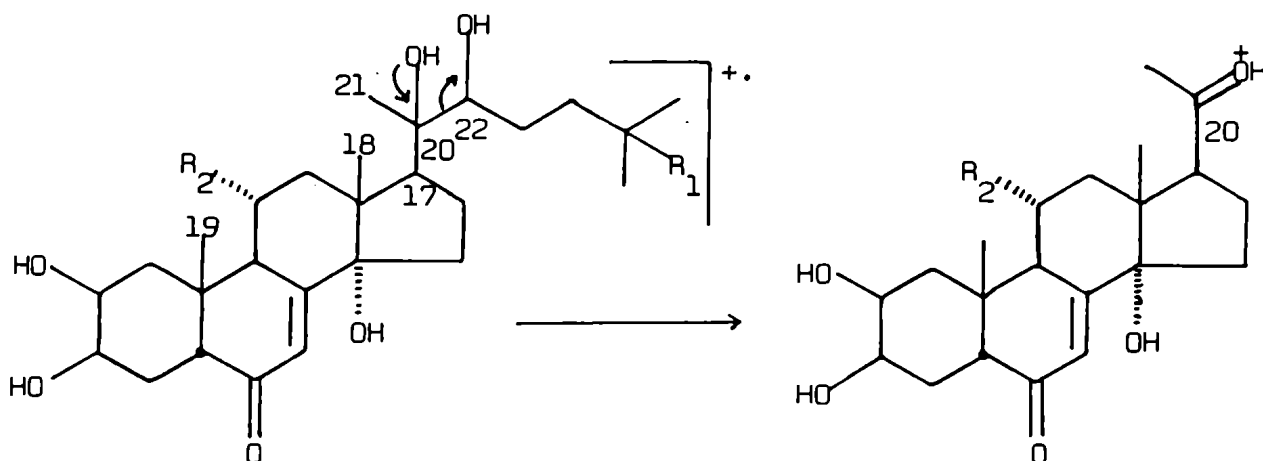
c) Espectrometría de masas

Resulta un arma poderosa para la elucidación de sus estructuras. El ión molecular puede observarse o no, pero a partir de él, se observan picos prominentes correspondientes a sucesivas pérdidas de 18 uma (H_2O) y también, a partir del M^+ y de los picos originados por las deshidrataciones, pérdidas de 15 uma por la fragmentación de los metilos angulares (74).

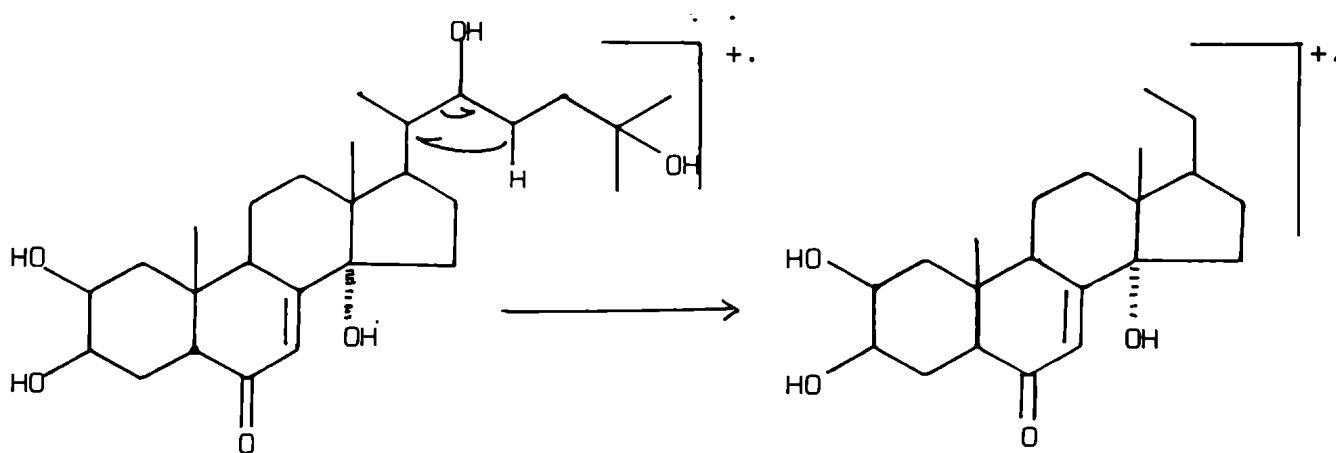
La ruptura principal corresponde a la pérdida de la cadena lateral, que ocurre por escisión del enlace 20-22 (Fig. 15). Si existen hidroxilos en ambas posiciones la ruptura es sin reordenamiento dando fragmentos impares que a su vez, sufren sucesivas pérdidas de 18 uma (77). Si no existe hidroxilo en C-20, como en el caso de la ecdisona (73), la ruptura es con reordenamiento de un H, originando fragmentos pares con las correspondientes pérdidas de 18 uma.

Todos estos fragmentos, abundantes, definidos y con su serie de pérdidas de agua, tienen gran valor de diagnóstico respecto a las modificaciones del núcleo, como se observa en la Fig.15, en la comparación entre ecdisterona y ajugasterona C o entre ecdisona y 7,8-dihidroecdisona.

En la zona de masas bajas se observan los fragmentos correspondientes a la cadena lateral y sus deshidrataciones, una de las cuales, (rupt. 20-22) -18, es usualmente el pico base del espectro. También son importantes los fragmentos de cadena originados por la ruptura del enlace 17-20 (83) y la del punto de ramificación de la cadena, si esta tiene metilo o etilo, como en el caso de los



	R_1	R_2	Iones correspondientes al núcleo después de la ruptura de la cadena (m/e)
Ecdisterona	OH	H	363-345-327-309
Ajugasterona C	H	OH	379-361-343-325



	Iones correspondientes al núcleo después de la ruptura de la cadena (m/e) :
ecdisona	348-330-300
7,8-dihidroecdisona	350-332-302

Fig. 15: Fragmentos del núcleo esteroideal en espectrometría de masas de ecdisteroides.

ecdisteroides de 28 o 29 carbonos (96, 97).

En la tabla 6 se consignan datos de m/e de fragmentos de cadena lateral obtenidos por diversos autores para distintas estructuras aisladas.

Tabla 6: Los valores entre paréntesis indican iones con intensidades menores del 5 %.

	<u>Rupt.20-22</u>	<u>Rupt.17-20</u>	<u>Otras rupturas</u>
Ecdisona (73)	(117)-99-81	145-127-109	
Ecdisterona (74)	(117)-99-81	(161)-143-125	
Ponasterona A (81)	(101)-83	145-127-109	
Ajugasterona C (83)	(101)-83	145-127-109	
20, 26-dihidroxiecdisona (91)	133-115-97	177-159-141-123	31(1,2-glicol)
Estaquisterona C (86)	99-81	(143)-125-107	69(rup.alfl.22-23)
Maquisterona A (96) _{C₂₈}	131-113-95	(175)-157-139-121	70(PB)
Maquisterona B (97) _{C₂₈}	131-113-95		43(PB)
Maquisterona C (97) _{C₂₉}	145-127-109	189-171-153-135	98(127-Et);84
Ciasterona (100) _{C₂₉}	157-139	201-183-165	
Capitasterona (101) _{C₂₉}	141	185-167	

De acuerdo con esta tabla se puede determinar la naturaleza de la cadena lateral con respecto al grado de hidroxilación y alquilación, por el valor de m/e del fragmento mismo, de los obtenidos por las subsiguientes deshidrataciones y rupturas en los puntos de ramificación. Así, la ecdisterona muestra los fragmentos indicados en la tabla para la ruptura 20-22 (Fig. 16), mientras que la maquisterona A, por poseer un metilo en C-24, además de la ruptura del glicol presenta el pico base m/e 70 originado por un reordenamiento de cuatro centros (Fig. 16).

En resumen, de la combinación de los datos de fragmentos del núcleo y la cadena lateral, se obtiene información acerca de la sustitución en ambas porciones que aunque no distingue isómeros, es clara y concluyente.

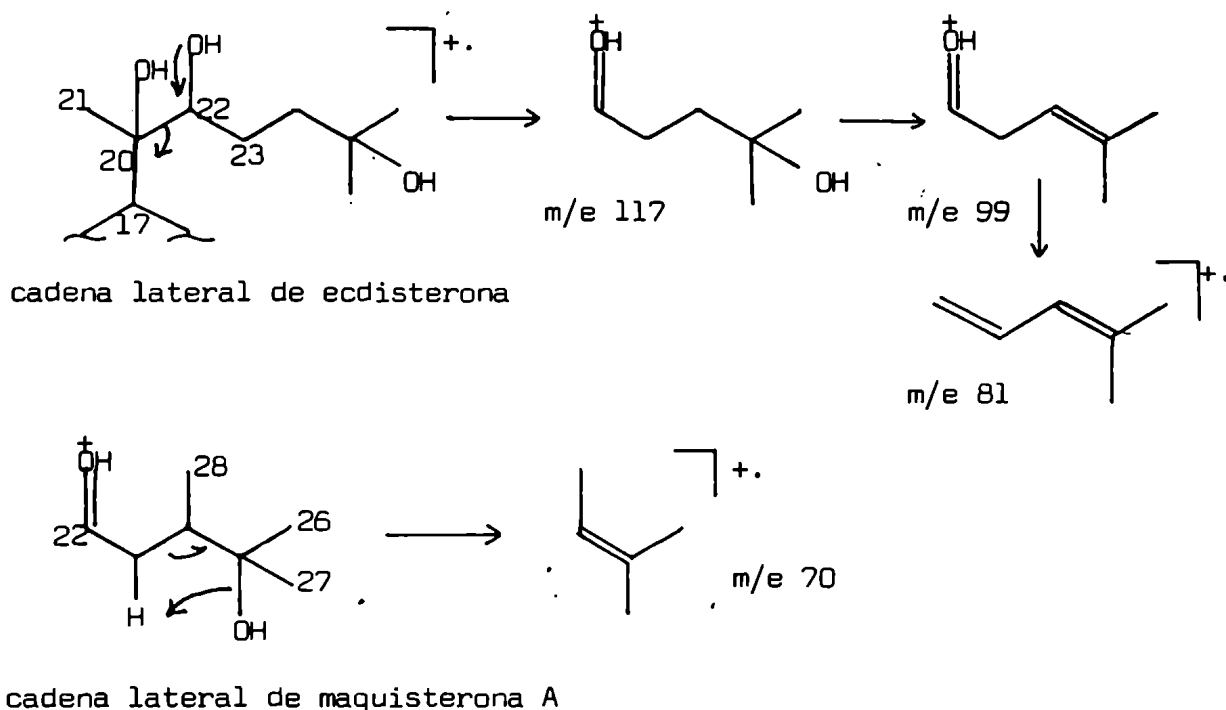


Fig. 16: Fragmentos de cadena lateral de algunos ecdisteroides.

d) Espectroscopía de ^1H -RMN

El espectro de ^1H -RMN de los ecdisteroides tiene el aspecto característico del de los esteroides, con los singuletes correspondientes a los metilos sobre el conjunto de las señales de los metilenos.

La mayoría de los espectros de ecdisteroides libres han sido realizados en piridina- d_5 , aprovechando la anisotropía del solvente, en el que las señales, y especialmente las de los metilos, quedan resueltas al distribuirse en un mayor rango de deltas. Se observa entonces claramente, la diferencia entre metilos secundarios, terciarios, unidos a un carbono que lleva un hidroxilo o sobre doble enlace, resonando en general entre 0,8 y 1,6 ppm.

Los desplazamientos químicos de los metilos dan las pautas de su cercanía a grupos polares, por ejemplo, el CH_3 -18 aparece a 0,74 ppm en ecdisona (73) y a 1,18 ppm en ecdisterona (79), evidenciándose la influencia del OH -20 en esta última. También el CH_3 -21, directamente unido a C-20, cambia naturalmente su desplazamiento químico y multiplicidad según exista o no hidroxilo en esa

posición: en ecdisona aparece como un doblete de $J = 6$ Hz en 1,21 ppm (73), en cambio en ecdisterona es un singulete a 1,56 ppm (77). Estos valores pueden generalizarse a todos los 20-hidroxi y 20-desoxiecdisteroides.

El CH_3 -19 (singulete) mantiene sus valores dentro de un rango más constante alrededor de 1,01-1,07 ppm, excepto en los casos en que exista un grupo polar en su entorno, por ejemplo, en ajugasterona C (83) (11α -hidroxiponasterona A) aparece a 1,27 ppm y en muristerona A (85) ($5\beta, 11\alpha$ -dihidroxiponasterona A) a 1,38 ppm.

Si hay un hidroxilo en C-25, la señal de CH_3 -26 y CH_3 -27 es un singulete en 1,37 ppm que integra para seis hidrógenos, aunque si el C-24 es asimétrico, estos dos metilos no resultan equivalentes y aparecen como dos singuletes cercanos en esa zona (74). Si no hay OH-25 su señal es un doblete de $J = 6$ Hz que integra para seis hidrógenos alrededor de 0,82 ppm (73, 88).

Las señales de sustituyentes alquílicos en la cadena lateral aparecen también en esta zona pero resultan de fácil interpretación (96).

En este solvente, el protón olefínico del sistema 7-en-6-ona, β, β -disustituido, aparece a 6,18 ppm como un doblete de $J = 2$ Hz por la partición alílica con el H-9 (81).

Otras señales identificables corresponden a los metinos α a hidroxilo y a carbonilo como en el caso de H-5.

Pero estas señales se observan con mayor claridad en el espectro de ^1H -RMN del derivado acetilado que se realiza en deuterocloroformo. La acetilación, que se lleva a cabo en condiciones usuales, acetila sólo los hidroxilos primarios y secundarios, pudiendo deducirse de la integración de las señales de metilo de acetato del espectro, el número de los hidroxilos acetilables en la molécula original.

Los metinos α a esos hidroxilos aparecen desplazados por la acetilación, lo que permite estudiar fácilmente sus constantes de acoplamiento (en muchos casos el dato registrado es el ancho de banda media, en multipletes no resueltos) y sacar conclusiones respecto a la configuración de los hidroxilos (88).

a) Espectroscopía de ^{13}C -RMN

No se ha aprovechado totalmente esta técnica en el campo de los ecdisteroides, la mayoría de la estructuras conocidas se elucidaron sin su ayuda. Se encuentra registrado el espectro de ecdisona en piridina- d_5 (108).

Sin embargo, la obtención del espectro de ^{13}C -RMN puede brindar gran información. Los carbonos del sistema del carbonilo α , β -no saturado, resuenan a campos muy bajos, alrededor de 203 ppm para el C-6 carbonílico, seguido por el C-8 alrededor de 165,9 ppm y el C-7 en 121,2 ppm.

Entre 65 y 85 ppm, aparecen los carbonos directamente unidos a hidroxilo. De su número se deduce el grado de hidroxilación de la molécula y de su multiplicidad, en experimentos de desacople parcial, su naturaleza de primarios, secundarios o terciarios.

CAPITULO III

GLICOSIDOS ACILADOS

DE FLAVONOIDES

EJEMPLOS DE PRODUCTOS NATURALES PERTENECIENTES A ESTE GRUPO

Hasta hace algunos años, los glicósidos acilados de flavonoides constituían un pequeño grupo de productos naturales, pero, últimamente, esta familia de compuestos está creciendo cada vez más, con la obtención de nuevos representantes, de las más variadas fuentes vegetales.

Las técnicas espectroscópicas nuevas o más perfeccionadas, permiten hoy en día, determinar con mayor facilidad la naturaleza y posición del grupo acilante en los hidroxilos del glicósido.

Los primeros ejemplos de flavonoides acilados se encontraron entre las antocianinas, sustancias responsables de los colores azules, rojos, violetas y rosados de los frutos y flores. Las estructuras conocidas hasta 1967 fueron recopiladas por Harborne (109). El grupo acilante en antocianinas era casi exclusivamente el ácido p-cumárico, aunque algunas veces se podía encontrar también ácido ferúlico o ácido cafeico.

Hasta entonces, se habían encontrado además unos pocos ejemplos de glicósidos acilados de flavonoles (109, 110, 111, 112) también con ácidos derivados del cinámico como esterificantes, pero sin haber llegado a establecer la posición de acilación.

La primera estructura de flavonoide acilado totalmente determinada correspondió a canferol-3-(2''-O-feruloil)soforósido aislada de pétalos de flores de la Solanácea Petunia hybrida (113).

Posteriormente, en 1969, Birkofer realizó un estudio por $^1\text{H-NMR}$ de distintas p-cumaroilglucosas, que sirvió de base para poder lograr la determinación exacta de la estructura de compuestos que poseyeran esa unidad (114).

En los siguientes años se ha ido ampliando el número de compuestos de este tipo, encontrándose además de glicósidos acilados de otras clases de flavonoides, otros agentes acilantes.

Por ejemplo, entre otros, de las especies Rosa multiflora (115) y Prunus persica (116), ambas pertenecientes a la familia de las Rosáceas, se aisló un

monoacetato de canferol-3- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosido, acilado en uno de los dos hidroxilos libres de la ramnosa; de flores de Azalea (117) se obtuvo 2''-O-acetilquercitrina (quercetina-(2''-O-acetil)ramnósido); de Salix viminalis (118), isoramnetina-3-O-(6''-O-acetil)glucósido y de Salix alba (119), glicósidos acilados de flavonas, apigenina-7-O-(6''-O-p-cumaroil) glucósido y apigenina-7-O-(4''-O-p-cumaroil) glucósido.

De Oxytropis myriophylla (120) se aislaron el glicósido quercetina-3-O-sofósido-7-O-ramnósido y los derivados acilados del mismo con ácido cumárico y ácido acético en la glucosa terminal, sin establecer totalmente su estructura. En especies del género Equisetum se describió la presencia de canferol-3-O- β -D-(6''-O-acetil) glucósido-7-O- β -D-glucósido y canferol-3-O- β -D-(6''-O-acetil) glucósido-7-O-ramnósido (121), así como también canferol-7-O-glucósido-3-O- β -D-(glucosil (1 \rightarrow 2))(O-sinapoil) glucósido (122).

También se han aislado C-glucosilflavonas aciladas, por ejemplo, en Sarotamnus scoparius (123), el derivado 6''-O-acetilado del escoparósido, una C-glucosilflavona aislada de la misma planta y en Hypericum hirsutum (124) se informó la presencia de luteolina-8-C- β -D-(2''-O-acetil) glucopiranosido (2''-O-acetilorientina). En brotes de soja se encontró 6''-O-acetildaidzina (125), un glicósido de isoflavona acilado, así como también 6''-O-acetilgenistina (126) que es la 5,4'-dihidroxiisoflavona-7-O- β -D-(6''-O-acetil) glucósido.

De la especie Valeriana wallichii (127) se aisló acetina-7-O-rutinósido, el glicósido conocido como linarina, y sus 2'''-O- y 3'''-O-metilbutiril ésteres cuyas estructuras fueron determinadas por ¹³C-RMN, presentando este curioso ácido esterificante.

Un grupo ruso de investigación, dedicado al aislamiento de glicósidos acilados de flavonoides entre especies de su flora de coníferas, principalmente en los géneros Pinus (128, 129, 130, 131), Crassulácea (134), Picea (132, 133), Cupressus (134), Sedum (135), etc., luego de aislar e identificar alrededor de treinta glicósidos acilados de flavonoides, llegaron a la conclusión que, al menos en los casos estudiados por ellos (134), se podía generalizar lo siguiente:

primero, que los azúcares glicosidantes son comúnmente glucosa, galactosa, ramosa, xilosa y arabinosa, mientras que los agentes acilantes que generalmente se encuentran son los ácidos acético (134), benzoico (134), cumárico (131, 134), gálico (3,4,5-trihidroxibenzoico) (134, 136), sinápico (122), ferúlico (137), etc.. Segundo, que se encontraron principalmente glicósidos monoacilados, algunos diacilados y sólo un ejemplo de triacilado (134); en el caso de monoacilación, el acilo está comúnmente ligado al OH-6 de hexosas y más raramente al OH-3; en pentosas, la posición preferida para la acilación es el OH-3 en caso de monoacilación. La diacilación tiene lugar en los OH-6 y OH-3 de hexosas y en los OH-2 y OH-3 de pentosas.

Algunos ejemplos de glicósidos acilados aislados son: di-p-cumaroilisoquercitrina de Pinus sylvestris (131), isoramnetina-3-O- β -D-(6"-O-acetil) galactósido y -3-O- β -D-(6"-O-acetil) glucósido (130) también en especies de Pinus, 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona-8-(3"-O-acetil) xilósido y -8-(3"-O-acetil) arabinósido (134); la 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona-8-(2,3-di-O-acetil) xilósido (134); astragalina-3-O- β -D-(3"-O-p-cumaroil) glucósido y -3-O- β -D-(6"-O-p-cumaroil) glucósido, ambas aisladas de Picea obovata (133) y 2"-O-p-cumaroilleuganina aislada de Picea koraiensis (132), miricitina-3-O- β -D-(6"-O-galoil) glucósido y miricitina-3-O- β -D-(6"-O-galoil) galactósido aisladas de Sedum kamtschaticum (135) y miricitina-3-O- α -L-(2"-O-galoil) ramnósido de Sedum selkianum (136).

En ramas de mimbre se caracterizó un glicósido acilado de flavanona, naringenina-5-O- β -D-(6"-O-p-cumaroil) glucósido.

Existen muchos ejemplos más que se están aislando actualmente de las más variadas fuentes vegetales, los enumerados son sólo representantes que ejemplifican las variaciones estructurales que pueden encontrarse entre los glicósidos acilados de flavonoides, algunos de los cuales se ilustran en la Fig. 17.

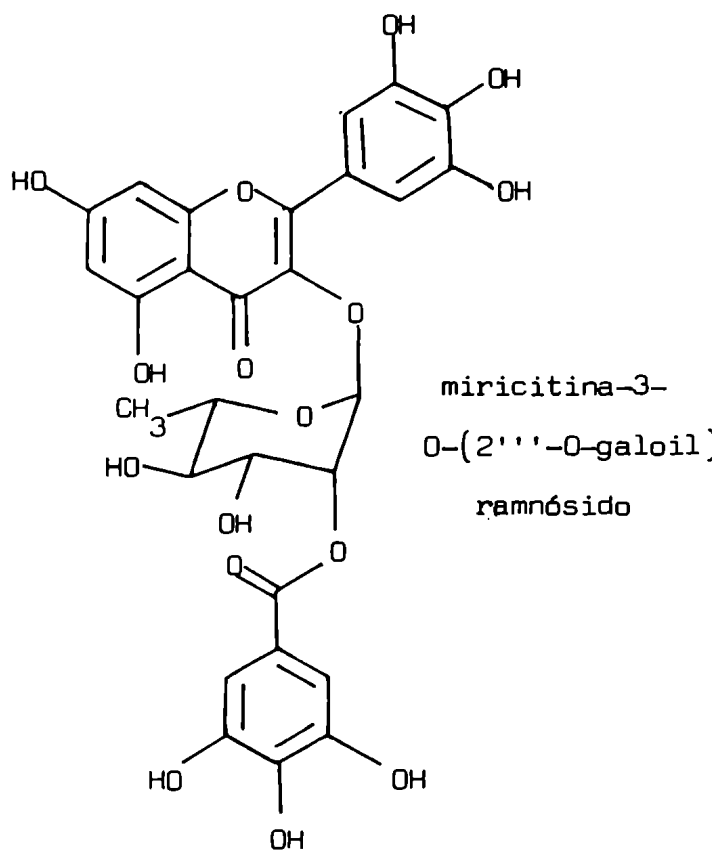
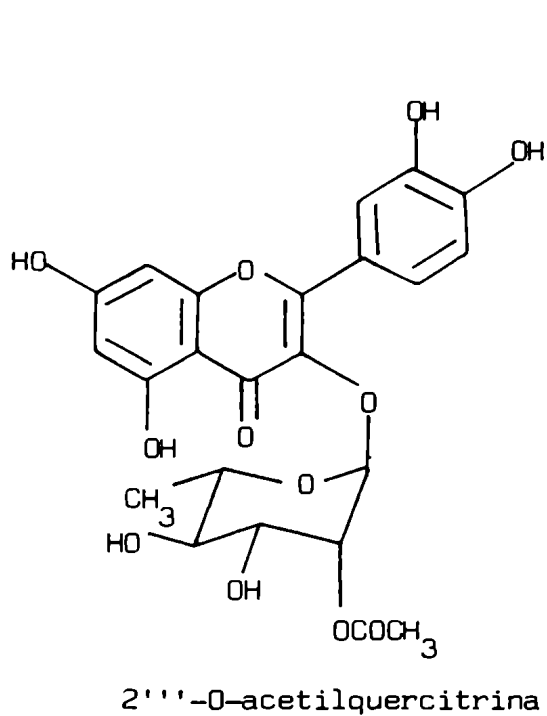
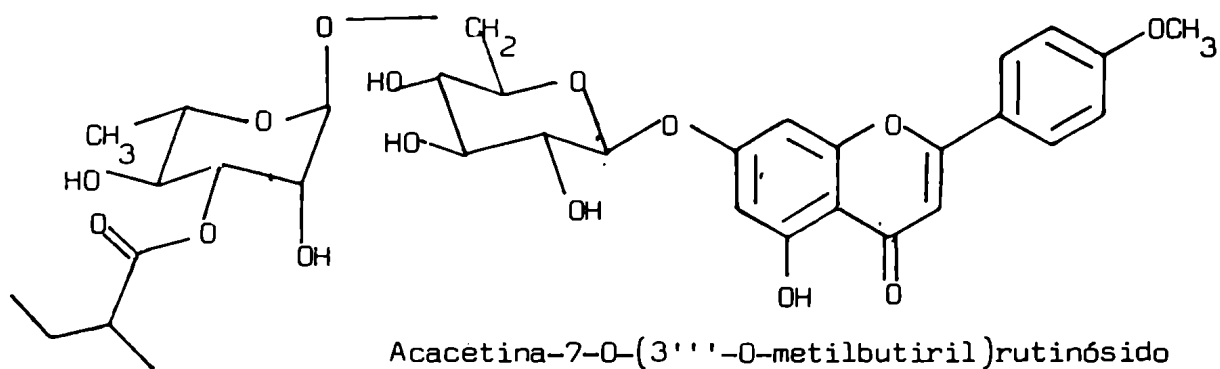
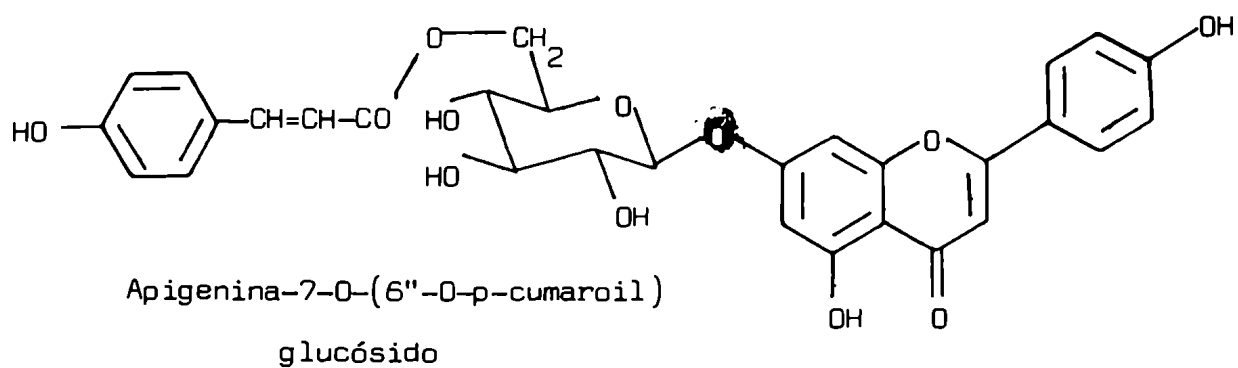


Fig. 17: Algunos ejemplos de glicósidos acilados de flavonoides.

METODOS ESPECTROSCOPICOS APLICADOS A LA ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE DISTINTOS TIPOS DE FLAVONOIDES

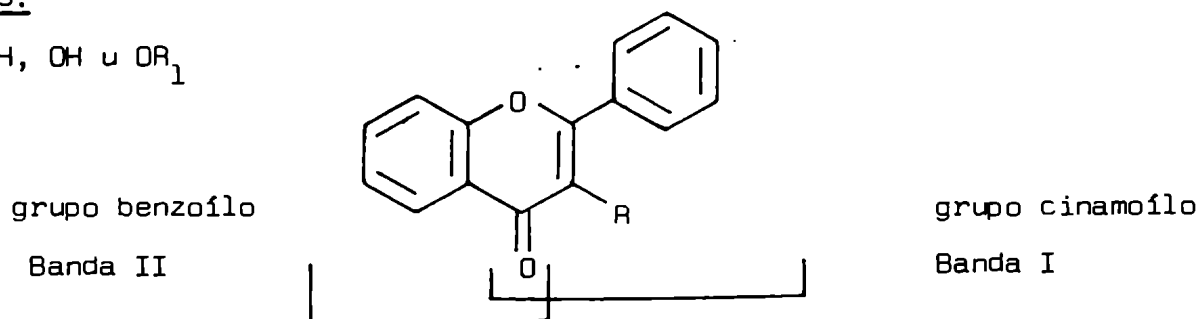
a) Espectroscopía ultravioleta (UV)

Los flavonoides presentan en UV dos bandas principales, denominadas Banda I (300-380 nm) y Banda II (240-300 nm) debidas a la presencia de dos cromóforos: el grupo cinamoílo y el grupo benzoílo, que dan información acerca de los anillos B y A, respectivamente (Fig. 18).

Esta técnica ha resultado muy efectiva en la deducción de las estructuras de los flavonoides, debido al uso sistemático de reactivos de desplazamiento (139) como Cl_3Al , $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{ClH}$, CH_3ONa , CH_3COONa y $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{BO}_3\text{H}_3$, respecto al espectro obtenido en metanol.

Fig. 18:

$R = \text{H}, \text{OH} \text{ u } \text{OR}_1$



b) Espectrometría de masas

El método de impacto electrónico es el más ampliamente usado en todos los espectros de masas de agliconas, C-glicósidos y O-glicósidos.

Agliconías (140)

Las agliconas dan en general M^+ intensos, que en muchos casos pueden ser el pico base. En la zona del M^+ puede observarse un intenso $(M-H)^+$ y un $(M-CH_3)^+$ para los compuestos con metoxilo aromático. Pero para la mayor parte de las agliconas (flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y dihidroflavonoles, excepto chalconas) los principales caminos de fragmentación se ven en la Fig.19

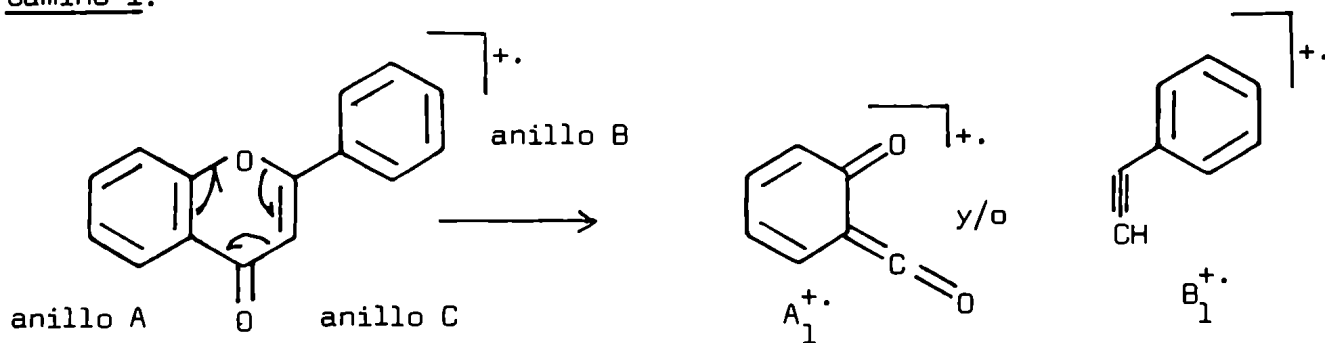
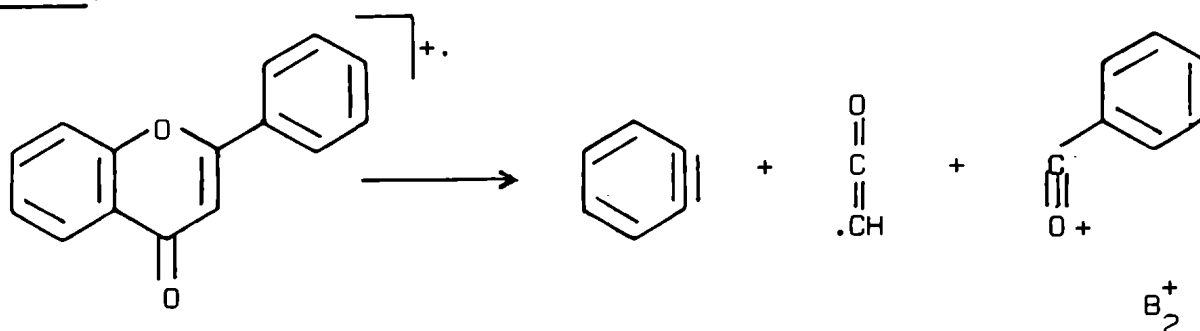
Camino I:Camino II:

Fig. 19: Principales fragmentaciones de flavonas en espectrometría de masas

El camino I es una reacción de retro Diels Alder sobre el anillo C y da origen a dos iones cuya proporción da idea de la distribución de cargas de la molécula y sus masas indican la sustitución. El camino II conduce a una sola especie cargada que corresponde al anillo B. Ambos caminos son competitivos y las intensidades de B_2^+ y de $B_2-CO)^+$ son aproximadamente inversamente proporcionales a las de A_1^+ y B_1^+ del camino I.

En flavonas el M^+ es generalmente el pico base y se observan iones importantes para $M-CO)^+$ y para el fragmento A_1^+ del camino I. Comparando la flavona (a), el ejemplo más sencillo, la 5,7-dihidroxi flavona (b) y la luteolina-3',4'-dimetiléter (c), se observa como puede detectarse y deducirse la sustitución de los anillos A y B, por espectrometría de masas (Tabla 7).

Surge de la Tabla, la asignación de los iones comunes entre (a) y (b) que coinciden en la sustitución del anillo B y entre (b) y (c), iguales en el anillo A, y los corrimientos correspondientes de los restantes iones por la sustitución.

Iones m/e(%)	(a)	(b)	(c)
M^+	222(PB)	254(PB)	314(PB)
$M-CO)^+$	194(54)	226(12)	286(10)
A_1^+	120(80)	152(20)	152(4)
$A_1-CO)^+$	94(49)	124(4)	124(1)
B_1^+	102(13)	102(6)	162(12)
$B_2-CO)^+$	77(10)	77(14)	135(5)

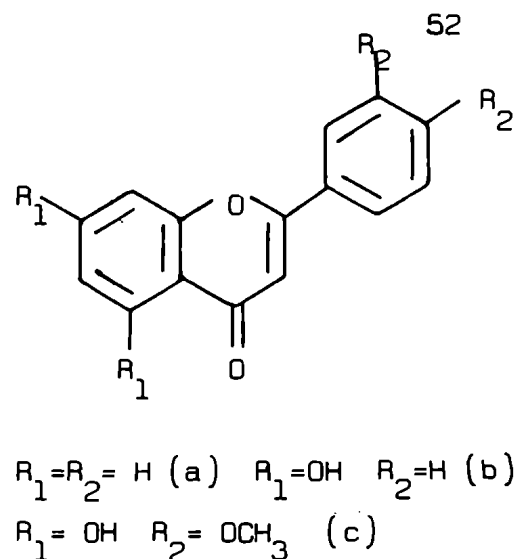


Tabla 7 : Algunos iones en espectros de masas de flavonas (140)

En el caso de flavonoles tambien el ión molecular es el pico base y en conjunto con los iones $M-H)^+$, $M-CH_3)^+$, $M-CH_3-CO)^+$ y fragmentos débiles debidos a $A_1+H)^+$ para el anillo A así como B_2^+ y $B_2-CO)^+$ para el anillo B, se obtiene bastante información estructural (140). El fragmento $M-CH_3-CO)^+$ de 3-metilflavonoles se ha atribuido a una pérdida concertada de metilo y carbonilo del anillo C; este mismo ión se observa en flavonoles con CH_3O-6 , aunque el $OH-3$ no esté metilado. La sustitución en el anillo C se deduce de la diferencia de masa entre el M^+ y los fragmentos de los anillos A y B.

La principal fragmentación en flavonas y dihidroflavonoles ocurre por el camino I y puede observarse el ión $A_1+H)^+$ por transferencia de hidrógeno. Tambien las isoflavonas tienen su principal fragmentación por el camino I (140).

Las chalconas constituyen un caso particular. Las rupturas principales ocurren a ambos lados del carbonilo con subsiguiente pérdida de CO (28 uma) de la porción del cinamoílo (Fig. 20) (140).

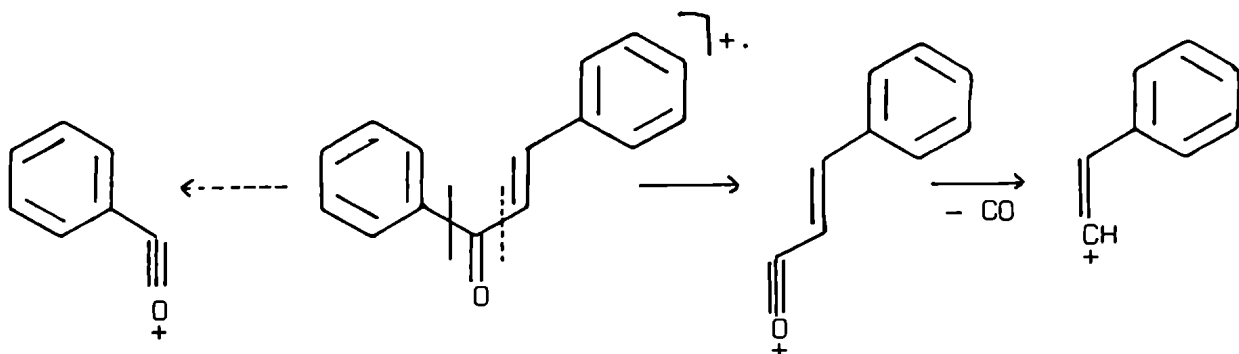


Fig. 20: Principales fragmentaciones de chalconas.

O-glicósidos de flavonoides

En general, el espectro de un O-glicósido de un flavonoide no presenta M^+ observable. Los azúcares al escindirse transfieren un hidrógeno al oxígeno de la aglicona al cual están unidos dando un ión intenso, correspondiente a la aglicona, que sufre las fragmentaciones ya discutidas originando los picos principales del espectro (140).

Los azúcares dan las señales correspondientes a su ión oxonio (Fig. 21), pérdidas de agua a partir de él y las fragmentaciones características de los hidratos de carbono a m/e 55, 69, 73, etc. (141),

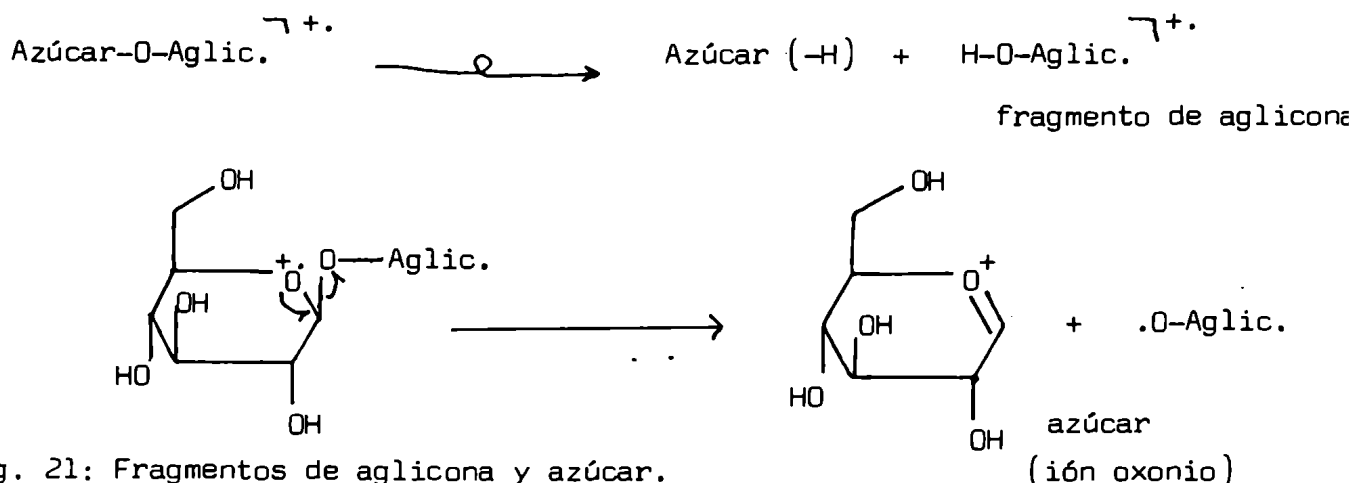


Fig. 21: Fragmentos de aglicona y azúcar.

En espectrometría de masas, que no distingue isómeros, el ión oxonio aparece a m/e 163 para hexosas, m/e 147 para monodesoxihexosas, m/e 133 para pentosas y m/e 177 para ácidos urónicos. En el caso de un oligósido, las señales más importantes son las del azúcar terminal. Si existe acilación, sobre todo en este azúcar, se observa el ión con la correspondiente diferencia de masa y iones originados a partir de él por pérdida de acilo, de agua, y de agua y acilo.

Por el estudio del espectro de masas de distintos derivados se logra obtener mayor información acerca del glicósido, como se discute a continuación.

Derivados peracetilados

Son de fácil obtención, pero la información que puede obtenerse de su espectro de masas no es completa. Se observa el M^+ pero de baja intensidad y a partir

de él se generan sucesivas pérdidas de 60 y 42 uma (ácido acético y cetena). Los picos de la aglicona no son importantes en este espectro sino que predominan los de los azúcares, que también van acompañados por pérdidas de 60 y 42 uma.

Derivados permetilados y perdeuterometilados

Estos derivados, cuyos espectros de masas han sido estudiados por varios autores (142, 143, 144, 145, 146) para todo tipo de glicósidos de flavonoides, presentan dos problemas importantes en su obtención: el de una metilación incompleta o excesiva y el de la necesidad de un paso posterior de purificación. De cualquier modo, una vez obtenido el derivado, se obtiene mucha información de su espectro de masas.

En casi todos los casos puede observarse el M^+ pero es un pico muy débil a menudo menor del 1 %.

Todos los O-glicósidos sufren fisión de los azúcares con transferencia de hidrógeno a la aglicona dando un pico intenso de aglicona, usualmente el pico base, acompañado de iones $1\text{ uma mayor y menor}$, $(A+H)^+$ y $(A-H)^+$.

Para los azúcares, los picos observados corresponden al oxonio permetilado o perdeuterometilado, menos protón, y pérdidas de $-\text{OCH}_3$ o $-\text{OCD}_3$ y de metanol o deuterometanol a partir de él. El disacárido también se escinde como su oxonio pudiendo deducirse en este caso la secuencia, porque el ión más importante de los azúcares de un diglicósido corresponde al oxonio de azúcar terminal(142).

En cuanto al punto de unión al flavonoide, se observó que las unidades 3- y 5-O-glicósidos se eliminan más rápidamente que los grupos 7-O-glicosilo. En general, para 3,7-O-diglicósidos permetilados de flavonoles, los iones correspondientes a $M-(3\text{-O-azúcar})$ tienen intensidades relativas del 40 al 50 %, mientras que los fragmentos $M-(7\text{-O-azúcar})$, intensidad menor que el 1 %.

Los grupos acilo presentes en el producto natural se hidrolizan en el proceso de derivatización corriente y las flavanonas también sufren degradación en medio alcalino fuerte, a menos que la metilación se realice en otro medio.

La comparación entre los espectros de derivados permetilados y perdeuterome-

tilados del mismo compuesto, indica por la diferencia de masa de los iones, (3 uma más por hidroxilo) el número de hidroxilos en cada fragmento y la presencia de metoxilos naturales(145).

Derivados trimetilsililados

Schels, Zinsmeister y Pflieger (147, 148) describieron los resultados de la espectrometría de masas de derivados trimetilsililados de flavonoides, resultando esta técnica tan útil como la de permetilación en cuanto a información obtenida del espectro, con la ventaja de la facilidad de obtención del derivado y extensión de aplicabilidad de la reacción, que se realiza en condiciones suaves y es cuantitativa y completa, obteniéndose un solo producto que puede someterse inmediatamente a la espectrometría de masas. El medio de reacción no afecta a las moléculas lábiles a bases..

El único inconveniente, sobre todo cuando se trabaja con espectrómetros de baja resolución, es que los M^+ de estos derivados aparecen por encima de las 1000 uma, y se solucionó por medio de un nuevo método de calibración del espectrómetro (147).

En todos los espectros de masas de estos derivados, puede observarse el M^+ con mayor intensidad relativa que en los derivados permetilados, aun en el caso de los 3-O-glicósidos que se escinden con gran facilidad. Además va acompañado por un pico más intenso a $M^+ - 15$ que puede llegar hasta el 40 %. Esta pérdida de 15 uma es característica de los grupos trimetilsililo y se observa a partir de todos los iones del espectro.

Como en el caso de los derivados permetilados, la fisión del enlace azúcar-aglicona implica transferencia de hidrógeno hacia esta última. En este caso, además, se transfiere trimetilsililo (R), obteniéndose los siguientes fragmentos para la aglicona (A): $A+H$, $A+2H$, $A+R$, $A+H+R$, $A+2R$ y las correspondientes masas menos 15.

Estos fragmentos de aglicona dan una indicación acerca de la naturaleza del flavonoide y de la posición de glicosidación. Entre los flavonoles, los 3-mono-

y biósidos muestran un A+H muy intenso, casi siempre el pico base, en los 7-O-glicósidos el (A+H)-15 es el cercano al 100 %, mientras que en los 3,7-O-diglicósidos, (A+H+R)-15 es el fragmento de aglicona más intenso. En flavonas son intensos A+R, (A+R)-15, A+H y (A+H)-15. Entre las flavanonas, los fragmentos más importantes de aglicona están en (A+H)-15, pero de mucha menor intensidad que en el caso de las flavonas. No se observan en ningún caso, fragmentaciones posteriores de la aglicona (por ejemplo una retro Diels Alder) (147, 148)(Fig. 22)

La formación de los iones de los azúcares está, la mayoría de las veces, acompañada por pérdida de hidrógeno y origina fragmentos importantes, de intensidades de hasta el 80 %, por ejemplo, para el azúcar terminal.

En diglicósidos se observan dos conjuntos de picos de azúcares. Uno corresponde al azúcar terminal y otro al disacárido (Fig. 22, fragmentos T y D respectivamente) y los picos originados por la pérdida de silanol a partir de ellos. Las masas típicas para el fragmento D-H son 828 (para el disacárido de dos hexosas), 740 (disacárido de hexosa y monodesoxihexosa), etc.. Para T-H son 464 (para ácidos urónicos), 450 (hexosas) y 362 (monodesoxihexosas).

En glicósidos más complejos, si al escindir el azúcar terminal, la carga queda en el resto de la molécula, se originan los fragmentos S (Fig. 22) que informan acerca del monosacárido directamente unido a la aglicona (147).

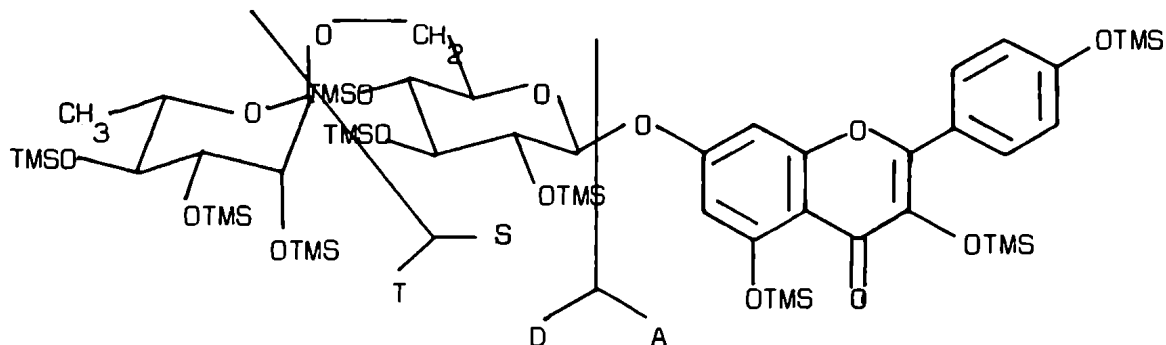


Fig. 22: Fragmentos primarios de trimetilsililderivados de glicósidos de flavonoides.

En 3,7-O-diglicósidos, por ejemplo, se fragmenta el azúcar de posición 3 dando los iones S_1 y los de posición 7 dando los iones S_2 , ambos con transferencia de hidrógeno o trimetilsililo y sus correspondientes masas menos 15. Como en el caso de los derivados permetilados, de las intensidades relativas de S_1+H y S_2+H se puede deducir el punto de unión de los azúcares si estos tienen diferentes masas. Del mismo modo que frente a la hidrólisis ácida, el azúcar de posición 3 se escinde con mayor facilidad que el azúcar de posición 7 y entonces los fragmentos S_1 son más intensos que los fragmentos S_2 , como se ejemplifica a continuación:

	$(S_1+R)-15$	S_1+H	$(S_2+R)-15$	S_2+H
Canferol				
3-O-ramn-7-O-glu	937 (86%)	880 (34%)	849 (7%)	792 (19%)
Canferol				
3-O-glu-7-O-ramn	849 (100%)	792 (49%)	937 (19%)	880 (8%)

Se observan en la tabla las grandes intensidades de los iones originados por escisión de los azúcares de posición tres.

En el caso de 1→2 y 1→6 biósidos, se pueden detectar en estos espectros diferencias debidas a la distinta posición de la unión interglicosídica.

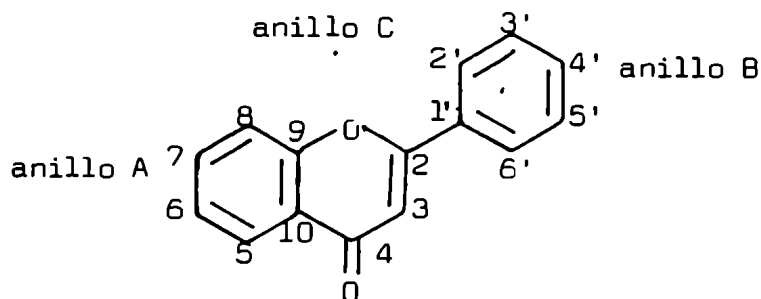
Los 1→6, por ejemplo rutinosa y robinobiosa, muestran un solo pico debido al disacárido (D-H). En cambio, los 1→2 (como neohesperidosa y soforosa) presentan además del pico del disacárido, picos D-silanol, a 651 para el disacárido de glucosa-ramnosa y 739 para el disacárido de glucosa-glucosa.

c) Espectroscopía de 1H -RMN

Las señales de los protones de los flavonoides permiten obtener casi toda la información necesaria para determinar su estructura. Es un sistema aromático con señales bien definidas que, por sus desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento, permite establecer el tipo de flavonoide y su sustitución.

Si existen indeterminaciones en las asignaciones, se puede recurrir a técnicas como el uso de solventes anisotrópicos en la realización del espectro (149), que provoca el desplazamiento de ciertas señales, o el uso de reactivos de desplazamiento como los compuestos de europio (150):

El sistema de numeración de los carbonos de un flavonoide es el siguiente, y se utiliza en la descripción de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ que se realiza a continuación:



Protones del anillo A

Los H-6 y H-8 de flavonas, flavonoles. e isoflavonas que tienen sustitución 5,7-, aparecen como dos dobletes entre 6,0 y 6,5 ppm, el H-6 a campos más altos (6,0-6,2) que el H-8 (6,3-6,5). En flavanonas y dihidroflavonoles 5,7-disustituídos, aparecen a campos más altos (151).

En las agliconas que sólo presentan sustitución en 7-, el H-5 se observa a campos muy bajos, desprotegido por el carbonilo de C-4, como un doblete de $J=9$ Hz por su acoplamiento orto con el H-6.

El único protón del resto del esqueleto que puede encontrarse en esta zona es el H-3 de las flavonas, que aparece como un singulete en 6,3 ppm. En caso de trisustitución (5,6,7- o 5,7,8-), el único protón del anillo A es también un singulete en la misma zona. Para distinguirlos es útil comparar el espectro del flavonoide trimetilsililado, con el del parcialmente sililado (en todos los hidroxilos menos en el OH-5) (151). En este último, la señal del H-3, se desplaza aproximadamente 0,15 ppm a campos más bajos, la señal del H-8, 0,15 ppm a campos más altos y la señal del H-6 no se corre (Fig. 23).

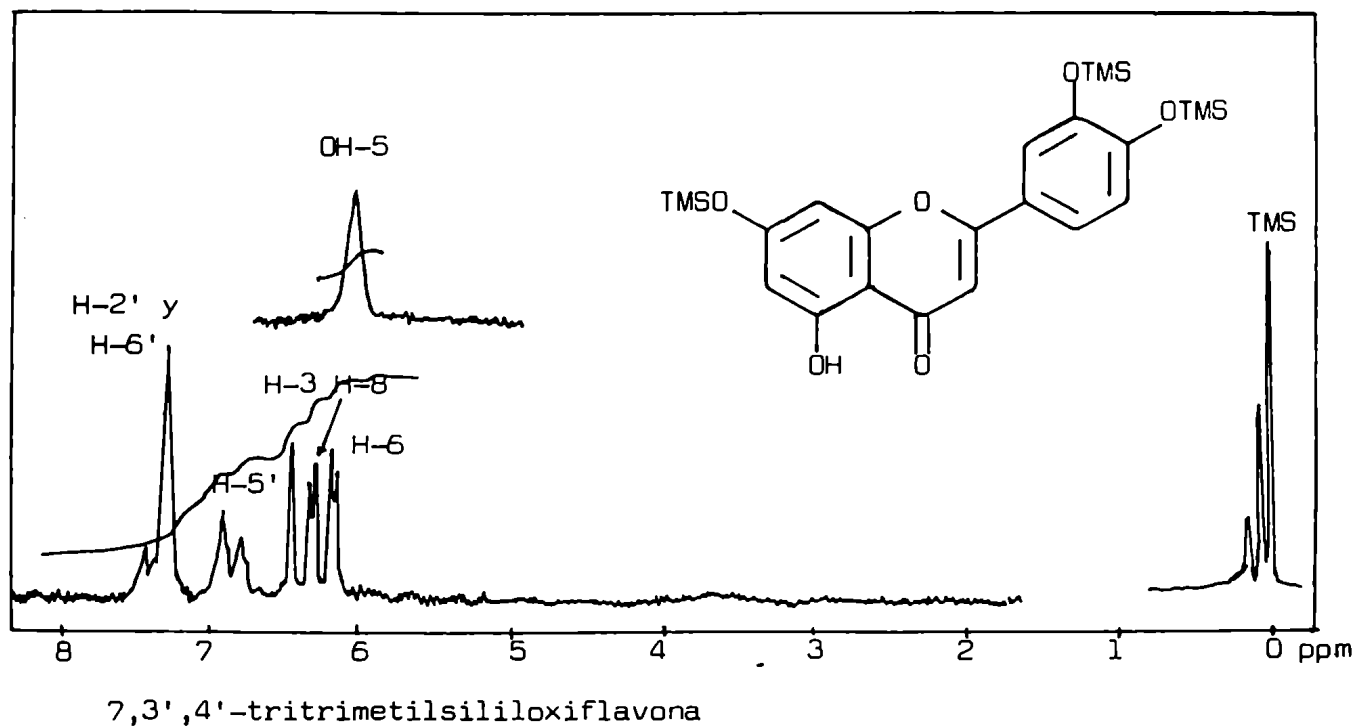
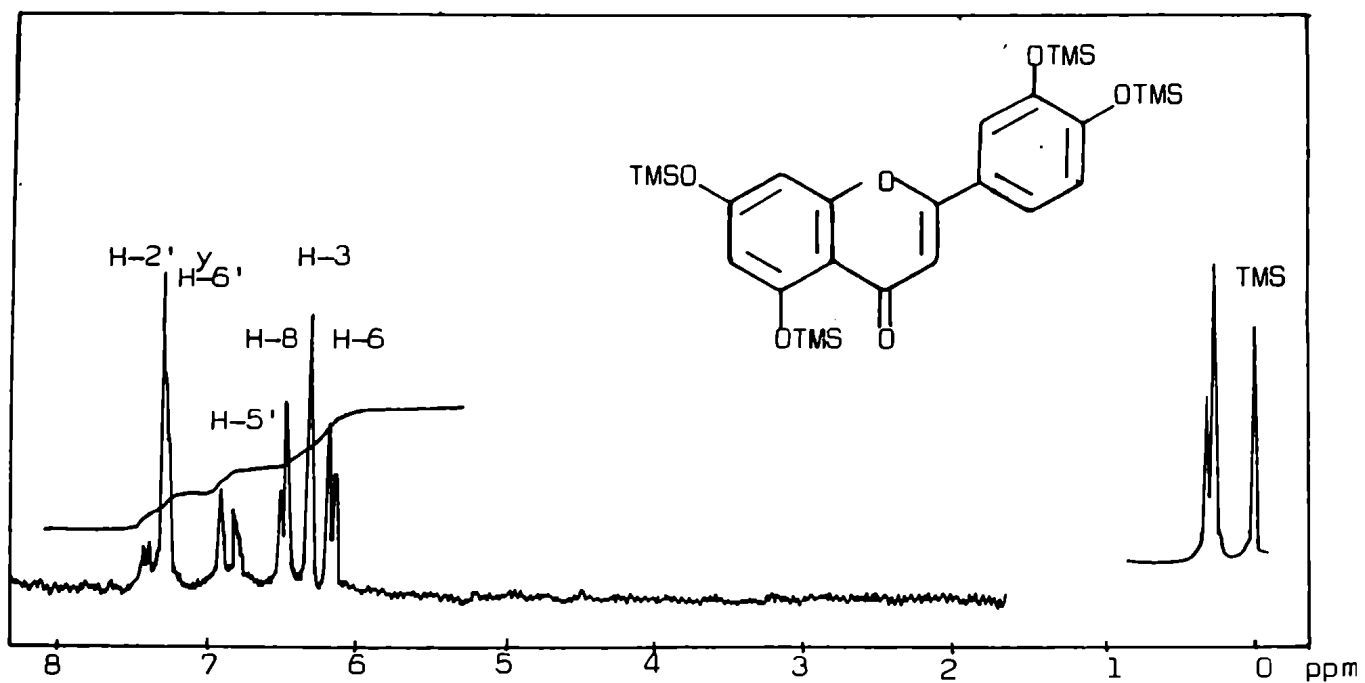


Fig. 23: Espectros de ^1H -RMN de derivados trimethylsilylados de luteolina en Cl_4C

Protones del anillo B

Aparecen en general a campos más bajos que los del anillo A, entre 6,7 y 7,9 ppm. Su aspecto es característico del esquema de sustitución del anillo y además está influido por el grado de oxidación del anillo C.

Si el anillo B está sustituido en 4', aparece el esquema típico de la sustitución para (152) con dos dobletes de constante de acoplamiento grande. El doblete correspondiente a los H-3' y 5' aparece a campos más altos, mientras que la posición del doblete de los H-2' y 6' depende en cierta medida del grado de oxigenación del anillo C: entre 7,1 y 7,4 para flavanonas, entre 7,2 y 7,4 para dihidroflavonoles, entre 7,2 y 7,5 para isoflavonas, entre 7,7 y 7,9 para flavonas y entre 7,9 y 8,1 para flavonoles.

La oxigenación en 3',4'- da un esquema más complejo (Fig. 23). El H-5' aparece como un doblete entre 6,7 y 7,1 ppm con $J = 8,5$ Hz (151) y los H-2' y 6', aparecen superpuestos entre 7,2 y 7,9. La posición relativa de las señales de los H-2' y 6' puede usarse para distinguir la sustitución $\text{CH}_3\text{O}-3'$, $\text{OH}-4'$ de la $\text{OH}-3'$, $\text{CH}_3\text{O}-4'$. En flavanonas, isoflavonas y dihidroflavonoles el esquema cambia observándose un multiplete complejo entre 6,7 y 7,1 ppm.

Si el anillo B no está sustituido, sus hidrógenos aparecen como multipletes complejos entre 7,1 y 7,5 (H-3', 4' y 5') y 7,5 a 7,9 ppm (H-2' y 6') en flavonas, desplazándose a campos más bajos en flavonoles. En flavanonas con el anillo B sin sustituir, los cinco protones aparecen en un multiplete a 7,4-7,5 ppm (151).

Protones del anillo C

El desplazamiento químico de estos hidrógenos varía completamente según el grado de oxidación de este anillo, es decir según el tipo de flavonoide.

El H-3 de flavonas es un singulete en la zona de los protones del anillo A (Fig. 23). El H-2 de isoflavonas aparece entre 7,8 y 8,1 ppm en Cl_3CD y a campos más bajos aun (8,5-8,7 ppm) en $\text{DMSO}-d_6$ como solvente, comportamiento que puede ayudar a su asignación (151).

Los H- α y H- β de las chalconas aparecen como dobletes de $J = 17$ Hz, entre 6,7 y 7,4 para el H- α y 7,3 y 7,7 ppm para el H- β .

En flavanonas, donde el enlace entre C-2 y C-3 está saturado, el H-2 aparece como un cuarteto a 5,2 ppm como la parte X de un sistema ABX, cuya parte AB la constituyen los dos protones de C-3, que resuenan alrededor de 2,8 ppm.

En dihidroflavonoles, la señal del H-2 es un doblete de $J = 11$ Hz alrededor de 5,0 ppm mientras que el H-3 aparece en 4,3 ppm como otro doblete acoplado al anterior. Este acoplamiento corresponde a hidrógenos 1,2-diaxiales y se observa en los dihidroflavonoles naturales, por poseer configuración absoluta R en los C-2 y C-3.

Glicósidos de flavonoides

El solvente de elección para glicósidos de flavonoides libres es el DMSO- d_6 por su gran poder disolvente. En general el método más conveniente y usado, y el que se discute a continuación es el espectro de ^1H -RMN del flavonoide trimetilsililado en CD_3CO .

i) Efecto de la glicosidación sobre los hidrógenos de la aglicona

En flavonas, flavonoles e isoflavonas 5,7-disustituidas, la glicosidación de un OH-7 hace que las señales del H-6 y del H-8 se desplacen a campos más bajos. Por otra parte, la glicosidación del OH-3 de un flavonol, afecta principalmente a los H-2' y H-6', provocando un desplazamiento a campos más altos de alrededor de 0,4 ppm (151).

ii) Resonancias de los protones de azúcar en glicósidos de flavonoides

La resonancia del H-1 del azúcar (protón anomérico) en los derivados trimetilsililados de glicósidos de flavonoides, depende de la naturaleza de la aglicona y de la estereoquímica de la unión glicosídica. En 5-, 7- o 4'- β -O-glicósidos de flavonoides la señal del protón anomérico aparece alrededor de 5 ppm en cambio, en 3-O-glicósidos de flavonoles esta señal se observa en 5,8 ppm. La configuración de la unión glicosídica se deduce de las constantes de acopla-

miento entre el protón anomérico y el protón vecino, según la naturaleza del azúcar. Por ejemplo, los β -D-glucósidos presentan un doblete de $J = 8$ Hz para su protón anomérico, por el acoplamiento axial-axial de ese protón con el H-2 de la glucosa, ya que el OH-2 de glucosa y el oxígeno etéreo de una unión glicosídica β , son ecuatoriales.

Los restantes protones del azúcar aparecen entre 3 y 4 ppm, como una serie de multipletes superpuestos, sin poder obtenerse mucha información, en general, a partir de ellos.

El uso de un solvente anisotrópico como piridina- d_5 , puede provocar desplazamientos que ayuden a la asignación (117, 153). Por otra parte, la protección de los hidroxilos como sus trimetilsililéteres, ahorra en el espectro del glicósido, la complicación por sus señales.

También se realizan los espectros de los derivados acetilados de los flavonoides. Los desplazamientos de metinos y metilenos por acetilación de sus hidroxilos alfa son de diferente magnitud (1,0 ppm y 0,5 ppm respectivamente). Este hecho permite por ejemplo, distinguir, por el espectro de los derivados acetilados, entre los dos ramnoglucósidos más comunes que glicosidan a los flavonoides: rutinosa (α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido) y neohesperidosa (α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido) (154). El diferente número de hidroxilos primarios y secundarios acetilables en cada uno de estos disacáridos, es el hecho que fundamenta su distinción.

En cuanto al análisis de los trimetilsilil derivados de ambos disacáridos, también se pueden hallar diferencias (154). En los rutinósidos el protón anomérico de ramnosa (H-1''') aparece entre 4,2 y 4,4 ppm y el metilo de C-6 de ramnosa (C-6''') como un singulete muy ancho entre 0,8 y 1,0 ppm, mientras que en los neohesperidósidos, el H-1''' se encuentra en 4,9-5,0 ppm y el metilo de C-6''' se observa como un doblete de $J = 6$ Hz en 1,1-1,2 ppm (154).

d) Espectroscopía de ^{13}C -RMNFlavonas

Joseph-Nathan y Schoolery (155) en 1974 publicaron la asignación completa de los carbonos de la flavona (I), pero recién en 1976, Ternai y Markham realizaron un estudio sistemático de flavonas y flavonoles, partiendo de la asignación de acetofenonas con distintos grados de sustitución (II) como modelos para el anillo A, de distintos ácidos cinámicos (III) como modelo para los anillos B y C y de la misma flavona (I) ya asignada (156).

En la Fig. 24 se observa el sistema de numeración de los carbonos en (I) y la nomenclatura de los anillos que se utilizará a continuación. Los carbonos de las moléculas modelo (II) y (III) están numerados por analogía a los de (I). Estos modelos resultaron útiles pues los anillos A y B son independientes (como en UV) y los cambios de sustitución en uno de ellos, no afectan al otro.

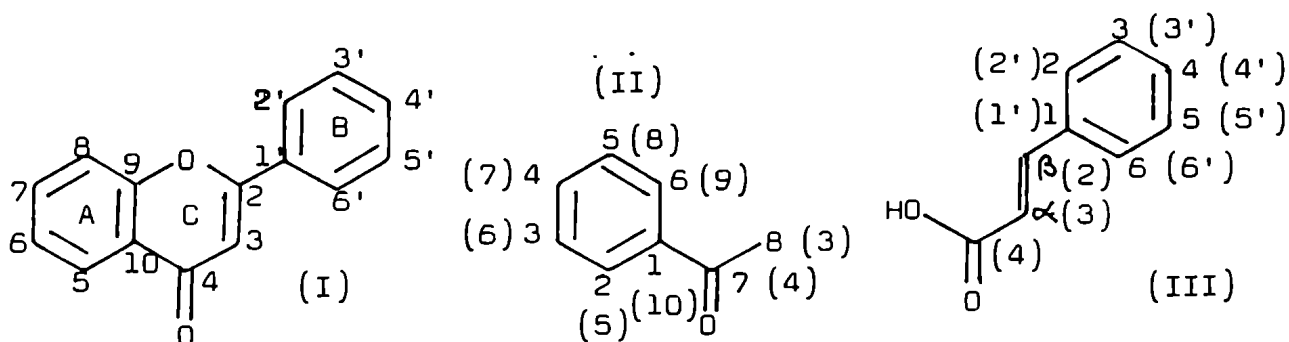


Fig. 24: Numeración de flavona (I), acetofenona (II) y ácido cinámico (III).

Se resumen en la Tabla 8, los resultados obtenidos para algunas acetofenonas

Tabla 8: ^{13}C -RMN de acetofenonas con distintas sustituciones (δ_c , ppm)

	8(3)	7(4)	2(5)	3(6)	4(7)	5(8)	6(9)	1(10)
2-OH	28,26	207,35	161,91	116,65	138,25	118,95	132,91	121,14
2,4-diOH	27,34	205,11	165,00	103,63	165,61	109,67	135,21	114,34
2,6-diOH	34,38	207,35	162,46	108,70	137,82	108,70	162,46	111,67
2,4,6-triOH	33,63	204,99	165,25	96,08	165,49	96,08	165,25	105,67

Los números entre paréntesis son las posiciones de cada carbono en flavona (I).

Sin confusión se atribuye, en todos los casos, la señal entre 205 y 208 ppm al C-4 carbonílico, y la señal entre 27 y 35 ppm, al metilo de la acetofenona. Las restantes señales también pueden asignarse de acuerdo a los desplazamientos esperados por la presencia de hidroxilos aromáticos (69). Así, por ejemplo, en la 2,6-dihidroxiacetofenona (simétrica), las dos señales a 162,46 ppm deben corresponder al C-2 y al C-6, desprotegidos por los hidroxilos directamente unidos a ellos y la restante señal intensa a 108,70 ppm a los C-3 y C-5 orto a los anteriores. El C-4 aparece a campos más bajos (137,82 ppm) como se espera para un carbono meta al sitio de hidroxilación y el carbono cuaternario C-1 a 111,67 ppm se distingue fácilmente por la baja intensidad de su señal debido a su mayor tiempo de relajación y menor efecto nuclear de Overhauser. La asignación de las restantes acetofenonas se realiza de manera análoga.

En los espectros de los ácidos cinámicos, la señal del carbonilo aparece alrededor de 170 ppm. En el espectro del ácido 4-hidroxicinámico, que es simétrico, las dos señales intensas a 131,7 y 117,3 ppm se asignan a los dos pares de carbonos equivalentes, C-2 y C-6 al primer valor de resonancia, y C-3 y C-5 al segundo. El C-1 por ser para al hidroxilo, aparecerá entre las señales anteriores y se asigna a 126,9 ppm. Las señales restantes a 146,6 y 115,9 ppm son las de los C-2 y C-3 vinílicos (compuesto III, Fig. 24), según la asignación realizada para 4-metoxiestireno. Las resonancias de estos carbonos no se afectan mayormente por posterior sustitución con metoxilo en el anillo.

La introducción de un metoxilo en C-3', provoca el intenso desapantallamiento del carbono directamente unido, apantallamiento de los carbonos orto y para y leve desapantallamiento en los carbonos meta. Análogamente se asignan las señales de ácidos cinámicos con otros esquemas de sustitución.

Teniendo en cuenta las resonancias de los carbonos de estas moléculas modelo se pueden asignar los espectros de algunas flavonas (Tabla 9).

El espectro de la 5-hidroxi flavona puede asignarse fácilmente por comparación con el de la 2,6-dihidroxiacetofenona, para los carbonos del anillo A, y de la flavona para los carbonos del anillo B. Las dos únicas señales que no se deducen directamente de la comparación son 110,8 y 107,2 ppm que se asignan

Tabla 9: Asignación de las resonancias de los carbonos de algunas flavonas (δ_c , ppm).

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1'	2'	3'	4'	5'	6'	
Flavona	(155)	163,2	107,6	178,4	125,7	125,2	133,7	118,1	156,3	124,0	131,8	126,3	129,0	131,6	129,0	126,3
5-OH Flavona	(156)	164,0	105,6	182,9	155,8	107,2	135,6	110,8	159,8	110,1	130,5	126,3	128,9	131,9	128,9	126,3
5,4'-diOH	(156)	165,4	103,9	183,4	156,4	108,0	136,1	111,4	160,0	110,4	121,9	129,1	116,7	161,7	116,7	129,1
5,7,4'-triOH	(156)	165,5	105,0	183,1	158,6	95,7	164,9	100,3	162,0	104,3	122,7	129,8	117,3	161,8	117,3	129,8
5,7,3',4'-tetraOH	(156)	165,1	103,9	182,6	158,2	94,9	164,3	99,9	161,5	104,8	123,0	114,3	145,9	149,8	117,1	120,1

Tabla 10: Comparación de las resonancias de los carbonos de 3',4'-dihydroxiflavona y 3',4'-dihydroxiflavonol para la asignación de este último (δ_c , ppm). (156).

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1'	2'	3'	4'	5'	6'
3',4'-diOH flavona	164,2	105,4	177,9	125,6	125,1	134,4	118,4	156,1	123,6	122,8	113,9	145,8	145,5	116,6	119,5
3',4'-diOH flavonol	147,7	138,1	173,8	125,4	125,4	134,5	118,8	155,5	121,5	123,4	116,3	145,4	148,0	116,7	121,7

Tabla 11: Comparación de las resonancias de los carbonos de 5,7,4'-trihydroxiflavanona (naringenina) con los de 5,7,4'-trihydroxiflavona (apigenina) (δ_c , ppm). (157)

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1'	2'	3'	4'	5'	6'
Naringenina	78,2	42,0	195,6	163,3	95,8	166,4	94,9	162,7	101,9	128,9	127,6	115,1	157,4	115,1	127,6
Apigenina	165,5	105,0	183,2	158,7	95,7	164,9	100,3	162,0	104,3	122,7	129,8	117,3	161,8	117,3	129,8

a C-8 y C-6 respectivamente, ya que uno está orto y otro para al OH-5, ligado por puente de hidrógeno al carbonilo de C-4.

La introducción de hidroxilo en C-5 afectará también los carbonos del anillo C, porque compromete al carbonilo de C-4. Esto provoca protección de los carbonos orto al carbonilo (C-3 y C-10) y desprotección de los meta (C-2 y C-9). Los carbonos 9 y 10, comunes a los anillos A y C, sufren además, el efecto que produce la presencia del OH-5, sobre el anillo A.

En 5,4'-dihidroxi flavona (Tabla 9), sólo el anillo B difiere del de la 5-hidroxi flavona. El C-4', oxigenado, aparece a 161,7 ppm, y los carbonos orto, meta y para sufren los desplazamientos conocidos para hidroxilaciones de sistemas aromáticos (69).

La metilación del OH-4' produce un ligero desplazamiento adicional del C-4' a campos más bajos y efectos de igual signo, y magnitud comparable, que los de la hidroxilación, sobre los carbonos orto, meta y para.

En el espectro de 5,7,4'-trihidroxi flavona (apigenina) el anillo B se puede asignar por analogía con el del compuesto anterior sin dificultad. La señal a 104,3 ppm se asigna a C-10, por correlación entre 2,6-dihidroxiacetofenona y 2,4,6-trihidroxiacetofenona. Por la introducción de un hidroxilo en C-7, en 5,4'-dihidroxi flavona, se espera y se observa un desplazamiento a campos más altos (-13 ppm) para C-6 y C-8. Los carbonos oxigenados C-5 y C-9 se desplazan a campos más bajos (+2 ppm) por efecto meta y de este modo se asignan en el espectro. Los C-4' y C-2 no deben afectarse, y por lo tanto, la única señal que resta asignar en esa zona es 164,9 ppm, que se adjudica al C-7 (Tabla 9).

La asignación de 5,7,3',4'-tetrahidroxi flavona (luteolina) se deduce de la comparación de los espectros de 5,7,4'-trihidroxi flavona para los anillos A y C y del ácido 3',4'-dihidroxicinámico para el anillo B. La coherencia es total y la única ambigüedad, que es la asignación respectiva de las resonancias correspondientes a los C-3 y C-10, se resuelve con un espectro de desacople parcial.

Con el mismo método de comparación compuesto a compuesto, se observa que la resonancia de los carbonos C-2 al C-10, en flavonas con distintos grados de sustitución en el anillo B, no se afecta por esos cambios; la asignación de los

21

carbonos de este anillo, realizada por comparación con los correspondientes ácidos cinámicos y los efectos orto, meta y para esperados para el nuevo sustituyente, resultaron correctos.

Flavonoles

Estos compuestos son formalmente 3-hidroxi-flavonas y la asignación de su espectro de ^{13}C -RMN puede lograrse, estimando los desplazamientos esperados por el reemplazo de hidrógeno por hidroxilo en el C-3 del esqueleto de la correspondiente flavona. La comparación entre 3',4'-dihidroxi-flavona y 3',4'-dihidroxi-flavonol (Tabla 10) ilustra este hecho.

La mayoría de las señales se asignan por simple comparación con las de la flavona correspondiente. Pero aparecen dos totalmente desplazadas, las que se atribuyen a C-2 y C-3, los más afectados por la hidroxilación en C-3. De acuerdo con los valores promedio esperados, el C-2 debería desplazarse alrededor de 15 ppm a campos más altos y el C-3 aproximadamente 30 ppm a campos más bajos. De las dos señales desplazadas, se asigna a C-2 la de campos más altos (147,7 ppm) y se confirma por acoplamiento ^{13}C - ^1H . La de campos más bajos (138,1 ppm) se adjudica al C-3.

Otros carbonos afectados por la introducción del OH-3 son los C-2' y C-6'. Entre los carbonos del anillo B, se asigna la señal en 123,4 ppm al C-1', cuaternario, por medio de experiencias de desacople parcial. La señal en 116,7 ppm se asigna a C-5', por su carencia de acoplamiento meta en el espectro acoplado al hidrógeno. Como las señales de C-3' y C-4' (hidroxilados) se encuentran a campos mucho más bajos, las dos señales restantes en esta zona se asignan a C-2' y C-6' (116,3 y 121,7 ppm respectivamente) y se observa que ambas han sufrido una desprotección de alrededor de 2,2 ppm, por la introducción de hidroxilo en C-3 (Tabla 10).

En 3',4'-dimetoxi-flavonol, se observan desplazamientos en la misma dirección, pero de magnitud mucho mayor. Probablemente, el efecto estérico de dos metoxilos vecinos, provoca la desviación de las reglas de aditividad de los efectos orto, meta y para de este sistema aromático.

El espectro de quercetina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol), puede asignarse por comparación con el de 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona para el anillo A y el de 3',4'-dihidroxiflavonol para los anillos B y C.

Generalizando, la asignación del espectro de un flavonol a partir del de la flavona con el mismo esquema de sustitución, puede lograrse fácilmente teniendo en cuenta los efectos producidos por la introducción de un hidroxilo en C-3: la resonancia de C-3 se desplaza +33 ppm, la de C-2, -17 ppm, las de C-2' y C-6', +2 ppm.

Flavanonas

Las diferencias en las resonancias de sus carbonos respecto a la correspondiente flavona son debidas básicamente a la saturación del enlace C-2/C-3, que suprime la conjugación entre los anillos A y B. Todos los carbonos se afectan en alguna medida por esta razón (157), como se observa en la Tabla 11, en la comparación de los espectros de naringenina (5,7,4'-trihidroxiflavanona) y apigenina (5,7,4'-trihidroxiflavona).

El carbonilo de C-4 se desplaza a campos más bajos por que en el caso de las flavanonas se trata de un carbonilo aislado. Los C-2 y C-3, no son aromáticos y resuenan a campos mucho más altos, en las zonas esperadas (69).

Dihidroflavonoles

Su espectro es similar al de la correspondiente flavanona, excepto en las resonancias de los carbonos del anillo C. En el espectro de 5,7,3',4'-tetrahidroxidihidroflavonol ((+)-taxifolina), todos los carbonos del anillo A tienen desplazamientos químicos casi idénticos a los de naringenina, y si se consideran los desplazamientos provocados por la introducción de un hidroxilo en C-3', también los del anillo B son muy similares (157). Las señales a 83,1 y 71,7 ppm se asignan a C-2 y C-3 respectivamente, observándose, para cada uno de ellos, desplazamientos de 5 y 30 ppm, respecto a la correspondiente flavanona. Los mismos resultados son menores que lo esperado, hecho que se atribuye al puente de hidrógeno que se origina entre el OH-3 y el carbonilo de C-4 (157).

Chalconas

La asignación de sus carbonos se realiza a partir de los correspondientes modelos de acetofenonas y ácidos cinámicos, comparación compuesto a compuesto y haciendo uso de las reglas conocidas de aditividad para los desplazamientos por sustitución en anillos aromáticos, de manera análoga a la que se describió para otros tipos de flavonoides (69, 157).

Variaciones en la resonancia del carbono carbonílico (C-4)

Este carbono, que entre todos los de un flavonoide es el que resuena a campos más bajos, presenta resonancias notablemente diferentes según la naturaleza del anillo C, es decir, según el tipo de flavonoide.

En las acetofenonas, por la conjugación con un anillo aromático, aparece entre 205 y 207 ppm (156). En flavona resuena a campos mucho más altos (178,4 ppm), ya que el carbonilo forma parte de la conjugación de toda la molécula.

La introducción de hidroxilo en C-5 y formación de puente de hidrógeno, hace que resuene alrededor de 183 ppm. Por otra parte, en flavonoles que no poseen OH-5, se observa que, por efecto orto, la presencia de OH-3 provoca un desplazamiento a campos más altos del valor de resonancia de C-4. En 5-hidroxi flavonoles, en los que están presentes ambos grupos, el C-4 resuena alrededor de 177 ppm, observándose una compensación de los efectos, con ligero predominio de la influencia del OH-3 (156).

En flavanonas, la saturación del enlace C-2/C-3 desplaza la resonancia del carbonilo a campos más bajos, aproximándose al modelo de las acetofenonas. La introducción de hidroxilo en el C-3 de una flavanona, originando un dihidroflavonol, no produce el efecto orto sobre el C-4, porque en esta molécula el anillo C no es aromático.

En todo tipo de flavonoide tiene gran importancia en la resonancia del C-4 y de todos los carbonos del anillo C, la protección del OH-5, ya sea por metilación, acetilación o glicosidación. La resonancia del C-4 aparece entre 8 a 10 ppm a campos más altos, por pérdida de la interacción puente de hidrógeno.

Glicósidos de flavonoides

En el estudio sistemático de los espectros de ^{13}C -RMN se evidencia la utilidad de esta técnica en la determinación de sus estructuras. En la mayoría de los glicósidos de flavonoides naturales, el punto de unión a la aglicona así como la clase y secuencia de los azúcares, puede determinarse por otros métodos pero el tamaño del anillo de cada azúcar, su forma anomérica y el punto de la unión interglicosídica quedan generalmente ignorados o indefinidos a menos que se utilicen métodos químicos. Estos datos pueden conocerse por medio de la asignación de todas las señales del espectro de ^{13}C -RMN.

Los desplazamientos químicos de los carbonos de la aglicona se asignan como se describió anteriormente. Los de los azúcares habían sido asignados para monosacáridos y metilglicósidos (158, 159). También existía la asignación de distintos glucobiósidos (160, 161). La porción glicosídica se estudió por comparación con estos modelos, y los glicósidos más complejos se resolvieron comparando los espectros, con distintos conjuntos de señales calculadas para ellos, según los desplazamientos esperados, viendo cual coincidía mejor, haciendo, de ser posible, el estudio de mono o diglicósidos más simples que constituyan parte de la estructura (162).

i) Efecto de la glicosidación en las resonancias de los carbonos de la aglicona

Tomando como ejemplo la glicosidación en el hidroxilo de C-7 de una aglicona se observa que, en promedio, la señal del C-7 se desplaza 1,4 ppm a campos más altos, acompañada por desplazamientos significativos a campos más bajos de los carbonos orto y para (C-6,8 y 10), de los cuales el más notable es el del para.

El mismo comportamiento se observa por la glicosidación de OH-3, OH-3' y OH-4'. Debe destacarse un efecto orto mucho mayor de lo esperado en C-2 de 3-O-glicósidos de flavonoles.

En general, entonces, el método para determinar la posición de glicosidación es la observación de las variaciones de resonancia del propio carbono y los carbonos orto y para al mismo (162).

La glicosidación del OH-5 constituye un caso aparte, ya que , además de los efectos orto y para mencionados, se producen variaciones en las resonancias de los carbonos del anillo C, debido a la ruptura del puente de hidrógeno que existía entre el carbonilo de C-4 y el OH-5. Los C-2 y C-4 se desplazan notablemente a campos más altos y el C-3 a campos más bajos, (162).

ii) Determinación de la posición y configuración de la unión interglicosídica y tamaño del anillo de cada azúcar

Como se había observado anteriormente (160), la glicosidación de hidroxilos de un azúcar, produce un desplazamiento medible del carbono implicado en la unión glicosídica. Así, en rutinósidos, el C-6 de la glucosa aparece entre 4,5 a 5,8 ppm a campos más bajos que en glucosa y los carbonos vecinos sufren un desplazamiento a campos más altos, por ejemplo alrededor de 1,5 ppm para C-5.

Cuando la glucosa es el glicosidante (por ejemplo en soforosa, que es una β (1 \rightarrow 2) glucosilglucosa), se observa un desplazamiento de aproximadamente 8 ppm en el C-2 a campos bajos y una protección de alrededor de 3 ppm en el vecino C-1 (anomérico) . Estos valores grandes de desplazamientos son característicos de la β -glucosidación.

Se observan en la Tabla 12, los efectos descriptos ejemplificados para algunos diglicósidos.

Por otra parte, las pautas para determinar la configuración de la unión glicosídica, están de acuerdo con las de los α - y β -metilglicósidos de azúcares (163). Como se observa en la Tabla 12, los anómeros β tienen sus C-1 desplazados a campos más bajos que los anómeros α , excepto en L-ramnosa (163).

Finalmente, el tamaño del anillo que posee cada azúcar en un producto natural, puede deducirse fácilmente por ^{13}C -RMN, por comparación con las resonancias de metilglicofuranósidos y metilglicopiranósidos del mismo azúcar (158, 163), ya que todas las resonancias se modifican al variar el tamaño del anillo (Tabla 12).

Tabla 12: Resonancias de los carbonos de azúcar en monosacáridos, metilglicósidos y glicósidos de flavonoides (δ_c , ppm). (G=glucosa o galactosa, A=ramnosa).

	1 G	2 G	3 G	4 G	5 G	6 G	1 A	2 A	3 A	4 A	5 A	6 A
Metil- β -D-glucopiranos	104,3	74,2	76,9	70,8	76,9	61,4						
Metil- α -L-ramnopiranos							101,9	71,0	71,3	73,1	69,4	17,7
Hesperetina-7-O-rutinósido	100,5	73,3	76,6	69,9	75,8	66,4	99,8	70,6	71,0	72,4	68,6	18,2
Naringenina-7-O-neohesperidósido	98,0	76,7	77,2	70,1	77,0	60,8	100,4	70,4	70,7	72,1	68,2	17,8
Canferol-3-O-soforósido	Glu "=98,6	82,0	76,6	70,0	76,6	61,0						
(β (1 \rightarrow 2) glucosilglicósido)	Glu"=103,6	74,3	76,7	70,5	76,6	61,0						
α -L-ramnosa							95,0	71,9	71,1	73,3	69,4	18,0
β -L-ramnosa							94,5	72,4	73,8	72,9	73,1	18,0
Metil- α -D-galactopiranosido	100,5	69,4	70,6	70,4	71,8	63,3						
Metil- α -D-galactofuranósido	103,1	77,4	75,5	82,3	73,7	63,4						
Metil- β -D-galactopiranosido	104,9	71,8	73,9	69,8	76,2	62,1						
Metil- β -D-galactofuranósido	109,2	81,9	77,8	84,0	72,0	63,9						

Tabla 13: Efecto de la acilación en el espectro de ^{13}C -RMN de glicósidos de flavonoides (δ_c , ppm).

	1 G	2 G	3 G	4 G	5 G	6 G	1 A	2 A	3 A	4 A	5 A	6 A
Canferol-3-O-gluc -7-O-ramn.	101,5	74,3	76,5	70,3	76,6	61,2	98,9	70,3	70,5	71,8	70,0	17,5
Canferol-3-O-(6"-O-acetil)gluc	101,3	74,1	76,4	70,0	74,1	62,8	98,9	70,0	70,6	71,1	68,9	17,5
-7-O-ramn.												

iii) Determinación de la posición de acilación en glicósidos acilados

En un glicósido acilado, el carbono directamente unido al hidroxilo acilado está desplazado a campos más bajos, acentuándose esta diferencia cuanto mayor carácter de atractor de electrones posea el acilante (162). Simultáneamente los carbonos vecinos se desplazan a campos más altos (2-5 ppm), este desplazamiento no se ve afectado por el cambio de acilo. Además, puede deducirse la identidad del acilante de sus señales en el espectro.

En la Tabla 13, puede observarse cómo la presencia de un acetilo en el OH-6 de glucosa en canferol-3-O-(6-O-acetil)glucósido-7-O-ramnósido, comparado con el compuesto no acetilado, afecta los C-6 y C-5 de este azúcar (162).

METODOS QUIMICOS APLICADOS A LA ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE GLICOSIDOS DE FLAVONOIDES

a) Hidrólisis ácida

Los glicósidos de flavonoides se hidrolizan en medio ácido con mayor o menor facilidad, obteniéndose, en la generalidad de los casos, la aglicona y los monosacáridos componentes. Ciertas uniones pueden ser algo más resistentes que otras y a veces son posibles hidrólisis parciales, por ejemplo un monosacárido y un glicósido más simple de la aglicona. La mayor o menor susceptibilidad de los glicósidos de flavonoides a la hidrólisis ácida ha sido muy estudiada (164) y depende de la naturaleza del azúcar, de la posición de la aglicona a la cual está unida y el tipo de glicósido de que se trate (O-glicósido o C-glicósido).

Harborne (164) observó que la dificultad de la hidrólisis de ciertos glicósidos en ácido acuoso se basaba sobre todo en su insolubilidad en el medio hidrolítico. Por ejemplo, luteolina-7-O-glucósido requería para su hidrólisis, seis horas de calentamiento en SO_4H_2 30 % (165) y menos de una hora en ClH 1N : etanol, 1:1 (164). Por el contrario observó que los C-glicósidos no se hidrolizaban ni aun con veinticuatro horas de calentamiento con su reactivo ácido clorhídrico etanólico ni había enzima que hidrolizara azúcares unidos por enlaces

carbono-carbono.

Estudió además las velocidades de hidrólisis aproximadas de O-glicósidos. Los resultados muestran que el factor más importante para determinar la velocidad de hidrólisis es la naturaleza del azúcar. Para monoglicósidos, los monosacáridos podrían ordenarse del siguiente modo, según su resistencia creciente a la hidrólisis ácida: L-ramnosa=L-arabinosa; D-glucosa aproximadamente igual a D-galactosa; ácido glucurónico. La resistencia a la hidrólisis de los O-glucurónidos es un hecho muy comprobado en hidrólisis de polisacáridos y saponinas con residuos urónicos, y se debería más a una conformación diferente de estos glicósidos respecto al resto, que a la existencia del grupo carboxilo en C-6.

La posición de glicosidación también es importante, los 3-O-glicósidos se hidrolizan más rápidamente que los 4'-O-glicósidos y estos más que los 7-O-glicósidos, por lo que la velocidad final de hidrólisis resulta de la combinación de ambos factores.

La naturaleza de la aglicona no influye; para un mismo azúcar y posición, los resultados son comparables al variar la aglicona.

Los grupos acilo aromáticos, unidos a azúcares de glicósidos de flavonoides, aumentan su resistencia a la hidrólisis ácida (166).

Un caso particular en la hidrólisis ácida parcial son los rutinósidos y neohesperidósidos, ambos α -L-ramnopiranosil- (β -D-glucopiranosidos, α 1+6 y α 1+2 respectivamente. Por hidrólisis en ClH alcohólico, sólo se obtienen los glucósidos del flavonoide como productos intermedios de hidrólisis a partir de los neohesperidósidos. Sin embargo, se describió (167) la obtención de quercetina-3-O-glucósido y hesperetina-7-O-glucósido a partir de rutina y hesperidina, por tratamiento con ácido fórmico en ciclohexanol hirviente.

b) Hidrólisis enzimática

La especificidad de las enzimas permite hidrólisis determinadas, de gran valor en el estudio estructural y en condiciones suaves. Las enzimas son específicas en mayor o menor medida al sustrato sobre el que actúan, pero es más útil la especificidad respecto a la configuración del C-1 de ese azúcar, así, β -glucosi-

dasa no tiene actividad apreciable sobre α -glicósidos.

El ácido glucurónico, tan resistente a la hidrólisis ácida, se escinde con facilidad y a temperatura ambiente, por tratamiento con la correspondiente β -glucuronidasa.

De acuerdo con lo esperado (164) se observa que la velocidad de hidrólisis de monoglicósidos es mucho mayor que la de los diglicósidos. Esto permite hidrólisis selectivas del monoglicósido, por ejemplo, en el caso de canferol-3-O-sofósido-7-O-glucósido, para dar el 3-O-diglicósido con buen rendimiento por tratamiento con β -glucosidasa. En general se trata de enzimas exo, por lo tanto, no hidroliza el enlace interno sin la escisión previa del azúcar terminal. Así, por ejemplo, una β -glucosidasa no actúa sobre quercetina-3-O-rutinósido (rutina) y sólo lo hace si previamente se utilizó α -ramnosidasa para obtener quercetina-3-O-glucósido (164).

c) Hidrólisis alcalina

Fue un método tradicionalmente usado en el estudio de flavonoides por métodos químicos, cuando los métodos espectroscópicos no tenían el desarrollo actual. En general consistía en la ruptura del anillo pirano central de flavonoides (anillo C) por fusión con hidróxido de potasio o calentamiento con álcali diluido de dos a seis horas. Se obtenían los fragmentos de los anillos A y B como las correspondientes acetofenonas y ácidos benzoicos en chalconas y flavanonas (168). En flavonas, la digestión en KOH 30-50 % durante algunas horas, o en tubo cerrado con NaOH alcohólico a 170°C o directamente la fusión con KOH a 220°C durante quince minutos, conducía a polifenoles, ácido acético y derivados del ácido benzoico, según la sustitución del anillo B (168).

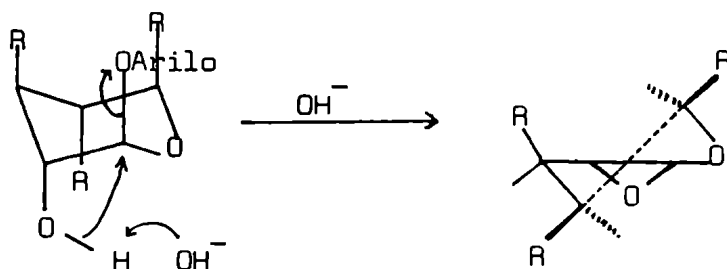
Estas degradaciones han caído en desuso frente a los métodos espectroscópicos, pero en 1963 Horowitz y Gentili (169) la utilizaron para demostrar la estructura de neohesperidosa, el disacárido de ramnosa y glucosa presente en los glicósidos de flavonoides amargos de Citrus. Se conocía ya, por ese entonces la estructura de rutinosa, otro ramnoglicósido de flavonoides de Citrus. Neohesperidina, un glicósido isomérico de hesperidina (hesperetina-7-O-rutinósido)

era también un 7-O-ramnoglicósido de hesperetina. Tanto neohesperidina como naringina, otro flavonoide de Citrus, daban, por calentamiento con KOH 20-25 % el mismo ramnoglicósido de floracetofenona, cuya estructura fue confirmada por hidrólisis y metilación de los hidroxilos fenólicos. Ambas flavanonas estaban glicosidadas en su OH-7, por el mismo disacárido distinto de rutinosa.

Una observación significativa era que los derivados de neohesperidosa, como se denominó a este nuevo disacárido, se degradaban suavemente y sin deglicosidación dando la 4'-neohesperidosil-floracetofenona, en cambio con los de rutinosa, era imposible aislar cualquier fragmento discreto que contuviese azúcar.

Una explicación de este comportamiento se basa (170) en la inestabilidad en álcalis de glicósidos que tengan un hidroxilo trans a un grupo ariloxi adyacente (como en el caso del OH-2 de glucosa en hesperidina y en los derivados de rutinosa) que se descomponen dando un compuesto 1,2-anhidro (Fig. 25).

Fig. 25:



La estabilidad de los derivados de neohesperidosa da una clave acerca de su estructura. Se sabía que si el OH-2 estaba metilado, el desplazamiento no ocurría (170), por lo tanto, si el OH-2 de glucosa en neohesperidosa estaba bloqueado para la degradación alcalina, debía estar glicosidado por la ramnosa del disacárido. Esta hipótesis demostró ser correcta en posteriores estudios por metilación.

En 1967 se introdujo otra modificación al método de degradación alcalina (171) realizándola en medio reductor, con amalgama de sodio. Es suave, aplicable a todo tipo de flavonoide y en cualquiera de ellos, para un determinado esquema de sustitución se obtienen los mismos productos, porque en todos los casos la reacción transcurre a través de la apertura reductiva del anillo C y posterior ruptura de la dihidrochalcona producida, dando siempre polifenoles para el anillo

A y los correspondientes ácidos fenilpropiónicos junto a los fenilpropanoles para el anillo B. Todos estos compuestos pueden caracterizarse fácilmente por cromatografía bidimensional en sílicagel.

d) Hidrólisis del oligosacárido como tal, a partir de un glicósido de flavonoide

Se requieren procedimientos especiales para la ruptura selectiva del enlace azúcar-aglicona, frente al resto de las uniones glicosídicas. Esta reacción, tiene interés como método preparativo de oligosacáridos y para las determinaciones estructurales de productos naturales.

Las hidrólisis ácidas controladas o las acetólisis se han usado en casos particulares (172, 173) pero son métodos empíricos, no siempre exitosos.

Otros métodos probados fueron la reducción o hidrogenólisis, la ozonólisis y el ácido bromhídrico en ácido acético glacial en glicósidos peracetilados.

La oxidación controlada con peróxido de hidrógeno es un método muy selectivo para la identificación del oligosacárido en OH-3 de un flavonol o antociana. Fue aplicada por primera vez en 1932 (174) a la antociana malvina del malvón. El método fue modificado en 1961 (175) y generalizado a los flavonoles. No se liberaban azúcares de otras posiciones, lo que permitía el estudio del de OH-3.

Bognár y Gross (176) describieron una técnica aplicable en modo general a la ruptura selectiva de oligosacáridos en cualquier posición. El tratamiento del glicósido acetilado con dicloro o dibromometil metil éter en presencia de Cl_2Zn produce el oligosacárido como haluro del glicósido acetilado. Por ejemplo, los heptaacetatos de metil y fenil- β -celobiosa dan cloruro de hepta-O-acetil- α -celobiosilo con rendimientos del 82 y 49 % respectivamente.

Al aplicar este método a glicósidos de flavonoles, como el acetato de rutina (quercetina-3-O-rutinósido peracetilada) se obtuvieron haluros de hexa-O-acetil- α -rutinosa, que por hidrólisis daban (177) hepta-O-acetilrutinosa.

e) Análisis por metilación

Las hidrólisis inespecíficas sólo permiten el estudio de la calidad y cantidad de monosacáridos que glicosidan a un flavonoide. Otras propiedades del glicósido como ser la secuencia de los azúcares, la posición de la unión interglicosídica o puntos de ramificación, la naturaleza anomérica de cada componente y la posición de acilación, si se trata de un glicósido acilado, no pueden determinarse a menos que la hidrólisis sea específica en algún sentido, o que las características del glicósido natural se puedan "marcar" de algún modo previamente a la hidrólisis ácida.

En cuanto a la primera de las opciones, como se discutió anteriormente, cuando un método de hidrólisis es específico para alguna propiedad brinda información acerca de ella. Por ejemplo, las hidrólisis enzimáticas que son específicas respecto a la configuración del C-1 del azúcar que hidrolizan.

En cuanto a la segunda posibilidad, se desarrolló el estudio de la estructura de hidratos de carbono por metilación exhaustiva de sus hidroxilos libres formando metil éteres que son estables frente a la hidrólisis ácida, de modo que en el estudio de los productos de hidrólisis de un producto permetilado, los hidroxilos metilados provienen de hidroxilos originalmente libres, y las posiciones libres, de hidroxilos sustituidos en el compuesto original, teniendo en cuenta las dos condiciones esenciales para que el análisis tenga valor: la metilación completa y la minimización de la demetilación durante la hidrólisis.

Métodos generales de metilación exhaustiva

La metilación de un polisacárido o de un glicósido, no es una reacción completa en cualquier condición, requiere o un alquilante poderoso o la ionización completa de los hidroxilos. Para lograr la metilación exhaustiva requerida en un estudio por metilación, se aplicaron distintas técnicas, perfeccionadas a lo largo de los años por muchos investigadores.

Denham (178), Woodhouse (178) y Haworth (170) utilizaron las repetidas reacciones con sulfato de metilo e hidróxido de sodio. A menudo se obtenía sólo un

producto parcialmente metilado, por lo que se ideó un método alternativo, debido a Irvine y Purdie (180), que consistía en el tratamiento con óxido de plata en ioduro de metilo hirviente.

La técnica de Purdie fue modificada por Kuhn *et al.* (181), llevando a cabo la reacción en un solvente polar, N,N-dimetilformamida, en el que los polisacáridos y glicósidos se disolvían mejor. Como el óxido de plata a veces causaba degradaciones oxidativas de los glicósidos parcialmente metilados, modificaron la reacción con el uso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ o NaOH . La reacción también podía llevarse a cabo en dimetilsulfóxido, que es también muy buen solvente de glicósidos.

El mejor método de metilación fue desarrollado por Hakomori (182) sobre estas bases. El compuesto a metilar se trata con una base muy fuerte el anión dimetilsulfinilo en dimetilsulfóxido. La base se prepara agregando hidruro de sodio al dimetilsulfóxido (183) y se agrega el compuesto, también disuelto en dimetilsulfóxido, con agitación. En algunas metilaciones de polisacáridos (184), han agregado el hidruro de sodio directamente a la solución en dimetilsulfóxido del polisacárido (Fig. 26).

Los hidroxilos de los azúcares se ionizan dando un polialcóxido que luego reacciona rápidamente con ioduro de metilo. El tratamiento de la mezcla de reacción con ultrasonidos (185) facilita la disolución del polisacárido o glicósido y la reacción final con CH_3I . De este modo se puede realizar la permetilación en un solo paso. La etapa de la ionización total es algo lenta comparada con la reacción posterior y debe dejarse algunas horas en contacto con la base antes de agregar el ioduro de metilo (Fig. 26).

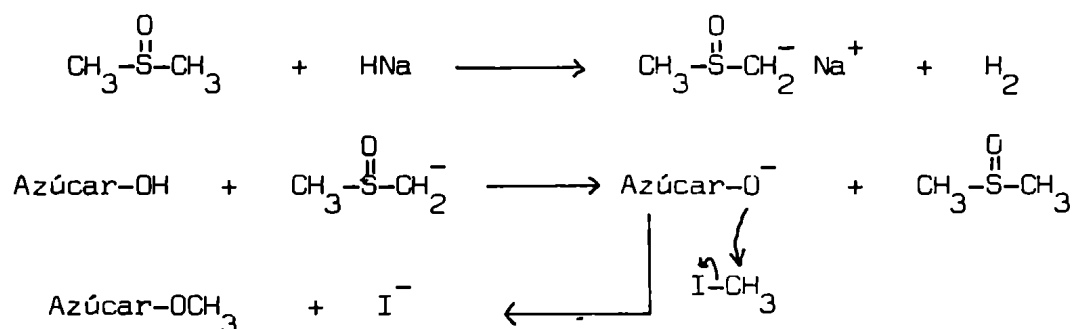


Fig. 26: Esquema de la metilación por la técnica de Hakomori.

La limitación del método es evidente: no puede ser usado con compuestos lábiles a bases. En polisacáridos acetilados, los O-acetilos son completamente reemplazados por O-metilo en las condiciones de la metilación de Hakomori (186) mientras que en la metilación de Kuhn, la mayor parte de los acetilos permanece, pero en las condiciones de la reacción se promueve su migración (187). Los otros O-acilos reaccionan de igual modo y se eliminan en la metilación de Hakomori. Los hidratos de carbono con sustituyentes lábiles a bases, sin embargo, pueden metilarse con diazometano-trifluoruro de boro eterato (188), pero la presencia de un ácido de Lewis fuerte y un solvente no polar, limita la aplicabilidad de la reacción.

Modificaciones a los métodos clásicos de metilación, para el estudio de compuestos lábiles a bases.

Para poder estudiar compuestos lábiles a bases, por ejemplo glicósidos acilados, era necesario el empleo de un metilante poderoso que no requiriera un medio básico fuerte para la ionización de los hidroxilos.

El trifluormetanosulfonato de metilo, resultó un reactivo adecuado para estos fines. La alquilación con triflatos (trifluormetanosulfonatos) había sido estudiada en 1973 (189) comprobando la gran capacidad metilante y alquilante de este reactivo en condiciones suaves, y como grupo saliente de sistemas policíclicos de otro modo no reactivos, extendiendo así el panorama de las reacciones de solvólisis. Su gran reactividad con alcoholes de baja nucleofilicidad fue probada con 2,2,2-trinitroetanol; 2,2-dinitro-1,3-propanodiol y 2-fluor-2,2-dinitroetanol que no habían sido alquilados anteriormente ni en medio ácido ni en medio alcalino. Con un conveniente secuestrante de protones (CC_3K_2 o SO_4Na_2) se obtienen rendimientos del 43 al 75 %.

El método fue aplicado a la metilación (190, 191) y bencilación (191, 192) de hidratos de carbono. Era necesario el agregado de una base para neutralizar el ácido liberado, pero el uso de CO_3K_2 resultó insuficiente ya que se producía anomerización por el ácido fuerte. Otras bases orgánicas se N-metilaban con rapidez, por lo que fue necesario el uso de una base impedida como 2,6-diterbutil-

piridina, que no se metilaba por impedimento estérico. Así, la reacción de un compuesto con trifluormetanosulfonato de metilo en diclorometano con esta base como secuestrante de protones, se completaba en aproximadamente dos horas y media de calentamiento a 80°C en atmósfera de N₂ (190, 191).

Esta reacción era limpia y completa pero restringida a hidratos de carbono solubles en diclorometano o a los derivados acetilados o trimetilsililados de los que no lo eran.

Una modificación posterior (193) extendió las potencialidades del reactivo a todo tipo de hidratos de carbono y glicósidos. Se buscaba un solvente de amplio poder disolvente, aprótico y que no disminuyera la reactividad del trifluorometano de metilo. Solventes polares apróticos como la triamida del ácido hexametilfosfórico, el dimetilsulfóxido y la N,N-dimetilformamida, disminuían la reactividad (194). Se probaron entonces, solventes apróticos con menor carácter donador de electrones como tetrametilensulfona, carbonato de etileno y propileno, y fosfato de metilo (195) respecto a su capacidad de disolver hidratos de carbono y mediar en la metilación. Se halló que el fosfato de metilo era un solvente excelente para la metilación con trifluormetanosulfonato de metilo y 2,6-diterbutilpiridina y fue aplicado exitosamente en lipopolisacáridos de Escherichia coli por reacción a 50°C durante dos horas, en condiciones suaves y en un solo paso.

El único método alternativo para analizar la posición de un acilante fue descrito por Belder y Norrman (196) en 1968, en el estudio de la posición de los sustituyentes de un dextrano parcialmente acetilado. Consistía en reemplazar los grupos O-acetilo naturales por grupos O-metilo estables a la hidrólisis, previa protección de los restantes hidroxilos con metil vinil éter.

Un antecedente de esta estrategia era el método de Bouveng (197, 198) que consistía en proteger los hidroxilos libres por reacción con fenilisocianato en condiciones en que los acetilos eran estables y no migraban. A continuación se realizaba la hidrólisis ácida selectiva de los acetilos, metilación de esas posiciones, escisión reductiva de los grupos fenilcarbamoilo y finalmente la hidrólisis total de la cual resultaba una mezcla de azúcares metilados, de la

que podía deducirse la posición original de los acetilos.

El método presentaba algunos inconvenientes debidos a la inevitable desacetilación en medio ácido junto con algo de despolimerización y pérdida de grupos fenilcarbamoilo (199). Además la ruptura reductiva de los grupos fenilcarbamoilo conducía a cierto grado de demetilación (199).

El uso de los metil vinil éteres como grupos protectores, simplificó y acortó el método y subsanó sus desventajas. La reacción de vinil éteres con alcoholes da mezclas de acetales que son estables en medio básico y muy fácilmente hidrolizables en medio ácido (196) (Fig. 27).

Los intentos para sustituir completamente O-acetildextrano, usando 2,3-dihidro-4H-pirano, metil vinil éter o etil vinil éter en dimetilsulfóxido con ácido p-toluensulfónico como catalizador, no tuvieron éxito, quizás porque con este procedimiento ocurría algo de hidrólisis de los grupos acetales durante la precipitación en agua pese a los intentos de evitar la acidez. Sin embargo, si el producto se aísla por filtración por gel en ausencia de agua, se obtiene la separación cuantitativa del derivado de los productos de reacción de bajo peso molecular y de los restantes reactivos. La desacetilación se realiza con metóxido de sodio en metanol y la metilación puede realizarse por cualquiera de los métodos descritos en medio básico. La hidrólisis ácida total produce en el caso del O-acetildextrano, una mezcla de D-glucosa y de sus metil éteres (196) (Fig. 27).

Como se observa en la Fig. 27 para la comparación entre los métodos de metilación directa y el método recién descrito que utiliza la protección de los hidroxilos libres con metil vinil éter, los productos finales de un mismo polisacárido o glicósido por ambos métodos tienen la distribución exactamente opuesta de posiciones libres y metoxiladas, excepto en el caso del punto de unión interglicosídica, que resulta en un hidroxilo libre en los productos de ambas secuencias. En el esquema de metilación directa, los hidroxilos originalmente acilados quedan libres, mientras que en el método alternativo, las posiciones metiladas del producto final indican las posiciones originales de acilación.

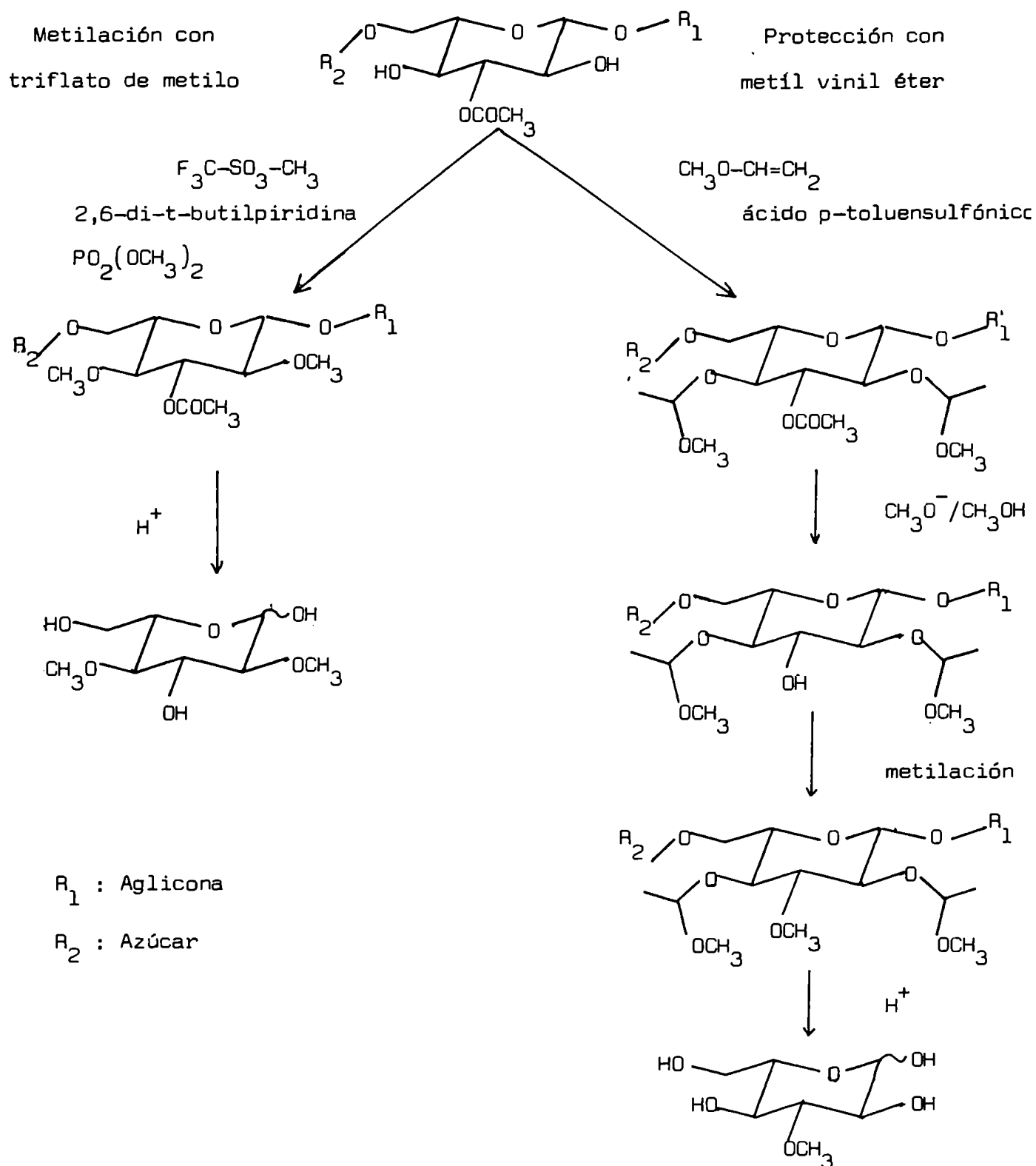


Fig. 27: Comparación de los productos obtenidos a partir de una unidad acilada de un glicósido por los dos métodos usados con sustituyentes lábiles a bases.

f) Estudio de los productos de hidrólisis del glicósido y de sus derivados

Aglicona

Se aísla de la mezcla de hidrólisis por extracción con solvente y, libre de los azúcares, se puede completar su estudio si fuera necesario. La polaridad de la molécula disminuye mucho. En su espectro UV se observa la aparición de los efectos de un nuevo hidroxilo, que probablemente produzca desplazamientos con alguno de los reactivos (139). El espectro de masas y de $^1\text{H-NMR}$ resultan más fáciles de interpretar y el de $^{13}\text{C-NMR}$ presentará los mismos desplazamientos, aunque en sentido inverso, a los causados por la glicosidación del hidroxilo hidrolizado (162).

Azúcares

Permanecen en la fase acuosa de la extracción de la aglicona. La identificación inequívoca de cada uno de ellos, tanto entre los productos de la hidrólisis ácida directa total o parcial, como en los productos de la hidrólisis del compuesto permetilado, permite conocer la cantidad y calidad de azúcares, la secuencia de los mismos en un oligósido, la posición de las uniones interglicosídicas, así como también el punto de ramificación en trisacáridos ramificados, y, finalmente, la posición de acilación, si existe en el producto natural.

Desde hace muchos años, se utiliza la cromatografía de partición para hidratos de carbono (200), así como las técnicas de cuantificación de azúcares por reacciones químicas (201). Pero en los últimos años, con el avance de la cromatografía gaseosa y el desarrollo de fases adecuadas, se halló un método más sensible y exacto de comparación, identificación y cuantificación de los azúcares productos de hidrólisis.

Para aumentar su volatilidad, los monosacáridos deben derivatizarse como sus acetatos o trimetilsililéteres. Las mejores separaciones de estos derivados se obtienen en columnas de succinato de butanodiol o de polifeniléter como fases (186). Como luego de la hidrólisis, los azúcares llegan a la mezcla de equilibrio de los anómeros en C-1, se obtienen dos picos por azúcar. Este hecho, que

puede ser de ayuda en mezclas simples, es una desventaja en mezclas complejas, por lo que se desarrolló el estudio de los azúcares como sus alditoles acetilados por cromatografía gaseosa. Así, por reducción, se obtiene un solo derivado por azúcar. Sin embargo, este método no fue posible hasta la introducción de una nueva fase para cromatografía gas-líquido, que permitiera la buena separación cromatográfica de los alditoles acetilados y los acetatos de alditoles parcialmente metilados. Esta fase era un copolímero de nitrosilicona y poliéster (202) llamada ECNSS-M. Los pocos alditoles que no se separan en ella, pueden separarse en otra fase desarrollada para alditoles, OS-138, fase de polifeniléter.

La identificación de los alditoles acetilados puede obtenerse por comparación con alditoles testigos en cromatografía gas-líquido, o por comparación de sus tiempos de retención relativos al 1,5-diacetil-2,3,4,6-tetrametilglucitol que están tabulados para los alditoles acetilados (203) y para los acetatos de alditoles parcialmente metilados (186), o bien por la interpretación de sus espectros de masas (186, 204), sobre todo de los alditoles parcialmente acetilados y metilados.

En efecto, la tabulación de los datos de espectrometría de masas para acetatos de pentitoles, hexitoles y 6-desoxihexitoles con distintos grados de metilación demuestra cómo para cada esquema de sustitución se obtiene un único espectro de masas (204) que en conjunto con el dato de tiempo de retención relativo a 1,5-diacetil-2,3,4,6-tetrametilglucitol y el conocimiento previo de la composición cuali y cuantitativa de los azúcares presentes, ofrece, en casi todos los casos suficiente evidencia para la caracterización inequívoca.

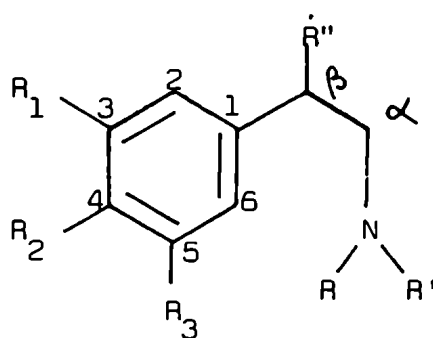
CAPITULO IV

ALCALOIDES

PARTE 1: FENETILAMINAS

INTRODUCCION A LA FAMILIA DE COMPUESTOS

Las fenetilaminas, son aminas simples con el esqueleto básico de 2-feniletilamina (Fig. 28), que presentan actividad fisiológica en el hombre y animales superiores, y se hallan distribuidas en gran número de familias vegetales (205).



$R, R' = H, CH_3 \text{ o } -COR.$

$R'' = H, CH_3 \text{ u } OH.$

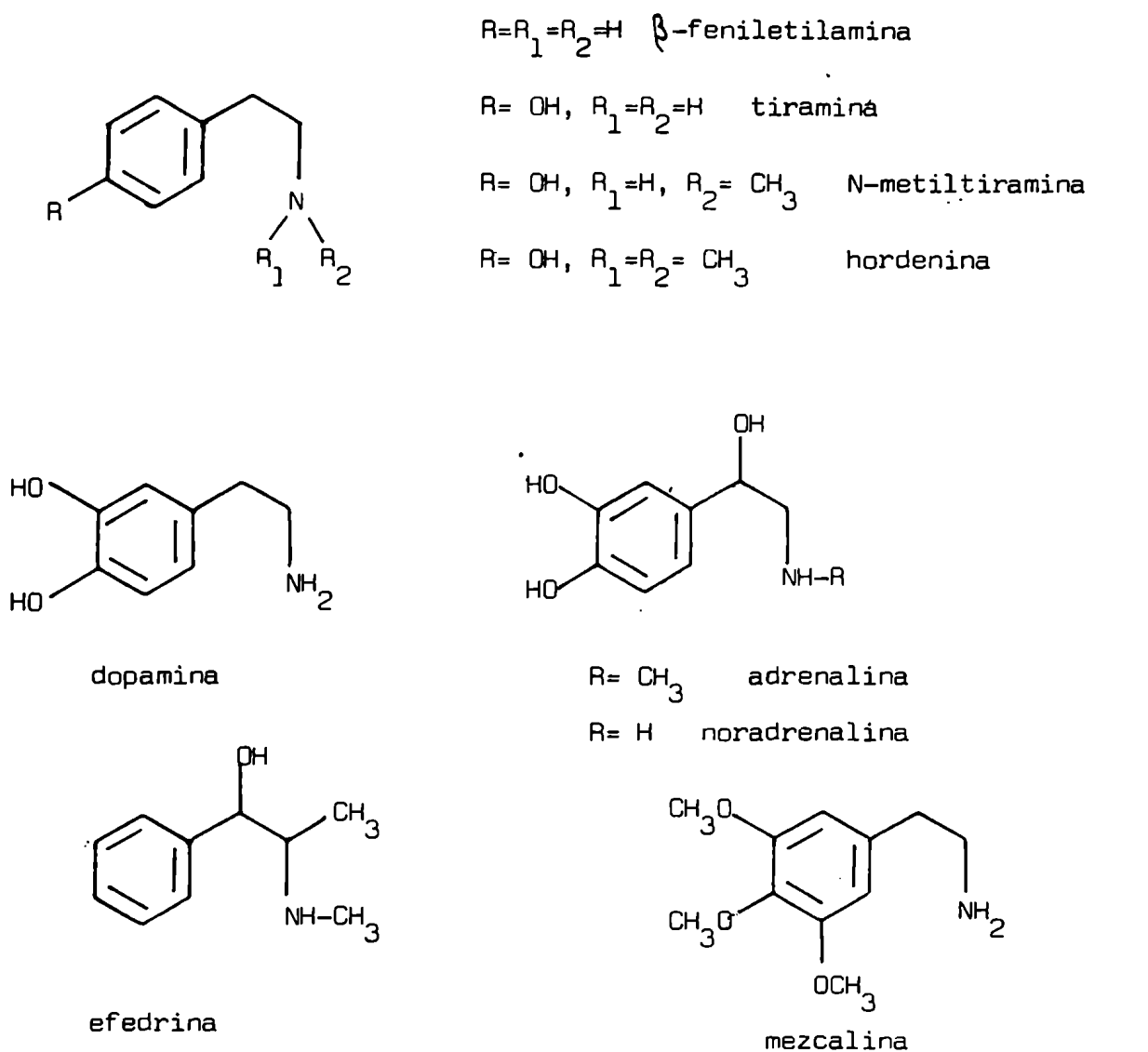
$R_1, R_2, R_3 = H, OH \text{ o } CH_3O-.$

Fig. 28: Esqueleto básico de las fenetilaminas.

Su distribución puede tener inclusive, algún interés quimiotaxonómico, porque ciertos compuestos relacionados aparecen característicamente en determinadas familias vegetales, por ejemplo las Rutáceas, donde se han identificado fenetilaminas N-aciladas con ácidos aromáticos (205), las Gnetáceas, con su género Ephedra de donde siempre se ha aislado efedrina (20, 205), mientras otras familias como las Leguminosas y especialmente las Cactáceas (205, 206), se caracterizan por la gran diversidad de estructuras de fenetilaminas aisladas, con distintos tipos de sustituciones en el anillo aromático, el nitrógeno o los metilenos (Fig. 29).

Por otra parte, los miembros más sencillos de esta familia, la β -feniletilamina, la 4-hidroxifenetilamina (tiramina), la N-metiltiramina y la N,N-dimetiltiramina (hordenina) (Fig. 29), se encuentran solas o en conjunto en gran cantidad de especies de distintas familias vegetales: Gramíneas, Leguminosas, Rosáceas, Lorantáceas, Solanáceas y además en algas y hongos (205).

La razón de su importancia y lo que ha impulsado su estudio, es su actividad fisiológica. La hormona adrenalina y los transmisores del sistema simpático (207



Algunas fenetilaminas aisladas de Rutáceas.

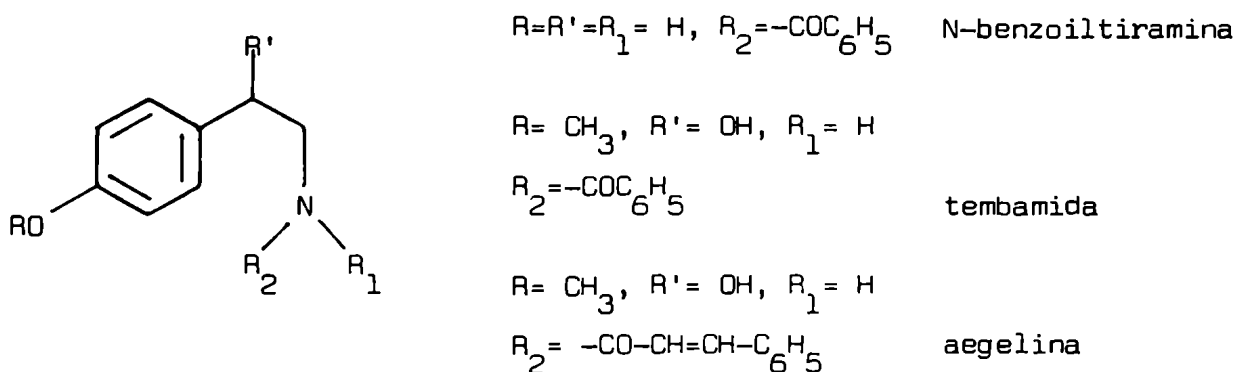


Fig. 29: Algunos ejemplos de fenetilaminas aisladas de vegetales.

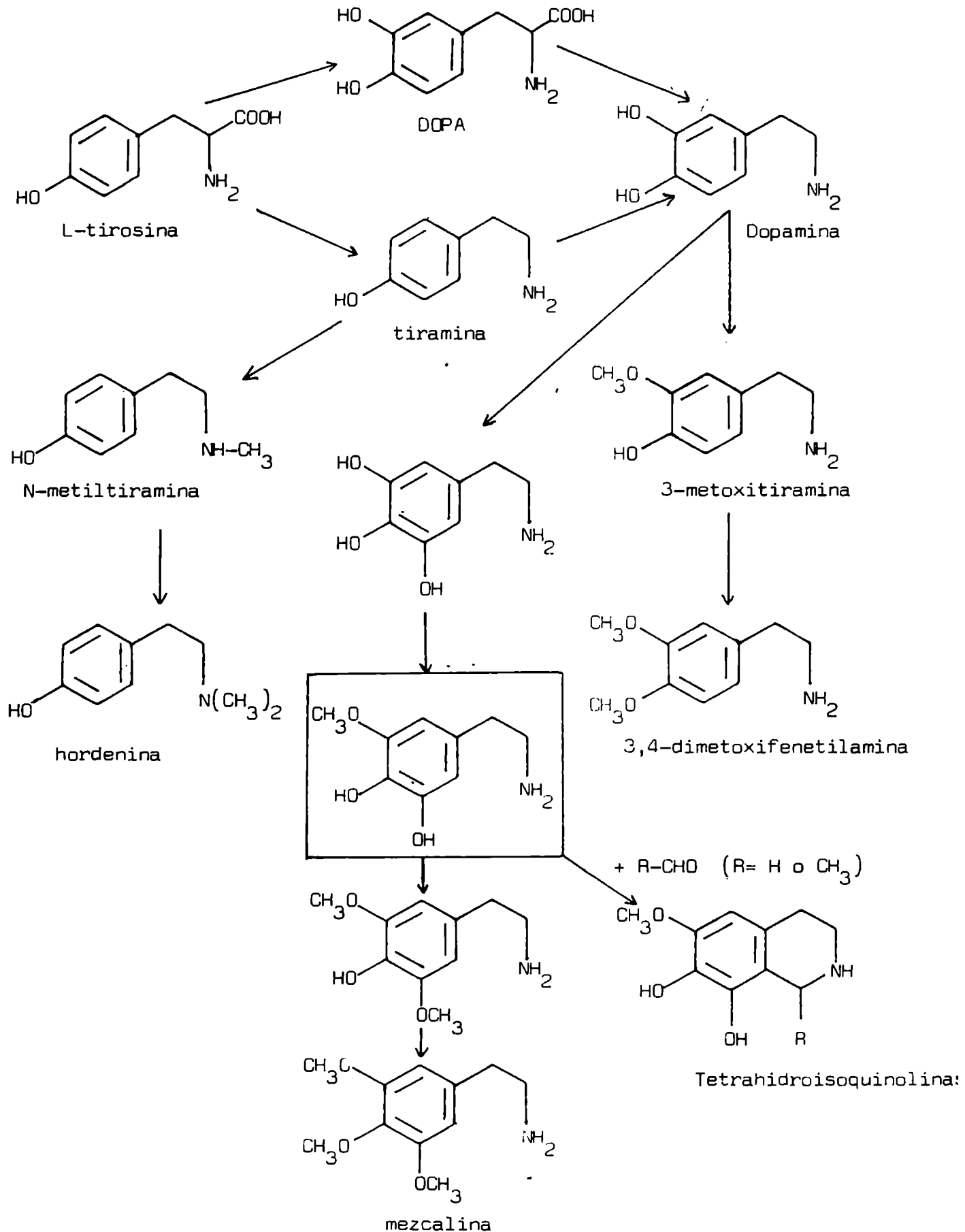


Fig. 30: Esquema biosintético de fenetilaminas en Cactáceas (210, 211, 212).

noradrenalina y dopamina (Fig. 29), son fenetilaminas hidroxiladas llamadas en conjunto catecolaminas por presentar dos hidroxilos fenólicos en posición orto. Se las ha aislado también en grandes cantidades, de ciertas especies vegetales de las familias Portulacáceas, Pasifloráceas, Musáceas, etc. (20, 205).

Muchas fenetilaminas presentes en plantas comestibles provocan alteraciones orgánicas en seres humanos y animales, por ejemplo, entre otras, la N-metiltiramina, presente en especies de Acacia, produce migrañas en el hombre y ataxia en animales (208), y la mezcalina, conocido alucinógeno, en el cactus Lophophora williamsii, cuyo nombre común es el peyote (209).

Las fenetilaminas derivan biosintéticamente del aminoácido tirosina teniendo a la dopamina como intermediario, como ha sido demostrado en varias especies (210, 211) (Fig. 30) y a su vez, son precursores biosintéticos de las tetrahydroisoquinolinas, con las que coexisten en las Cactáceas (212, 213). Ciertas plantas sintetizan y degradan luego determinadas fenetilaminas en una etapa de su crecimiento, y se ha estudiado en ellas el catabolismo de estos alcaloides (214). También se han aislado como productos naturales, algunos compuestos de amonio cuaternario derivados de las fenetilaminas (20, 215) (Fig. 31).

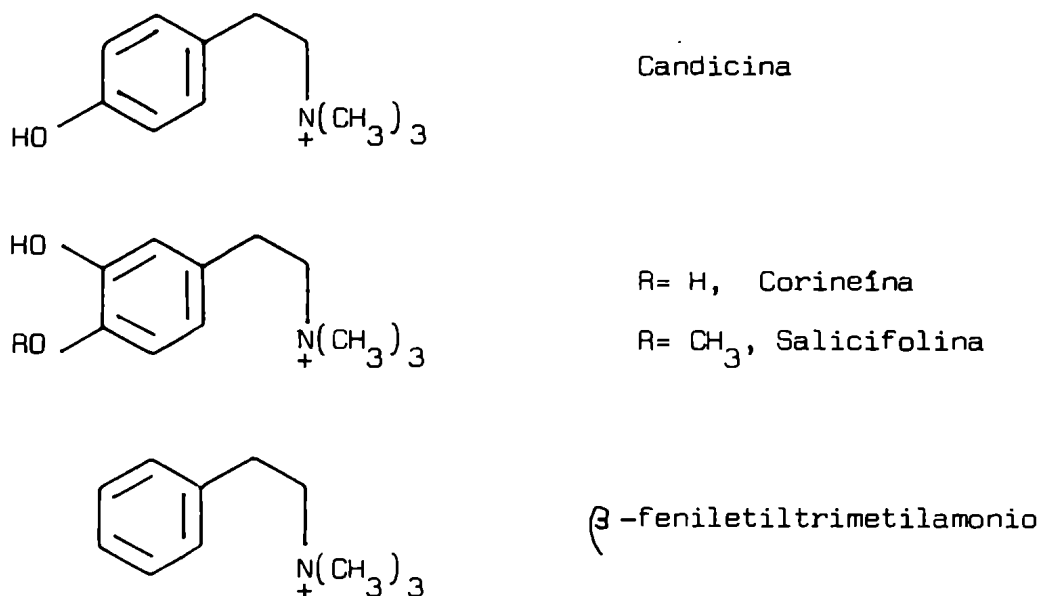


Fig. 31: Algunos ejemplos de compuestos de amonio cuaternario derivados de fenetilaminas.

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS APLICADOS A LA ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE FENETILAMINAS

a) Espectrometría de masas

El espectro de masas de las fenetilaminas es sencillo de interpretar y de gran ayuda para la elucidación estructural (216).

El ión molecular no es intenso, en general del 1 al 5 % del pico base, pero siempre visible. El fragmento principal proviene de la ruptura homolítica entre los carbonos α y β al nitrógeno (Fig. 32). El fragmento nitrogenado es usualmente el pico base e indica si la amina en estudio es primaria (m/e 30), secundaria (m/e 44) o terciaria (m/m 58). El fragmento correspondiente al anillo aromático es un catión bencílico(I), originado por una ruptura heterolítica, de cuya masa puede deducirse la sustitución aromática. Por un reordenamiento de Mc Lafferty del ión molecular se obtiene el ión (III) (Fig. 32). Este ión se produce en aminas primarias y secundarias, pero no en las terciarias en las que el único correspondiente a la porción aromática es el catión bencílico (216).

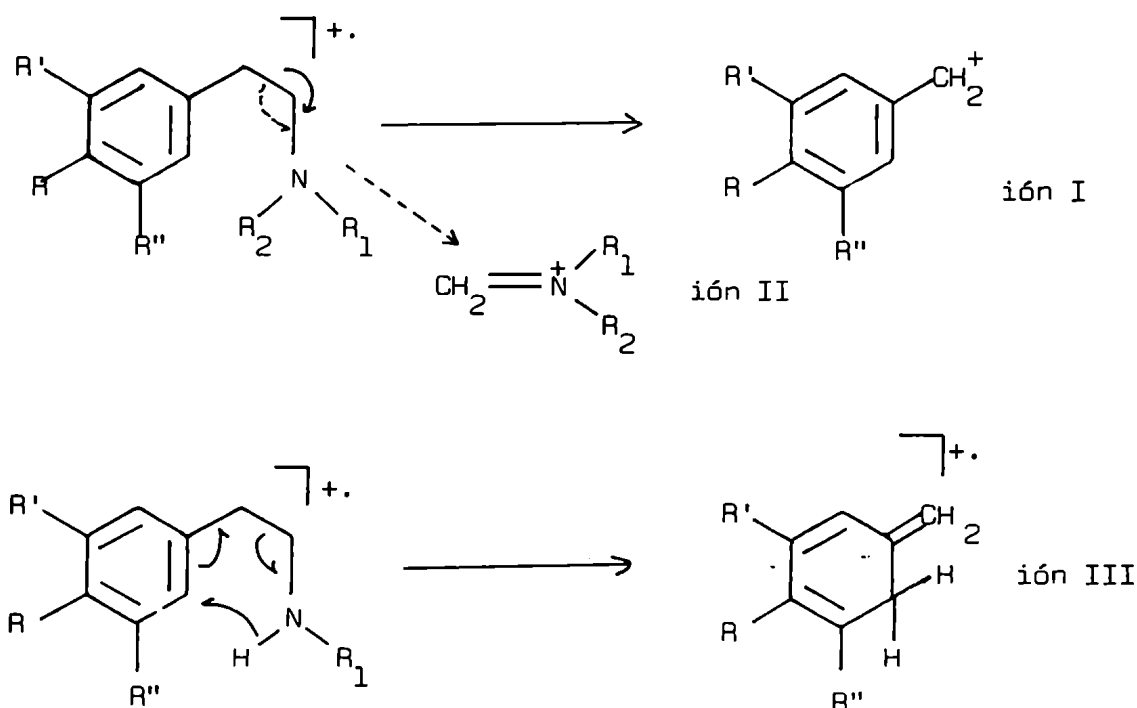


Fig. 32: Rupturas de fenetilaminas en espectrometría de masas.

En ciertos casos, se observan además picos provenientes de las pérdidas de los sustituyentes aromáticos, por ejemplo pérdida de 15 uma de un metoxilo aromático. En caso de existir un hidroxilo en posición β al nitrógeno se observa la pérdida de agua del ión molecular como se ejemplifica a continuación para sinefrina (217)(Fig. 33).

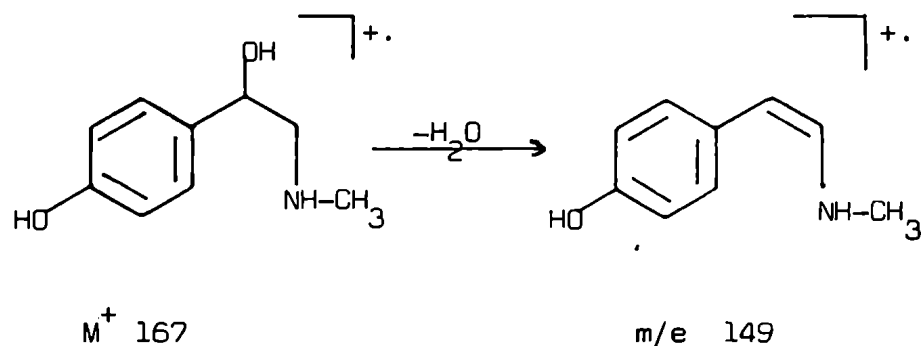


Fig. 33: Ión originado por deshidratación en sinefrina (217).

En los productos N-acilados y en las amidas naturales derivadas de fenetilaminas, hay una fragmentación tipo Mc Lafferty con transferencia de un hidrógeno hacia el carbonilo amídico, dando un ión tipo estireno, además de la ruptura β mencionada (218)(Fig. 34).

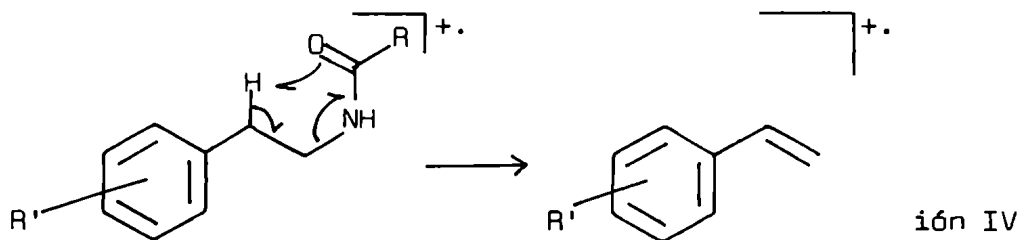


Fig. 34: Reordenamiento tipo Mc Lafferty en fenetilaminas N-aciladas.

La combinación de la espectrometría de masas con la cromatografía gas-líquido, facilita aun más la caracterización de estos alcaloides en mezclas.

Una técnica conveniente para el análisis de pequeñas cantidades de fenetilaminas no fenólicas es la espectrometría de masas de sus dansil derivados (219). Las amidas formadas por reacción con este compuesto (ácido-5-dimetilamino-1-naftalensulfónico) son separables por cromatografía; los derivados presentan intensa

fluorescencia a la luz ultravioleta de onda larga. Estos derivados se habían usado extensamente en la determinación de aminas (220) y aminoácidos (221) en sistemas biológicos complejos y se aplicaron en la determinación de pequeñas cantidades de fenetilaminas vegetales por espectrometría de masas de los derivados separados por cromatografía preparativa bidimensional (219) .

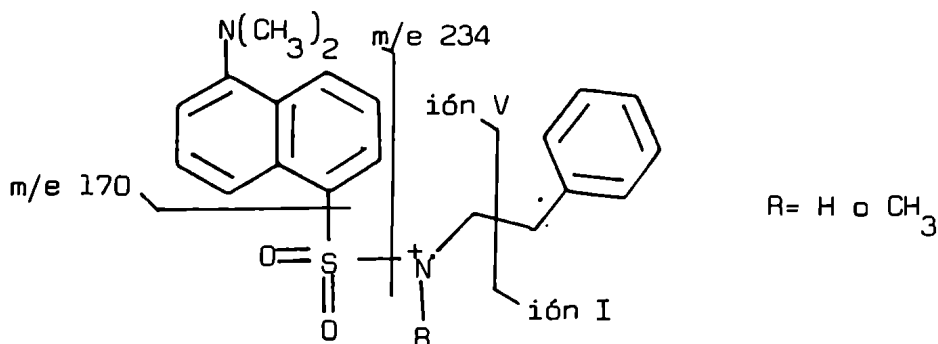
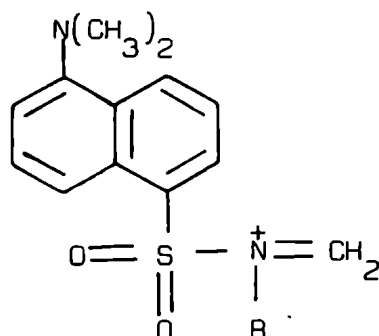


Fig. 35: Principales fragmentos de derivados dansilados de fenetilaminas.

Los espectros de masas de los derivados dansilados presentan rupturas análogas a las fenetilaminas correspondientes (Fig. 35). El ión molecular presenta en todos los casos una intensidad del 10 hasta el 60 % del pico base. Este último corresponde en todos los casos a m/e 170 y es debido a la porción del dansilo al igual que otros iones que también aparecen a 234 o 235, 186, 168, 154, 127 y 115. El ión aromático correspondiente a la ruptura β (I) se observa también con buena intensidad (20 al 70 %). La parte nitrogenada está en forma de dansilamida (ión V) y corresponde a m/e 263 para aminas primarias y m/e 277 para las secundarias, con intensidades relativas del 10 al 30 %. En la Tabla 14 se observan algunos ejemplos (219).



	m/e
R= H	263
R= CH ₃	277

Ión V (Tabla 14)

Dansil derivado de (219)	M^+ (%)	$Ión\ V$ (%)	Ruptura β (%)
β -feniletilamina	354 (43)	263 (9)	91 (14)
N-metilfenetilamina	368 (54)	277 (23)	91 (11)
4-metoxifenetilamina	384 (65)	263 (18)	121 (65)
N-metil-4-metoxifenetilamina	398 (5)	277 (31)	121 (26)
3,4-dimetoxifenetilamina	414 (19)	263 (21)	151 (76)
N-Me-3,4-dimetoxifenetilamina	428 (10)	277 (26)	151 (24)
Mezcalina	444 (7)	263 (21)	181 (75)
N-metilmezcalina	458 (9)	277 (28)	181 (24)

Tabla 14: Rupturas de diagnóstico en dansil derivados de fenetilaminas (m/e)

Otro tipo de derivado, usado especialmente con fenetilaminas inestables y con pobres propiedades cromatográficas en cromatografía gaseosa, como por ejemplo las catecolaminas, son los derivados trimetilsililados y los N-trifluoracetilados-O-trimetilsililados (222). Estos últimos sobre todo, resultaron ser más estables que los primeros y dieron mayor información en sus espectros de masas.

La sililación y trifluoracetilación es una técnica sencilla desarrollada por Donike (222, 223). El reactivo sililante es N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida y el acilante, N-metil-bis(trifluoracetamida). La técnica de derivatización puede aplicarse sobre sales de bases sin necesidad de liberarlas y los derivados, que son bastante estables protegidos de la humedad, presentan muy buenas propiedades cromatográficas.

En cuanto a sus espectros de masas, que se pueden realizar directamente o acoplado el espectrómetro al cromatógrafo gaseoso, presentan una diferencia sustancial entre los dos tipos de derivados mencionados. Ambos poseen el ión m/e 73, pico base en la mayoría de los casos; los iones moleculares no siempre se observan, siendo más común encontrar el $(M-15)^+$. Sin embargo, los derivados N,O-trimetilsililados retienen la carga en la porción nitrogenada, después del impacto electrónico y la ruptura β , perdiéndose muchas veces la información

acerca de la sustitución del anillo aromático, mientras que, los derivados N-trifluoracetilados-O-trimetilsililados, retienen la carga en la porción bencílica, que es un fragmento de 70 a 100 % de intensidad. Esto, que permite deducir la sustitución aromática, también indica por diferencia del M^+ o del $M-15)^+$, la sustitución sobre el nitrógeno N-trifluoracetilado (224).

b) Espectroscopía de ^1H -RMN

Los distintos protones de una fenetilamina resuenan a campos muy diferentes por lo que su espectro de ^1H -RMN es, en general, de fácil interpretación.

De las señales de la zona aromática surge su esquema de sustitución, dependiendo el desplazamiento químico de la naturaleza del sustituyente y las constantes de acoplamiento de los protones, de las posiciones sustituidas (51).

Los metilenos aparecen a campos más altos, como dos cuartetos complejos constituyendo un sistema AA'BB' que aparecerán más o menos separados según el desplazamiento químico que produzca su entorno. El metileno α al nitrógeno aparece entre 2,8 y 3,0 ppm en bases libres y entre 3,0 y 3,5 ppm en sales (51). La presencia de hidroxilo o metoxilo en el metileno β produce los correspondientes cambios en desplazamiento químico, integración y forma de la señal del protón bencílico (217) (Fig. 36).

Los metilos unidos al nitrógeno aparecen como singuletes alrededor de 2,4 ppm en las bases libres y 2,7 ppm en las sales (51). Los protones unidos a nitrógeno aparecen en zonas variables y como los hidroxilos fenólicos y alcohólicos se intercambian con D_2O . Los metoxilos aparecen como singuletes entre 3,7-3,9 si son aromáticos y alrededor de 3,2 ppm si son alifáticos (51) (Fig. 36).

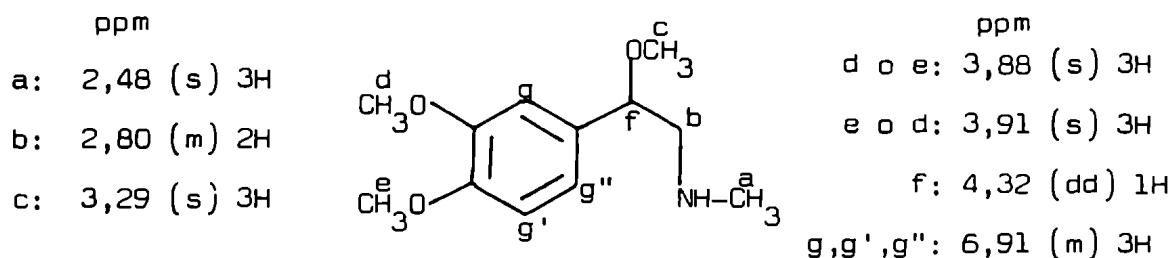


Fig. 36: Datos de ^1H -RMN de una fenetilamina (225).

PARTE 2 : ALCALOIDES DEL TROPANO

INTRODUCCION A LA FAMILIA DE COMPUESTOS

Pese a no ser éste el único grupo de bases que se encuentran en las Solanáceas, el término "alcaloides de las Solanáceas" ha quedado restringido a los alcaloides del tropano. Tal es su importancia histórica y farmacológica, por una parte, y fitoquímica por otra, ya que no hay tribu ni subtribu de la que no se hayan aislado este tipo de alcaloides (3, 20).

Estos compuestos consisten en un amino alcohol bicíclico, formado por la ciclación de una base pirrolidínica entre sus dos carbonos directamente unidos al nitrógeno, resultando un anillo de siete miembros. Su precursor biogenético es la higrina (226, 227) que, como se observa en la figura, lleva en sí, todos los carbonos de un núcleo de alcaloide del tropano (Fig. 37).

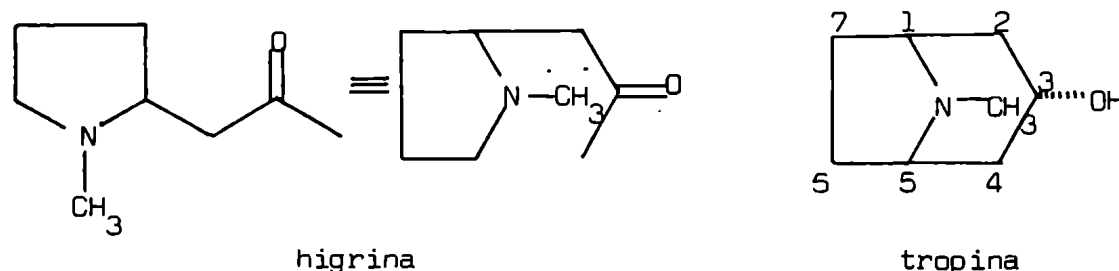


Fig. 37

Esta, a su vez, deriva biogenéticamente de la ornitina (228, 229) (Fig. 38) y ha sido demostrado en varias especies (226-228) que es el precursor de todos los alcaloides con núcleo pirrolidínico.

Estos alcaloides tan distribuidos en las Solanáceas, también se han encontrado en géneros de las familias Convolvuláceas (género Convolvulus) y Eritroxiláceas (género Erythroxyllum) (20). En cada uno de estos géneros los alcaloides cuentan con una característica que los distingue, por ejemplo en Convolvulus, la esterificación de los alcaloides del tropano con ácido 3,4-dimetoxibenzoico y en Erythroxyllum, son características la ecgonina (2-carboxitropina) y sus ésteres, de los cuales la cocaína (el éster metílico de la benzoilecgonina) es la más conocida por sus propiedades anestésicas (230).

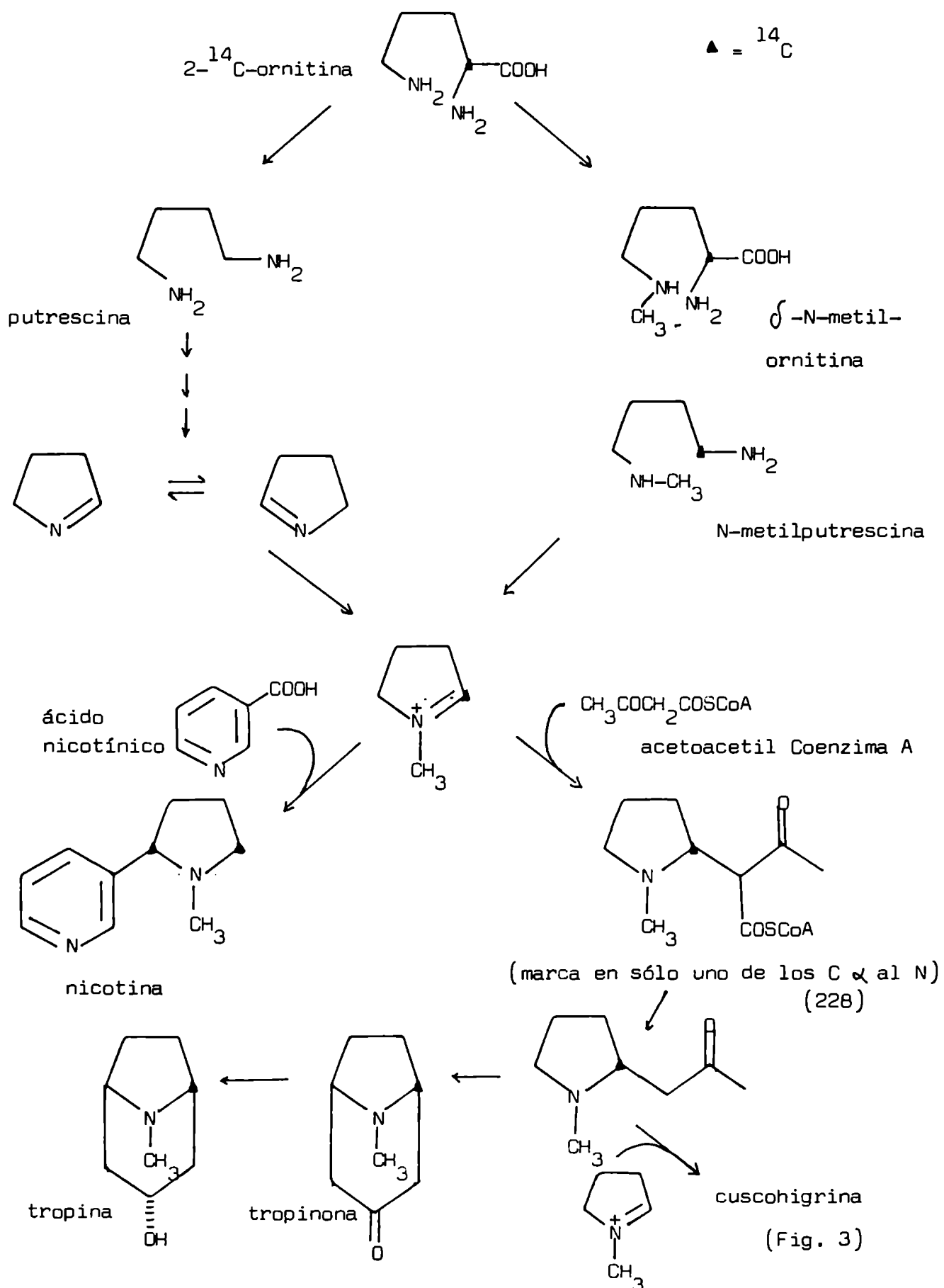


Fig. 38: Esquema biosintético de alcaloides con núcleo pirrolidínico a partir de ornitina (229).

Las bases del tropano más conocidas han sido aisladas de las Solanáceas y tienen un hidroxilo en C-3, en posición α (tropina) o este sustituyente más un epóxido entre C-6 y C-7 (escopina). Su actividad farmacológica la presentan cuando están esterificadas con el ácido trópico (Fig. 3) y estos compuestos han recibido el nombre de hiosciamina (o atropina para el racemato en C-3) y escopolamina, respectivamente. Se encuentran en cantidades muy importantes en ciertos géneros de Solanáceas, de los que se las aísla industrialmente con fines farmacológicos, por su acción parasimpaticolítica. Algunos de sus derivados son conocidos antiespasmódicos (230).

Pero además de estos compuestos, se han aislado otras estructuras de las Solanáceas. Respecto del núcleo tropano, se encontró en casi todos los casos el compuesto análogo de la serie nortropano, o derivados de tropina con la configuración β en el hidroxilo de C-3 (pseudotropina), o bases hidroxiladas en posiciones 3 y 6 (valeroidina) o en C-3, C-6 y C-7 (teloidina) o hidroxiladas en C-3 y C-7 y metoxiladas en C-6 (meteloidina) (Fig.39). Además de hallarse libres o esterificadas con ácido trópico, se las ha encontrado esterificadas con una gran variedad de ácidos (en distintos hidroxilos del núcleo o en todos ellos) fórmico, acético, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, tíglico, senécico, angélico, benzoico, cinámico, atrópico, etc.

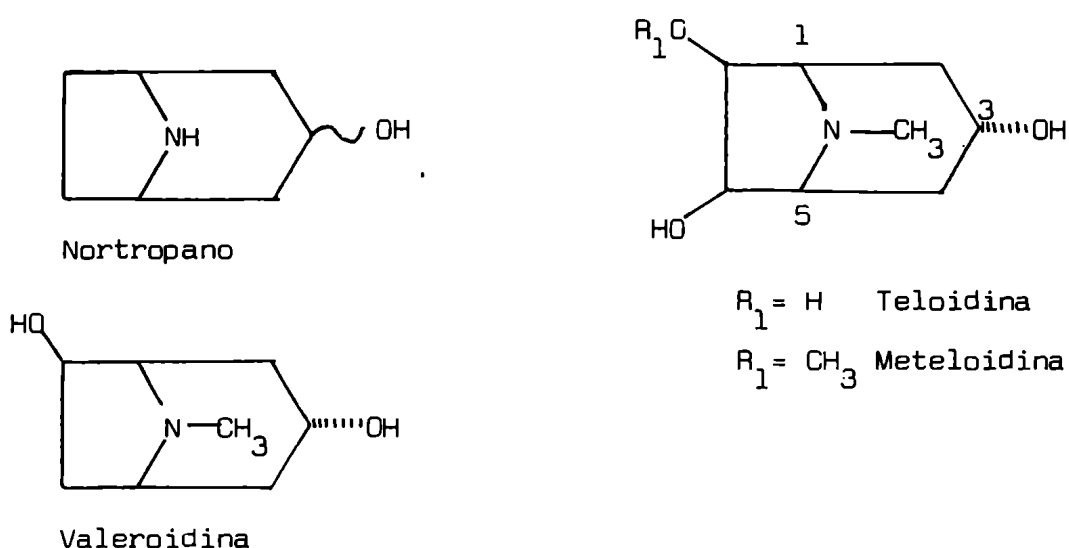


Fig. 39: Otros esqueletos base de alcaloides del tropano.

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS APLICADOS A LA ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE ALCALOIDES DEL TROPANO

a) Espectrometría de masas

La estructura de estos alcaloides alicíclicos, con función amino y funciones oxigenadas, hace que estén favorecidas las rupturas características en espectrometría de masas. El primer estudio sistemático, sobre compuestos no esterificados, fue realizado por Blossey, Fodor, Ohasi, Budzikiewicz y Djerassi en 1964 (231) demostrando que para estos compuestos también resultaban válidas las reglas de fragmentación conocidas y asignando las estructuras de los principales iones, confirmadas por deuteración.

Se observa en la Fig. 40, ejemplificado para tropinona (216, 231), el esquema de rupturas a partir de la fragmentación primaria, entre los carbonos α y β al nitrógeno. Este proceso está altamente favorecido, dada la estabilización de la carga positiva obtenida en la formación del ión de nitrógeno cuaternario, por participación del par de electrones no compartido de este átomo. El ión a m/e 82 (VI) resulta el pico base y proviene de la porción pirrolidínica, aunque también es importante el ión m/e 110, correspondiente al piridinio (III).

En los espectros de masas de todos los alcaloides del tropano puede detectarse con facilidad el ión molecular, aunque lo habitual es que su intensidad no sobrepase el 20 %. Otro ión característico aparece a m/e 42, representado por $\text{CH}_3-\overset{\dagger}{\text{N}}\equiv\text{CH}$ y está presente con abundancia en todos los alcaloides del tropano N-metilados.

Cuando aumenta la sustitución, por ejemplo en los carbonos 6 y 7, el proceso primario más favorecido es la ruptura entre el carbono α al nitrógeno y el carbono funcionalizado. Esto hace variar las abundancias de los iones, predominando los de la porción piperidínica (Fig. 40, iones I, II y III) (231).

Cuando el C-3 está hidroxilado, como en el caso de tropina, el ión molecular exhibe una pronunciada pérdida de 17 uma (M-OH) en m/e 124. Aparte de este ión, el resto de las rupturas encuadran dentro del esquema de la tropinona. Así, la

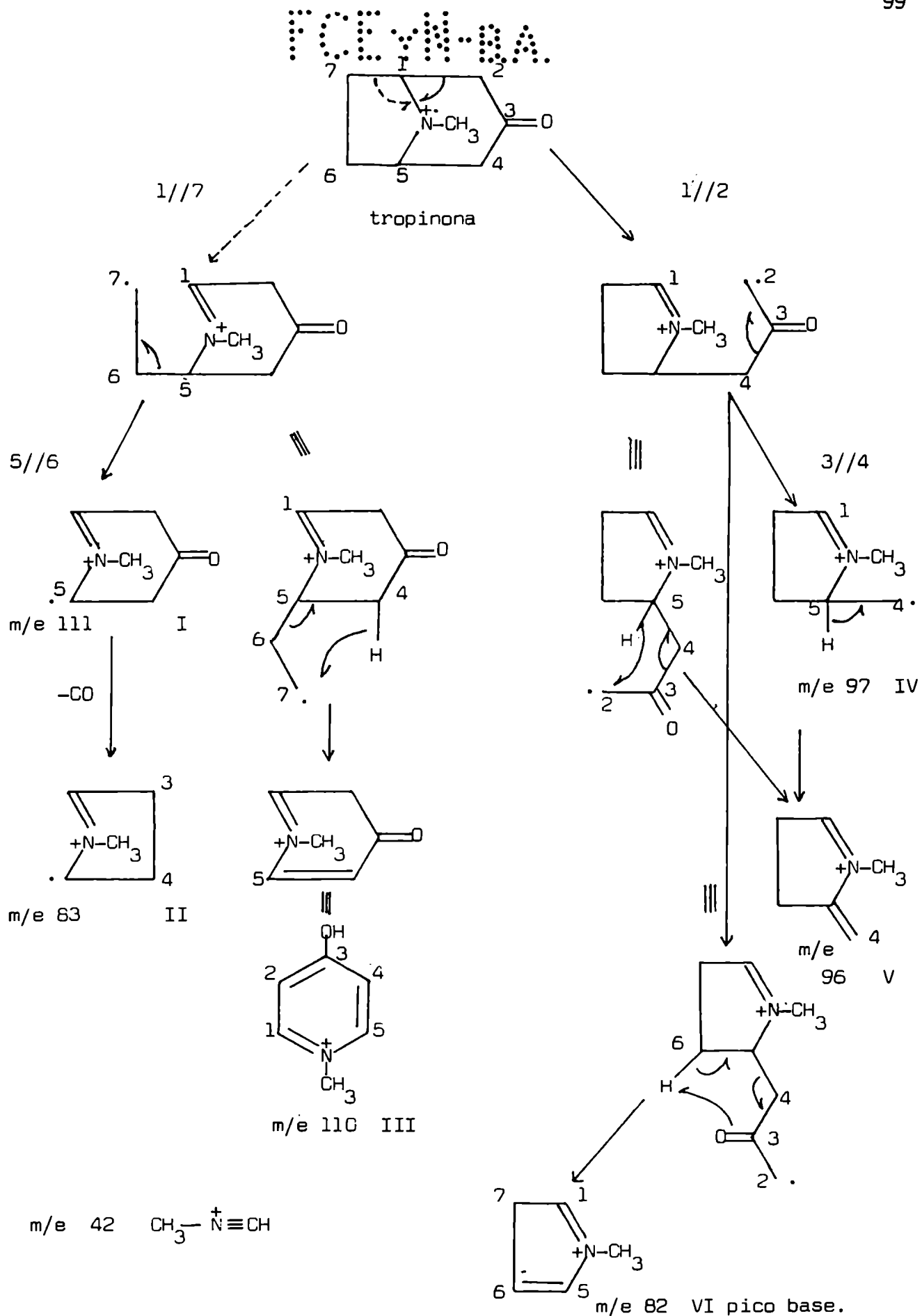


Fig. 40: Principales fragmentaciones de tropinona.

DOI: 10.1002/1522-2675(198109)23:1<100::AID-HLCA100>3.0.CO;2-1

pérdida de los C-6 y C-7, con o sin transferencia de hidrógeno, conduce a los iones m/e 112 y 113, respectivamente análogos a III y II, generando este último el ión m/e 96, por pérdida de hidroxilo. Los fragmentos de la porción pirrolidínica se encuentran sin cambio y otra vez m/e 82 es el pico base (231).

El espectro de la ecgonina presenta las mismas características salvo las pérdidas de 44 y 45 una del ión molecular debidas a la presencia del carboxilo.

Los picos más importantes del espectro de 6 β -metoxitropina son 113 y 113-OH (m/e 96) que como se dijo anteriormente derivan de la porción piperidínica, por pérdida de los C-6 y C-7. El espectro de teloidina (6,7-dihidroxitropina) tiene los mismos picos principales (231).

De lo dicho anteriormente, surge que por espectrometría de masas se puede caracterizar un compuesto como perteneciente a los alcaloides del tropano y aun dentro de una subclase dentro de esta familia de compuestos.

La esterificación de los hidroxilos complica un poco más el espectro, pero también puede obtenerse mucha información. Dos pérdidas que siempre aparecen son $M-RCO)^+$ y $M-RCOO)^+$, pudiendo inferirse de estas diferencias la naturaleza del ácido esterificante, aunque, naturalmente, no puedan distinguirse ácidos isómeros.

En cuanto a las fragmentaciones del núcleo del alcaloide esterificado, se encuentran fragmentos análogos a los descritos, con la correspondiente diferencia de masa del acilo, que permiten caracterizar el tipo de alcaloide.

Por ejemplo, se puede distinguir fácilmente entre 3 α -tigloiloxitropan-6 β -ol y 6 β -tigloiloxitropan-3 α -ol, por sus respectivos iones II que son m/e 195 para el primero (232) y m/e 113 para el segundo (233) (Fig. 41).

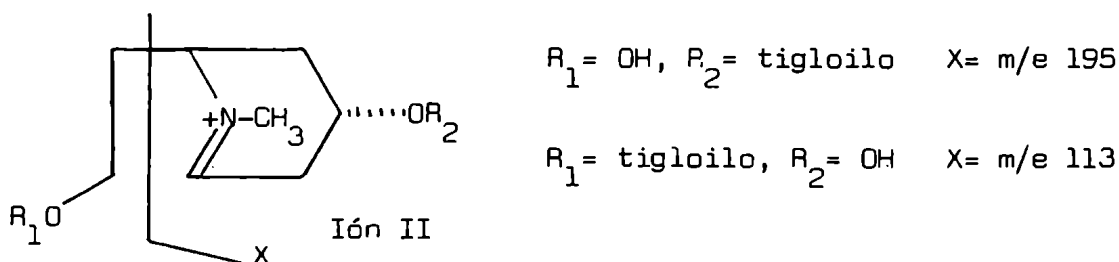


Fig. 41

b) Espectroscopía de ^1H -RMN

Además de la caracterización de los distintos protones del núcleo tropano y de los sustituyentes, por sus desplazamientos químicos, multiplicidad e integración, siguiendo las reglas generales de asignación (225), el estudio del espectro de ^1H -RMN de los alcaloides del tropano, permite hacer algunas deducciones estereoquímicas.

Primeramente, este método físico distingue entre las series de tropanol (I) y pseudotropanol (II)(Fig. 42) (234).



Fig. 42

La diferencia más característica reside en la señal de resonancia del H-3, un triplete a 4,05 ppm en tropanol y un quintuplete a 3,89 ppm en pseudotropanol. El método de doble irradiación aplicado a hiosciamina (Fig. 3), permite encontrar los desplazamientos químicos (1,55 y 2,10 ppm) de los protones de C-2 (o de C-4) y definir las constantes de acoplamiento de cada uno de ellos con el H-3 (5 y 2 Hz). La señal del H-3 corresponde a la parte X de un sistema A_2B_2X y los ángulos pueden obtenerse aplicando la ecuación de Karplus (235) o la de Williamson (236). Los valores de ángulos así obtenidos, indican que el ciclo piperidínico se encuentra en una conformación cercana a la silla en hiosciamina. En el caso de tropacocaína, que pertenece a la serie pseudotropanol, el quintuplete que aparece a 5,26 ppm se analizó teóricamente como la parte X de un sistema A_2B_2X , ya que el método de desacople no resultaba apropiado por la poca definición y superposición con los metilenos de la señal a desacoplar. El cálculo de las constantes y los ángulos indica que la conformación del anillo piperidínico es muy cercana a la encontrada en hiosciamina, predominantemente silla en ambos casos y en todos los restantes estudiados (234).

Se observan en la Tabla 15 los datos de desplazamientos químicos de H-1, H-5 y N-metilo, así como de H-3 y el efecto de la esterificación sobre la resonancia de este hidrógeno.

<u>Tabla 15:</u>	H-1 y H-5.	H-3	N-CH ₃
Tropanol	(m) 3,08 ppm	(t) 4,05 ppm	2,26 ppm
Pseudotropanol	(m) 3,17 ppm	(q) 3,89 ppm	2,30 ppm
Atropina	(m) 2,97 ppm	(t) 5,00 ppm	2,18 ppm
Tropacocaína	(m) 3,25 ppm	(q) 5,27 ppm	2,32 ppm

Los metinos α a hidroxilo de otras posiciones se observan también separadamente y sus constantes de acoplamiento permiten deducir la configuración del carbono al cual están unidos.

Por otra parte, los ácidos esterificantes dan sus señales características ya sean aromáticos, α , β -insaturados o alifáticos.

c) Espectroscopía de ¹³C-RMN

No están aprovechadas aun todas sus posibilidades en el campo de los alcaloides del tropano. Son necesarias aun la acumulación de datos de desplazamientos químicos de distintas estructuras, el perfeccionamiento de las técnicas y la difusión de su empleo y se convertirá en la herramienta de elección para la elucidación estructural.

Wenkert, en 1974 (237) publicó un trabajo de recopilación de espectroscopía de ¹³C-RMN de alcaloides. Observó que la simetría y la simplicidad estructural de la mayoría de los alcaloides del tropano, lo hacían un grupo muy fácil de estudiar por esta técnica y capaz de brindar información respecto a aspectos sutiles de su estructura, por ejemplo, el análisis conformacional, más eficientemente que cualquier otro método.

La estructura más simple corresponde al nortropano, en cuyo espectro de ¹³C-RMN se observan cuatro señales distintas de las cuales, la de campos más altos corresponde al carbono γ piperidínico y la de campos más bajos a los aminometinos. Las restantes se asignan por comparación con los desplazamientos químicos

de los metilenos β en los anillos de piperidina y pirrolidina y los efectos esperados por el sustituyente α alquilo axial (69) (Fig.43).

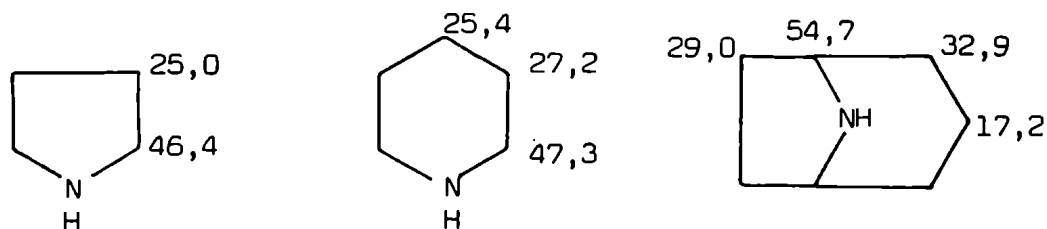


Fig. 43

En estudios en tropano y sus derivados oxigenados, se pueden sacar conclusiones estereoquímicas acerca de la orientación del N-metilo y la configuración de los carbonos hidroxilados. Respecto al primer punto, el pequeño apantallamiento de C-2 y C-4 y el gran desapantallamiento de C-6 y C-7, indican que el grupo N-metilo es ecuatorial en el anillo piperidínico (237). Las configuraciones epiméricas, por ejemplo en el sustituyente de C-3, dan diferencias en los desplazamientos químicos de los carbonos α , β y en los del puente etano de C-6 y C-7, espacialmente cercanos, aunque con valores de diferencias más pequeños que los esperados. Esto se debe al aplanamiento que adquiere el núcleo tropano en su conformación más estable, como demostró la difracción de rayos X, lo que disminuye la diferencia entre el comportamiento axial y el ecuatorial (237). La hidroxilación en una dada posición provoca un desplazamiento a campos bajos de la magnitud esperada y la esterificación una desprotección adicional de 4-5 ppm.

Los valores de resonancia de los carbonos del ácido esterificante se deducen de la teoría simple de los desplazamientos químicos. En la Fig. 44 se observan los valores asignados al éster del ácido trópico de la tropina (hiosciamina).

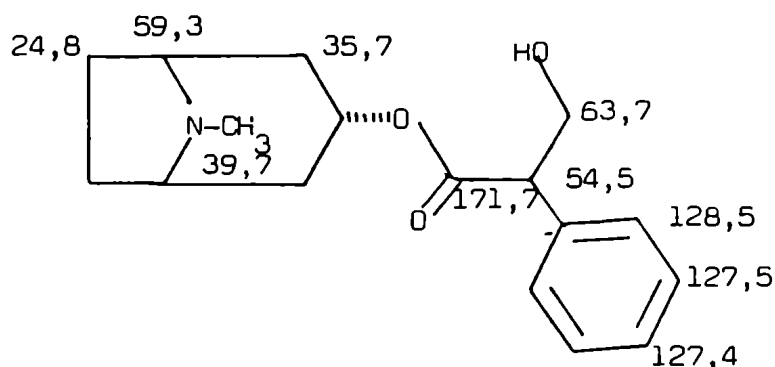


Fig. 44: Valores de resonancia de los carbonos de hiosciamina (237).

PARTE 3 : ACCION FARMACOLOGICA DE LOS ALCALOIDES DESCRIPTOS

Sistema nervioso autónomo y neurotransmisores

El mecanismo de adaptación del organismo a las necesidades internas o externas variables, está regulado por el sistema nervioso. Este consiste en un sistema nervioso central y periférico voluntario, que es sensitivo o motor y en un sistema nervioso autónomo, involuntario y vegetativo, que a su vez consiste en dos porciones antagónicas en su acción pero que en conjunto, se equilibran mutuamente para lograr la regulación: el sistema simpático y el parasimpático (230), y todos los órganos están inervados por ambos.

Si bien la transmisión del impulso nervioso es un fenómeno eléctrico, el paso de la orden de neurona a neurona, no se realiza por contacto o continuidad entre ellas sino a través del espacio sináptico, mediado por la liberación de moléculas pequeñas, los neurotransmisores, desde las vesículas que existen en las terminaciones de una célula y que actúan sobre los receptores de la otra y desencadenan despolarización en las membranas de esa segunda neurona, continuando así la transmisión nerviosa de tipo eléctrico. Del mismo modo se transmite la señal desde la última neurona del arco nervioso al órgano efector.

Respecto a su morfología estos dos sistemas poseen dos porciones: la preganglionar y la postganglionar, que se inicia en un ganglio, una concentración de los cuerpos celulares de las neuronas, mientras la primer porción se inicia en la médula espinal. Allí, en los ganglios se produce la sinapsis.

Para los dos sistemas el neurotransmisor preganglionar es la acetilcolina, mientras que el postganglionar, continúa siendo la acetilcolina para el sistema parasimpático, pero varía en el simpático, siendo la noradrenalina (207, 230) Mientras la acetilcolina es un compuesto de amonio cuaternario, la noradrenalina, al igual que la adrenalina y la dopamina (que también son secretadas por otros órganos del sistema neuroendócrino y tienen matices de acción que sirven en una regulación fina) son fenetilaminas, que por poseer dos hidroxilos fenólicos en orto se denominan en conjunto catecolaminas.

El hecho de que estos neurotransmisores sean moléculas nitrogenadas, explica y justifica la acción fisiológica de muchos alcaloides, cuya estructura sea de algún modo semejante a la del neurotransmisor y pueda interactuar con el correspondiente receptor, ya sea compitiendo por él con el neurotransmisor verdadero o hasta bloqueándolo. Las drogas de estructura análoga a la del transmisor pueden tener efectos de la misma índole que éste, de mayor o menor intensidad o por el contrario pueden ocupar al receptor sin presentar acción, lo que anula esa porción del sistema, en la medida en que esa ocupación sea irreversible.

Las drogas que actúan sobre el sistema nervioso autónomo se han clasificado (230) en:

- a) Drogas adrenérgicas o simpaticomiméticas: se llaman así a las drogas que actuando sobre las células efectoras, producen los efectos del sistema simpático.
- b) Drogas bloqueantes adrenérgicas o simpaticolíticas: son drogas que actúan sobre las células efectoras inhibiendo la respuesta al transmisor simpático, sin suprimir su liberación. Otro tipo de drogas de efecto final semejante actúan impidiendo la liberación de las catecolaminas y para distinguirlas se las denomina simpaticoplégicas.
- c) Drogas colinérgicas o parasimpaticomiméticas: son las que en su acción producen efectos del sistema parasimpático, ya sea por semejanza estructural con la acetilcolina o por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, encargada de degradar el transmisor.
- d) Drogas bloqueantes colinérgicas o parasimpaticolíticas: actúan respecto del sistema parasimpático, como las drogas simpaticolíticas respecto del simpático.

Como los órganos están inervados por ambos sistemas antagónicos, el bloqueo de uno de ellos se manifiesta en la expresión de una o varias de las acciones del otro sistema sobre ese órgano.

En cuanto al sistema nervioso central, su transmisión sináptica también tiene lugar por medio de neurotransmisores, entre los que se cuentan principalmente la noradrenalina, la dopamina y la 5-hidroxitriptamina, aunque también se ha observado la presencia de aminas en trazas, que modularían la respuesta (238).

Acción farmacológica de las fenetilaminas

Las catecolaminas noradrenalina, adrenalina y dopamina que son los transmisores del sistema nervioso simpático tienen, por consiguiente, acción adrenérgica o simpaticomimética (230). Mientras la noradrenalina se encuentra en cualquier sitio en el que haya terminaciones simpáticas, la adrenalina es escasa fuera de la médula de la glándula suprarrenal, que es donde se encuentra la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa, que la biosintetiza a partir de noradrenalina (239).

Se halló que los receptores celulares de estas moléculas constan de dos porciones de diferentes acciones: a) los receptores alfa, responsables de las acciones estimulantes (vasoconstricción y midriasis) y de la inhibición del intestino; b) los receptores beta, responsables de la acción básicamente inhibidora (vasodilatación y broncodilatación) y de la estimulación poderosa del músculo cardíaco.

La noradrenalina estimula los receptores alfa-adrenérgicos, provocando vasoconstricción e hipertensión. La adrenalina estimula tanto los receptores alfa como los beta y su efecto final es vasodilatación, taquicardia y aumento de la fuerza de la contracción del miocardio, provocando inicialmente un aumento de presión que luego revierte a hipotensión (207, 230, 239).

Pero las catecolaminas, por su grupo "catecol", son inestables, se oxidan espontáneamente y son degradadas en el intestino por lo que no son activas por ingestión. Otros tipos de fenetilaminas, con un solo grupo fenólico o metoxiladas o con el anillo bencénico no sustituido, son estables por vía bucal y por ejemplo, la ingestión de un vegetal que las contenga puede causar los efectos fisiológicos correspondientes. Estas aminas no actúan directamente sobre los receptores adrenérgicos, sino estimulando la liberación de noradrenalina, aunque si están β -hidroxiladas, por ejemplo efedrina (Fig.29), también poseen acción adrenérgica directa (230).

Fenetilaminas simples, como β -feniletilamina y tiramina son sinergistas de los transmisores del sistema nervioso central (238).

La N-metiltiramina fue identificada como el principio activo de especies del género Acacia (208), que provocan migrañas en seres humanos y ataxia en el ganado. La N,N-dimetiltiramina (hordenina, Fig. 29), se conocí como antiséptico (240), y en disentería (241); además, aunque en pequeñas dosis no tiene acción en la circulación sanguínea, en dosis grandes produce una apreciable hipertensión y aceleración del pulso, aunque se halló que estos efectos no se deben a estimulación central sino del músculo cardíaco (209). Otros autores informaron que hordenina también presenta un efecto nicotínico, es decir que en grandes dosis disminuye o revierte la acción hipertensiva de adrenalina (209).

La efedrina posee acciones adrenérgicas, con efectos alfa y beta y también es estimulante del sistema nervioso central. A nivel vegetativo provoca estimulación cardíaca, elevación de la presión arterial y vasoconstricción arteriolar, semejantes a las de la adrenalina, que aunque presentan una potencia unas 100 veces menor, dada la estabilidad de la molécula son de una duración mucho mayor. Localmente, produce vasoconstricción sin dilatación posterior (230). En conjunto se denomina a estos compuestos aminas simpaticomiméticas.

Otra fenetilamina de notable acción, es la mezcalina, el principio alucinógeno del cactus Lophophora williamsii, denominado peyote (209). Este efecto impulsó el estudio de muchos otros cactus más o menos relacionados, usados entre los indígenas, hallando en ellos gran diversidad de estructuras de fenetilaminas en su mayoría metoxiladas, algunas también alucinógenas (206, 209, 213). La mezcalina provoca respuestas adrenérgicas luego de su ingestión, pero durante la fase de excitación mental se caracteriza por las alucinaciones visuales y alteraciones en la percepción del resto de los sentidos, alteraciones sobre la percepción del propio cuerpo, desórdenes emocionales, volitivos e intelectuales y lo que es más importante, síntomas de esquizofrenia (209). Es curioso hacer notar que otra fenetilamina metoxilada, la 3,4-dimetoxifenetilamina, se encontró como metabolito anormal en orina de esquizofrénicos (220). Estas aminas actuarían entonces alterando las transmisiones nerviosas en el sistema nervioso central, con alteraciones de la conciencia y la personalidad; aunque parecen desarrollar tolerancia, no provocan real adicción (209).

Acción farmacológica de los alcaloides del tropano

Los alcaloides del tropano, cuyos representantes más significativos son la atropina y la escopolamina, tienen una marcada acción parasimpaticolítica en un amplio rango de dosis, resultando venenos mortales en dosis no muy elevadas.

Su mecanismo de acción consiste en inhibir las terminaciones nerviosas del sistema parasimpático, cuyo transmisor es la acetilcolina, por inhibición competitiva del receptor. En dosis altas ocasiona bloqueo ganglionar y parálisis tipo curare en la musculatura esquelética (207).

En el tracto digestivo, inhiben la secreción y la motilidad, mientras sobre el aparato respiratorio actúan eliminando los espasmos de la musculatura bronquial. Provocan midriasis y aumentan la frecuencia cardíaca sin alterar la circulación periférica. Se observa como estos efectos son la expresión del sistema simpático sin el antagonismo del parasimpático, inhibido por estos alcaloides (207, 230). Algunos derivados de alcaloides del tropano se usan como espasmolíticos (230).

El efecto en el sistema nervioso central es distinto en atropina y escopolamina. Mientras la primera causa gran excitación, que puede llegar al delirio furioso, la escopolamina, en pequeñas dosis causa depresión psíquica y motora, aunque en dosis elevadas su efecto es similar al de la atropina, provocando excitación central y parálisis respiratoria(230).

La cocaína, otro alcaloide del grupo, pero que no proviene de las Solanáceas, tiene acción anestésica y además estimulante del sistema nervioso central, por lo cual causa adicción (207, 230).

CAPITULO V

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

OBTENIDOS EN ESTA TESIS

OBJETO DEL TRABAJO REALIZADO

La finalidad de este trabajo consistió en el estudio de los componentes químicos presentes en Nierembergia hippomanica Miers., una Solanácea argentina conocida desde hace tiempo por su toxicidad para el ganado.

Si bien existían antecedentes bibliográficos sobre su acción farmacológica (41, 42, 43) y además meros intentos de caracterización de los principios activos (37, 38, 39), ninguno de ellos condujo al conocimiento fitoquímico de esta planta (pág. 8).

DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

a) Criterios seguidos en el fraccionamiento del material vegetal

La extracción de plantas enteras secas y molidas de Nierembergia hippomanica se encaró de la manera usual, utilizando solventes de muy distinta polaridad (éter de petróleo y metanol respectivamente), comenzando por el menos polar. Ensayos farmacológicos preliminares mostraron que la actividad fisiológica se encontraba sólo en el extracto metanólico y en el marco vegetal, por lo que se inició el estudio del extracto metanólico.

La marcha analítica para el conocimiento previo de las familias de compuestos del extracto metanólico (242) reveló la presencia de glicósidos de flavonoides, triterpenos pentacíclicos, alcaloides, así como la carencia de taninos, glicósidos cardiotónicos y glicósidos cianogenéticos.

Por reposo del extracto metanólico a temperatura ambiente, se obtuvo un precipitado inorgánico identificado como SO_4K_2 (IR, ensayo a la llama). La concentración del filtrado a la décima parte, produjo un precipitado orgánico que se estudió separadamente (Precipitado 1). La separación cromatográfica del precipitado 1, permitió el aislamiento de triterpenos pentacíclicos y de un glicósido de flavonoide, acompañados por compuestos minoritarios relacionados.

Para poder identificar los flavonoides presentes en menor cantidad en el

Precipitado 1 fue necesario realizar un esquema separativo directo de flavonoides: parte del extracto metanólico, suspendido en agua, se extrajo sucesivamente con cloroformo, acetato de etilo y butanol. Los compuestos buscados se encontraban en el extracto de acetato de etilo.

El estudio de los alcaloides se encaró con una marcha separativa del filtrado del Precipitado 1, suspendido en ClH 0,1 N y filtrando el insoluble en ese medio. Sobre la solución acuosa ácida, se realizaron extracciones con éter etílico y cloroformo. A continuación, la solución acuosa se llevó a pH 10 y se reextrajo con éter etílico y cloroformo, obteniéndose extractos con reacción positiva frente al reactivo de Dragendorff (243) (Extractos etéreos y clorofórmicos en medio básico) que se estudiaron separadamente.

La solución acuosa, aun contenía alcaloides, inextraíbles con solventes orgánicos, por lo que se los trabajó como alcaloides cuaternarios, precipitándolos como sales del anión complejo del reineckato de amonio ($\text{Cr}(\text{SNC})_4(\text{NH}_3)_2 \cdot \text{NH}_4$) a pH 12, 8, 5 y 1. Se obtuvieron precipitados sólo a pH 12 y 8, que se estudiaron por separado.

La actividad tóxica observada en el marco vegetal de las extracciones, motivó, por último, una extracción del mismo con agua a 80°C, con agitación magnética. Este extracto acuoso, que mostró toxicidad, contenía el principal alcaloide cuaternario de la planta, ya identificado en el extracto metanólico, y glicósidos terpenoidales cuyas agliconas, en un análisis preliminar, presentaron características de diterpenos y serán objeto de próximos estudios.

b) Estudio del Precipitado 1

El estudio del Precipitado 1, obtenido del extracto metanólico por concentración, se realizó por cromatografía en columna de sílicagel, con polaridades crecientes de benceno:acetona, acetona:metanol y metanol:agua. Por cromatografía analítica en placas de sílicagel (benceno: acetona, 9:1) se observaba una mancha muy importante, con reacción cromogénica de triterpenos pentacíclicos ($\text{SO}_4\text{H}_2:\text{AcOH}$ 8:2, violeta) con R_f : 0,15, acompañada por otras minoritarias, con igual reacción

cromogénica, pero de mayor Rf. A Rf: 0,9, con ese solvente, una mancha con intensa fluorescencia celeste a 366 nm, tenía igual Rf que la cumarina escopolentina. Aumentando la polaridad en la cromatografía analítica, las sustancias mencionadas anteriormente se observaban con Rf entre 0,9 y 1,0, pero podía advertirse ahora, una mancha principal (Rf:0,15 en benceno: acetona, 1: 2), acompañada por otras tres minoritarias de mayor Rf, todas con iguales reacciones cromogénicas (Cl_3Fe positivo, violeta, indicativo de compuestos fenólicos; Cl_3Fe 2%: $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ 1%, 1:1, azul, indicativo de flavonoides).

b.1) Hydrocarburos y alcoholes superiores

La primera fracción de la columna del Precipitado 1, dió un residuo blanco que, analizado por cromatografía gas-líquido demostró ser una serie homóloga. Se realizaron los espectros de masas por acople del espectrómetro de masas al cromatógrafo gaseoso, en condiciones de temperatura programada (Fig.45). Los espectros de masas de los picos 2-3 y 5-11, presentaban picos importantes con 14 uma de diferencia, con caída exponencial de las abundancias hacia masas altas, típico de hidrocarburos lineales de cadena abierta (244). Los iones moleculares variaban de 310 para el pico 2 hasta 422 para el pico 11 ($\text{C}_{22}\text{H}_{46}$ al $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$) siendo los más abundantes los de C_{24} , C_{25} y C_{26} , (Tabla21, Parte experimental). El cromatograma gaseoso en condiciones isotérmicas (Fig. 46), permitió obtener los tiempos de retención necesarios para realizar el gráfico de log tr vs N° de carbonos para esta serie homóloga (Fig. 47).

De la siguiente fracción de la columna, se obtuvo un residuo (Rf: 0,5, ccd sílicagel, benceno: acetona, 95:5) que purificado en columna de alúmina y estudiado por cromatografía gaseosa, mostró la presencia de otra serie homóloga, cuyos tiempos de retención se encuentran en la Tabla22, Parte experimental y su gráfico de log tr vs. N° de carbonos en la Fig. 48.

La comparación con una mezcla de testigos de alcoholes superiores lineales de C_{24} , C_{26} y C_{28} ; permitió identificar los compuestos en estudio como alcoholes normales superiores desde $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{O}$ hasta $\text{C}_{32}\text{H}_{66}\text{O}$.

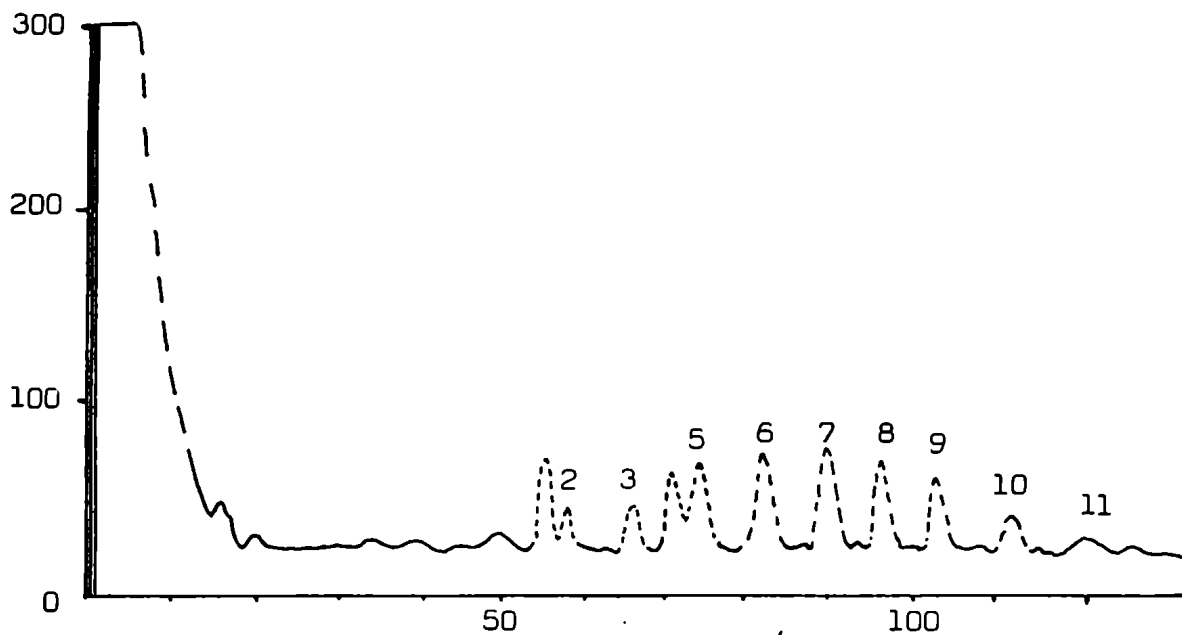


Fig. 45: Cromatograma en condiciones de temperatura programada (CGL-EM) de la fracción 1 de la columna del Precipitado 1.

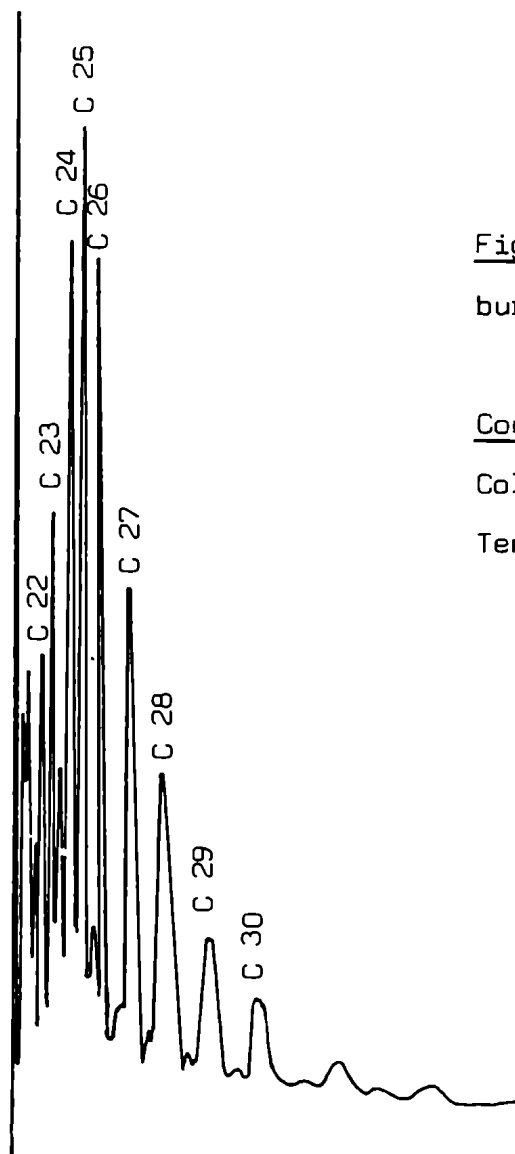


Fig. 46: CGL de los hidrocarburos de la fracción 1.

Condiciones:

Columna de OV-17.

Temperatura: 260°C

(condiciones isotérmicas)

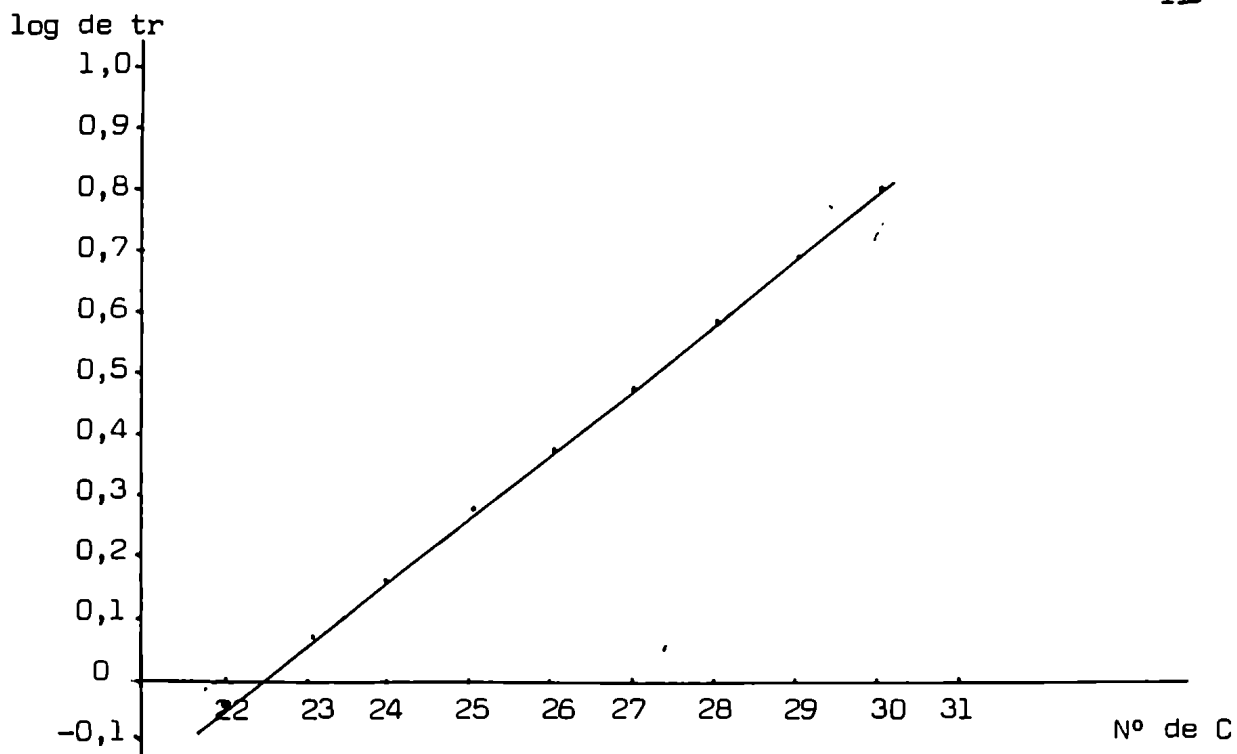


Fig. 47: Relación entre tr (obtenido por CGL) y número de C de los hidrocarburos de Nierembergia hippomanica.

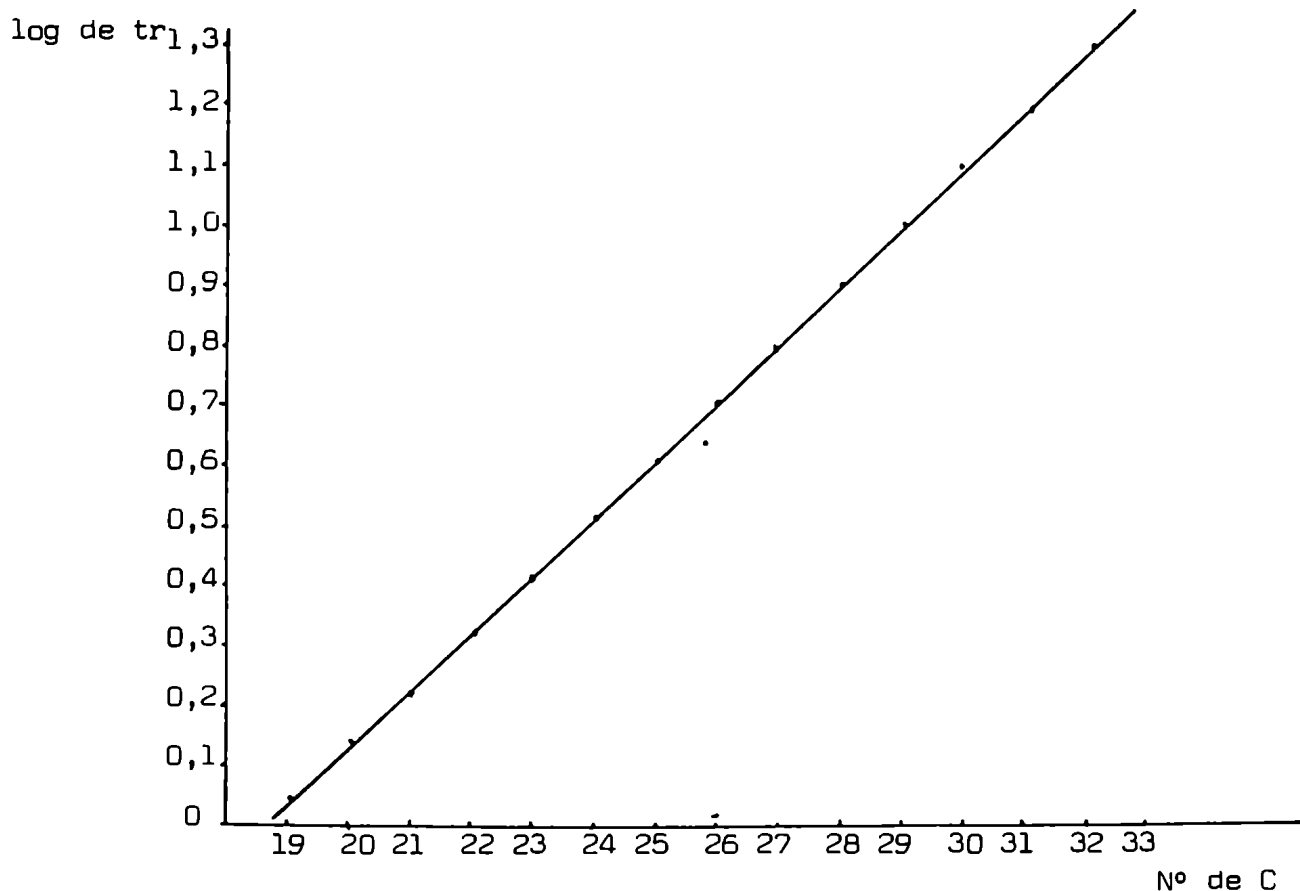


Fig. 48: Relación entre los tr y el Nº de C de los alcoholes superiores normales de la fracción 2 del Precipitado 1.

b.2) Triterpenos pentacíclicos

Las fracciones 3 y 4 de la columna del Precipitado 1, daban reacción de Liebermann-Burchard violeta (245), indicativa de la presencia de triterpenos pentacíclicos. La cromatografía de la fracción 4, la más abundante, presentaba una mancha (ccd, sílicagel, Rf: 0,6 benceno: acetona, 85:15) coincidente con una de las dos sustancias mayoritarias del Precipitado 1.

Se efectuó su purificación por cromatografía en columna seca, obteniéndose una fracción principal que recristalizada de etanol daba agujas blancas de punto de fusión 275-281°C. El amplio rango del punto de fusión que no disminuía con las recristalizaciones, sugería una mezcla de triterpenos isoméricos (I y II) que coprecipitaban y eran inseparables por cromatografía en sílicagel.

El espectro infrarrojo de la fracción (Fig. 49) mostraba absorciones a 3400 cm^{-1} característica de la tensión O-H, a 2900 cm^{-1} la tensión C-H de alcanos, a 1695 cm^{-1} la tensión de un carbonilo, mientras que a 1450 y 1380 cm^{-1} , la flexión simétrica y asimétrica del metilo. La señal del carbonilo se atribuyó a un carboxilo, ya que un carbonilo de lactona aparecería a 1780 cm^{-1} , uno de éster a 1730 y uno de cetona a 1715 cm^{-1} (246).

El espectro de ^1H -RMN de la fracción en estudio en DMSO-d_6 , corroboraba la estructura triterpénica, con seis singuletes (Fig. 50) que integraban para veintiún protones (7 CH_3 -), en apariencia todos terciarios, sobre el conjunto de las señales de los metilenos de los anillos. Además se destacaba la señal de un protón alfa a hidroxilo a 4,3 ppm y la de un protón vinílico a 5,2 ppm.

La presencia del carboxilo explicaba las pobres propiedades cromatográficas de la fracción en cromatografía gaseosa y fue necesaria la protección de los grupos polares ($-\text{OH}$ y $-\text{COOH}$) por acetilación y metilación para poder obtener buenos picos en cromatografía gas-líquido. El cromatograma gaseoso mostró que la fracción estaba constituida por dos compuestos principales, uno de tr 12,08 minutos (9,5 %) y otro con tr 13,49 minutos (71,6%) en las condiciones que se indican en la Fig. 51.

La cromatografía gas-líquido asociada a la espectrometría de masas dió la

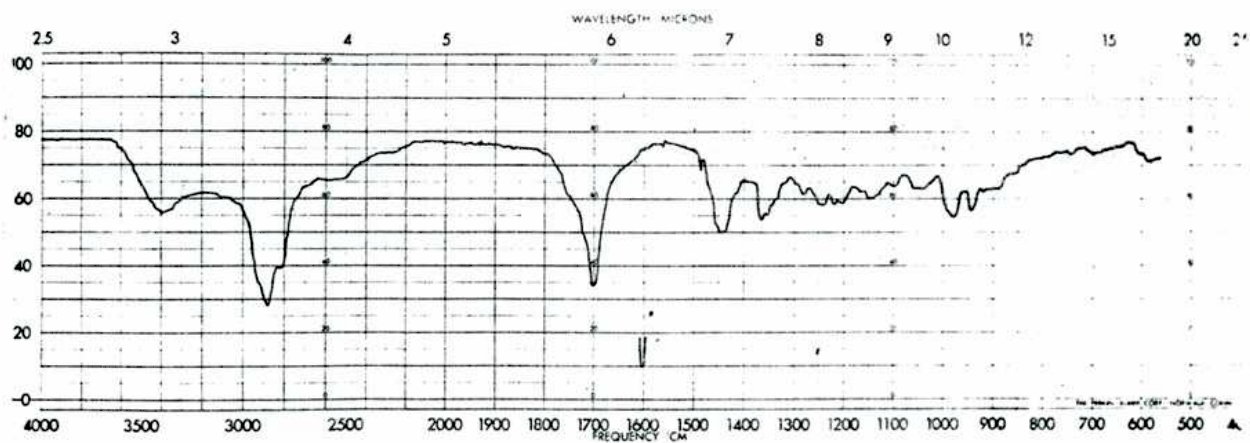


Fig. 49: Espectro infrarrojo de la fracción 4 de la columna del Precipitado 1.

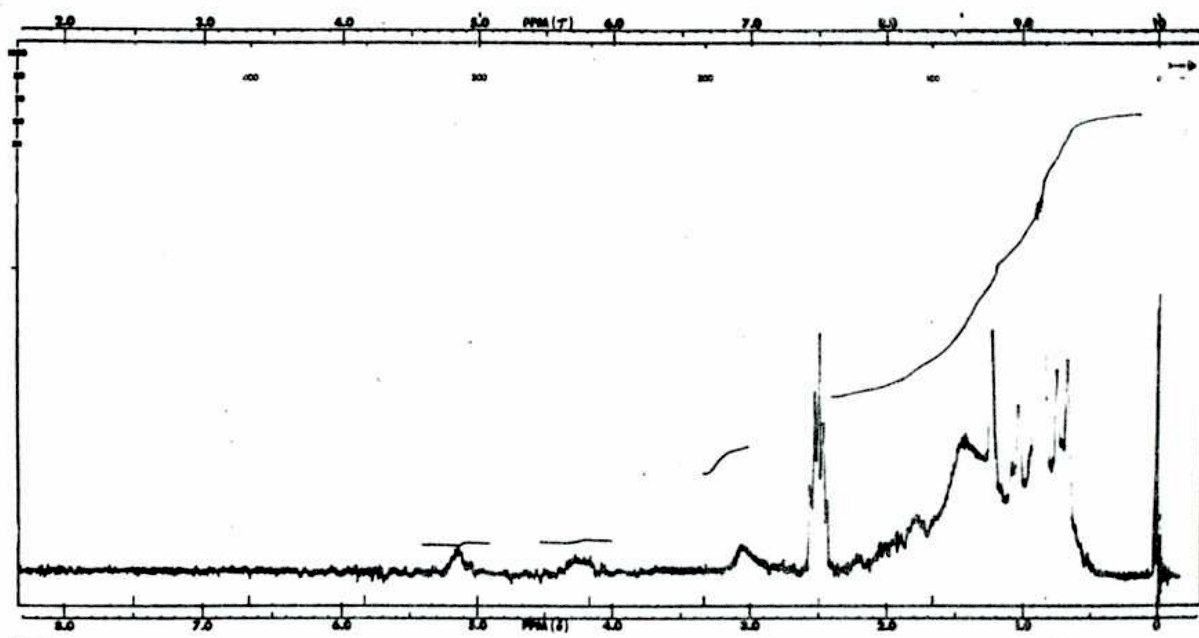


Fig. 50: Espectro de ^1H -RMN en DMSO-d_6 , de la fracción 4.

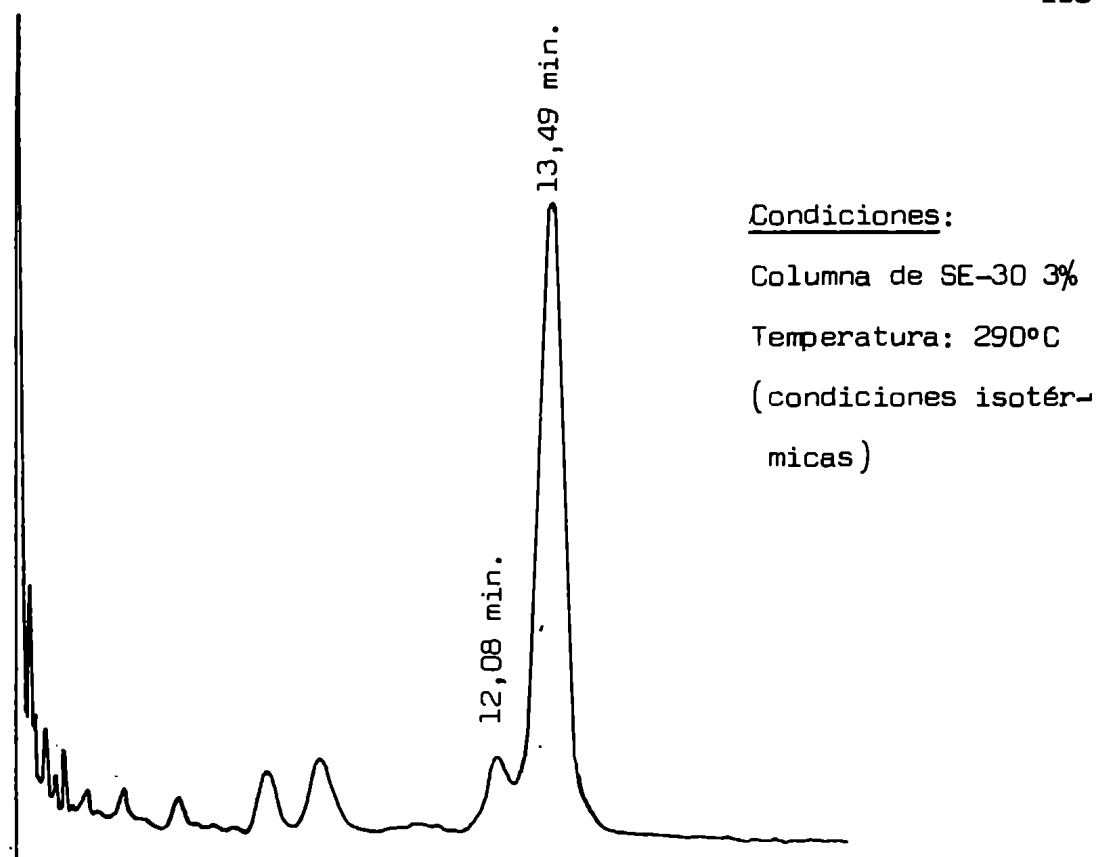


Fig. 51: Cromatograma gaseoso de la fracción 4 acetilada y metilada.

clave de la estructura. Para los derivados acetilmetilados de estos dos compuestos se obtuvieron iguales espectros de masas, con M^+ 512 y un ión muy importante en m/e 262, que por pérdida de 59 uma, originaba el pico base en m/e 203, y también se observaban picos a m/e 249, 189 y 133 (Fig. 52).

Sabiendo que se estaba en presencia de ácidos triterpénicos pentacíclicos y teniendo en cuenta las fragmentaciones que sufren este tipo de compuestos (49, 50), se consideró que podían tratarse de Δ^{12} -oleanenos y Δ^{12} -ursenos, ya que el ión a m/e 262 se podía asignar al fragmento de los anillos D y E originado por reacción de retro Diels Alder en el anillo C, con un grupo carboximetilo en alguno de los carbonos de estos anillos. Además, ya que la pérdida del carboximetilo (59 uma) originaba el pico base, se podía ubicar este grupo en C-17, es decir, se producía la ruptura del sustituyente angular más favorecida en este tipo de compuestos (Fig. 53). (Cap. II, pág. 14).

La masa del ión molecular comprendía también un grupo acetato, lo cual indicaba la presencia de un hidroxilo acetilable en el producto natural, que se ubicó, en principio en C-3, donde, por consideraciones biogénicas, se espera

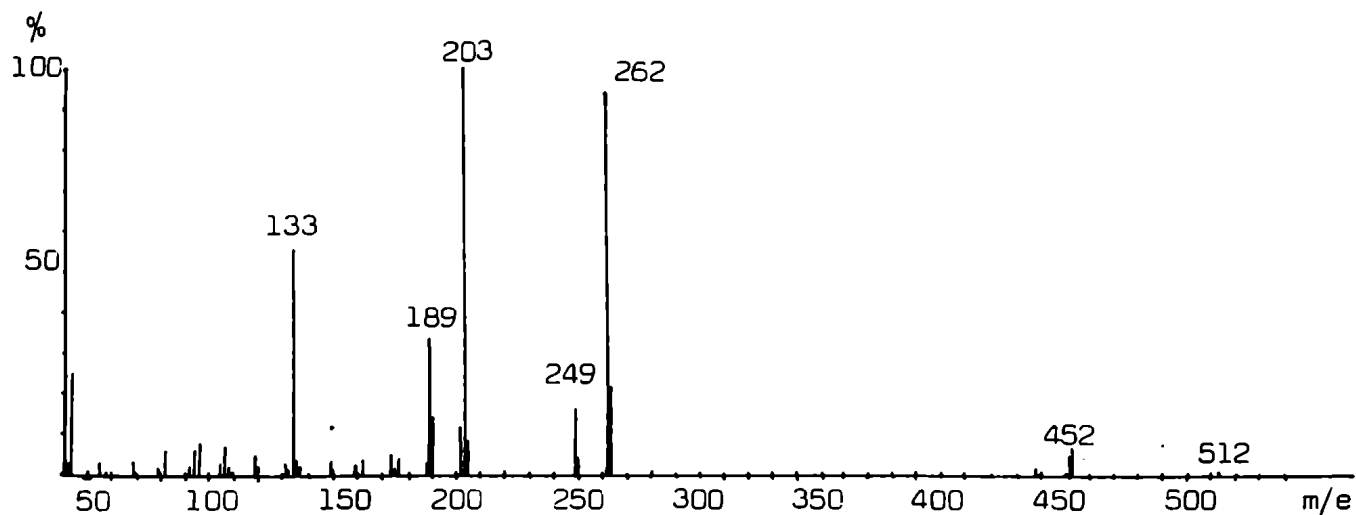


Fig. 52: Espectro de masas (CGL-EM) del pico a 13,49 min del cromatograma Fig. 51

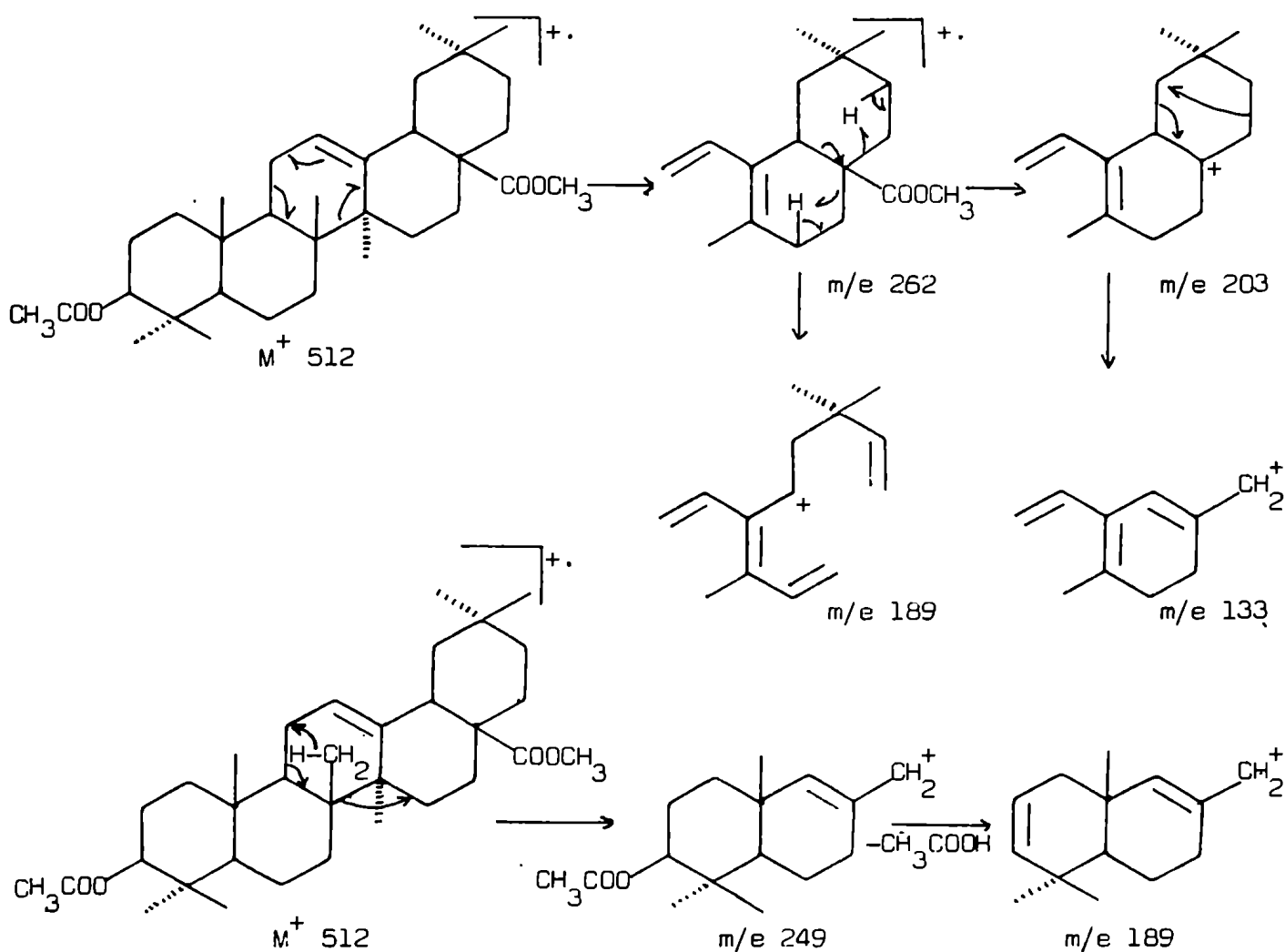


Fig. 53: Asignación de los iones del espectro de la Fig. 52, correspondientes al acetiloleanato de metilo (derivado acetilado y metilado de II).

siempre la presencia de un sustituyente oxigenado.

El ión m/e 189 se asignó, por una parte a los anillos A y B, formado a partir de la pérdida de ácido acético del ión m/e 249 y por otra parte, se conoce (49) que también se origina por subsiguiente fragmentación del ión m/e 203, al igual que el ión m/e 133.

Se supuso a partir de estos datos, que estos compuestos eran dos ácidos triterpénicos pentacíclicos muy difundidos en el reino vegetal, conocidos como ácido ursólico y ácido oleanólico. Se pudo contar con un testigo auténtico de la mezcla de los acetil metil derivados de estos ácidos y comprobar, en conjunto, su identidad con la mezcla de triterpenos de Nierembergia hippomanica por cromatografía gas-líquido. Pero, para identificarlos individualmente y poder conocer así a qué serie pertenecía el más abundante de ellos en la planta, se intentó separar la mezcla isomérica. Para ello se recurrió al método de cristalización fraccionada, aprovechando el hecho de que el acetiloleanato de metilo era levemente más insoluble en etanol que el acetilursolato de metilo (247). Aunque por este método no se logró la separación total de ambos isómeros, la cabeza de la secuencia de recristalizaciones que se realizaron, se enriqueció en el compuesto de mayor tiempo de retención, al que se le asignó por lo tanto la estructura básica de Δ^{12} -oleaneno. Esta asignación resultó concordante con los datos de tiempos de retención relativos de triterpenos pentacíclicos y sus derivados, hallados posteriormente en la literatura (248), para estos mismos derivados, en condiciones de corrida análogas. Por lo tanto, el ácido oleanólico (II) es el triterpeno pentacíclico más abundante en el extracto metanólico de Nierembergia hippománica, acompañado por su isómero de la serie urseno, el ácido ursólico (I)

El espectro de ^1H -RMN de la fracción acetilada en Cl_3CD , mostraba la presencia de un solo acetilo y los desplazamientos esperados de los metilos para una función acetato en C-3 (55) (Fig. 54).

Se advierte en los espectros de ^1H -RMN de la mezcla, el predominio de las señales del ácido oleanólico (II), a causa de que éste se encuentra en ella en mucha mayor concentración que su isómero.



Fig. 54: Espectro de ^1H -RMN de la fracción 4 acetilada en Cl_3CD (50 MHz).

En placas de sílicagel de la fracción 3 de la columna del Precipitado 1, existían manchas con reacciones cromogénicas de triterpenos pentacíclicos, presentes en muy poca cantidad. La fracción se acetiló y metiló por los métodos usuales, observándose acetilación pero no metilación, lo que indicaba la presencia de hidroxilos acetilables y ausencia de grupo carboxilo. El producto de acetilación fue analizado por cromatografía gas-líquido y espectrometría de masas acoplada a la cromatografía gaseosa (Fig. 55). El espectro de masas del diacetato del compuesto de mayor tiempo de retención (diacetato de III) se observa en la Fig. 56 y el esquema de fragmentaciones de este compuesto en la Fig. 57.

Otros picos de esta fracción acetilada resultaron coincidentes en la comparación por cromatografía gas-líquido, con los derivados acetilados de α - y β -amirina testigos (acetato de IV: 8,88 min. coincidente con el acetato de α -amirina; acetato de V: 8,18 min. coincidente con acetato de β -amirina; Fig. 55).

Por lo tanto, en la planta se encuentran α - (IV) y β -amirina (V), como compuestos minoritarios (Fig. 58).

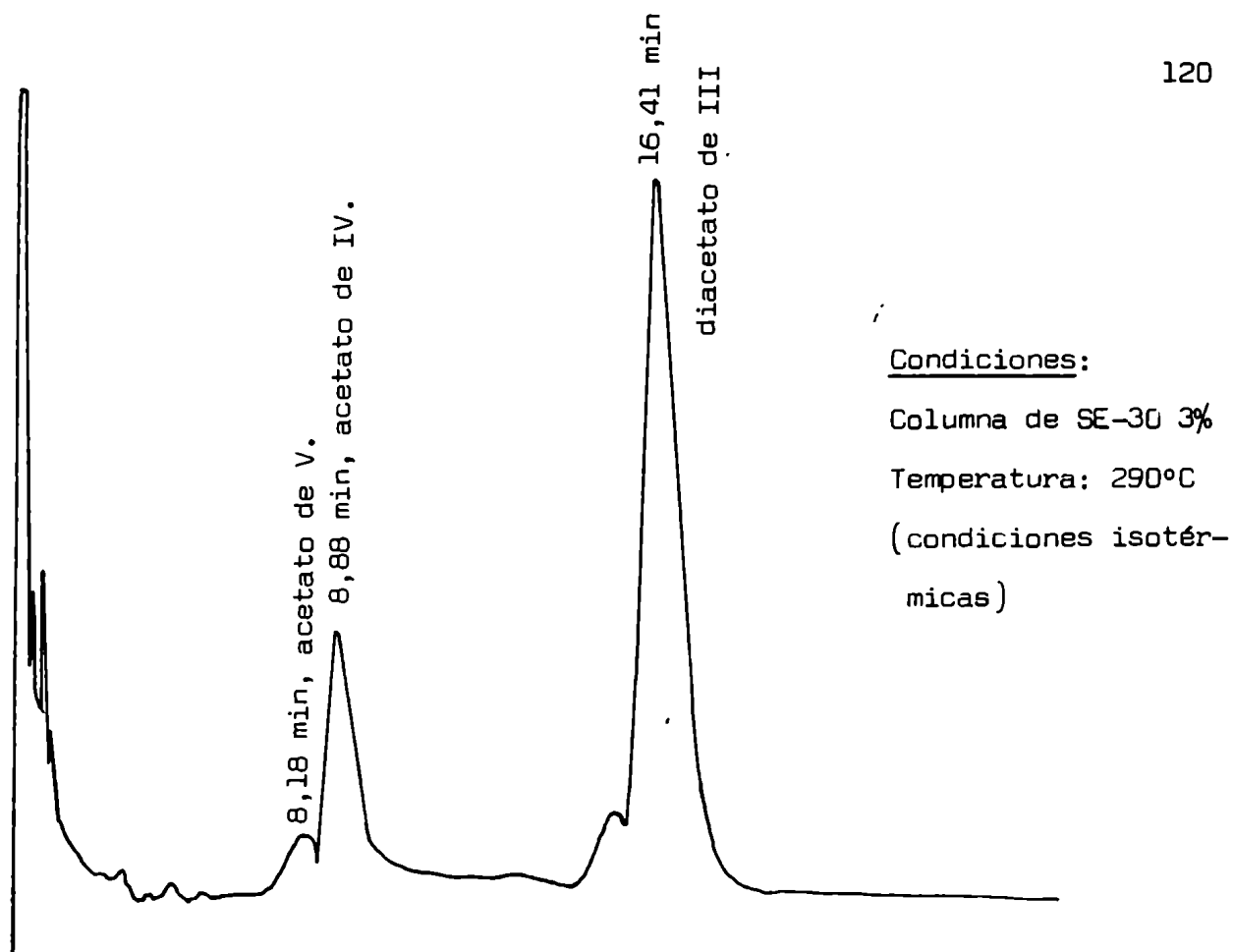


Fig. 55: Cromatograma gaseoso de la fracción 3 acetilada.

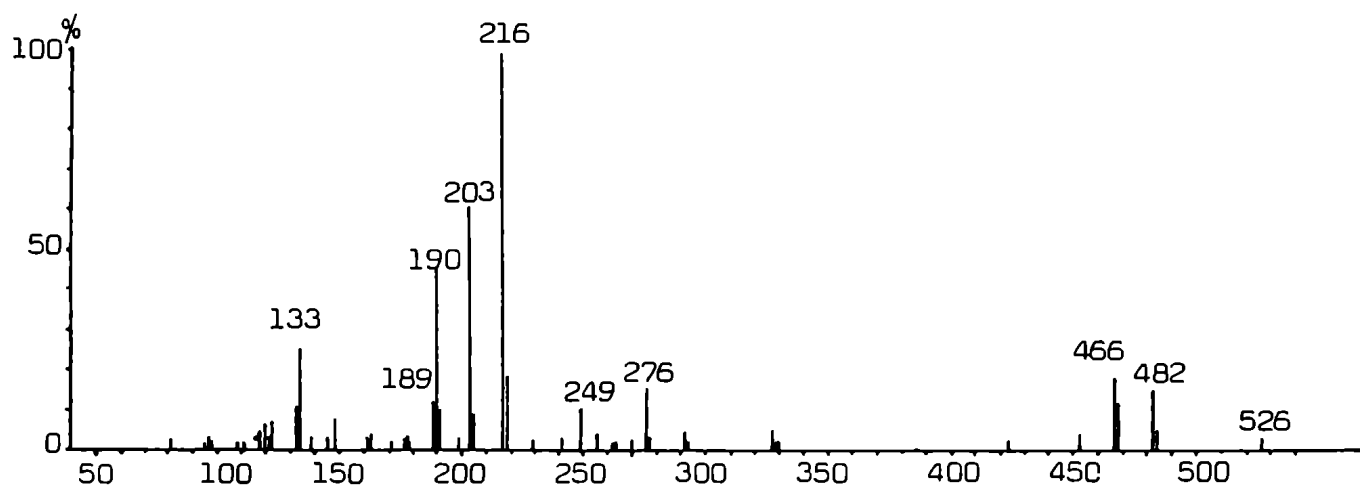


Fig. 56: Espectro de masas correspondiente al pico de $t_r = 16,41$ min (diacetato de III) (CGL-EM).

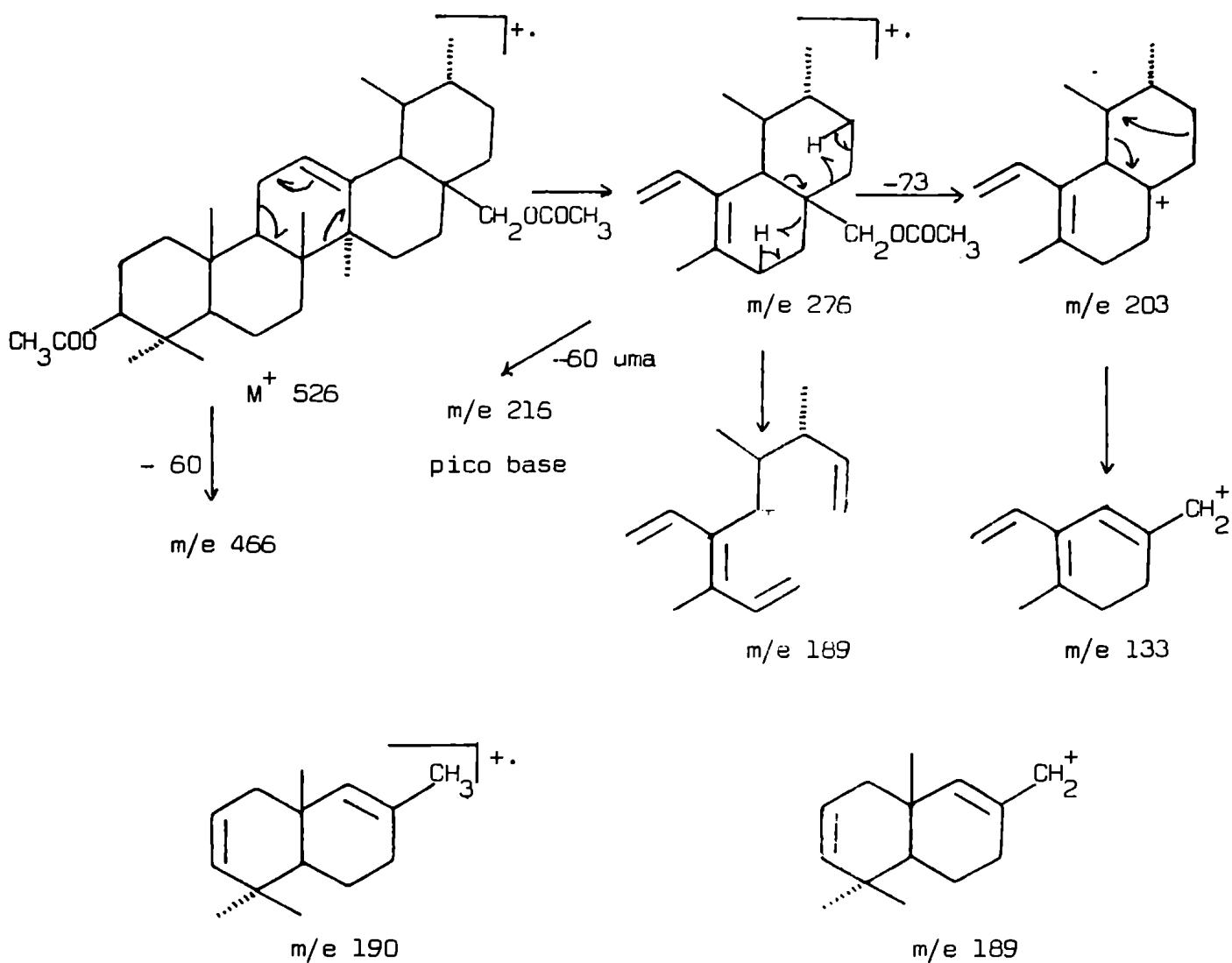


Fig. 57: Asignación de los principales iones del espectro de la Fig. 56, correspondientes al diacetato de uvaol (diacetato de III).

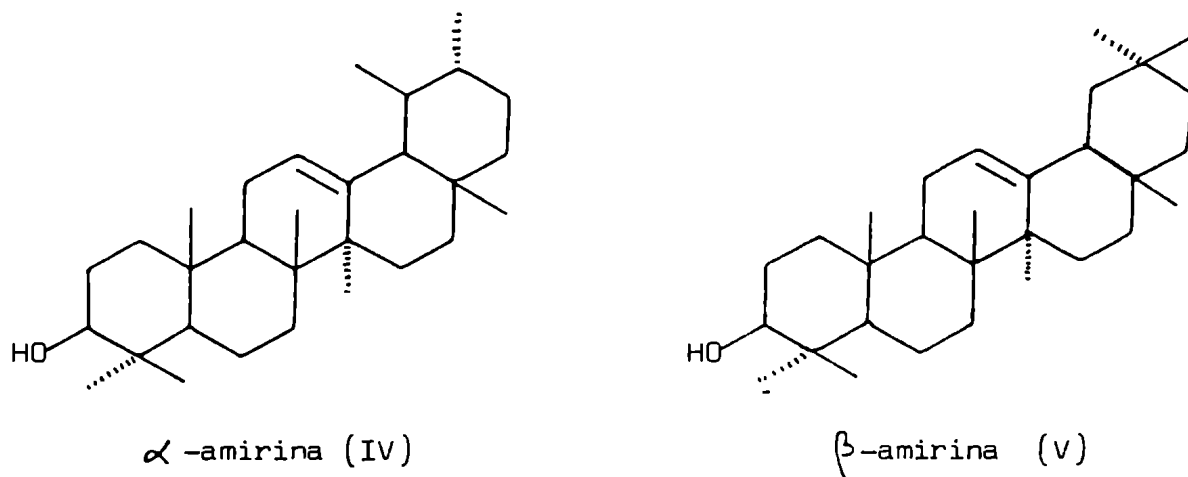


Fig. 58: Estructuras de α - y β -amirina (compuestos IV y V respectivamente).

En el espectro de masas del diacetato de III, el ión molecular (M^+) se asignó al pico de mayor masa a m/e 526, correspondiendo m/e 466, a la pérdida de ácido acético a partir del M^+ . El siguiente pico importante, m/e 276, se podía considerar originado por una reacción de retro Diels Alder en el anillo C de un triterpeno pentacíclico Δ^{12} -insaturado (49) con un grupo $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ en los anillos D o E y que a su vez, por pérdida de ácido acético, originaba el pico base en m/e 216. El ión 203 era nuevamente un pico importante del espectro. Se atribuyó su formación a la pérdida del grupo $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ del ión m/e 276 (73 uma) y su intensidad podía tomarse como indicación tentativa de la ubicación del grupo en C-17. Los iones correspondientes a los anillos A y B (m/e 249 y 189) eran iguales a los de acetiloleanato de metilo, así como m/e 133, que provenía del esqueleto. Todo indicaba que se trataba de 3,28-dihidroxi- Δ^{12} -oleaneno o urseno diacetilado, coincidente con los datos para diacetato de uvaol o de eritrodol, compuestos ya descritos. Ambos son indistinguibles por espectrometría de masas y para completar la identificación se comparó el diacetato del producto natural (diacetato de III) con testigos auténticos, resultando coincidente con el diacetato de uvaol. Por consiguiente la planta posee uvaol (III), (Fig. 59).

Los triterpenos pentacíclicos ácidos parecen ser característicos de muchas Solanáceas; por ejemplo, el ácido oleanólico (II) es el principal triterpeno en Fabiana imbricata (5) y en otras especies pertenecientes a la tribu Nicotianeae a la que también pertenece el género Nierembergia (3).

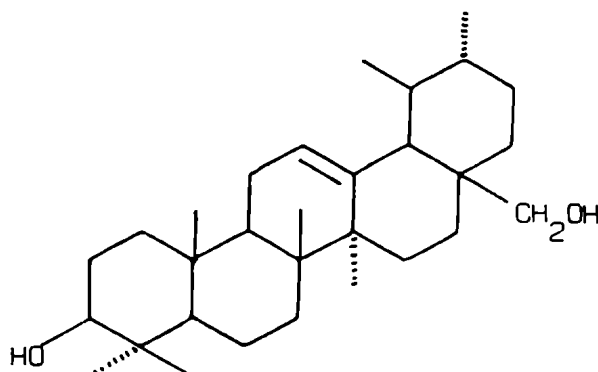


Fig. 59: Uvaol (3,28-dihidroxi- Δ^{12} -urseno, III).

b.3) Compuestos fenólicos

b.3.1) Cumarina

En la fracción 5 de la columna del Precipitado 1 se observó una mancha de intensa fluorescencia celeste a 366 nm (ccd; sílicagel; Rf 0,8; benceno: acetona, 8: 2) (VI). Su comportamiento frente a las reacciones cromogénicas (KOH 5 % en metanol + luz UV: reactivo para cumarinas, y Cl_3Fe 2 % en etanol, verde oscuro: reactivo para fenoles) indicó que podía tratarse de una cumarina con hidroxilos fenólicos. Debido a la pequeña cantidad en que se encontraba este compuesto en el Precipitado 1, no pudo realizarse su estudio espectroscópico completo. Sin embargo, por cromatografía gas-líquido y comparación de su tiempo de retención con el de un testigo auténtico y espectro de masas, realizado por acople al cromatógrafo gaseoso (Fig. 60) pudo ser identificada como escopoletina (VI) que es una cumarina típica de las Solanáceas (18). El esquema de fragmentaciones se observa en la Fig. 61.

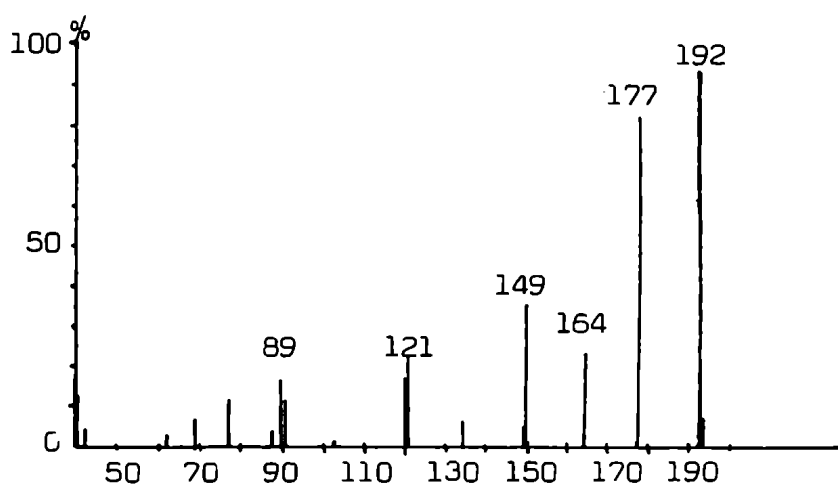


Fig. 60: Espectro de masas del compuesto VI (CGL-EM).

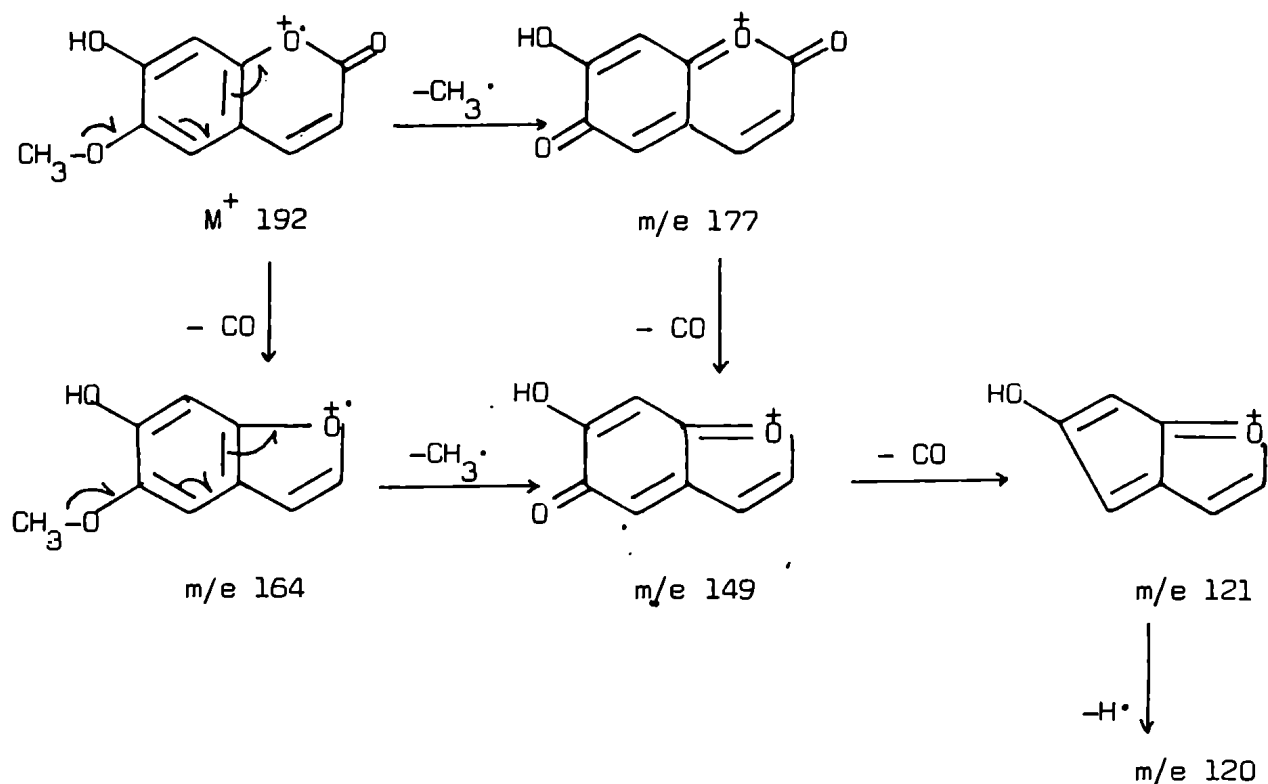


Fig. 61: Principales fragmentos del espectro de masas de escopoletina (VI).

b.3.2) Flavonoide principal

Uno de los compuestos mayoritarios (VII) de Nierembergia hippomanica es un sólido blanco, extraíble con metanol pero de marcada insolubilidad en frío en solventes alcohólicos y agua, lo cual hizo que formara parte del Precipitado 1, obteniéndoselo parcialmente impurificado con compuestos relacionados, de la fracción 7 de la columna de este precipitado.

Presentaba reacción de Liebermann-Burchard negativa, reacción de Shinoda (249) (Mg/ClH) positiva color naranja, indicando naturaleza flavonoídica y color violeta frente al Cl_3Fe , evidenciando la presencia de un grupo fenol (ccd; sílicagel; Rf 0,15; benceno: acetona, 1: 2; luz UV: fluorescencia celeste claro a 366 nm; SO_4H_2 : AcOH, 8:2, pardo amarillento).

Su purificación resultó sencilla, por cromatografía en columna y recristalización de etanol (Parte experimental).

El espectro infrarrojo de VII mostró una absorción intensa a 3380 cm^{-1} que indicó la presencia de hidroxilos, otra a 1645 cm^{-1} correspondiente a un carbo-

nilo conjugado, a 1575 cm^{-1} una señal fuerte de doble enlace, a 1175, 1145 y 1100 cm^{-1} señales de deformación O-H, a 1050 cm^{-1} una señal fuerte y ancha de deformación característica de una unión glicosídica y a 980, 920, 835, 770, 710, 685, 670 y 640 cm^{-1} absorciones fuertes típicas de bencenos polisustituídos (Fig.62).

El espectro ultravioleta de VII presentó dos máximos, uno a 285 nm de gran coeficiente de extinción y otro a 328 nm de bajo coeficiente de extinción. El hecho de no observar dos máximos intensos como en los flavonoides en que los anillos A y B están conjugados, hizo pensar que podía tratarse de una flavanona, un dihidroflavonol o una isoflavona. Debido a que la banda II (285 nm) absorbía entre 270 y 295 nm, se podía descartar en principio a las isoflavonas, cuya banda II se encuentra generalmente entre 245 y 270 nm (139) (Fig. 63).

Por agregado de Cl_3Al , se observó un desplazamiento batocrómico intenso de ambos máximos que no variaba al utilizar $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{ClH}$ (Fig. 63). Esto indicó la presencia de un hidroxilo libre en C-3 o C-5 que junto con el carbonilo de C-4 formaba un complejo con Cl_3Al estable en medio ácido. Otros complejos con Cl_3Al serían posibles con hidroxilos orto, pero estos se destruirían en medio ácido y el espectro en $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{ClH}$, hubiese resultado diferente.

Al agregar acetato de sodio, que ioniza preferencialmente el OH-7, no se observaron desplazamientos respecto al espectro en metanol, lo que indicaba la ausencia de OH-7 libre, es decir, que si este grupo existía, debía estar bloqueado por algún sustituyente (metoxilo, glicosilo, etc.)

El agregado de metóxido de sodio, base fuerte que ioniza todos los hidroxilos de un flavonoide, sólo provocó un desplazamiento batocrómico de la banda de mayor longitud de onda, hecho que reveló la presencia de un hidroxilo ionizable en el anillo A, probablemente el de C-5 (139) (Fig. 63).

El espectro de $^1\text{H-RMN}$ de VII, presentó señales complejas entre 3,2 y 4,1 ppm y 4,4-4,8 ppm que son características de protones de azúcares (9H) y en la zona de protones anoméricos un multiplete que integraba para dos hidrógenos, entre 5,1 y 5,4 ppm, lo que indicaba que la molécula del flavonoide estaba gli-



Fig. 62: Espectro infrarrojo del compuesto VII, en pastilla de BrK.

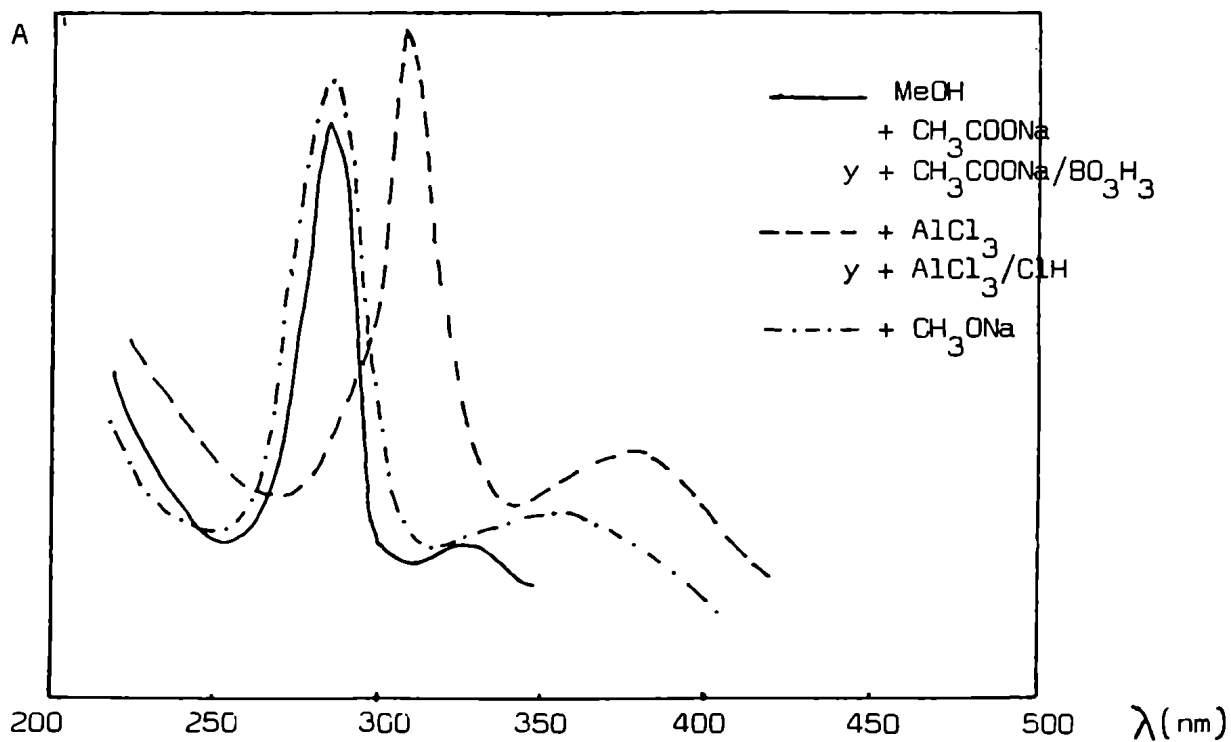


Fig. 63: Espectro ultravioleta del compuesto VII.

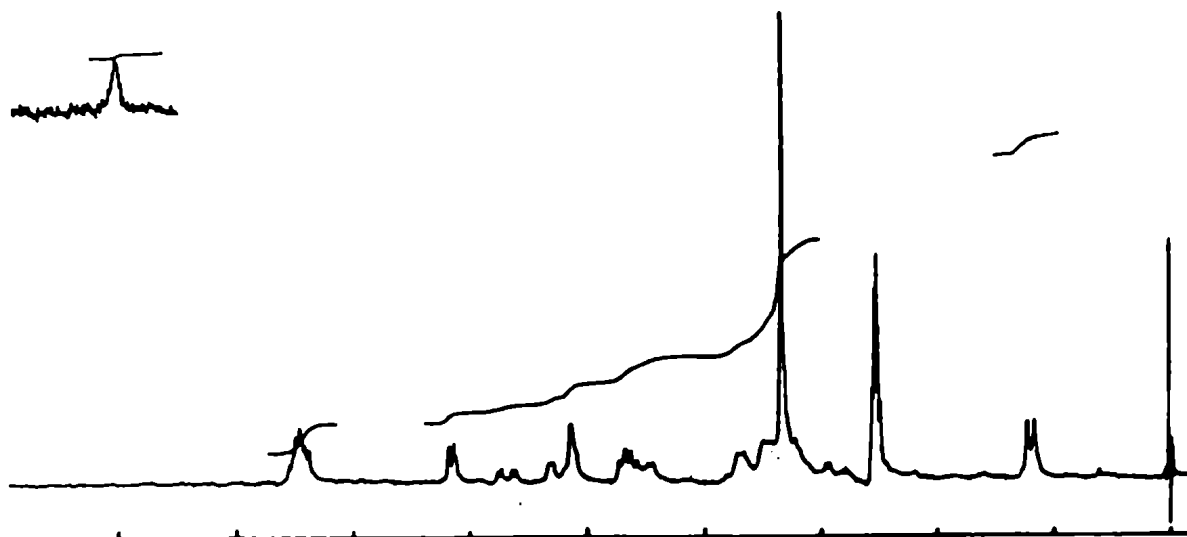


Fig. 64: Espectro de ^1H -RMN del compuesto VII en DMSO-d_6 (60 MHz).

cosidada con dos monosacáridos. A campos altos se observó un doblete en 1,15 ppm (3H, $J = 6$ Hz) que se asignó al metilo de C-6 de un 6-desoxiazúcar (Fig. 64). Las señales de la aglicona presentaban un doble cuarteto entre 2,6 y 3,0 ppm (2H) que fue asignado a los dos hidrógenos de C-3 de una flavanona, ya que ambos no son equivalentes y se parten entre sí y cada uno con el H-2 (151). Un doble doblete a 5,6 ppm se asignó al H-2 con las mismas constantes de acoplamiento con cada H-3. En la zona aromática se observaron tres señales: un doblete a 6,13 ppm (1H), otro a 6,19 ppm (1H) y un multiplete a 7,50 ppm (5H). Las dos primeras señales correspondían a H-6 y H-8 respectivamente ya que presentaban una partición meta ($J = 2$ Hz) demostrando una sustitución 5,7- en el anillo A. La tercera señal se asignó a un anillo B no sustituido.

Con todos estos datos se pudo postular para la aglicona el esqueleto de una 5,7-dihidroflavanona, glicosidada en el OH-7; (Fig. 65).

El espectro de masas de VII (Fig. 66) presentó un pico base a m/e 256, correspondiente a la aglicona 5,7-dihidroflavanona ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4^+$) originado por escisión de los azúcares con transferencia de H y acompañado por el ión 255.

Los fragmentos m/e 179, 152, 124 y 104 también correspondían a la aglicona (Fig. 67), el primero de ellos originado por pérdida del anillo B (256-77) y los restantes según las rupturas características de flavanonas (140, Cap.III), los iones m/e 152 y m/e 124 provenían de una reacción de retro Diels Alder en el anillo C, indicando los sustituyentes en el anillo A, y m/e 104 los del anillo B, junto a los C-2 y C-3 (140).

El ión molecular (M^+ 564) de muy baja intensidad (0,25 %) evidenció que la aglicona estaría unida a hexosa y a 6-desoxihexosa (256+180+164-(2x18)), hecho corroborado por el fragmento m/e 147, correspondiente al ión oxonio del azúcar terminal y que estaba de acuerdo con una 6-desoxihexosa y por m/e 418 (aglicona unida a hexosa) proveniente de la pérdida del azúcar terminal a partir del M^+ .

Estos iones permitieron establecer la presencia de un disacárido formado por una 6-desoxihexosa y una hexosa, con el desoxiazúcar como unidad terminal, que evidentemente debería estar unido al OH-7 de una 5,7-dihidroxi-flavanona, teniendo en cuenta los datos espectroscópicos anteriormente mencionados (Fig. 65

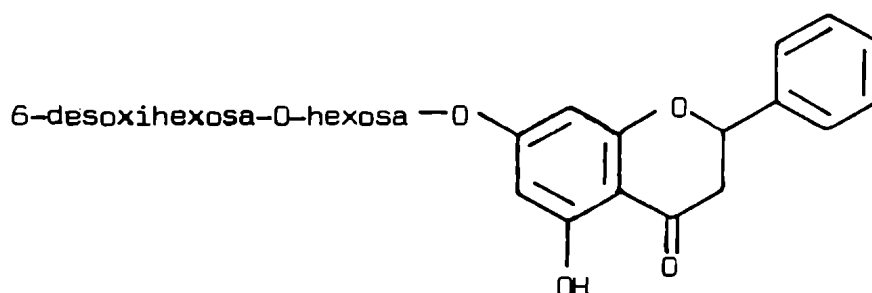


Fig. 65: Estructura de 7-O-diglicósido de 5,7-dihidroxi-flavanona, correspondiente al compuesto VII.

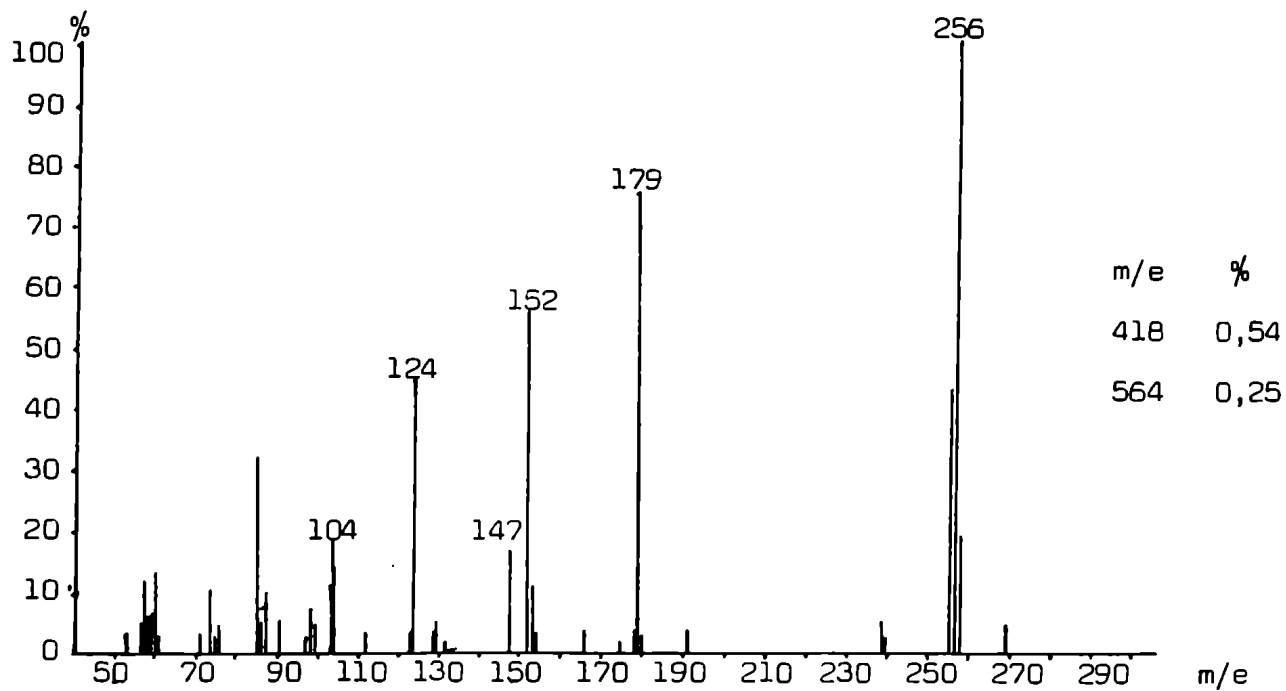


Fig. 66: Espectro de masas de VII.

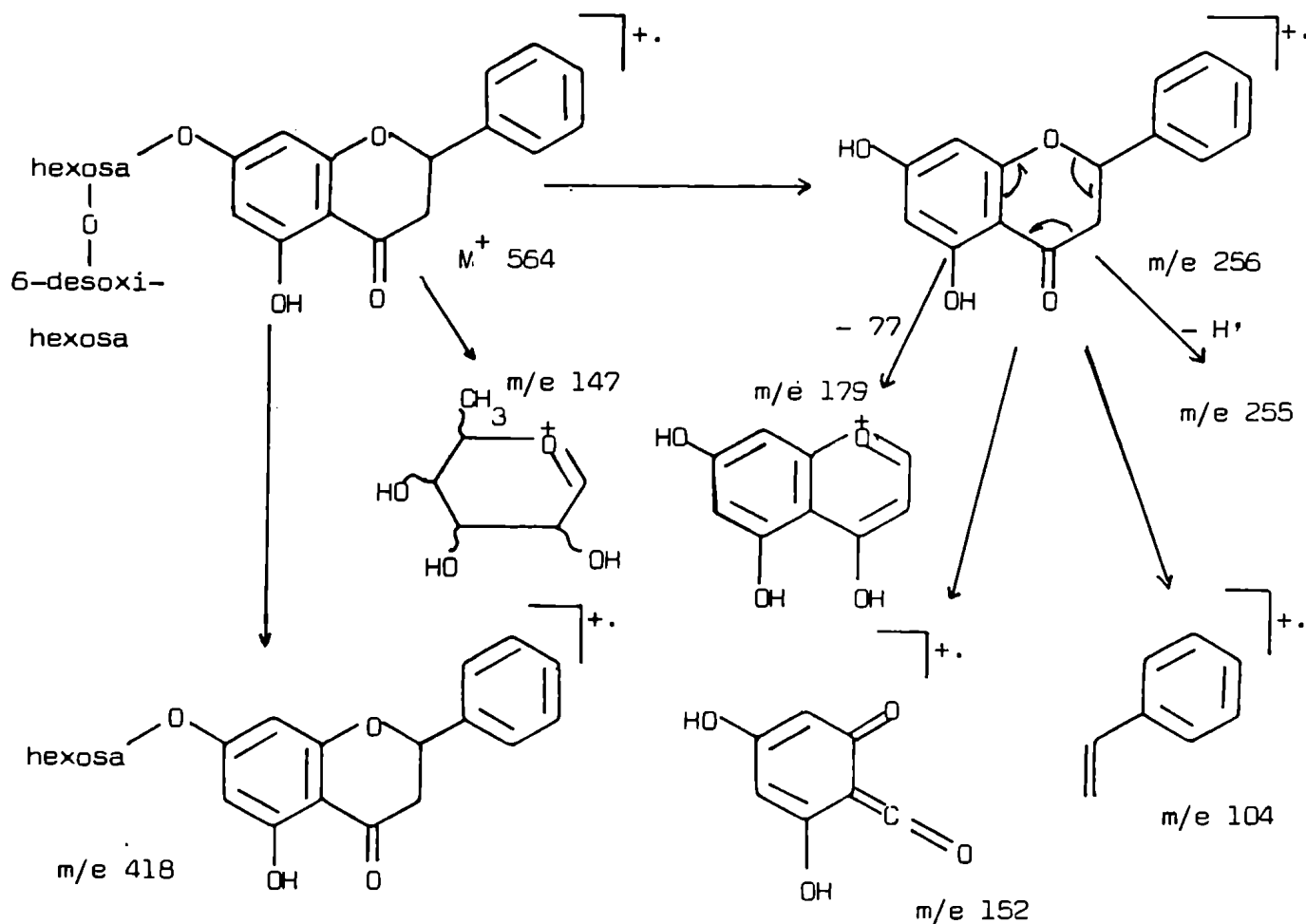


Fig. 67: Asignación de los principales iones de VII.

Hidrólisis total del glicósido

Por hidrólisis ácida total de VII, se obtuvieron la unidades constitutivas del glicósido: la aglicona y los azúcares. La aglicona (VIII), un compuesto fenólico, poco polar, extraíble con solvente orgánico de la mezcla final de hidrólisis (ccd; sílicagel; Rf 0,5; benceno: acetona, 18:1) presentó un espectro UV similar al del glicósido, excepto en un desplazamiento batocrómico de la banda principal al agregar acetato de sodio, indicativo de OH-7 libre, hecho que confirmaba la glicosidación en ese hidroxilo.

Su espectro de ^1H -RMN en DMSO-d_6 (Fig.68) presentó el sistema ABX esperado para una flavanona. Para analizar los acoplamientos del H-2 con los H-3 de este sistema se recurrió a la técnica de doble resonancia. Se esperaba que al irradiar el H-2 sólo permaneciera el acoplamiento geminal entre los dos H-3, mientras que por irradiación de cada H-3, el H-2 quedara únicamente acoplado con el H-3 no irradiado. Los resultados obtenidos (Fig. 68) confirmaron lo anterior y permitieron establecer los valores de las tres constantes de acoplamiento.

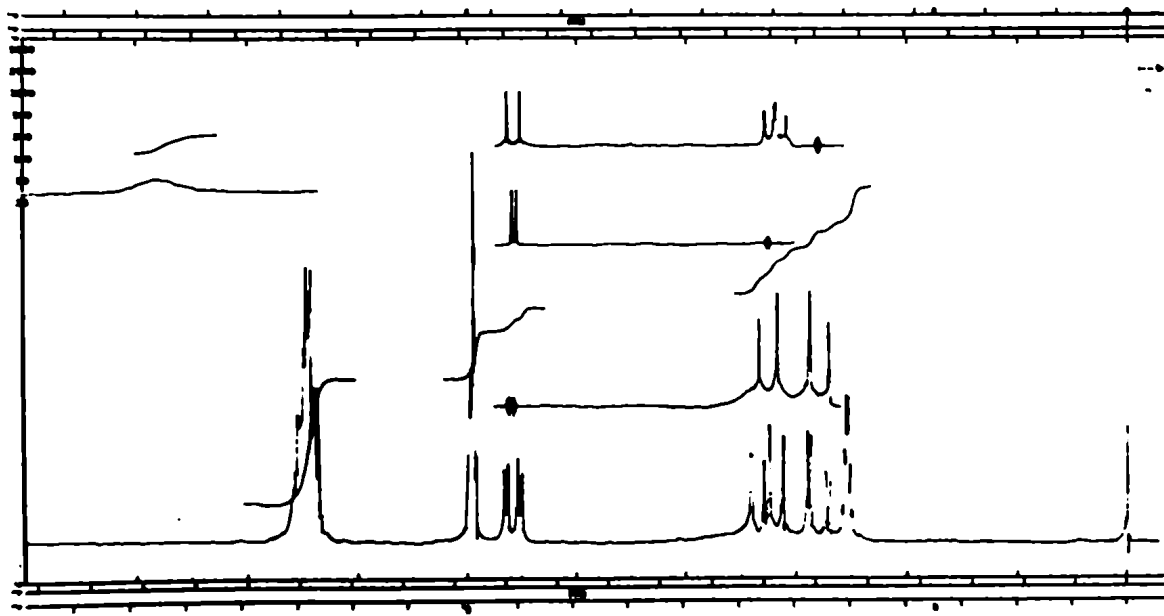


Fig. 68: Espectro de ^1H -RMN de pinocembrina (VIII) en DMSO-d_6 (100 MHz).

Así, al irradiar en 5,6 ppm (H-2), las señales de los dos H-3 aparecían como dos dobletes en 2,8 y 3,3 ppm cada uno con una constante de acoplamiento de 16,5 Hz, característica de una partición geminal. La irradiación en 2,8 ppm (zona central de la señal de uno de los H-3) transformó el doblete de H-2 en un doblete de $J = 12$ Hz, correspondiente a la partición anti del H-2 con el H-3 axial. En cambio por irradiación del otro H-3, señal asignada al H-3 axial en 3,3 ppm, la señal del H-2 resultó un doblete de $J = 4$ Hz a causa de la partición gauche con el H-3 ecuatorial (Fig. 69).

El C-2 de las flavanonas es asimétrico y muchas flavanonas sintéticas se han resuelto en sus enantiómeros (+) y (-). Los productos naturales, aislados en forma ópticamente activa, demostraron ser siempre levorrotatorios, así como se observó en este caso. En hesperetina (-57° , metanol) y liquiritigenina (-92° , metanol) (250) se relacionaron químicamente sus estructuras con L-(-)-malamida de configuración absoluta conocida. Por lo tanto, (-)-hesperetina tiene la configuración absoluta que se observa en la Fig. 69. Se deduce que las restantes flavanonas levorrotatorias, como en el caso de los compuestos VII y VIII, poseerían probablemente igual configuración. Las restantes señales del espectro confirmaron la 5,7-disustitución en el anillo A y el anillo B no sustituido. El espectro de masas (M^+ y pico base 256) mostró las rupturas descriptas (Fig. 67). Por lo tanto, la aglicona fue identificada como 5,7-dihidroxi-flavanona, conocida como pinocembrina (VIII) (Fig. 69) (251, 252).

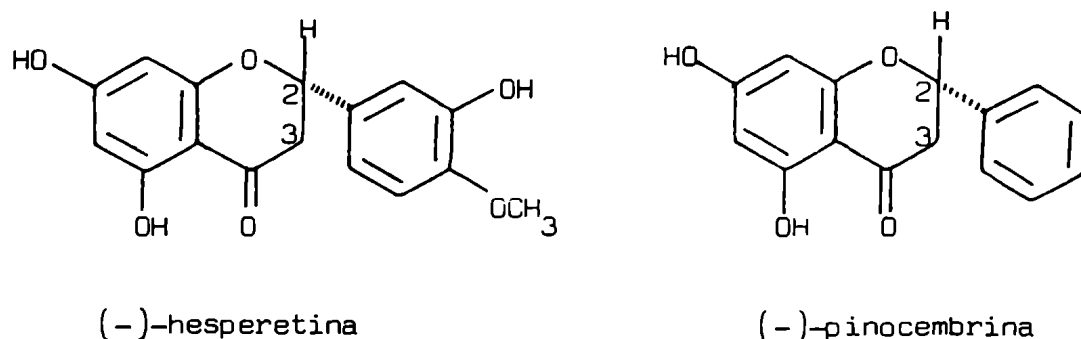


Fig. 69: Configuración absoluta de flavanonas levorrotatorias.

En la fase acuosa de la hidrólisis total se encontraban los azúcares, que fueron transformados en sus alditoles acetilados(186), analizados por cromatografía gas-líquido por comparación con testigos y así caracterizados como D-glucosa y L-ramnosa.

Hidrólisis parcial del glicósido

Un resultado interesante durante la hidrólisis ácida de VII fue la aparición de un producto intermedio (IX) con máxima concentración a los treinta minutos de reacción (ccd; sílicagel; Rf 0,44; benceno: acetona, 1:2; pinocembrina (VIII) Rf 0,88; glicósido de partida (VII) Rf 0,15), que se aisló por cromatografía en columna y cristalizó de metanol. Su espectro UV era muy semejante al del glicósido de partida VII y el espectro IR mostraba también la presencia de hidroxilo, carbonilo, unión glicosídica y naturaleza aromática.

Su espectro de ^1H -RMN (Fig. 70) presentaba las señales descritas de los protones de las flavanonas y multipletes en la zona entre 3,0 y 3,8 ppm correspondientes a 5H. No se observaba metilo de 6-desoxiazúcar y existía un solo protón anómico en 5,0 ppm.

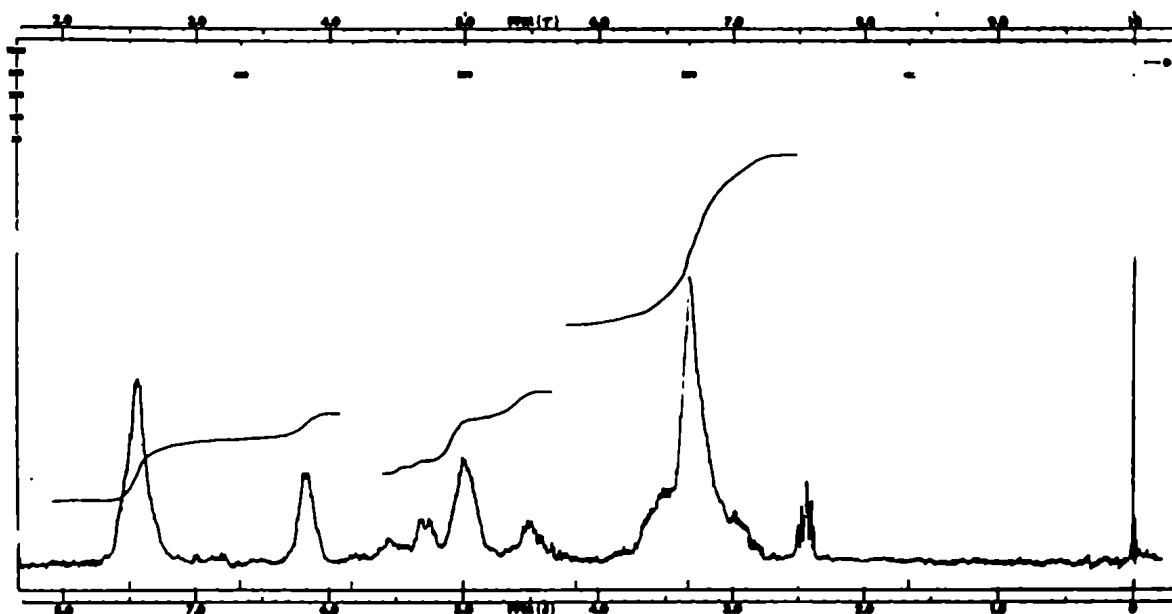


Fig. 70: Espectro de ^1H -RMN de IX, en DMSO-d_6 (60 MHz).

Su espectro de masas presentaba un M^+ a 418, coherente con pinocembrina unida a una hexosa, que de acuerdo al análisis de los azúcares debía ser D-glucosa. Los principales iones correspondían a la aglicona de acuerdo a las rupturas de la Fig. 67.

La acetilación de IX condujo a un pentaacetato, en cuyo espectro de ^1H -RMN (Fig. 71) se observaban claramente cuatro singuletes en 1,98, 1,99, 2,0 y 2,02 ppm correspondientes a los cuatro acetilos del azúcar y otro singulete a 2,30 ppm (3H) asignado al acetilo del hidroxilo fenólico de C-5. Los protones de la glucosa (indicados con el supraíndice ") aparecían distribuidos en dos grupos, tres protones a campos más altos (4,1-4,3 ppm) correspondientes a un H-5" y dos H-6" y cinco protones a campos más bajos (5,1-5,3 ppm) atribuibles a H-1", H-2", H-3" y H-4".

En el espectro de masas del derivado acetilado de IX (Fig. 72) prevalecían las fragmentaciones del azúcar de la molécula, siendo m/e 331 el ión de mayor masa, correspondiente al oxonio de una hexosa acetilada, acompañado por pérdida de ácido acético y cetena.

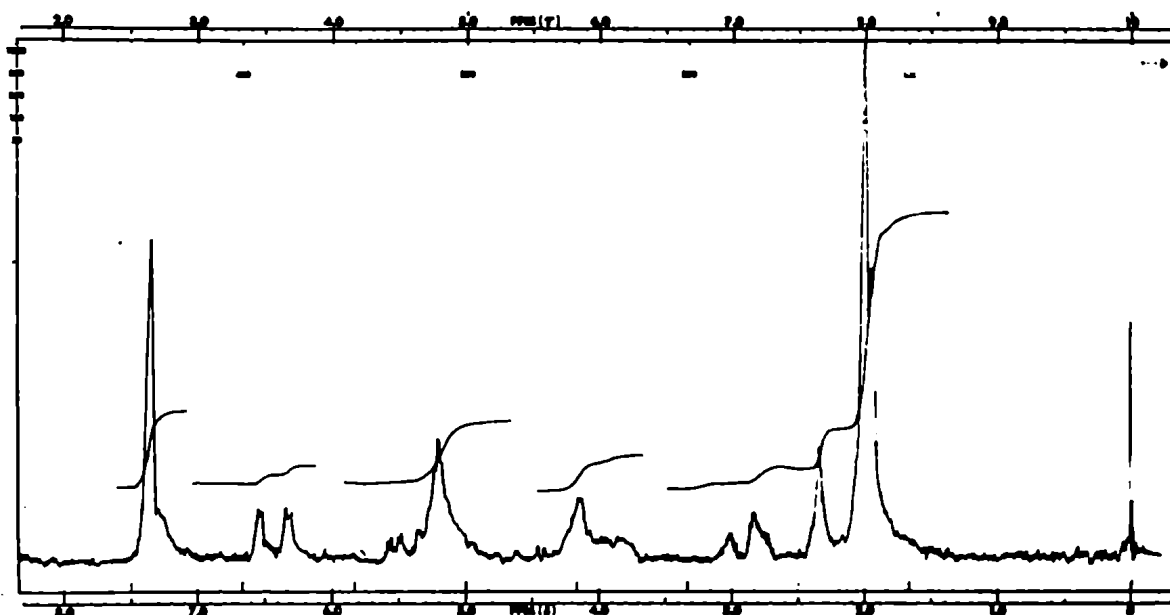


Fig. 71: Espectro de ^1H -RMN del derivado acetilado de IX en Cl_3CD (60 MHz).

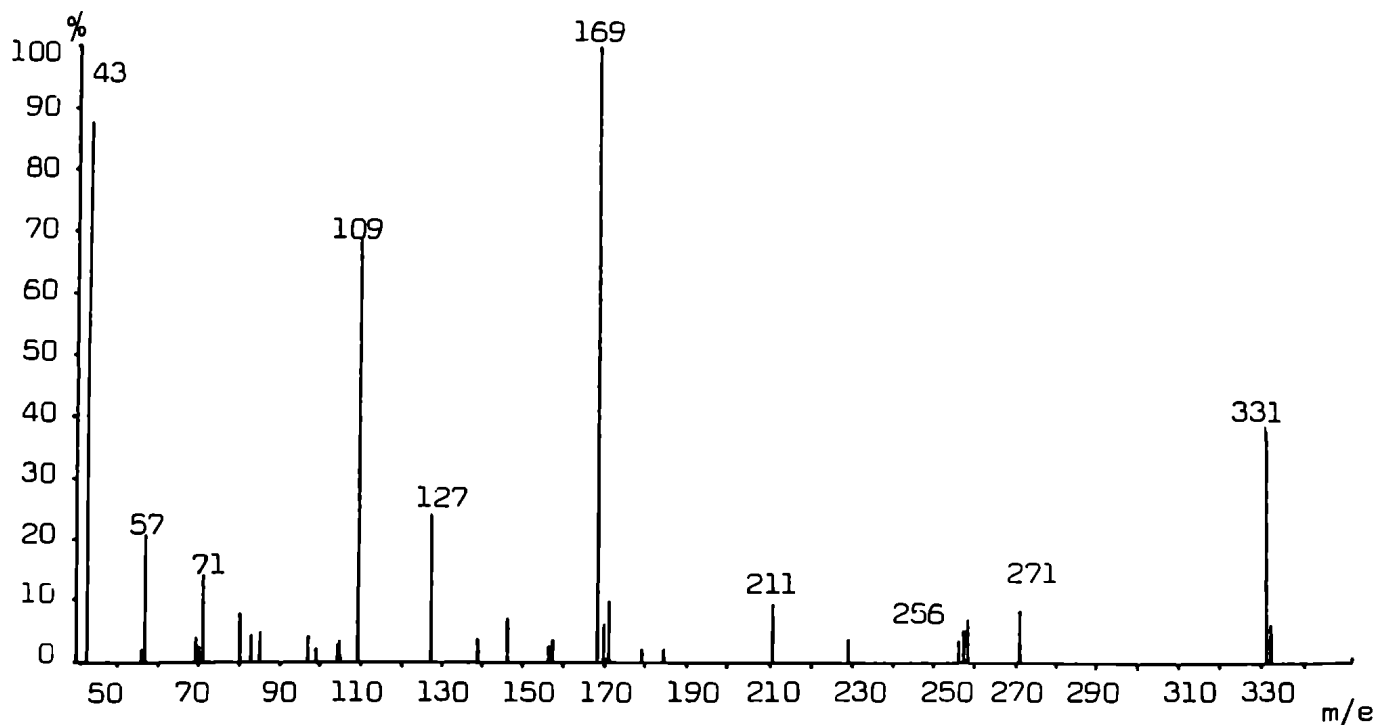


Fig. 72: Espectro de masas del pentaacetato de pinocembrina-7-O-glucósido.

El pico base era m/e 169, originado por la pérdida de dos moléculas de ácido acético y una de cetena a partir de m/e 331 (Fig. 72).

Evidentemente, el producto intermedio IX era pinocembrina-7-O-glucósido cuya obtención confirmaba que la glucosa era la unidad del disacárido directamente unida a la pinocembrina. No se conoce descripción alguna de pinocembrina-7-O-glucósido en la literatura.

Determinación de la unión interglucosídica en el producto natural (VII)

La existencia de pinocembrina-7-O-glucósido (IX) como producto intermedio de la hidrólisis de VII, la obtención de D-glucosa y L-ramnosa en la hidrólisis total y los datos espectroscópicos ya discutidos para VII, indicaban que éste debía ser un 7-O-ramnoglucósido de pinocembrina. Era necesario determinar la naturaleza de ese ramnoglucósido. Se conocían sólo dos ramnoglucósidos como unidades glicosidantes en flavonoides naturales: rutinosa (6-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosido) y neohesperidosa (2-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosido) (Fig.73).

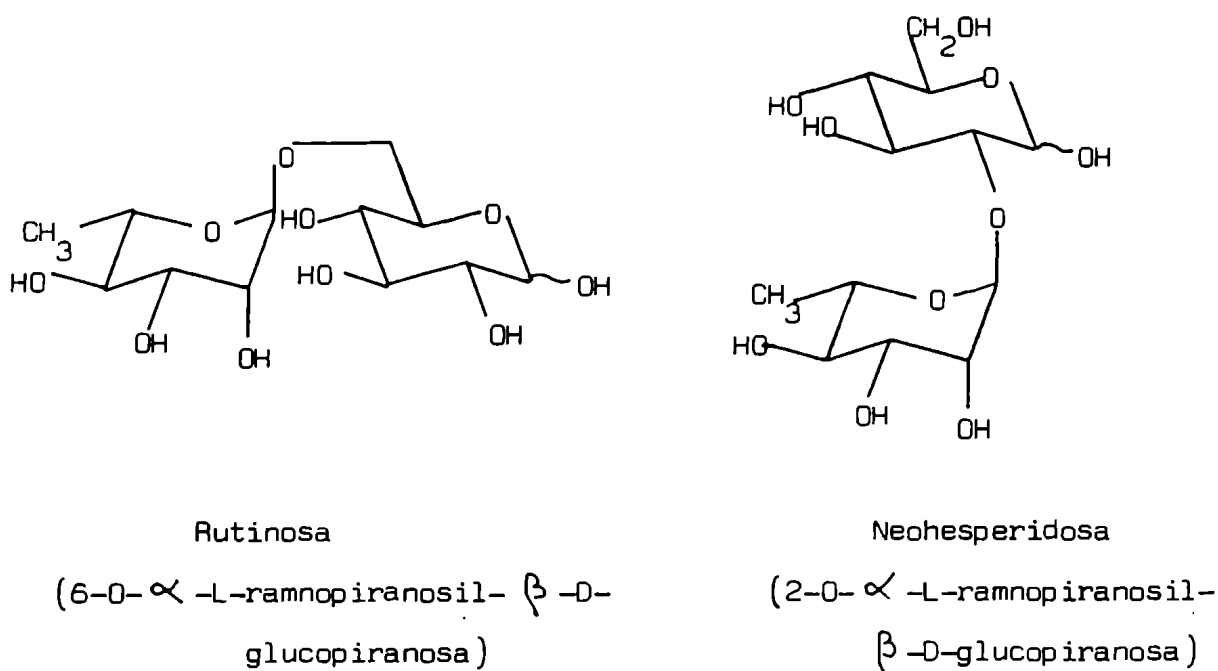


Fig. 73: Estructuras de rutinosa y neohesperidosa.

Para determinar cuál de los dos disacáridos se encontraba unido a la aglicona, se analizaron los espectros de ^1H -RMN de los derivados acetilados y trimetilsililados de VII, según las pautas expuestas en el Capítulo III (154).

Ambos espectros de ^1H -RMN se realizaron en Cl_3CD (Figs. 74 y 75). En los derivados acetilados, ambos disacáridos presentan distinta distribución de sus protones porque los metinos α a un grupo acetoxi y los protones anoméricos están a campos más bajos que el metileno unido a un grupo acetoxi y los metinos unidos a un solo enlace éter. Por lo tanto, observando la moléculas de los dos disacáridos (Fig.73) se puede deducir fácilmente que la relación entre los protones que pertenecen a cada uno de estos dos grupos es 8 a 4 para rutinosa y 7 a 5 para neohesperidosa. El espectro del derivado acetilado de VII se asemejaba al de un neohesperidósido (Fig. 74).

El espectro del derivado trimetilsililado de VII, presentaba la señal del protón anomérico de ramnosa ($J=1$ Hz) en 4,91 ppm, mientras que el metilo de C-6 resonaba en 1,30 ppm como un doblete ($J= 6$ Hz) (Fig. 75). Estos resultados coin-

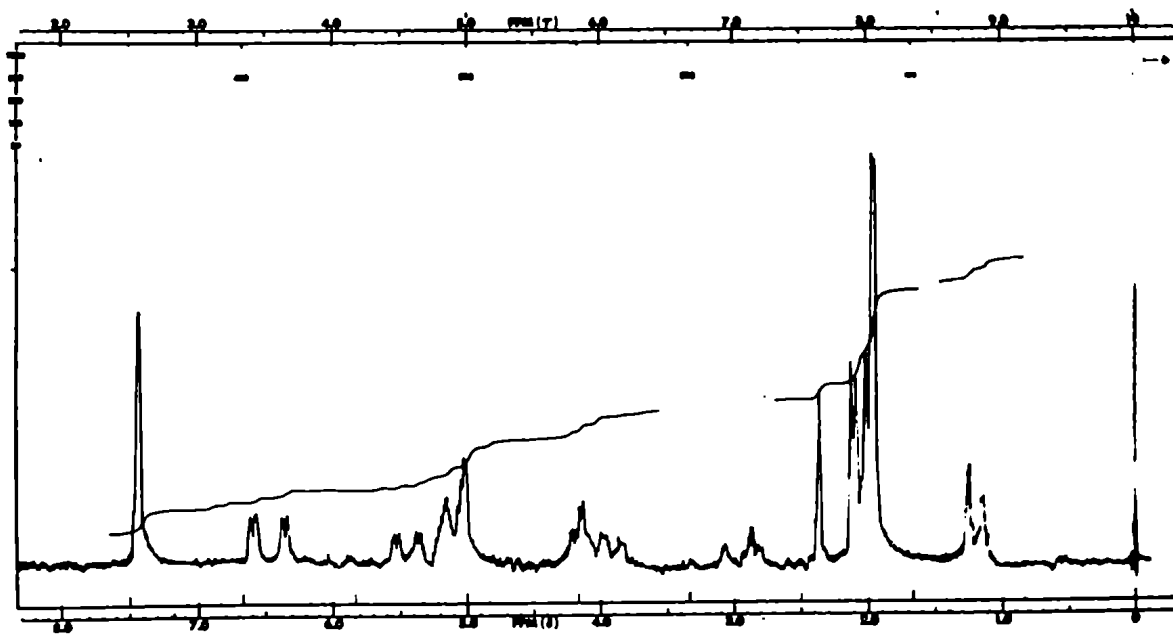


Fig. 74: Espectro de ^1H -RMN del derivado acetilado de VII, en Cl_3CD (60 MHz).

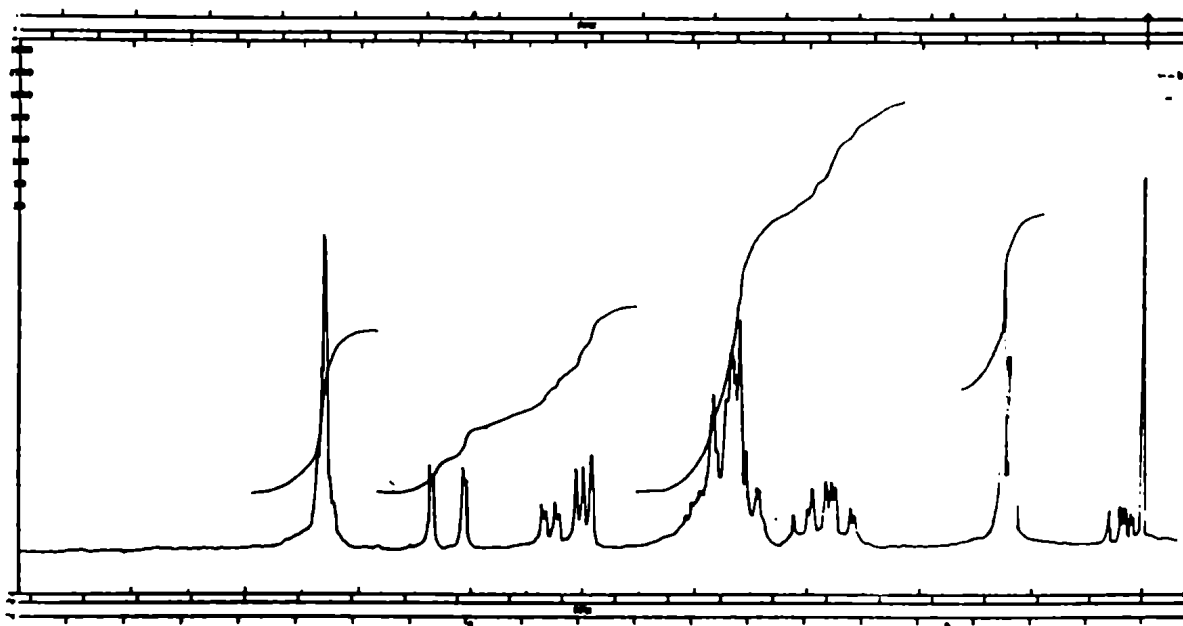


Fig. 75: Espectro de ^1H -RMN del derivado trimetilsililado de VII, en Cl_3CD , (100 MHz).

cidían con los hallados para neohesperidósidos trimetilsililados (151), mientras que los rutinósidos así derivatizados presentaban el protón anomérico de ramnosa entre 4,2 y 4,4 ppm y el metilo de C-6 resonaba como un multiplete entre 0,9 y 1,0 ppm. Por otra parte, la constante de acoplamiento del protón anomérico de ramnosa ($J = 1$ Hz) evidenció un acoplamiento ecuatorial-ecuatorial con el H-2 vecino, indicando una unión interglucosídica α . El protón anomérico de glucosa presentó en cambio, una constante de partición grande ($J = 10$ Hz) típica de un acoplamiento axial-axial revelando una unión β glicosídica. Se podía entonces suponer que el glicósido VII de Nierembergia hippomanica era pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido.

La asignación de las 27 señales del espectro de ^{13}C -RMN de VII, en forma totalmente desacoplada (Tabla 16) confirmaron esta estructura. Se compararon primeramente los espectros de ^{13}C -RMN de desacople total y parcial de pinocembrina-7-O-glucósido (IX) y pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII). En ambos casos la señal que aparecía a campos más bajos (196,70 ppm) se asignó al carbono carbonílico de C-4, las dos señales intensas en la zona de carbonos aromáticos (126,85 y 129,16 ppm) se atribuyeron a los C-2' y C-6' y a C-3' y C-5' respectivamente, coincidentes por su equivalencia magnética. Otra señal de carbono aromático terciario (129,08 ppm) correspondía a C-4', mientras que el carbono restante del anillo B, C-1', cuaternario, aparecía en 139,10 ppm.

Los C-2 y C-3 del anillo C se encontraban a campos más altos que los anteriores, como un doblete y un triplete respectivamente en el espectro de desacople parcial (Tabla 16), en la zona esperada para flavanonas.

Entre los carbonos del anillo A existían dos terciarios y cuatro cuaternarios. Los dos terciarios aparecían en 96,3 y 97,7 ppm, marcadamente protegidos por el efecto orto de dos funciones oxigenadas (69) y fueron asignadas a C-6 y C-8 respectivamente en base a los datos de literatura (157).

De los cuatro carbonos cuaternarios, el más fácilmente asignable resultó ser el C-10, a campos más altos que los restantes, por encontrarse en posición orto y para a sustituyentes oxigenados, mientras los restantes carbonos cuaternarios

Tabla 16: Desplazamientos químicos de los carbonos de pinocembrina-7-O-neohesperidosido (VII), pinocembrina-7-O-glucósido (IX), metil glucósido (A), metil ramnósido (B), naringina (C) y hesperidina (D) en ^{13}C -RMN.

	VII	IX	A	B	C	D
C-2	79,50	79,50			78,60	78,40
C-3	42,30	43,40			42,00	42,00
C-4	196,70	196,60			196,70	196,70
C-5	164,10	164,40			162,90	163,00
C-6	96,25	96,41			96,50	96,70
C-7	166,05	166,68			164,90	165,20
C-8	97,70	97,88			97,40	97,80
C-9	163,34	163,32			162,70	162,50
C-10	104,30	104,25			103,50	103,50
C-1'	139,10	139,35			128,70	131,20
C-2' y 6'	126,83	126,82			128,00	114,30-117,80
C-3' y 5'	129,16	129,08			115,30	146,70-112,70
C-4'	129,08	129,01			157,70	148,10
C-1 G	99,20	101,54	104,30		98,00	99,88
C-2 G	78,00	74,60	74,20		76,70	73,30
C-3 G	78,60	79,50	76,90		77,20	76,60
C-4 G	70,80	70,98	70,80		70,10	69,90
C-5 G	78,50	78,98	76,90		77,00	75,80
C-6 G	61,77	62,20	61,90		60,80	66,40
C-1 R	102,37			101,90	100,40	100,70
C-2 R	72,02			71,00	70,40	70,60
C-3 R	72,40			71,30	70,70	71,00
C-4 R	73,66			73,10	72,10	72,40
C-5 R	69,80			69,40	68,20	68,60
C-6 R	18,70			17,70	17,80	18,20
Solvente:	piridina	piridina	D ₂ O	D ₂ O	DMSO	DMSO

directamente unidos a un oxígeno, aparecían entre 163,30 y 166,70 ppm. Para discernir cada uno, se tuvieron en cuenta los efectos orto, meta y para en anillos aromáticos (69) y el efecto de la glicosidación (156), (Tabla 16).

En pinocembrina-7-O-glucósido, los seis carbonos del azúcar se asignaron tomando como referencia los datos de literatura para D-glucosa y el metil glucósido (158). El C-6 de este azúcar se distingue fácilmente del resto por resonar a campos altos y por aparecer como un triplete en los experimentos de desacople parcial (62,2 ppm). Los restantes carbonos, excepto el anomérico aparecían entre 70 y 80 ppm (tabla 16) y el anomérico en aproximadamente 101,5 ppm.

El espectro de pinocembrina-7-O-neohesperidósido aparece complicado con seis señales más, correspondientes al segundo azúcar del disacárido, cuyo C-6 era un cuarteto a campos altos (18,7 ppm) confirmando su naturaleza de 6-desoxiazúcar. La variación en la resonancia del C-2 de glucosa, que se desplaza a campos más bajos y de los C-1 y C-3 de ese azúcar que se apantallan, aseguró la posición de la unión interglicosídica. También la asignación de los carbonos de ramnosa se realizó por comparación con los datos de L-ramnosa y el metil ramnósido (158).

De acuerdo a estos resultados, el glicósido mayoritario del Precipitado 1 se identificó como pinocembrina-7-O-(2-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosido), Pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII).

Confirmación de la estructura de pinocembrina-7-O-neohesperidósido por síntesis

Si bien la pinocembrina (VIII, 5,7-dihidroxi-flavanona) se encuentra muy difundida en maderas de especies de Pinus (251) y Prunus (252, 253), se conocen muy pocos glicósidos de esta flavanona. Sólo se ha descrito el aislamiento de pinocembrina-5-O-glucósido (verecundina) de Prunus verecunda (253) y Prunus aequinoctialis (254), así como de pinocembrina-7-O-neohesperidósido de Spartosperma vernicosum (255) sin comprobar fehacientemente la estructura de neohesperidosa como unidad glicosidante.

Por esta razón, para confirmar la estructura propuesta, se realizó la síntesis total del flavonoide (256). Para ello, se sintetizó la aglicona por el método de Fries (257) a partir de monocinamato de floroglucina (Fig. 76). Se ob-

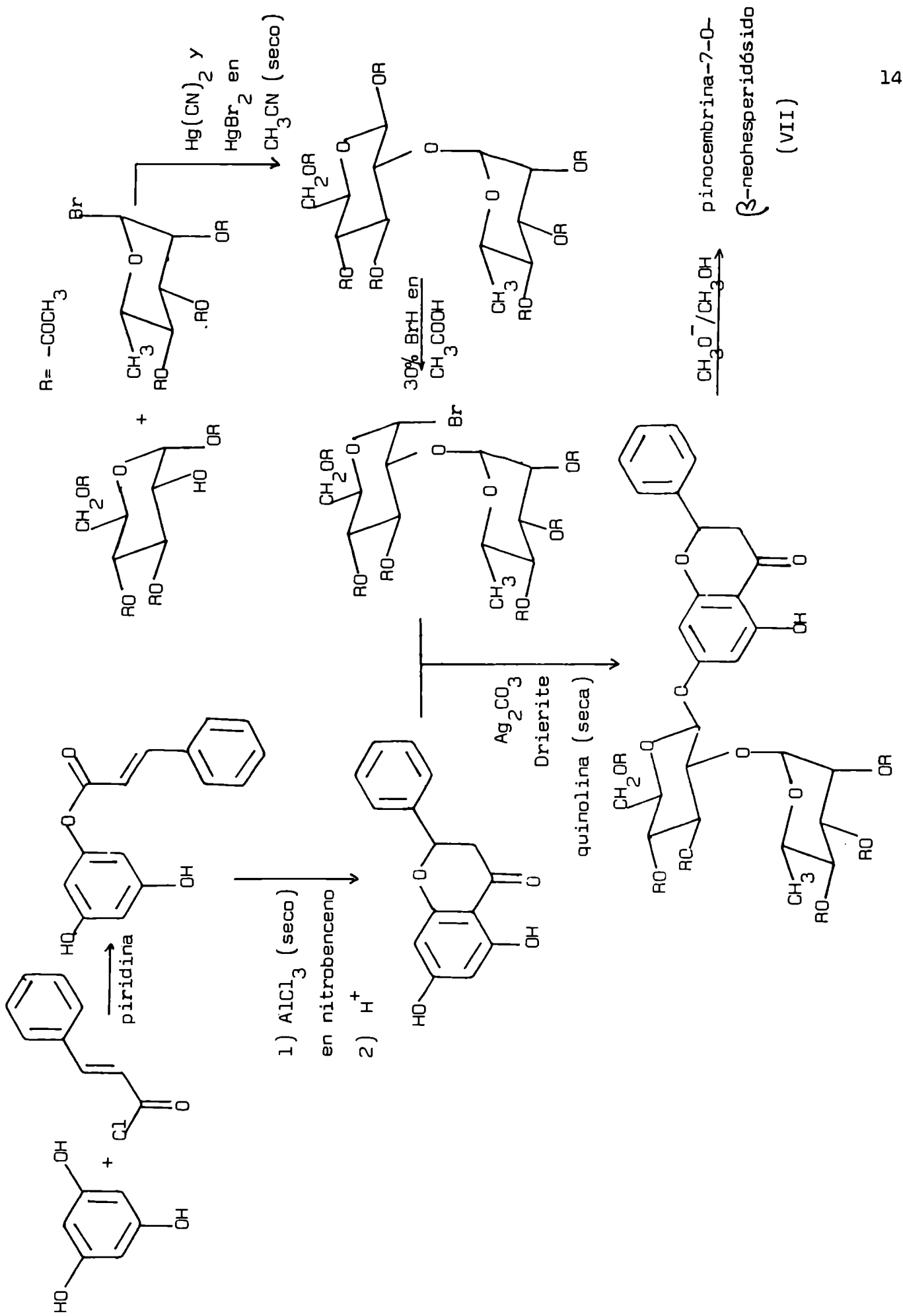


Fig.76: Esquema de síntesis de pinoembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII).

tuvo directamente la flavanona, ya que la hidroxichalcona correspondiente no es estable en las condiciones de reacción.

Se preparó además hepta-O-acetil- β -neohesperidosa por el método de Helferich (258) condensando bromuro de 2,3,4-tri-O-acetil- α -L-ramnopiranosilo con 1,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranososa en presencia de cianuro y bromuro de mercurio en acetonitrilo (Fig. 76). Para producir la condensación del disacárido con la aglicona por el método de Koenigs-Knorr (259) se sintetizó el bromuro de α -hexa-O-acetilneohesperidosilo. El producto de condensación fue desacetilado y el compuesto final resultó idéntico a VII en todas sus propiedades físicas excepto en el poder rotatorio, debido a que la flavanona sintética se había obtenido como racemato en el C-2.

Una condensación similar se llevó a cabo con pinocembrina natural, aislada de maderas de Pinus pinaster y Pinus radiata. En este caso, la coincidencia entre el compuesto sintético y el natural (VII) fue total.

b.3.3) Flavonoides minoritarios

La fracción 6 de la columna del Precipitado 1 estaba formada por pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII) acompañada de tres compuestos minoritarios (ccd; sílicagel; Rf 0,34 (X), Rf 0,40 (XI) y Rf 0,47 (XII); benceno: acetona, 1:2) que presentaban iguales reacciones cromogénicas que el glicósido principal. Sus aislamientos en cantidades suficientes para el análisis estructural no fueron posibles a partir de esta fracción, por lo que se decidió realizar una extracción directa de flavonoides a partir del extracto metanólico total como se indica en la sección a). Los resultados obtenidos se discuten en la sección c.1).

La fracción 9 de la columna de Precipitado 1 presentaba dos manchas fenólicas con reacciones cromogénicas de flavonoles (fluorescencia amarilla que se intensificaba con vapores de amoníaco y color amarillo al revelar con Cl_3Sb (260)), Rf 0,53 (XIII) y Rf 0,28 (XIV), acetato de etilo: metanol: ácido acético, 100:20:1). Se aislaron por columnas de sílicagel y se purificaron por columnas de Sephadex LH-20.

Con el solvente agua: butanol: acetona: ácido acético, 16:2:1:1, en poliamedia, sistema que separa mono, di y triglicósidos de flavonoles entre sí (261), uno de ellos (XIII) tenía propiedades de monoglicósido (Rf 0,1) mientras el segundo (XIV) se comportaba como un diglicósido (Rf 0,3). Además, estos compuestos presentaron comportamiento de mono y diglicósidos de flavonoles, en la cromatografía bidimensional de partición en las condiciones establecidas (262).

Ambos flavonoides se encontraban en muy pequeña cantidad. En el caso de XIII resultó apenas suficiente para su análisis estructural, pero en el de XIV fue insuficiente, pudiéndose solamente establecer a qué familia pertenecía este compuesto.

El espectro UV de XIII (Fig. 77) mostraba dos máximos de intensidad comparable (256 y 356 nm) y con sendos hombros, que indicaban una estructura de flavonol (Banda I: 356 nm). Los distintos corrimientos observados con Cl_3Al y $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{ClH}$ demostraron la existencia de dos tipos de complejos del compuesto con Al^{+3} , uno estable en medio ácido (como los que forman los OH-3 u OH-5 y el carbonilo

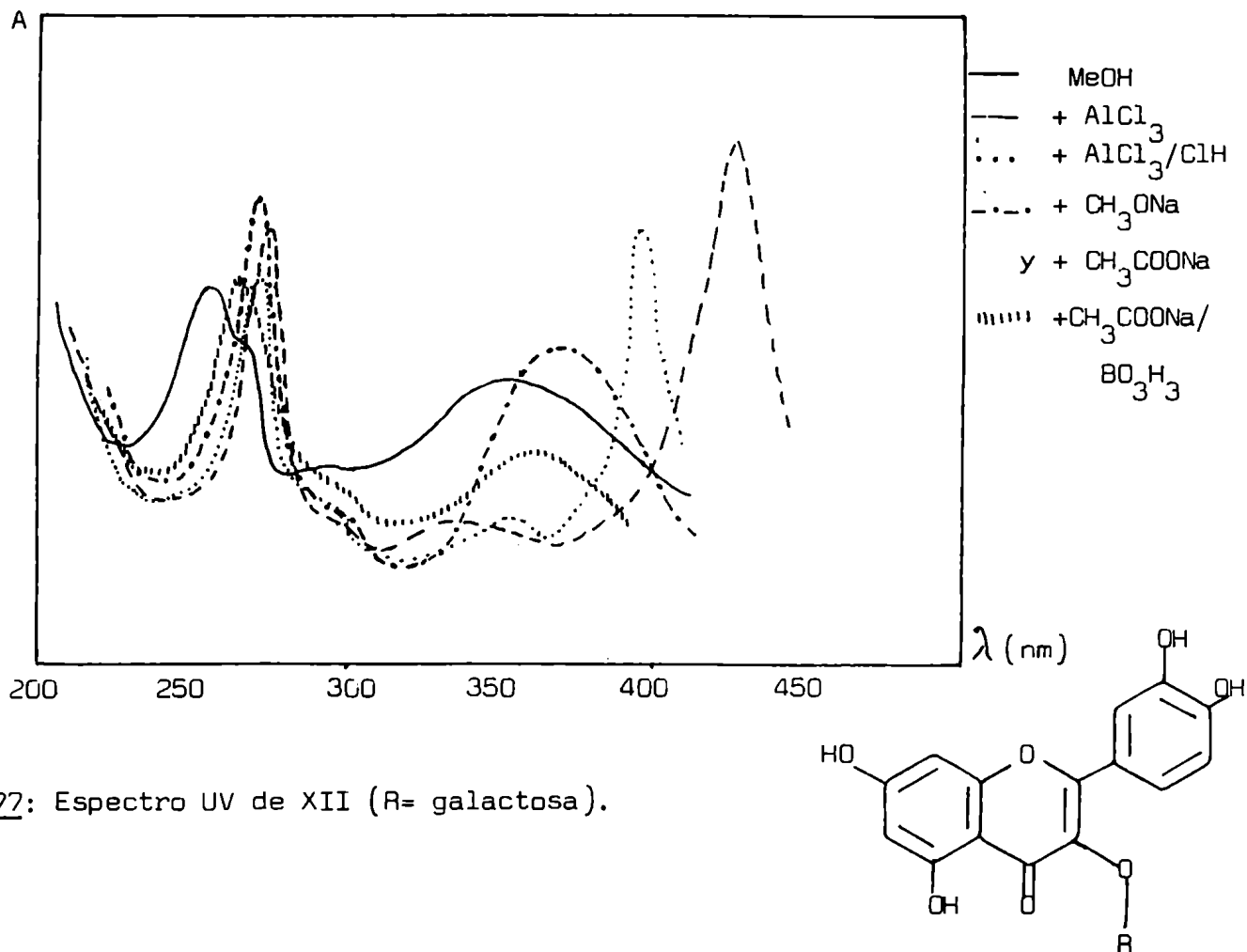


Fig. 77: Espectro UV de XII (R= galactosa).

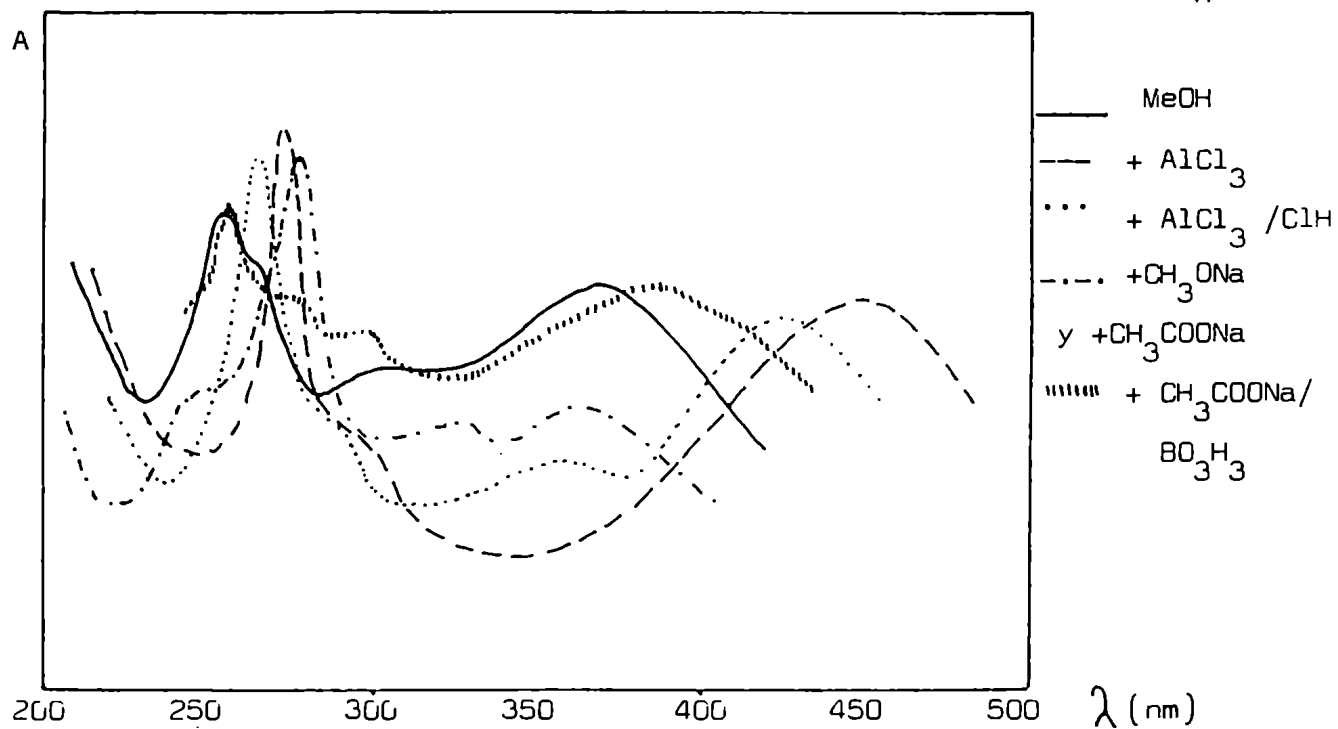


Fig. 78: Espectro UV de la aglicona de XII (R= H), quercetina.

de C-4) y otro inestable (originado por dos hidroxilos fenólicos orto). Por la diferencia entre las absorciones en los espectros realizados con $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{ClH}$ y en metanol ($\Delta\lambda_{\text{BI}}$: 39 nm) se podría deducir la presencia de un complejo entre el OH-5 y el carbonilo de C-4 en un flavonol 3-O-sustituído.

El desplazamiento con acetato de sodio ($\Delta\lambda_{\text{BII}}$: 6 nm) indicaba la presencia de OH-7 libre, el desplazamiento con metóxido de sodio ($\Delta\lambda_{\text{BI}}$: 29 nm) la presencia de OH-4' libre mientras el desplazamiento con acetato de sodio/ BO_3H_3 ($\Delta\lambda_{\text{BI}}$: 14 nm) mostraba que existían hidroxilos fenólicos libres en posición orto en el anillo B, que se asignan entonces a OH-3' y OH-4'. Dada esta hidroxilación, si se trataba de un flavonol, el OH-3 debería estar sustituido, ya que el compuesto se mostraba estable frente a los reactivos básicos en el espectro ultravioleta.

La hidrólisis ácida del flavonoide produjo una aglicona (ccd; sílicagel; Rf 0,4; benceno: acetona, 2;1) cuyo espectro UV (Fig. 78) en metanol era similar al del glicósido, excepto en el hecho de un mayor desplazamiento de la banda I por agregado de Cl_3Al y $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{ClH}$, lo que indicaba la existencia de un nuevo grupo cercano al carbonilo de C-4 que pudiera formar complejos con él. La descomposición de la molécula observada con acetato de sodio y metóxido de sodio era indicio de la presencia en la aglicona de un sistema de hidroxilación lábil a bases (139). Estos datos espectroscópicos y la comparación cromatográfica contra testigo auténtico permitían suponer que la aglicona era un 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol conocido como quercetina. Por otra parte, la comparación entre los espectros ultravioleta de glicósido (XIII) y aglicona, indicaban al OH-3 como posición de glicosidación.

La espectrometría de masas confirmó la estructura de la aglicona como quercetina (Fig. 79) presentando un M^+ 302 y un intenso $\text{M}-1$ ⁺. El fragmento del anillo A de la reacción de retro Diels Alder en el anillo C aparecía a m/e 152, indicando dihidroxilación en este anillo mientras el fragmento B_2^+ , correspondiente al anillo B, aparecía a m/e 137, acompañado por el correspondiente ión menos CO, en m/e 109, indicando dihidroxilación en el anillo B.

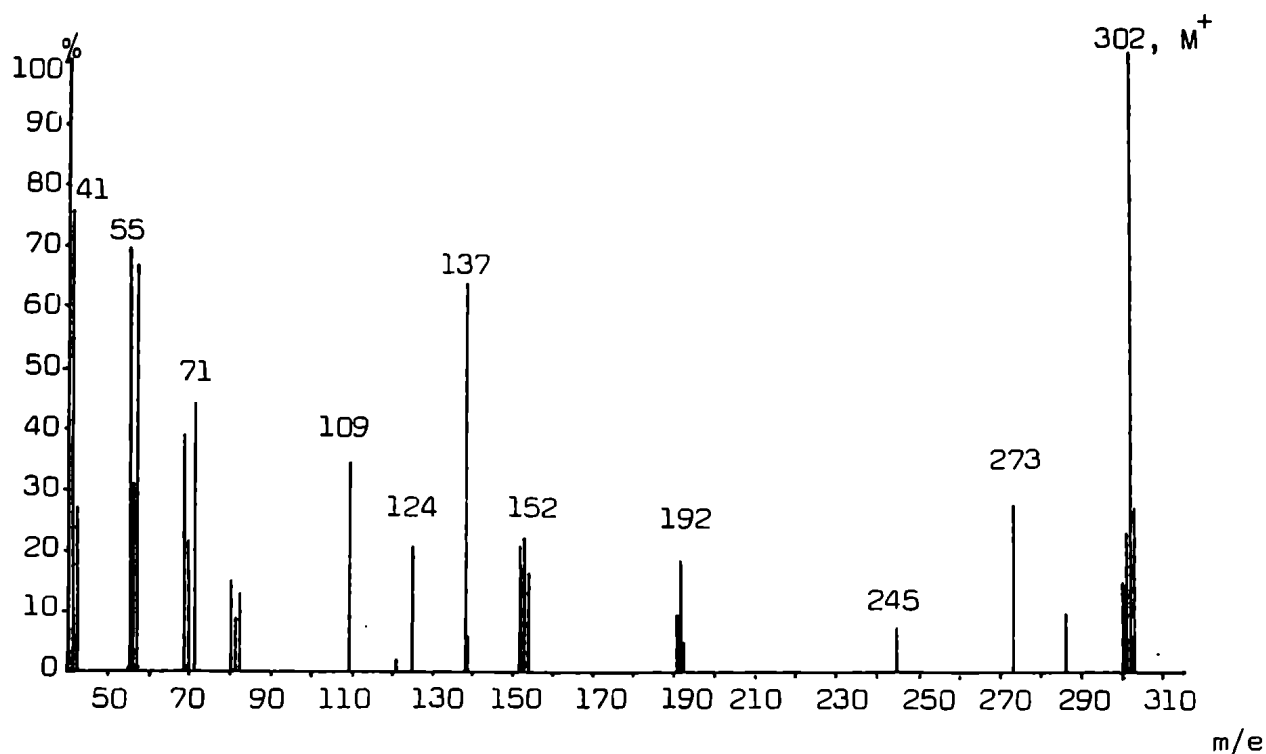


Fig. 79: Espectro de masas de quercetina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol).

De la diferencia de masas entre el ión molecular y los valores de masas de los anillos A y B, surgía la ubicación de un quinto hidroxilo en el anillo C.

Los productos presentes en la fase acuosa de la hidrólisis se cromatografiaron en placas de celulosa contra testigos, identificándose el azúcar presente como D-galactosa. Por lo tanto, el compuesto XIII se pudo caracterizar como quercetina-3-O-galactósido, sin haber llegado a establecer la configuración de la unión glicosídica.

Se realizó un espectro ultravioleta del compuesto XIV, que tenía comportamiento de diglicósido, estableciéndose por el estudio de los desplazamientos, muy similares a los del compuesto XIII, que probablemente se trataba de un 3-O-diglicósido de quercetina.

La presencia de glicósidos de flavonoles es característica de las Solanáceas (3, 16, 263).

b.4) Polialcohol

El residuo de la fracción 10 de la columna del precipitado 1 era un jarabe color ámbar que, por recristalización de etanol, produjo agujas blancas (Pf 166-167°C) de un compuesto (XV), que no absorbía la luz ultravioleta y cuyo espectro infrarrojo presentaba absorciones fuertes de tensión O-H a 3300 cm^{-1} y de deformación O-H a 1420, 1380, 1080 y 1010 cm^{-1} .

El espectro de ^1H -RMN de XV (Fig. 80) en DMSO-d_6 mostraba una molécula de naturaleza alifática y sólo tres señales: un multiplete a 3,65 ppm (2H), un doblete a 4,15 ppm (1H) y un doble doblete a 4,45 ppm (1H).

El espectro de masas de XV presentaba un ión molecular débil a M^+ 182, con sucesivas pérdidas de 18 uma, lo que demostraba que se trataba de una molécula pequeña muy hidroxilada.

La acetilación de XV, llevada a cabo de la manera usual, produjo un derivado acetilado cuyo espectro de ^1H -RMN de 100 MHz en Cl_3CD (Fig. 81) permitió elucidar la estructura, ya que presentaba tres señales, dos de ellas formando un sistema ABX cuya parte X formaba un sistema AB con la señal restante, como se demostró por experimentos de doble resonancia. Al irradiar en 5,1 ppm (zona X del sistema ABX) el doble cuarteto presente a 4,2 ppm en el espectro original, se resolvía en dos dobletes de $J = 6,5\text{ Hz}$, y al irradiar a 4,2 ppm (zona AB del sistema ABX) el multiplete a 5,08 ppm se transformaba en un doblete de $J = 4\text{ Hz}$, acoplado al doblete a 5,4 ppm presente en el espectro irradiado y en el original.

Se dedujo que se trataba de una molécula simétrica con tres grupos de protones equivalentes, que se asignó, por sus datos espectroscópicos, a D-manitol.

El espectro de masas del derivado acetilado resultó coherente con la estructura asignada, mostrando un M^+ a 434, muy débil, y los fragmentos originados por escisión entre los carbonos de la cadena del hexitol, junto con los iones resultantes de las pérdidas de ácido acético y cetena a partir de ellos. Se comprobó finalmente la identidad por comparación por cromatografía gas-líquido (columna de ECCNS-M 3 %) contra hexaacetilmanitol testigo.

Por lo tanto, Nierembergia hippomanica contiene D-manitol (XV).

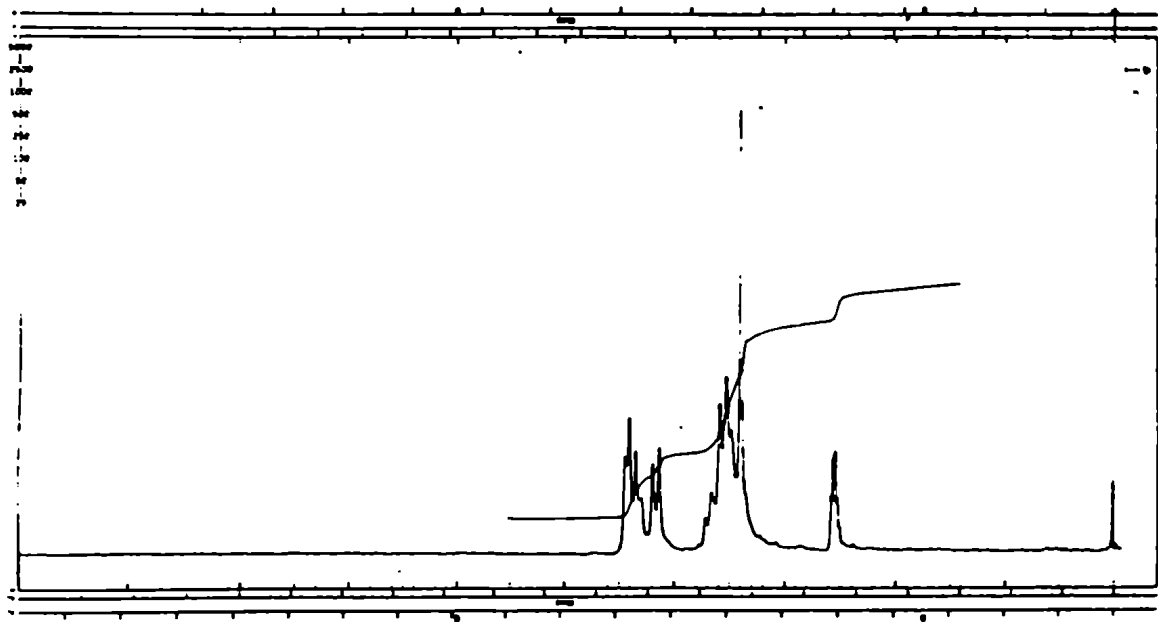


Fig. 80: Espectro de ^1H -RMN de XV, en DMSO-d_6 (100 MHz).

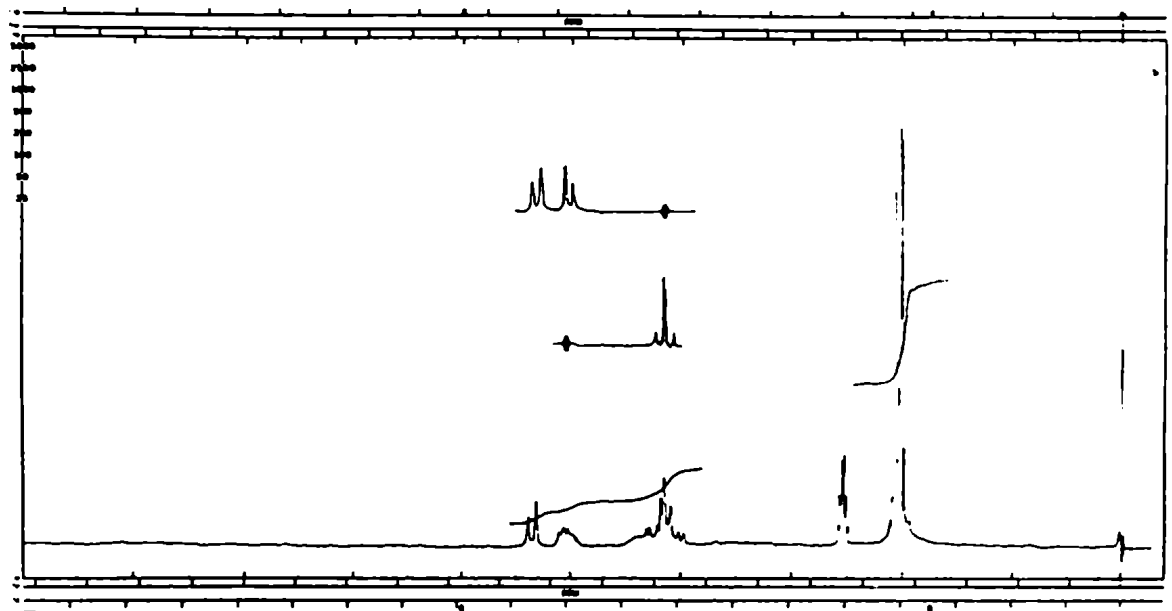


Fig. 81: Espectro de ^1H -RMN del derivado acetilado de XV, en Cl_3CD (100 MHz).

c) Estudio del extracto de acetato de etilo

c.1) Flavonoides acilados

Para el estudio de los flavonoides minoritarios encontrados en la fracción 6 del Precipitado 1, se decidió realizar una extracción directa de flavonoides a partir del extracto metanólico total, como se indica al comienzo de este capítulo. El extracto acetato de etilo así obtenido, estaba enriquecido en estas sustancias, purificado de clorofilas y compuestos no polares por la extracción previa con cloroformo y relativamente libre del flavonoide mayoritario extraído preferencialmente en el extracto de butanol. Los compuestos fenólicos estaban acompañados en este extracto por dos sustancias de naturaleza terpénica, sobre las que se trabajó como se discutirá en la sección c.2), (ccd; sílicagel; compuestos fenólicos: Rf 0,34 (X), 0,40 (XI) y 0,47 (XII); compuestos terpénicos: Rf 0,24 (XVI) y 0,37 (XVII); benceno: acetona, 1:2).

Después de varios intentos infructuosos de separar esta mezcla de flavonoides minoritarios, se recurrió a las repetidas cromatografías en columnas de sílicagel, en un proceso iterativo, para lograr el enriquecimiento de las fracciones en cada uno de los flavonoides, hasta alcanzar la pureza necesaria. El flavonoide X, presente en muy poca cantidad, fue considerablemente más difícil de separar ya que siempre se encontraba impurificado con uno de los terpenoides. Se lo aisló finalmente por medio de una columna de Sephadex LH-20.

El espectro infrarrojo de los tres flavonoides (X, XI y XII) presentaba absorciones análogas a las de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII) (tensión O-H a 3300 cm^{-1} , de carbonilo a 1630 cm^{-1} , de unión glicosídica a 1075 cm^{-1} y bandas de benceno polisustituído a 895, 840, 815, 775, 738 y 705 cm^{-1}) pero aparecía en cada uno de ellos una nueva señal, de carbonilo de éster, a 1720 cm^{-1} .

Los espectros ultravioleta de X, XI y XII eran exactamente superponibles al de VII, tanto en metanol como con los reactivos de desplazamiento.

El espectro de ^1H -RMN de 60 MHz de cada uno de ellos, correspondía al de un glicósido de flavanona y eran similares al de VII, excepto por un singulete alrededor de 2 ppm, que hizo pensar en la presencia de una unidad de acetilo

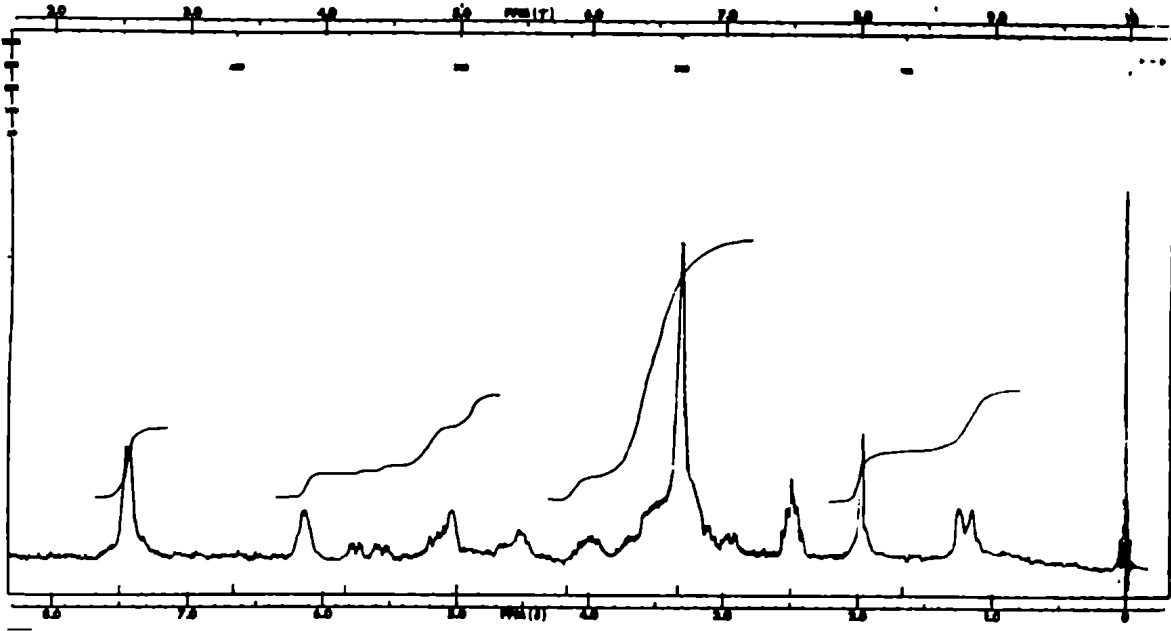


Fig. 82: Espectro de ^1H -RMN de X, en DMSO-d_6 (60 MHz).

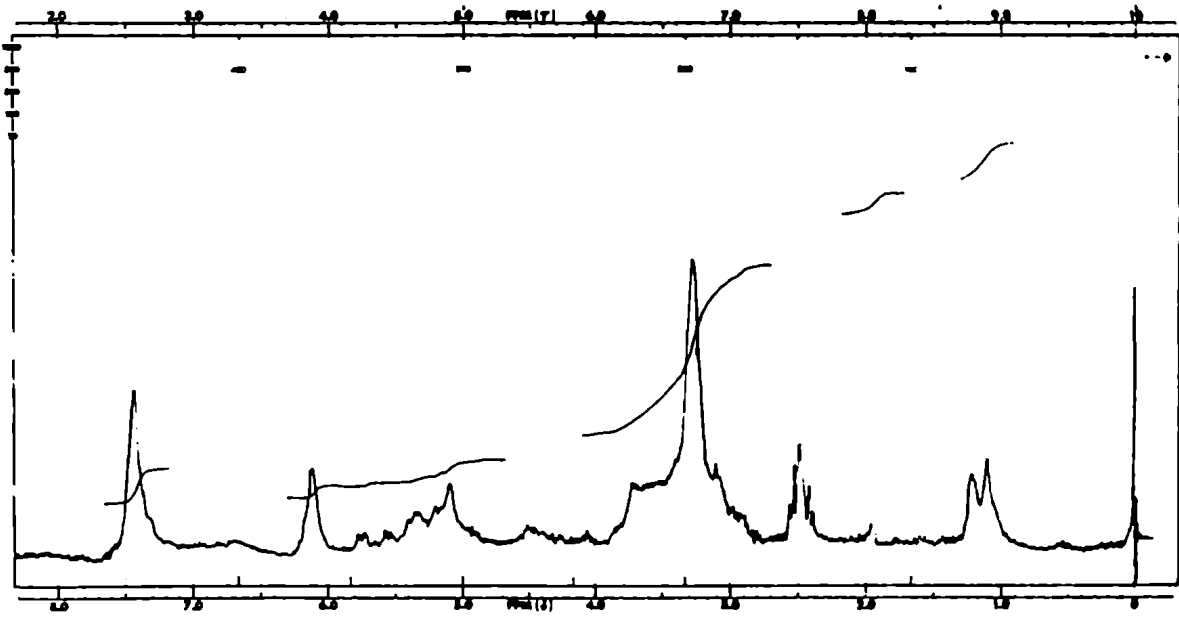


Fig. 83: Espectro de ^1H -RMN de XI, en DMSO-d_6 (60 MHz).

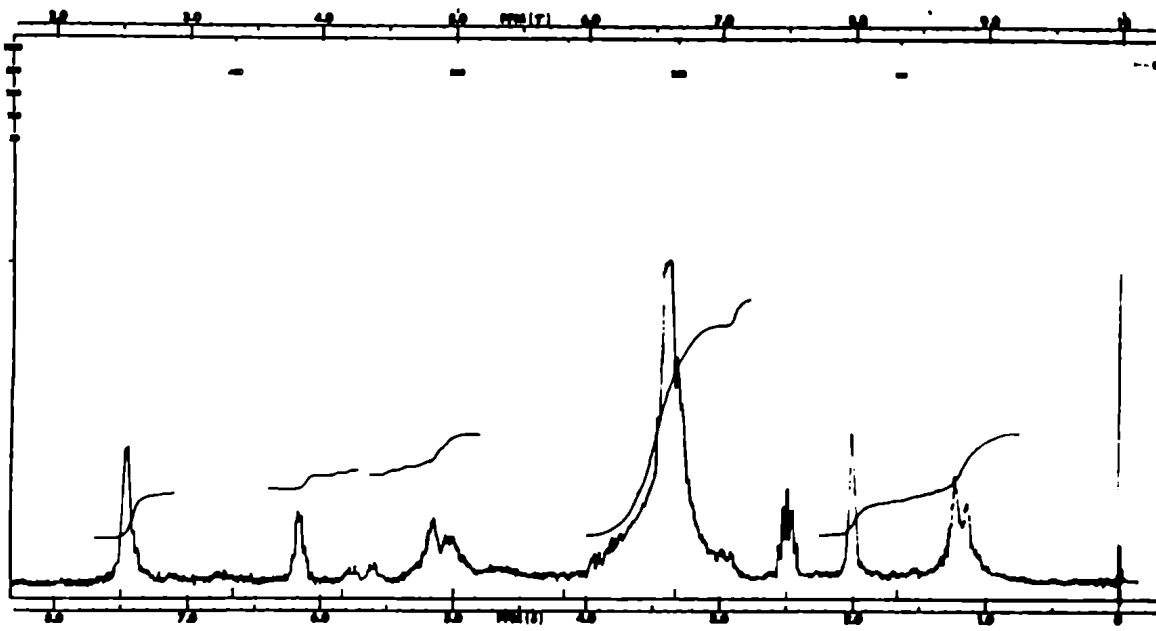


Fig. 84: Espectro de ^1H -RMN de XII, en DMSO-d_6 (60 MHz).

en cada una de estas tres moléculas (Figs. 82, 83 y 84).

Por hidrólisis ácida se obtenían, en los tres casos, pinocembrina, D-glucosa y L-ramnosa. La acetilación total de estos flavonoides por el método usual, condujo a un mismo compuesto, idéntico a heptaacetato de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (ccd, IR, ^1H -RMN). Por desacetilación en condiciones usuales, con metóxido de sodio en metanol, de cada uno de estos compuestos, se obtuvo pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII).

De todos estos datos químicos y espectroscópicos se dedujo que los tres flavonoides minoritarios X, XI y XII, eran derivados monoacetilados naturales de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII), que diferían entre sí en la localización del acetilo entre los hidroxilos del glicósido.

Los espectros de masas de los compuestos XI y XII, eran iguales entre sí. Presentaban pico base a m/e 256, correspondiente a pinocembrina y las rupturas de la aglicona ya descritas (Fig. 67). Pero a masas más bajas se observaban dos nuevos fragmentos (m/e 189 y 171, ambos de intensidad de aproximadamente el 40 % del pico base) que no correspondían a la aglicona.

Se asignó a m/e 189 la estructura del oxonio de monoacetilramnosa, y a partir de este fragmento, las pérdidas de agua (m/e 171), cetena (m/e 147) y ácido acético (m/e 129) (Fig. 85).

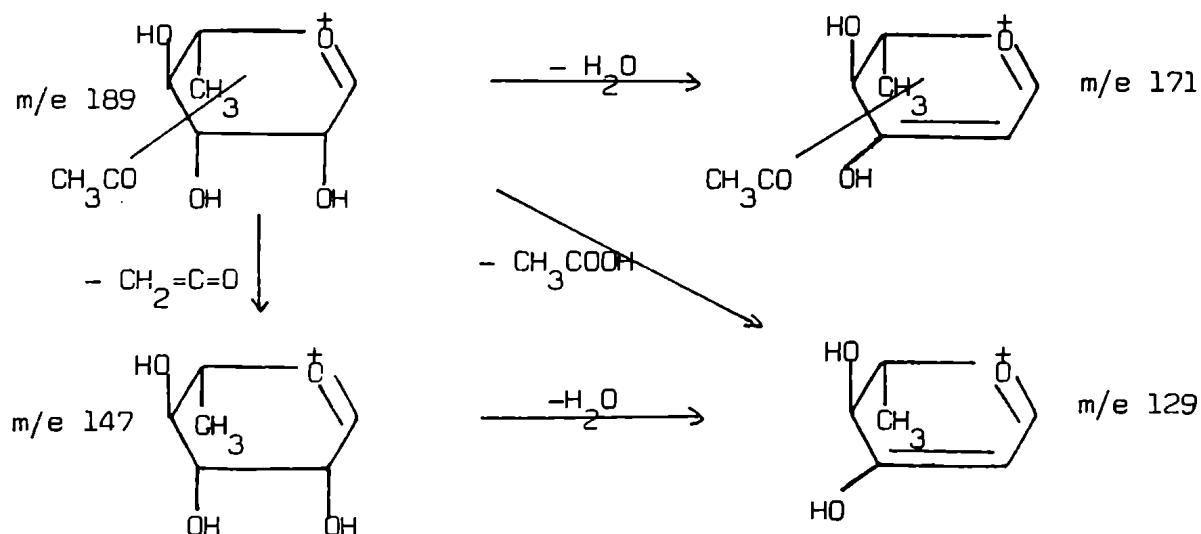


Fig. 85: Fragmentaciones del ión oxonio de monoacetilramnosa.

Aparentemente la unidad acetilada de estos dos compuestos era la ramnosa terminal, sin embargo, se buscó un método que lo demostrara más claramente.

Sabiendo que la espectrometría de masas de los flavonoides trimetilsililados (147, 148) permitía establecer la secuencia de azúcares y ver la naturaleza del disacárido unido a la aglicona, se intentó utilizar este método para determinar en cuál de las unidades del disacárido se encontraba el grupo acilante, si bien no se conocían antecedentes del uso de este método en flavonoides acilados.

Por lo tanto, cada uno de los tres flavonoides fue sililado (151) y se realizaron sus espectros de masas.

Los resultados para estos derivados se observan en la Tabla 17 y el origen de esas rupturas en la Fig. 86, ejemplificado para el derivado trimetilsililado de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII TMS).

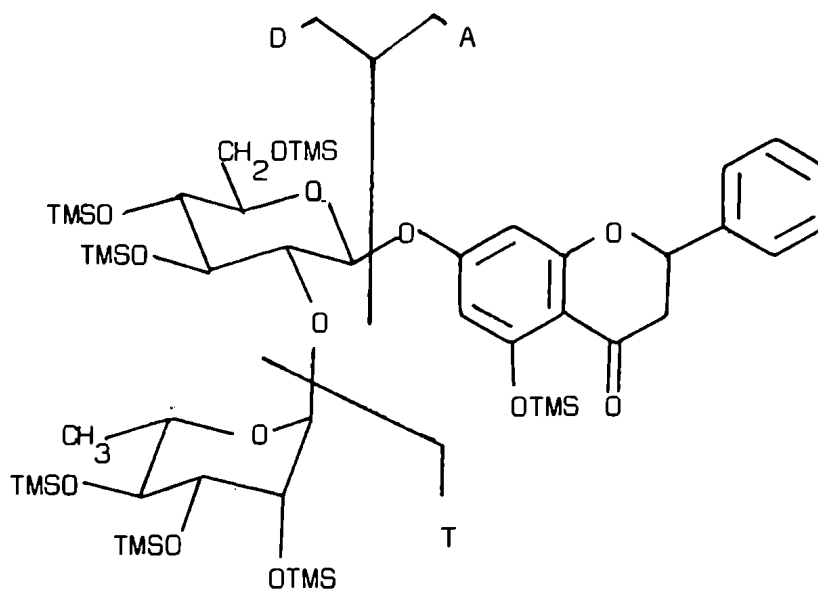


Fig. 86: Esquema de las fragmentaciones del trimetilsililderivado de VII.

Tabla 17: Valores de los principales iones de los trimetilsililderivados de pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII) y de los compuestos X, XI y XII en sus espectros de masas.

	A+H	A+H-15	A+R	D	D-60	D-60-90	D-90	T+OR	T	T-60	T-90
VII	328	313	400	741	-	-	651	451	363	-	273
X	328	313	400	711	651	561	621	451	363	-	273
XI	328	313	400	711	651	561	621	421	333	273	243
XII	328	313	400	711	651	561	621	421	333	273	243

R= TMS

60 uma= CH₃COOH

90 uma= TMSiOH

Los fragmentos de la aglicona correspondían a la ruptura entre el oxígeno glicosidado y el C-1 del azúcar con transferencia de H y/o trimetilsililo (TMS) siendo para estas flavanonas A+H-15 el fragmento de aglicona más importante. Pudo observarse sin dificultad en estos derivados, el ión correspondiente al disacárido trimetilsililado como su oxonio. Las masas esperadas para disacáridos de glucosa y ramnosa escindidos de este modo, son m/e 741 y 742 (D+H). El ión 741 se observó en el derivado trimetilsililado de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII TMS), pero no existía en ninguno de los espectros de masas de los derivados trimetilsililados de los tres flavonoides minoritarios (X TMS, XI TMS y XII TMS). En cambio se observaba en cada uno de ellos un fragmento a m/e 711, que se asignó al disacárido de glucosa y ramnosa monoacetilado trimetilsililado. A partir de este fragmento se originaba el ión correspondiente a la pérdida de silanol (D-90) como es característico para los glicósidos de neohesperidosa (147). Como se observa en la Tabla 17, este ión valía 651 para VII TMS y 621 para X TMS, XI TMS y XII TMS, indicando nuevamente la presencia de una unidad de acetilo en la porción del disacárido de cada uno de estos tres compuestos. Además, se observó a partir del ión 621, la pérdida de ácido acético (m/e 561).

La escisión del azúcar terminal produjo iones intensos en forma de oxonio trimetilsililado. Para VII TMS, éste correspondía a m/e 363, coherente con ramnosa como azúcar terminal y la correspondiente pérdida de silanol (m/e 273). El estudio de estos picos importantes en los espectros de XII TMS, XI TMS y X TMS, condujo a interesantes conclusiones: mientras en los espectros de XI TMS y XII TMS no existían 363 y 273, aparecían m/e 333 y 243, indicativos de la presencia de un acetilo reemplazando un grupo trimetilsililo en el oxonio de la ramnosa terminal de estos glicósidos. En el espectro de X TMS, los iones correspondientes al azúcar terminal eran iguales a los de VII TMS (Tabla 17).

Los fragmentos obtenidos por transferencia de TMSO hacia el azúcar terminal eran coherentes con los anteriores, ya que se encuentra 451 en el espectro de masas de VII TMS y X TMS, y el ión m/e 421 para los espectros de XI TMS y XII TMS (Tabla 17).

El fragmento S, correspondiente a la aglicona más el azúcar directamente unido a ella se observó con dificultad y a veces no fue detectado, por lo que no se lo utilizó como diagnóstico.

Por todo esto se dedujo, que los tres compuestos tienen un grupo acetoxi en el disacárido glicosidante, XI y XII en el azúcar terminal (ramnosa), y X en el azúcar directamente unido a la aglicona (glucosa). Por otra parte, el uso de la espectrometría de masas de los derivados trimetilsililados en flavonoides acilados resultó muy satisfactorio.

Localización exacta de la posición del acetilo

La comparación de los espectros de $^1\text{H-NMR}$ de los flavonoides trimetilsililados con el de pinocembrina-7-O-neohesperidósido trimetilsililado (VII TMS), permitió establecer las diferencias en las resonancias de los protones afectados por la acilación.

En el compuesto XII TMS, la diferencia más notable que surge de la comparación con el espectro de VIITMS (Figs. 87 y 88 respectivamente) es la complicación de la zona anomérica, en la que se encuentra un doble doblete superpuesto a la señal del protón anomérico de glucosa (5,12 ppm). Ese doble doblete se asignó a la señal del metino α al hidroxilo acetilado, desplazada por esta razón alrededor de +1 ppm del resto de los protones del glicósido. En XII, en el que se había establecido por espectrometría de masas que la unidad acilada era la ramnosa, las posibles localizaciones del acetilo se reducían al OH-2, OH-3 u OH-4 de ramnosa. Las constantes de acoplamiento del doble doblete eran 2 y 4 Hz y se dedujo, por su magnitud pequeña, que se trataba de una constante de acoplamiento ecuatorial-euatorial y de una ecuatorial-axial (153). El único protón en condiciones de producir estos tipos de acoplamientos era el H-2 de ramnosa (H-2'''), cuyo OH-2 es axial y por la configuración α de la unión interglicosídica poseía un acoplamiento ecuatorial-euatorial ($J= 2$ Hz) con el protón anomérico y una ecuatorial-axial ($J= 4$ Hz) con el H-3 de ramnosa (H-3''').

Para el derivado trimetilsililado de XI (XI TMS) (Fig.89) el espectro realizado del mismo modo y comparado también con el de VII TMS, se observaba igual-

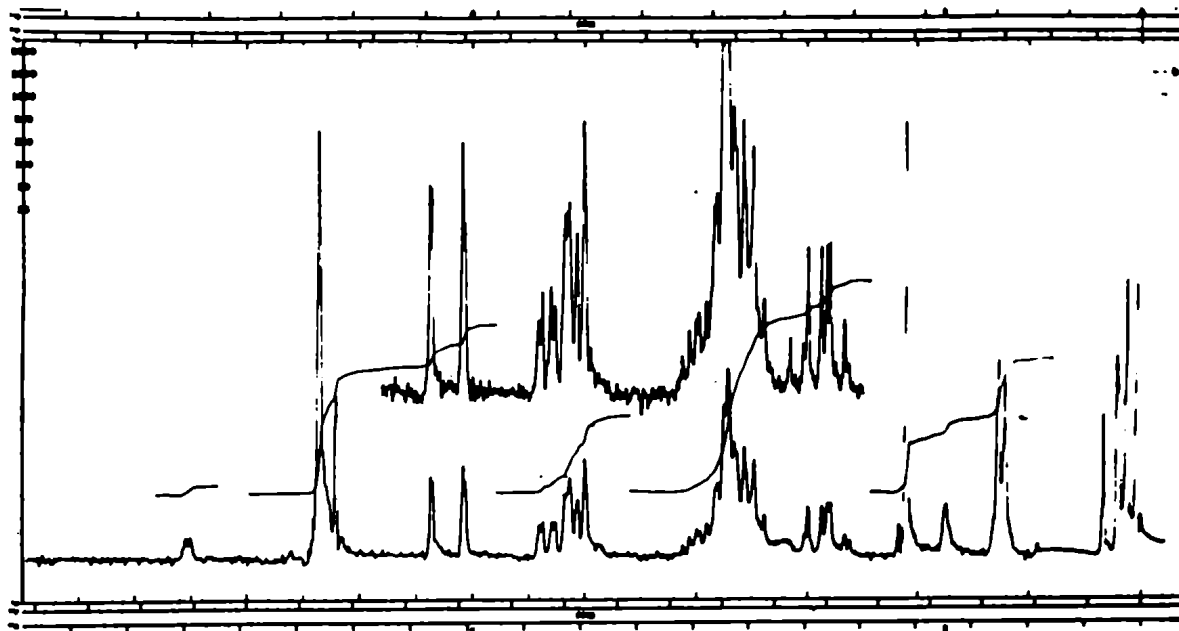


Fig. 87: Espectro de ^1H -RMN del derivado trimetilsililado de XII en Cl_3CD (100MHz)

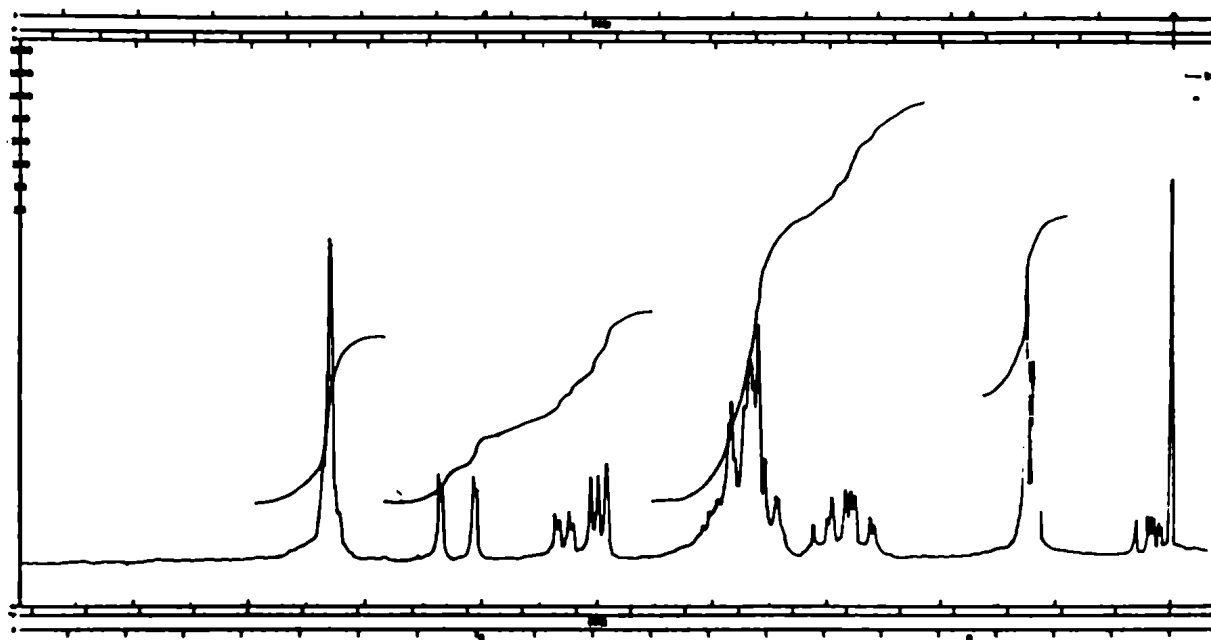


Fig. 88: Espectro de ^1H -RMN del derivado trimetilsililado de VII en Cl_3CD (100 MHz)

mente la existencia de una tercera señal en la zona anomérica. También en este flavonoide se había establecido que el acetilo estaba en la ramnosa y por lo tanto las posiciones posibles eran sólo OH-3 y OH-4 de este azúcar, ya que este segundo flavonoide (XI) era un compuesto distinto de XII.

Si se tenían en cuenta las configuraciones de los carbonos de ramnosa, se observaba que para el H-3''' se esperaba un acoplamiento axial-ecuatorial con el H-2''' y uno axial-axial, de magnitud mucho mayor, con el H-4''', mientras que para el caso del H-4''', este debería presentar dos acoplamientos axial-axial de magnitud comparable con los H-3''' y H-5''' (153). En este caso particular de diferentes acoplamientos, se podría entonces establecer sin inconveniente, la situación del acetilo en esta molécula por estudio de las constantes del protón desplazado por la acetilación, por ^1H -RMN. Sin embargo, el análisis del espectro del derivado trimetilsililado de XI (Fig. 89) no fue totalmente concluyente por la gran superposición de las señales del metino desplazado y del H-1 de glucosa, aunque se podía suponer, por la forma de la señal, que ese metino era el H-3'''.

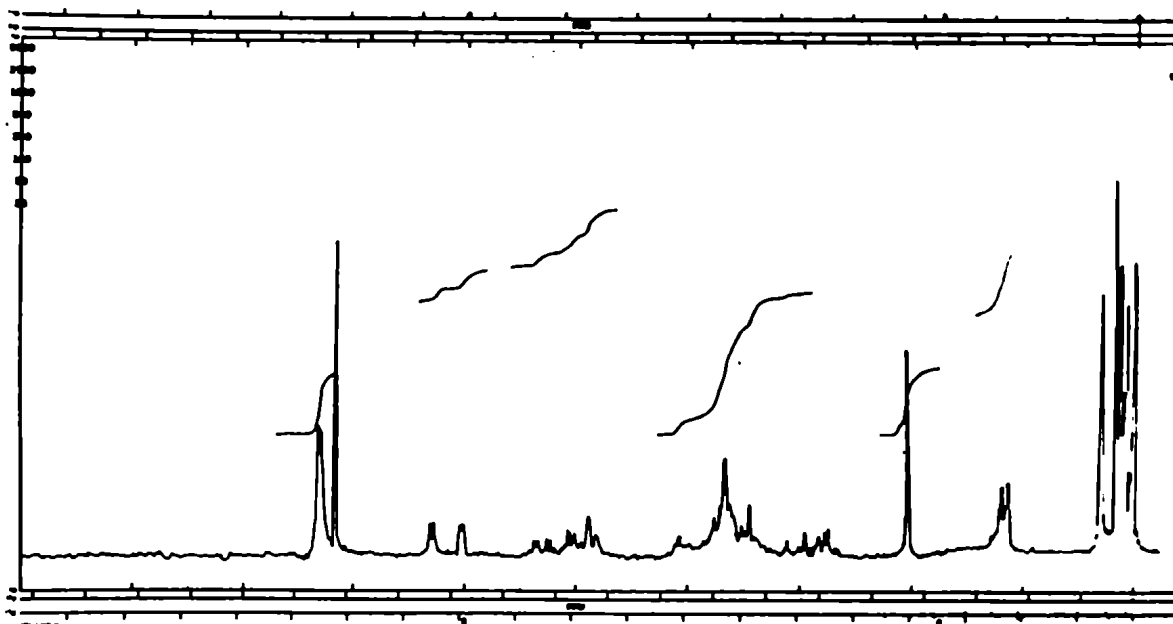


Fig. 89: Espectro de ^1H -RMN del derivado trimetilsililado de XI en Cl_3CD (100 MHz)

Esta asignación se aseguró totalmente con la realización de los espectros de los flavonoides libres en piridina deuterada a 300 MHz aprovechando los desplazamientos inducidos por la anisotropía del solvente.

Como se observa al comparar los espectros de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII) (Fig. 90) y los de los flavonoides XI (Fig. 91) y XII (Fig. 92) en piridina-d₅ a 300 MHz, las señales de los protones anoméricos y las de los protones desplazados por la acilación, pueden distinguirse y asignarse fácilmente por sus constantes de acoplamiento. La existencia de un doble doblete de J= 1,5 y 3 Hz en 4,86 ppm en el espectro de VII, que se desplazaba a 6,04 ppm en el espectro de XII, demostraba la asignación de la localización del acetilo en OH-2 de ramnosa en ese flavonoide (Fig. 92). En el espectro de XI, la señal que se había desplazado estaba en 5,83 ppm (4,54 ppm en el espectro de VII) y era un doble doblete de J= 3 y 10 Hz, que se asignó al H-3 de ramnosa, que como se discutió anteriormente presentaba una constante de acoplamiento ecuatorial-axial (J= 3 Hz) y otra axial-axial (J= 10 Hz), habiéndose desplazado por la acilación del OH-3 de ramnosa en ese compuesto (Fig. 91).

En el caso de X, flavonoide acilado en la glucosa, no se observó ningún protón desplazado a la zona anomérica en el espectro del derivado trimetilsililado (Fig. 93). En la comparación con el espectro de VII trimetilsililado se advirtió que la diferencia consistía en un multiplete a 4,5 ppm presente en el flavonoide acilado. En base a este hecho se dedujo que el acetilo debía estar ubicado en el OH-6 de glucosa, porque mientras los metinos se desplazan aproximadamente +1 ppm, los metilenos se desplazan +0,5 ppm por el reemplazo de hidroxilo por acetato en el carbono al que están unidos (152). Para este compuesto no se obtuvo mayor información en el espectro realizado en piridina-d₅.

Por lo tanto se asignaba tentativamente la estructura de pinocembrina-7-O-(2'''-O-acetil) neohesperidósido a XII, la de pinocembrina-7-O-(3'''-O-acetil) neohesperidósido a XI y la de pinocembrina-7-O-(6''-O-acetil) neohesperidósido a X, con los métodos espectroscópicos aplicados hasta el momento.

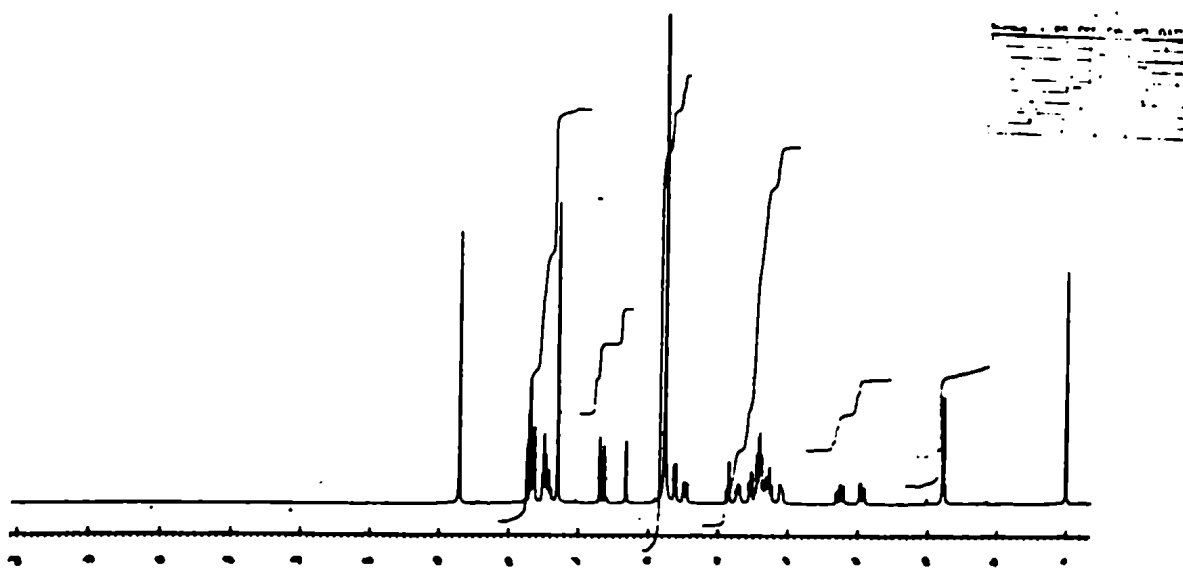


Fig. 90: Espectro de ^1H -RMN de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII), en piridina- d_5 (300 MHz).

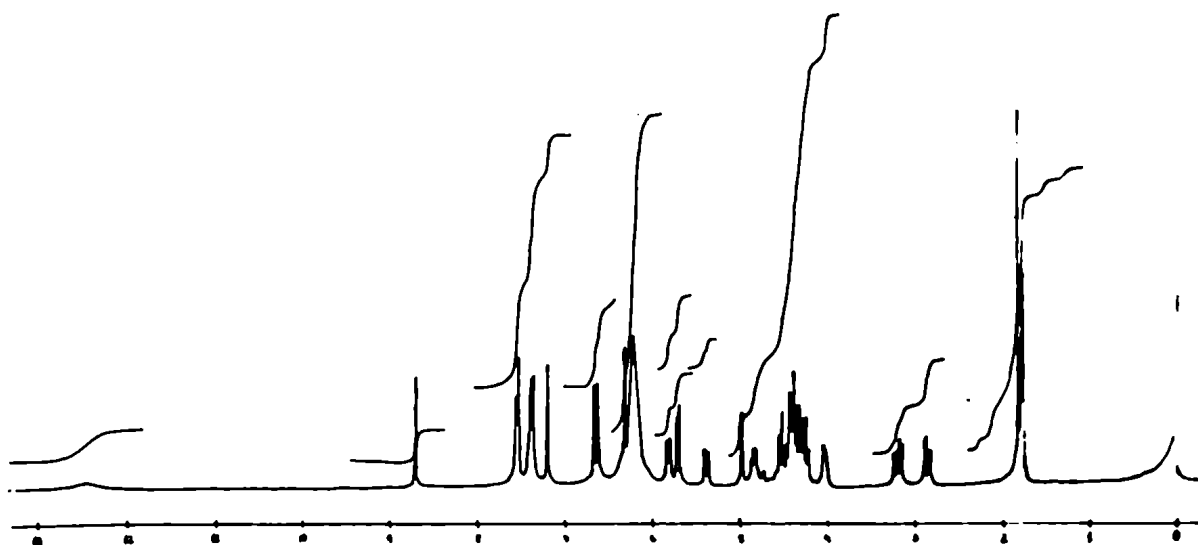


Fig. 91: Espectro de ^1H -RMN de XI, en piridina- d_5 (300 MHz).

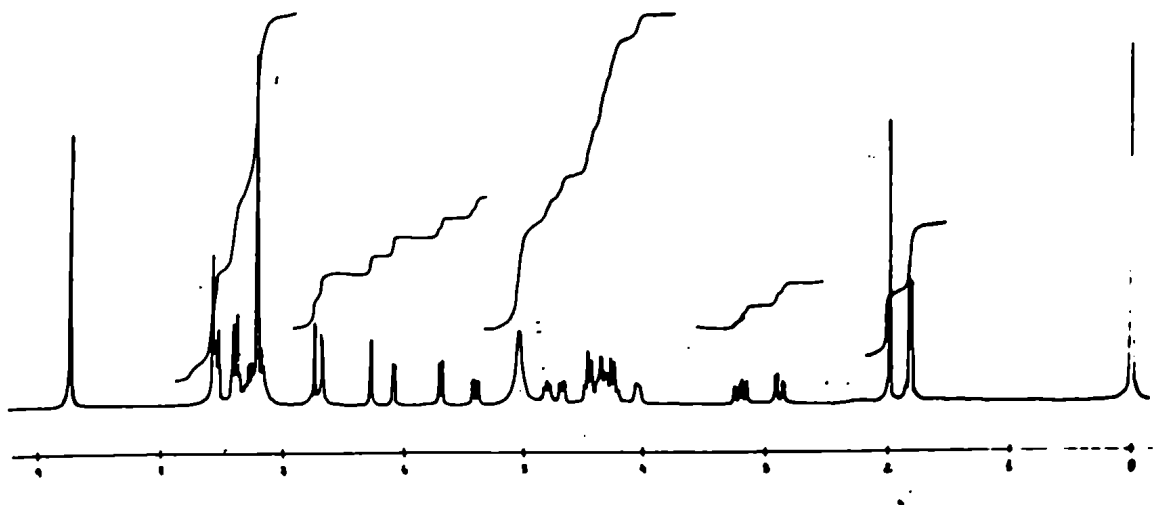


Fig. 92: Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de XII, en piridina- d_5 (300 MHz).

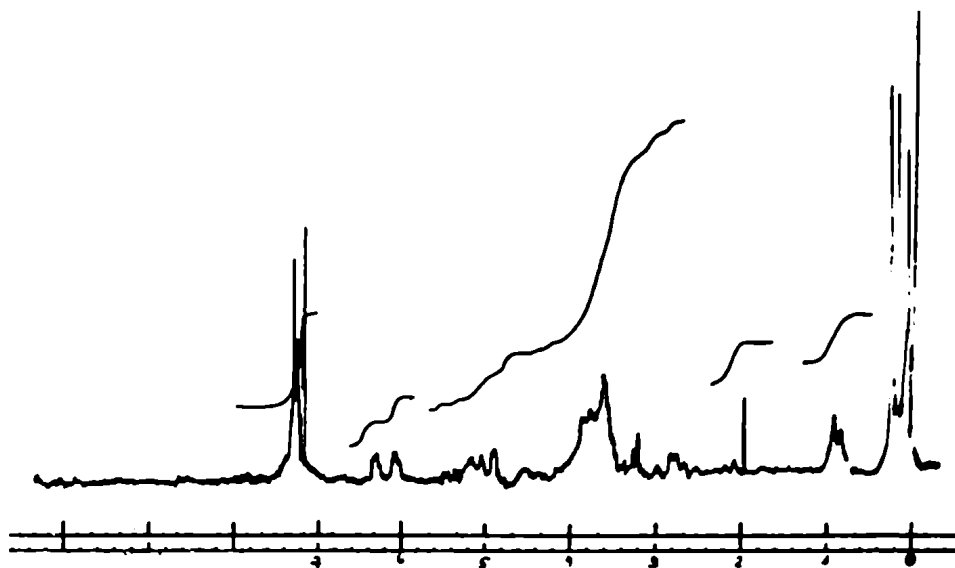


Fig. 93: Espectro de $^1\text{H-NMR}$ del derivado trimetilsililado de X en Cl_3CD (60 MHz).

Las asignaciones tentativamente realizadas por ^1H -RMN resultaron confirmadas por los estudios comparativos de los espectros de ^{13}C -RMN de cada flavonoide y de pinocembrina-7-O-neohesperidósido, asignado como se discutió anteriormente. Basándose además, en los desplazamientos conocidos (162) de la resonancia de un carbono hidroxilado por la acilación (alrededor de 2 ppm a campos más bajos) y las de sus dos carbonos vecinos (que simultáneamente aparecían desplazados, en magnitud semejante pero a campos más altos), se realizaron las asignaciones que se registran en la Tabla 18, detectándose los desplazamientos que se esquematizan en la Fig. 94.

La presencia de un singulete (cuarteto en los experimentos de desacople parcial) alrededor de 21 ppm, en los espectros totalmente desacoplados de los tres compuestos, confirmaba al grupo acetilo como acilante ($\text{CH}_3\text{CO-}$).

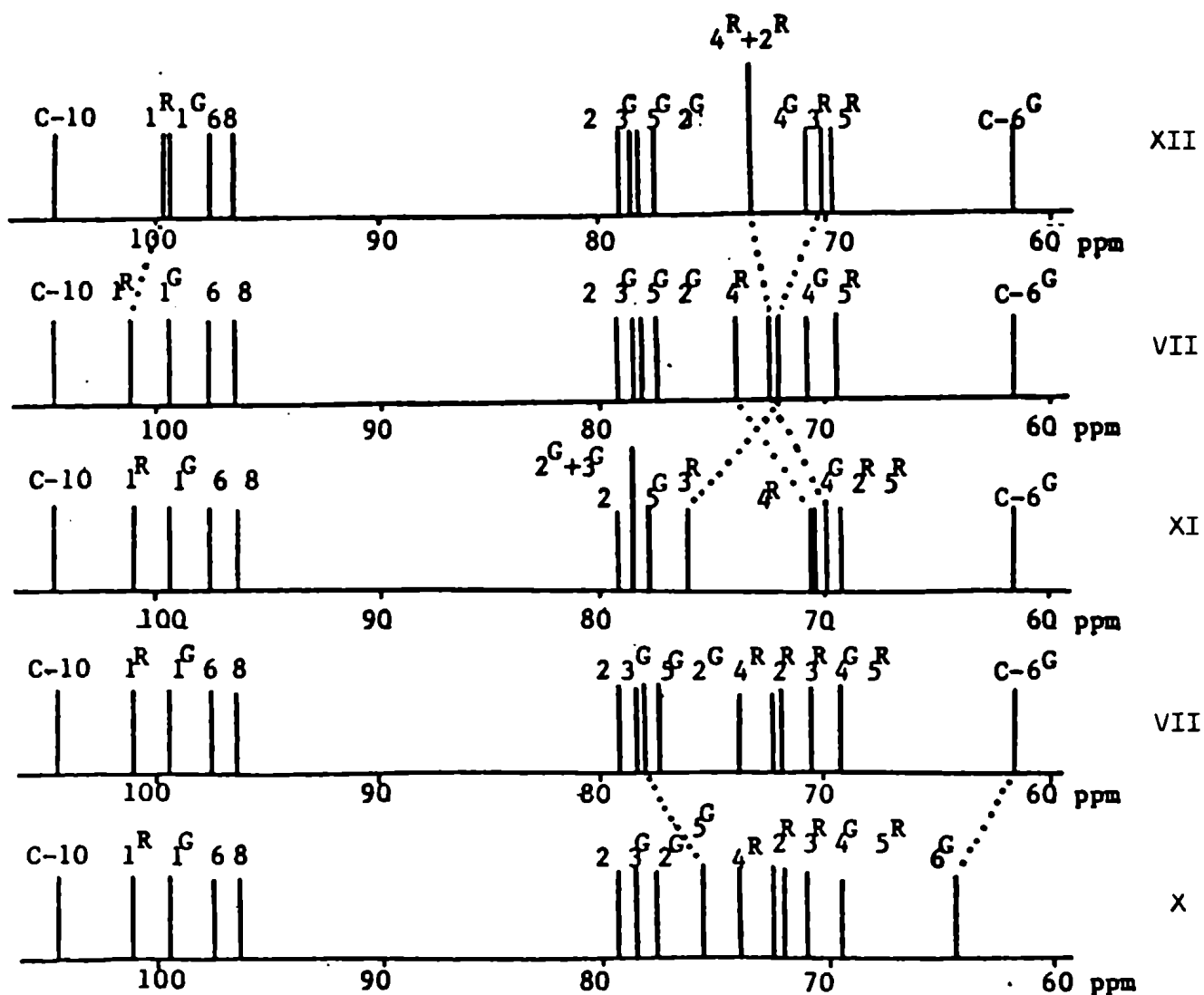
La comparación del espectro de XII con el de VII presentaba cambios, únicamente en las señales asignadas a los carbonos de ramnosa: en la zona de 72 ppm, no aparecía ninguna señal en el espectro de XII, si bien, allí se encontraban los C-2 y C-3 de ramnosa en el espectro de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII). Otra diferencia se observó en la señal del carbono anomérico de ramnosa, desplazada alrededor de 3 ppm a campos más altos en el espectro de XII. De estos datos se dedujo que la señal de C-2''', se había desplazado a campos más bajos por la acetilación, mientras sus carbonos vecinos (C-1''' y C-3'''), se protegían. Se asignó entonces a XII la estructura de pinocembrina-7-O- β -(2'''-O-acetil)neohesperidósido.

En el espectro de XI (en piridina- d_5), respecto al de VII, también se advertían cambios en los carbonos de ramnosa: la señal desplazada de 72,40 a 76,50 ppm se asignó a C-3''', y las desplazadas de 72,02 a 70,10, y de 73,66 a 71,08 ppm, se asignaron a C-2''' y C-4''' respectivamente. Por estos datos se concluye que el compuesto XI es pinocembrina-7-O- β -(3'''-O-acetil)neohesperidósido.

En el de X, las únicas diferencias respecto al espectro de VII, se advirtieron en las resonancias asignadas a los C-5 y C-6 de glucosa (C-5" y C-6" respectivamente). Esta última, fácilmente identificable entre los carbonos de glucosa, se desplazó a campos bajos, mientras el C-5" se protegía.

Tabla 18: Desplazamientos químicos de los carbonos de pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII) y de los compuestos X, XI y XII, en sus espectros de ^{13}C -RMN en piridina- d_5 , a 75,45 MHz.

	VII	XII	XI	X
$\underline{\text{CH}}_3\text{CO-}$		21,05	21,06	20,80
C-2	79,50	79,40	79,44	79,63
C-3	42,30	42,50	43,00	43,50
C-4	196,70	196,80	196,61	196,64
C-5	164,10	164,10	164,40	164,50
C-6	96,25	96,28	96,19	96,40
C-7	166,05	165,99	166,11	166,08
C-8	97,70	97,70	97,80	97,78
C-9	163,34	163,38	163,35	163,35
C-10	104,30	104,36	104,30	104,46
C-1'	139,10	139,10	139,36	139,00
C-2' y 6'	126,83	126,83	126,80	126,83
C-3' y 5'	129,16	129,30	129,11	129,08
C-4'	129,08	129,10	128,99	129,08
C-1 G	99,20	99,20	99,00	99,46
C-2 G	78,00	77,79	78,30	77,55
C-3 G	78,60	78,54	78,90	79,00
C-4 G	70,80	70,90	70,70	71,27
C-5 G	78,50	78,35	78,90	75,61
C-6 G	61,77	61,78	62,00	64,20
C-1 R	102,37	99,14	102,66	102,45
C-2 R	72,02	73,79	70,10	72,30
C-3 R	72,40	70,17	76,50	72,71
C-4 R	73,66	73,79	71,08	74,02
C-5 R	69,80	69,83	69,86	69,90
C-6 R	18,70	18,57	18,80	18,81
$\text{CH}_3\text{CO-}$		171,08	170,84	170,10



R = ramosa

G = glucosa

Fig. 94: Esquema comparativo de los espectros de ^{13}C -RMN de los compuestos VII, X, XI y XII, en piridina- d_5 , indicando los desplazamientos observados por la acilación en los carbonos de los azúcares (zona 60-105 ppm).

Por lo tanto se concluye que X está acetilado en el OH-6 de glucosa y se le asigna la estructura de pinocembrina-7-O-(6"-O-acetil) neohesperidósido.

Comprobación química de las estructuras asignadas

Como estos compuestos nunca habían sido aislados anteriormente de fuente natural, se decidió confirmar químicamente sus estructuras.

El método se basó en la metilación total de los glicósidos con un reactivo que para metilar no requiriera medio básico, en el que los grupos acilos eran reemplazados o migraban, por lo que no podía utilizarse ninguno de los métodos clásicos que se fundan en la ionización de los hidroxilos a metilar (186).

El triflato de metilo (trifluormetanosulfonato de metilo) era adecuado por ser un metilante poderoso que no requería medio básico fuerte y había sido aplicado en el estudio de varios polímeros naturales con sustituyentes acilo (191).

Se sometió la mezcla de los flavonoides XI y XII a la metilación en las condiciones descritas para compuestos polares (193), no contándose con material suficiente del flavonoide X, para realizar con él similar análisis.

La mezcla de reacción convenientemente purificada, se sometió a hidrólisis ácida. Los azúcares obtenidos por medio de extracción en la fase de acetato de etilo se purificaron de la aglicona por pasaje a través de una resina de intercambio débilmente alcalina y luego se redujeron y acetilaron del modo usual. Los alditoles acetilados parcialmente metilados así obtenidos se analizaron por cromatografía gas-líquido y espectrometría de masas acoplada al cromatógrafo gaseoso (Fig. 95). El cromatograma así obtenido presentaba tres picos principales, cuyos tiempos de retención relativos a 1,5-diacetil-2,3,4,6-tetrametilglucitol eran 0,89; 0,97 y 2,0 respectivamente. El análisis de los espectros de masas, con la asignación de las fragmentaciones primarias y secundarias (204) de cada uno de estos alditoles, permitió establecer para ellos las estructuras de 3,4-di-O-metil-1,2,5-triacetilramnitol (Fig. 96), 2,4-di-O-metil-1,3,5-triacetilramnitol (Fig. 97) y 3,4,6-tri-O-metil-1,2,5-triacetilglucitol (Fig. 98) respectivamente para cada uno de esos picos. Observando el esquema de la secuencia de reacciones expuesta, se deduce que eran los productos esperados según

las asignaciones previas, probando así las estructuras propuestas (Fig. 99). Para poder comparar estos alditoles con los correspondientes testigos, se sintetizaron, por metilación parcial por el método de Purdie, ramosas con distintos grados de metilación, que se redujeron y acetilaron luego de su separación en columnas de sílicagel y se estudiaron como se discutió anteriormente. Se compararon los ramnitoles obtenidos por metilación e hidrólisis de los flavonoides con estos testigos, pudiendo así corroborar las estructuras postuladas por sus tiempos de retención relativos y sus espectros de masas.

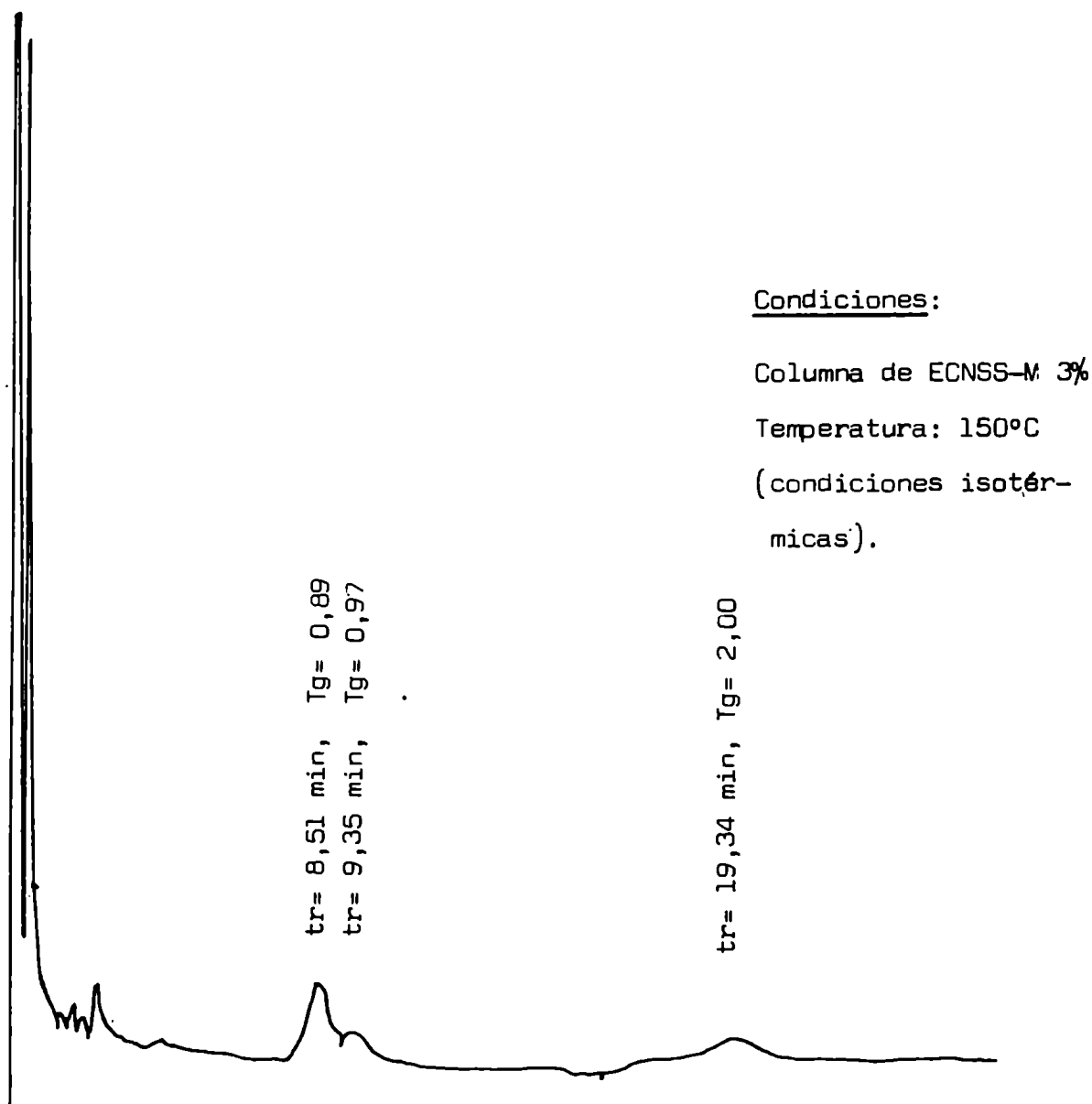


Fig. 95: Cromatograma gaseoso de los alditoles parcialmente acetilados y metilados, producto del análisis por metilación de los compuestos XI y XII.

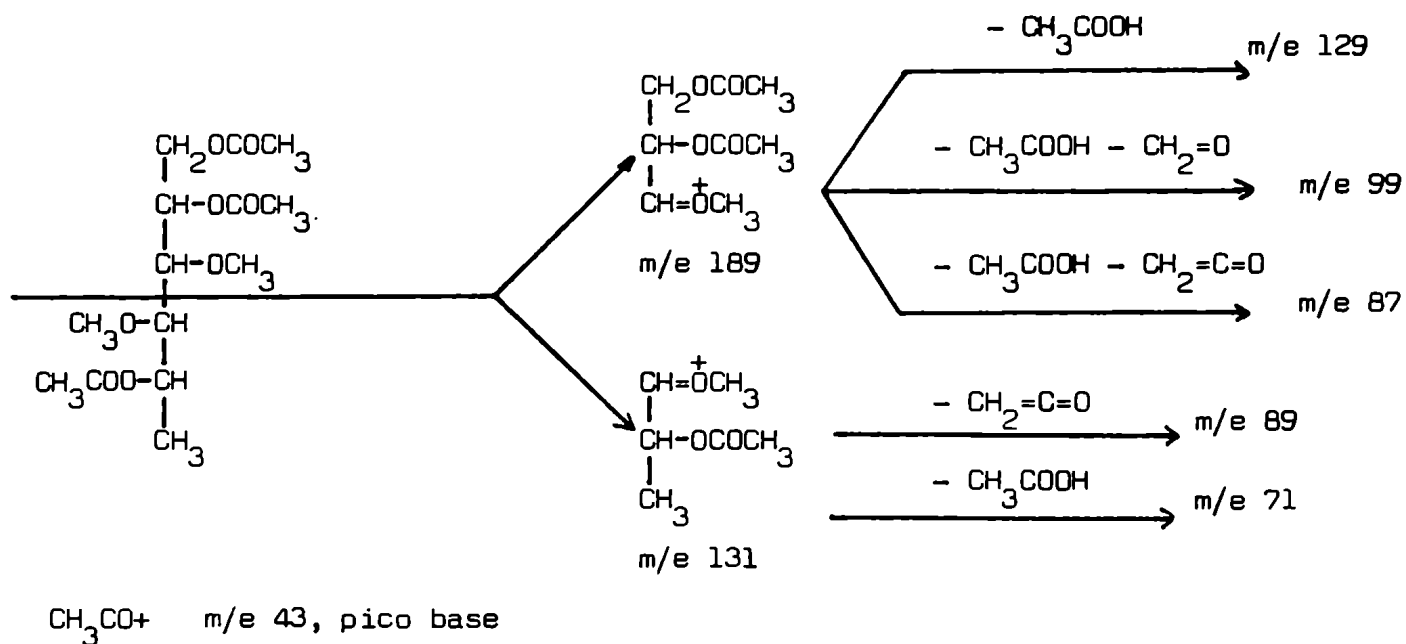
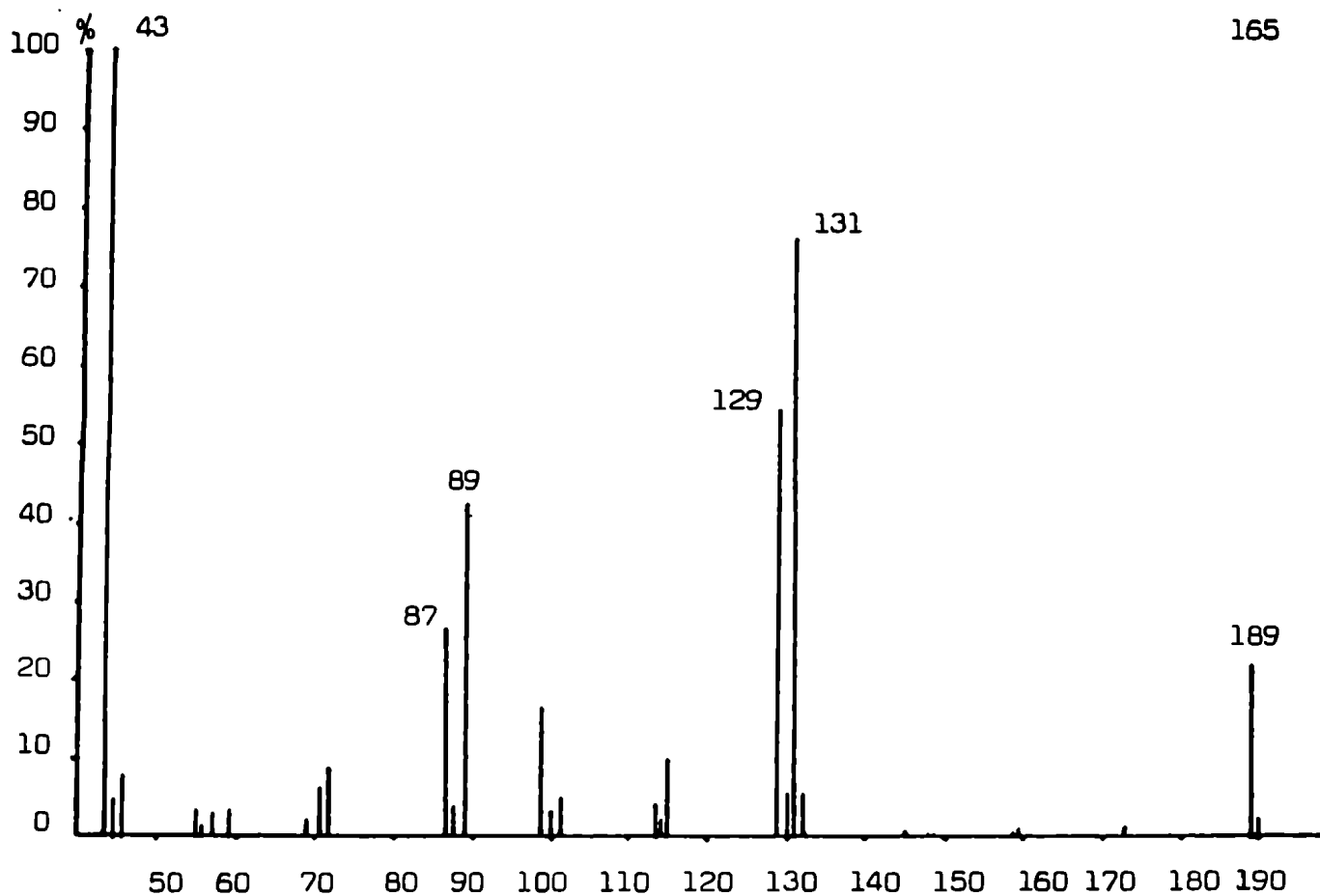


Fig. 96: Espectro de masas y asignación de las rupturas de 3,4-dimetil-1,2,5-triacetilramnitol.

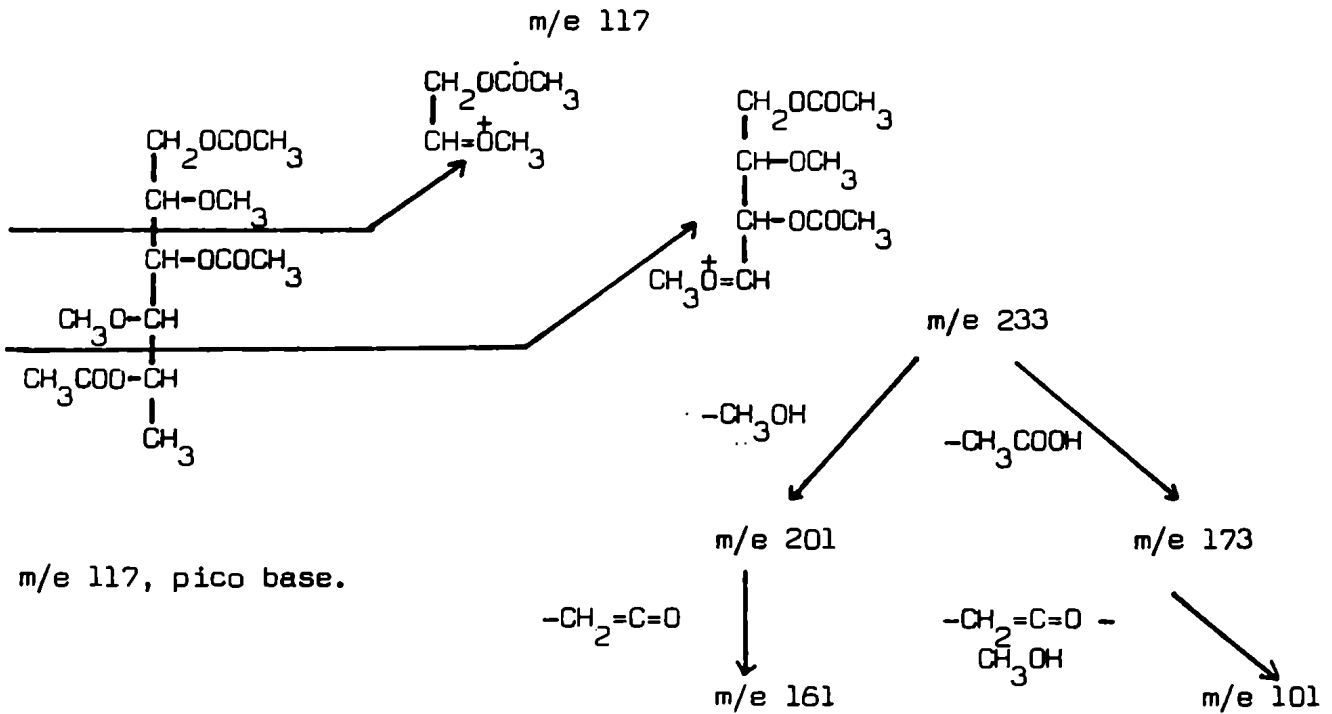
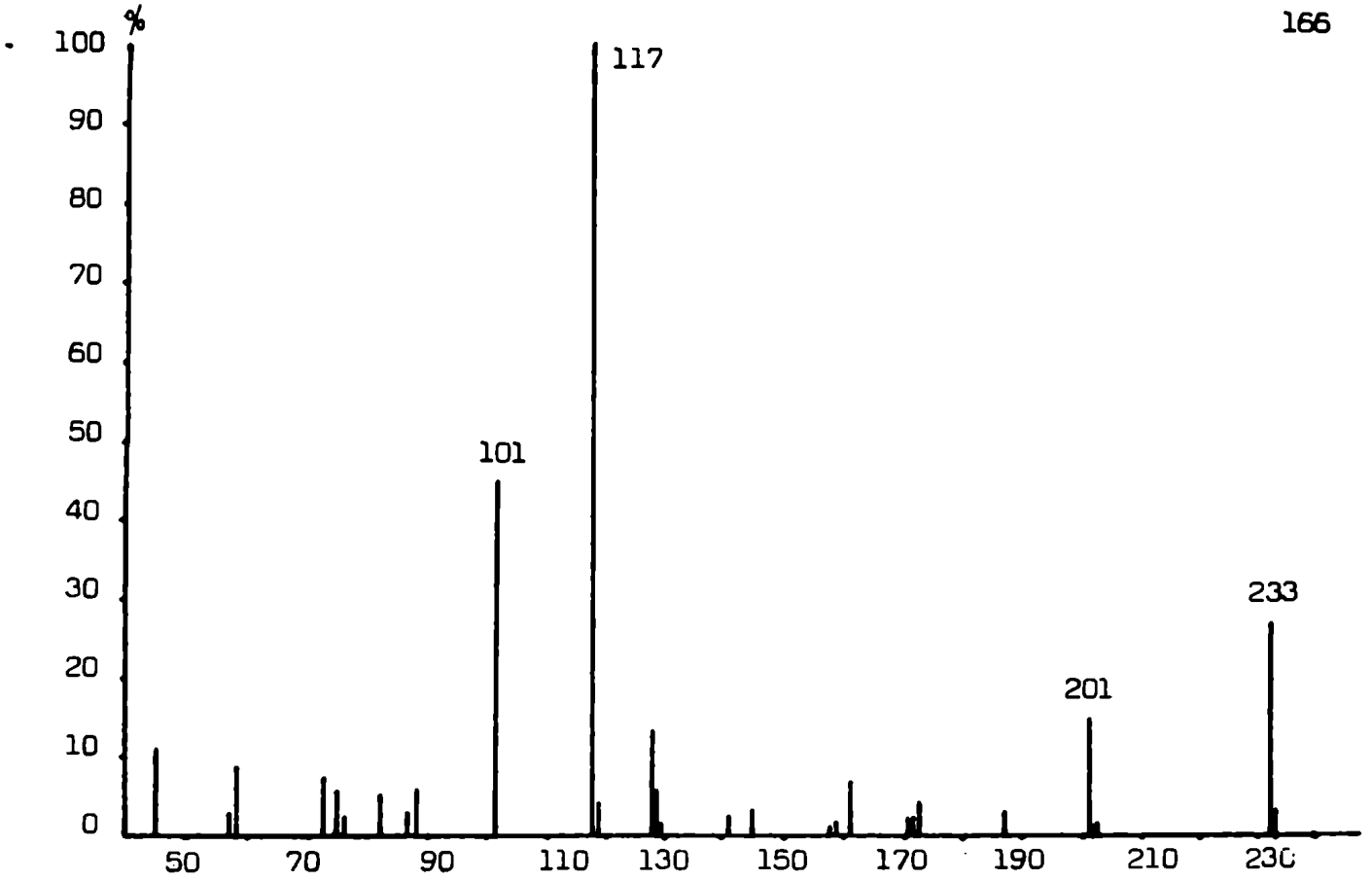


Fig. 97: Espectro de masas y asignación de las rupturas de 2,4-dimetil-1,3,5-triacetilramnitol.

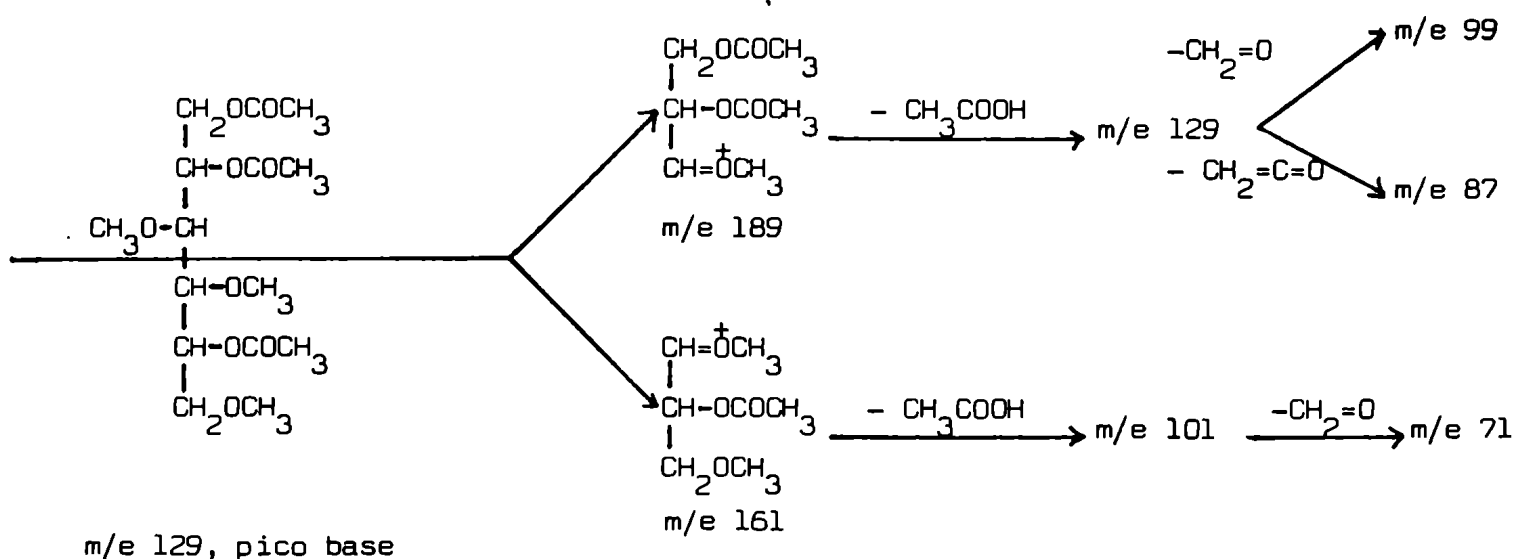
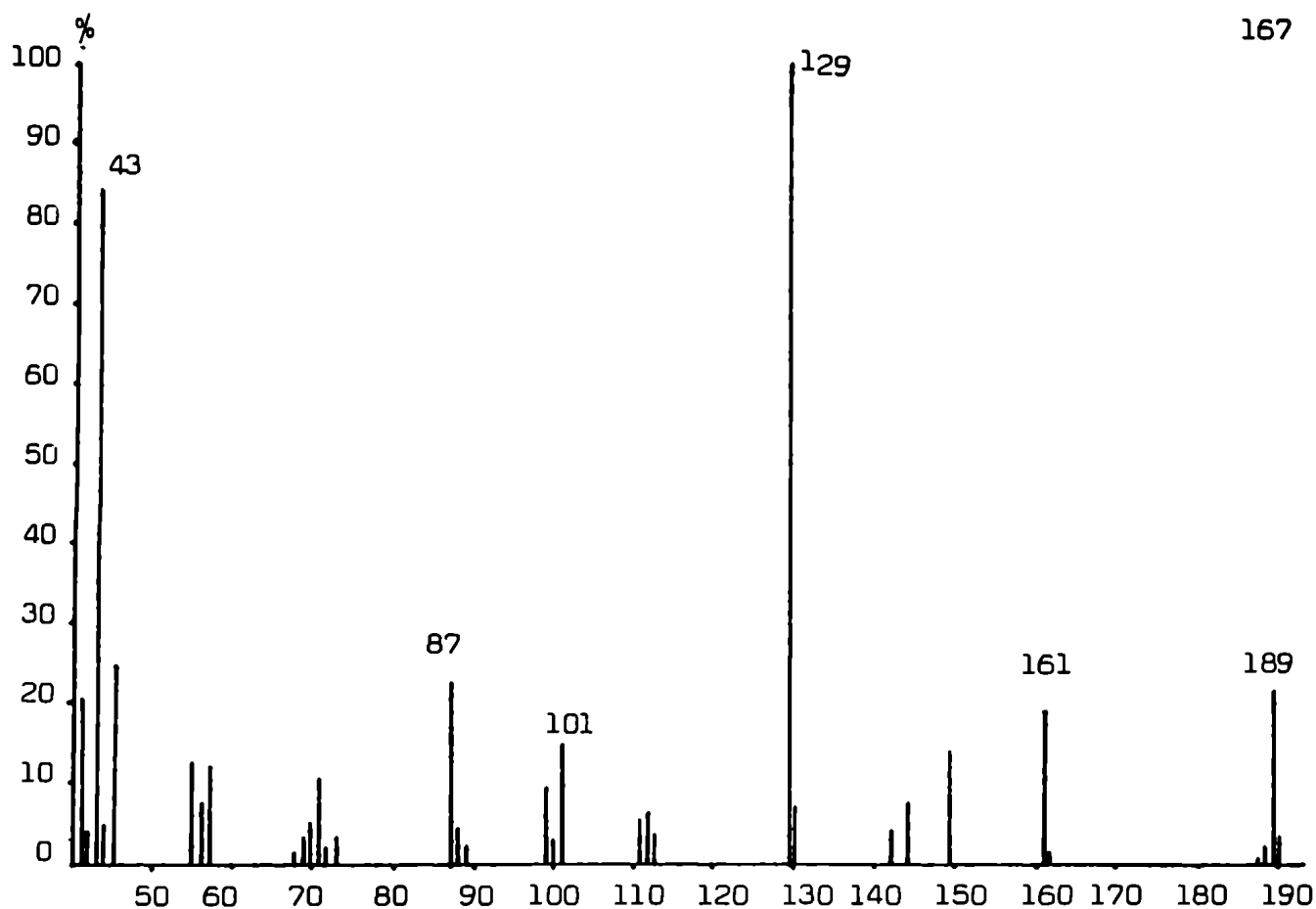


Fig. 98: Espectro de masas y asignación de las rupturas de 1,2,5-triacetil-3,4,6-trimetilglucitol.

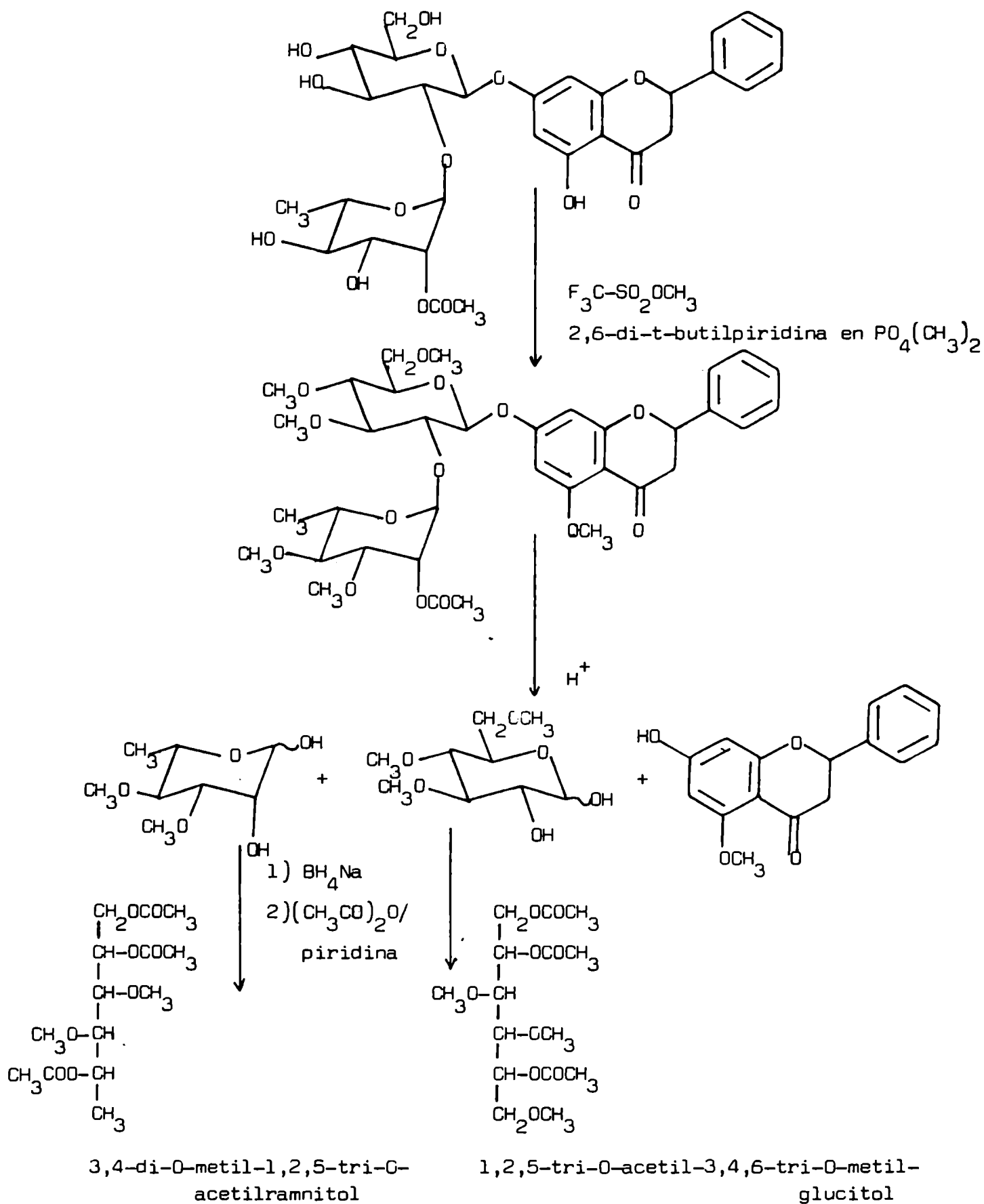
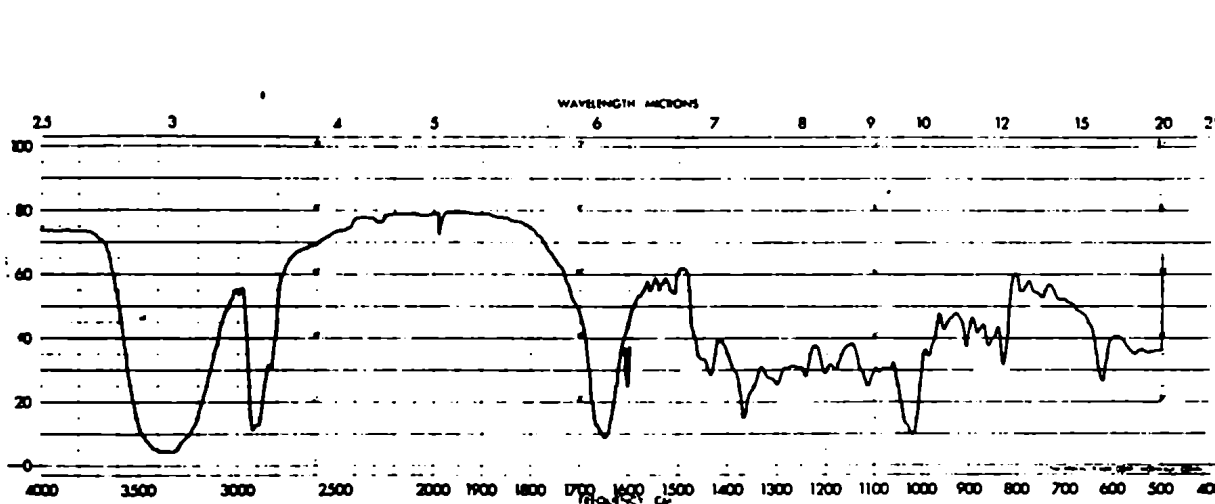


Fig. 99: Esquema-del análisis por metilación del compuesto XII.

c.2) Compuestos esteroidales

En el extracto de acetato de etilo, que contenía los flavonoides acilados, se encontraban además dos compuestos de naturaleza terpénica (ccd; sílicagel; Rf 0,24 (XVI) y 0,37 (XVII); benceno: acetona, 1:2; revelador: anisaldehído-SO₄H₂ o vainillina-SO₄H₂, color verde oliva). Separarlos completamente de los flavonoides resultó dificultoso debido a su polaridad similar, por ello fue necesario recurrir a las columnas de alúmina, sobre las fracciones enriquecidas, que retenían y descomponían a los flavonoides, pero permitían la elución de los compuestos terpénicos. La posterior purificación se realizó en columnas de sílica gel.

El espectro ultravioleta del compuesto XVI, de mayor abundancia, presentaba un máximo en 242 nm que sugería la presencia de un carbonilo α, β -no saturado (246). Su espectro infrarrojo tenía absorciones de tensión O-H a 3560 cm⁻¹, de tensión alifática a 2860 cm⁻¹, mientras que a 1660 y 1640 cm⁻¹ presentaba las señales fuertes de carbonilo y doble enlace de cetona α, β -no saturada (246). Entre 1470 y 1450 cm⁻¹ poseía absorciones de flexión de metilo, a 1075, 1060 y 1030 cm⁻¹ las de deformación O-H, y a 682 cm⁻¹ la de flexión fuera del plano de un doble enlace (Fig. 100).



.Fig. 100: Espectro infrarrojo del compuesto XVI (en pastilla de BrK).

El espectro de ^1H -RMN de XVI a 100 MHz en acetona deuterada mostraba singuletes agudos en 0,90, 0,93 y 1,18 ppm correspondientes a cinco metilos angulares, multipletes entre 1 y 2 ppm correspondientes a los metilenos, entre 3,10 y 3,85 ppm tres metinos α a hidroxilo y a 5,65 un protón olefínico (Fig. 101).

El espectro de ^1H -RMN de XVI a 100 MHz en piridina- d_5 , que presenta las señales cercanas a grupos polares desplazadas por la anisotropía del solvente, mostraba cuatro singuletes en 1,04; 1,18; 1,37 y 1,56 ppm que integraban respectivamente para 3, 3, 6 y 3H, los dos últimos deberían corresponder a metilos unidos a un carbono que llevara un grupo polar, por el desplazamiento respecto al espectro en acetona (Fig. 102).

La acetilación de XVI condujo a un derivado triacetilado, como se advirtió en el espectro de ^1H -RMN en Cl_3CD de ese producto (Fig. 103) y la presencia de la absorción de tensión O-H en el espectro infrarrojo de este derivado indicó que en la molécula aun quedaban hidroxilos no acetilados.

De acuerdo al análisis de los espectros mencionados, la estructura de XVI debía poseer un carbonilo α, β -no saturado, un protón vinílico que mostraba partición alílica, cinco metilos angulares, tres de ellos probablemente α a hidroxilo (y dentro de este grupo dos casi equivalentes), tres hidroxilos acetilables, probablemente secundarios ya que las señales de los H- α se desplazaban como metinos (1-1,5 ppm) con la acetilación y varios metilenos y metinos de esqueleto de un núcleo policíclico tipo esteroidal.

Como suele ocurrir con este tipo de moléculas, la espectrometría de masas resultó característica y de gran utilidad. En el espectro (Fig. 104) de XVI, el ión de mayor masa observado era m/e 462, con tres pérdidas de 18 uma a partir de él, que originaban los iones m/e 444, 426 y 408, con pérdidas de 15 uma a partir de cada uno de ellos. Por consiguiente, la fácil deshidratación era un buen indicio de hidroxilos terciarios, mientras que la pérdida de metilo indicaba metilos angulares.

Otra secuencia de deshidrataciones se iniciaba a partir del pico m/e 363, que por tres pérdidas de 18 uma originaba m/e 345, 327 y 309, todos ellos de



Fig. 101: Espectro de ^1H -RMN de XVI en acetona- d_6 (100 MHz).

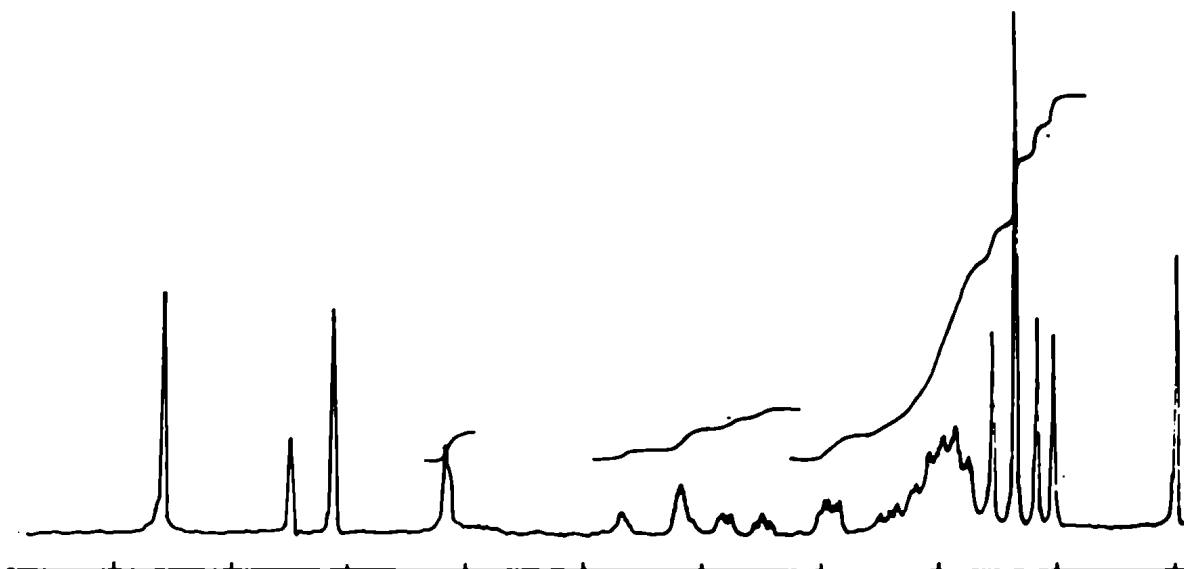


Fig. 102: Espectro de ^1H -RMN de XVI en piridina- d_5 (100 MHz).

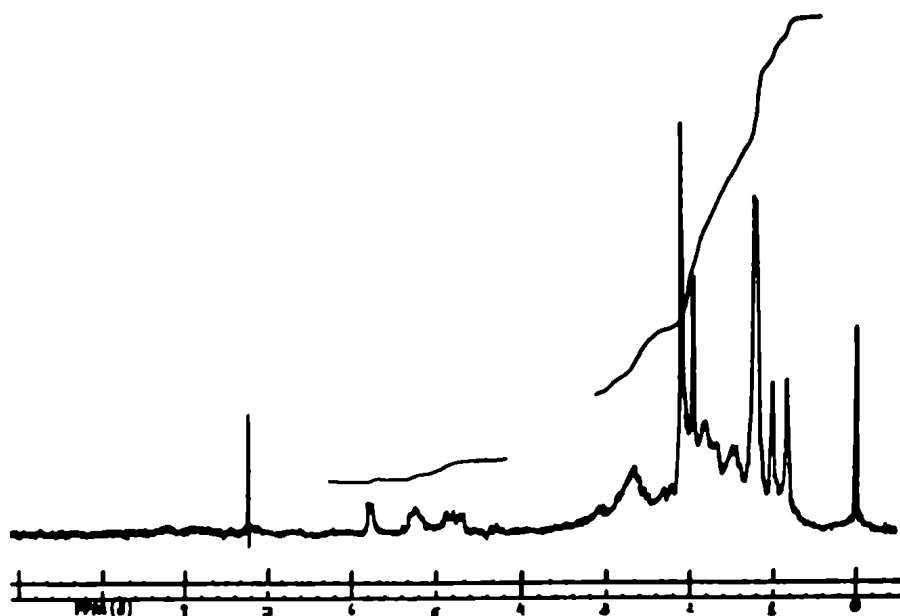


Fig. 103: Espectro de ^1H -RMN del derivado acetilado de XVI en Cl_3CD (60 MHz).

gran intensidad.

En la región de masas bajas del espectro, se encontraban los iones m/e 173, 143, 125 (143-18), 99 (pico base) y 81 (99-18) muy intensos, que se podían considerar originados por la cadena lateral de un esteroide. Pero para un esteroide de C_{27} , el ión 462 correspondería a una fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_6^+$ con siete insaturaciones, m/e 99 a una cadena lateral de $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}^+$ con una insaturación y m/e 363 al núcleo esteroidal de $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_5^+$ con seis insaturaciones. No parecía correcto que la cadena lateral poseyera una insaturación ya que, al no observarse metilo alguno sobre doble enlace en los correspondientes espectros de ^1H -RMN, debería verse en tal caso más de un protón olefínico, lo que no ocurría en estos espectros. Por lo tanto, se supuso que este fragmento m/e 99, provenía en realidad, de la deshidratación de una cadena lateral de m/e 117 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2^+$), ión que también se encontraba en el espectro, aunque con intensidad de 5 %.

Entonces, el ión de mayor masa m/e 462 era realmente M^+-18 porque M^+ 480, para $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7^+$ con seis insaturaciones, resultaba más lógico para los cuatro

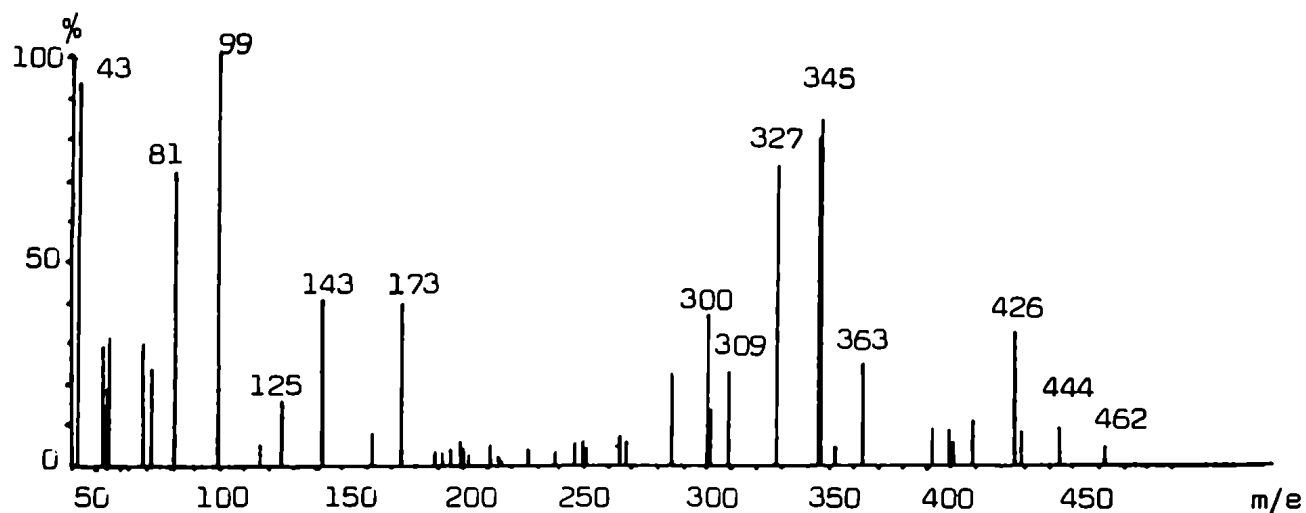


Fig.104: Espectro de masas de XVI.

ciclos de un esteroide, más un carbonilo α , β -no saturado, tres hidroxilos acetilables y por lo menos tres hidroxilos terciarios, dadas las repetidas pérdidas de agua observadas en el espectro de masas de XVI (Fig. 104).

Entre los esteroides polihidroxilados conocidos, los ecdisteroides (Fig. 105) eran los que presentaban este tipo de comportamiento espectroscópico (264).

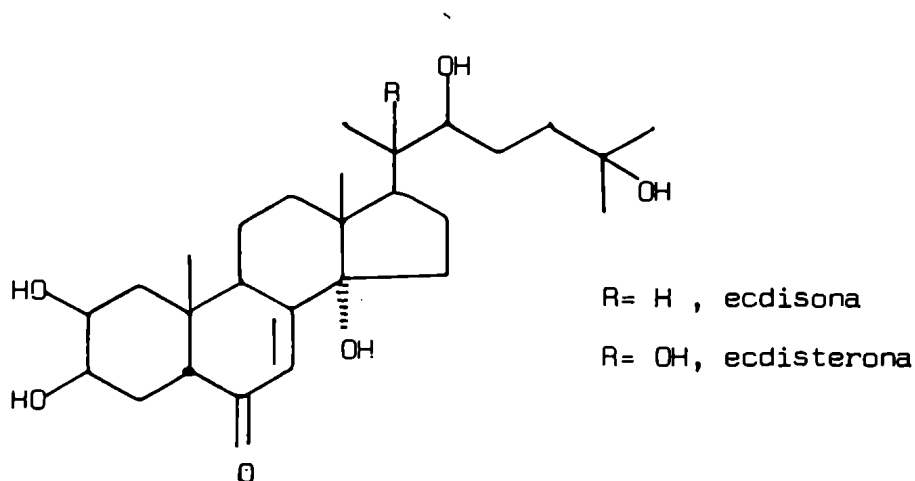


Fig. 105: Esqueleto básico de los ecdisteroides, ejemplificado con los dos más difundidos, ecdisona y ecdisterona.

Los espectros UV e IR correspondían a los de una 7-en-6-ona y, como estaba descrito para los ecdisteroides (73), para comprobar la existencia de un sistema 14-hidroxi-7-en-6-ona, se realizó el espectro ultravioleta luego del tratamiento del compuesto XVI con ClH/MeOH a 70°C durante 15 minutos. Así, se observó, como se esperaba para la existencia de este sistema, la aparición de dos nuevos máximos a 240 y 300 nm, el de mayor λ correspondiente al sistema 7,14(15)-dien-6-ona y el de menor λ al cromóforo 8(9), 14(15)-dien-6-ona (73, cap.II), originados por la deshidratación en medio ácido.

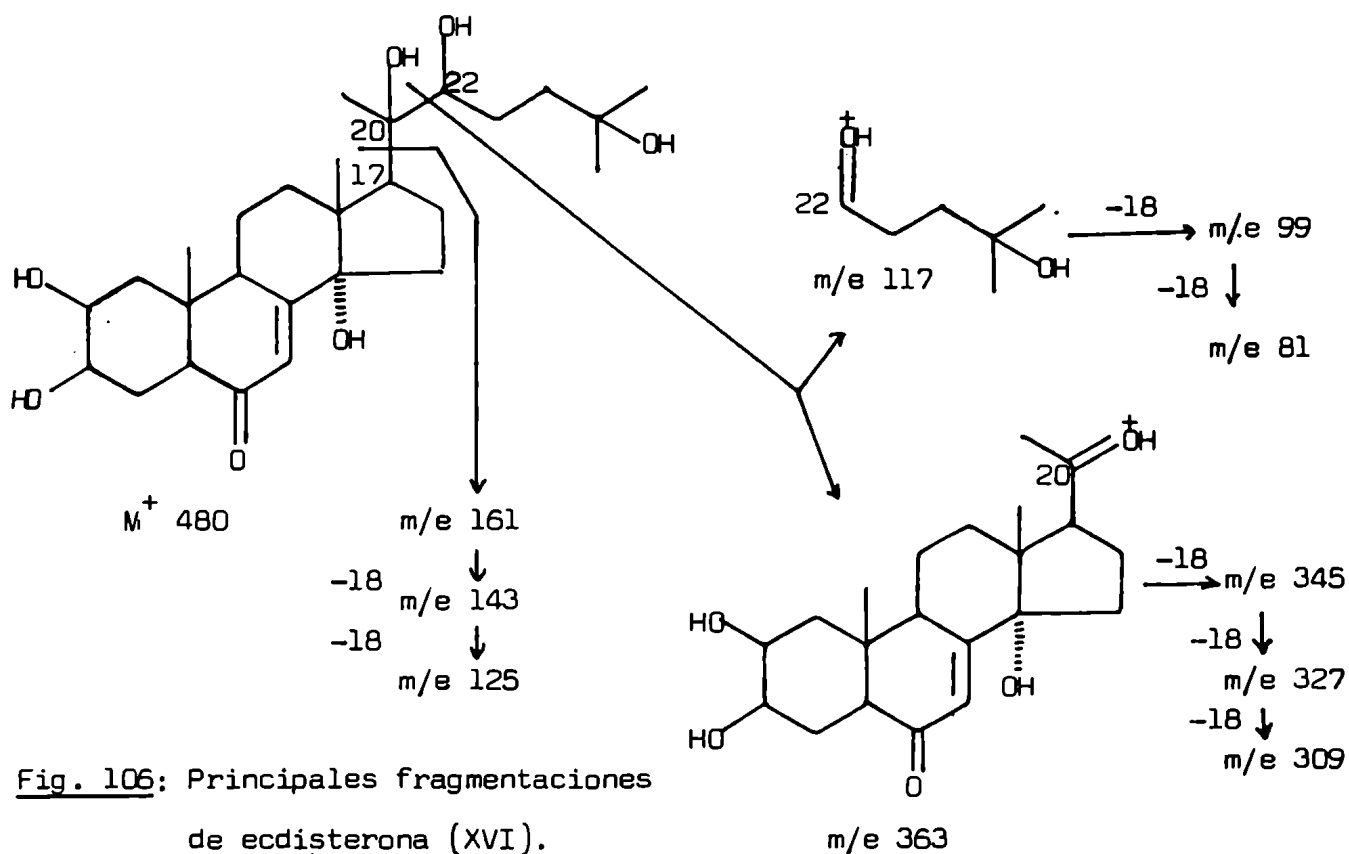
Los desplazamientos químicos de los metilos angulares de XVI en el espectro de ^1H -RMN en piridina- d_5 , indicaban la presencia de un hidroxilo en C-20 (CH_3 -21 asignado a 1,56 ppm y CH_3 -18 a 1,18 ppm) (96) y en C-25 (CH_3 -26 y 27 en 1,37 ppm). El restante metilo angular se asignó a CH_3 -19 (1,04 ppm). La señal en 6,18 ppm correspondía al H-7 olefínico (Fig. 102).

Los picos impares del espectro de masas originados por pérdida de la cadena lateral (m/e 363, 345, 327 y 309) sugerían la presencia de OH-22 (77) (Fig. 106), ya que en caso contrario la pérdida de esta cadena se hubiera producido con reordenamiento de hidrógeno dando fragmentos pares (73, 77).

Con estos datos, el compuesto XVI pudo ser caracterizado como 2,3,14,20,22,25-hexahidroxiprost-7-en-6-ona (ecdisterona), (Fig. 105).

Esto fue confirmado por comparación con un testigo auténtico de ecdisterona obtenido de Taxus baccata.

En cuanto a la estereoquímica de los C-2 y C-3, se determinó que ambos poseían la configuración β por comparación del espectro de ^{13}C -RMN del compuesto natural con el de ecdisona, cuyas configuraciones eran conocidas como β , β . En la zona de carbonos hidroxilados (65-80 ppm) del espectro de ecdisterona natural se observó la presencia de una señal adicional debida al C-20.



El segundo compuesto terpénico XVII, de este extracto de acetato de etilo, se encontraba en menor cantidad y fuertemente impurificado con los flavonoides acilados de los que no pudo ser aislado hasta utilizar columnas de alúmina.

Este compuesto mostraba reacciones típicas de ecdisteroides, sin embargo no absorbía al UV y su espectro infrarrojo mostraba la señal de un carbonilo aislado a 1695 cm^{-1} . El espectro de $^1\text{H-NMR}$ de XVII presentaba un doblete en 0,82 ppm (6H, $J = 6\text{ Hz}$) indicativo de un grupo isopropilo (Fig. 107). Aparecían además tres singuletes de metilos angulares. Es sabido que la presencia de hidroxilo en C-20, altera las resonancias de los metilos 21 y 18 de un ecdisteroide, desplazándolas a campos más bajos (96). De acuerdo a esto, podían asignarse en el espectro de XVII los singuletes a 1,53 y 1,23 ppm a $\text{CH}_3\text{-21}$ y $\text{CH}_3\text{-18}$ respectivamente. Por otra parte, el grupo isopropilo se podía asignar a $\text{CH}_3\text{-26}$ y 27. El singulete restante debía asignarse a $\text{CH}_3\text{-19}$ (1,40 ppm), si bien se encontraba a campos más bajos que los valores registrados para ese metilo en la mayoría de los ecdisteroides. Sólo en los casos de hidroxilación en la vecindad del $\text{CH}_3\text{-19}$, se observa desprotección de ese metilo (83, 85).

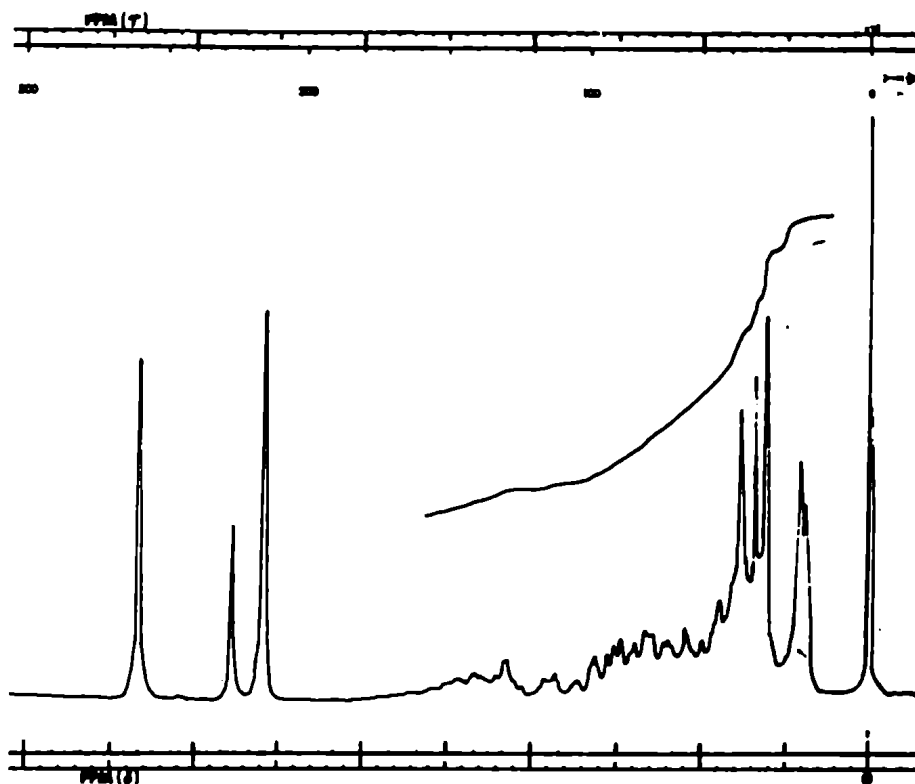


Fig. 107: Espectro de ^1H -RMN de XVII, en piridina- d_5 (60 MHz).

El doble doblete en 4,65 ppm fue atribuido a un metino unido a hidroxilo, probablemente ubicado en la cadena lateral, observándose además, otras tres señales de metinos α a hidroxilos.

El espectro de masas de XVII (Fig. 108) presentaba como pico de mayor masa m/e 467, acompañado de m/e 464, lo cual hacía suponer que el ión molecular era 482 y que los fragmentos indicados correspondían a pérdidas de metilo y agua respectivamente a partir del ión molecular. Desde los picos mencionados se observaban además sucesivas deshidrataciones. A 101 una del fragmento m/e 464 se iniciaba una nueva serie de deshidrataciones que originaban picos intensos a m/e 363, 345, 327 y 309. Si bien el ión m/e 363 representaba al núcleo esteroidal de estos compuestos como en ecdisterona (XVI), su masa no podía estar de acuerdo con la ausencia de absorción al UV, ya que se requeriría saturación del doble enlace Δ^7 o ausencia del grupo 7-en-6-ona, con lo que variarían la masa del fragmento. Se especuló entonces con la idea de que, si el doble enlace estaba saturado pero existía otro oxígeno en el núcleo esteroidal, se sumarían

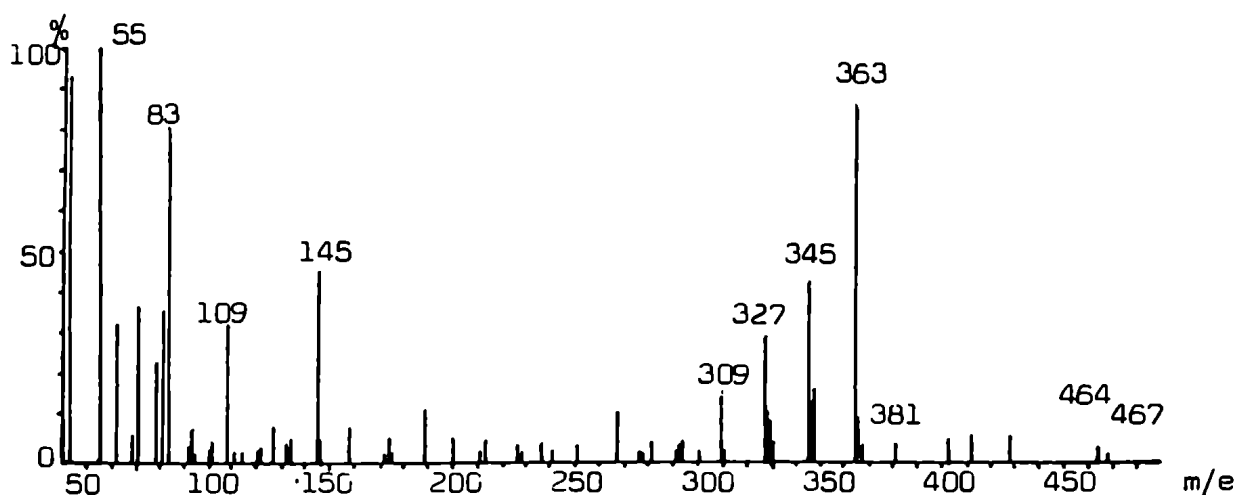


Fig. 108: Espectro de masas de XVII.

18 una entre ambas modificaciones y el ión del núcleo esteroideal correspondería a m/e 381, el cual por deshidratación daría las mismas masas para la secuencia de deshidrataciones. El ión m/e 381 estaba presente en el espectro aunque con abundancia menor del 4 %. Esto apoyaba la hipótesis expuesta y este nuevo hidroxilo debería estar en la vecindad del CH_3 -19 para provocar su desprotección. La escisión en picos impares sugería la presencia del grupo 20,22-diol como se discutió para ecdisterona.

En la región de masas bajas aparecían los iones de la cadena lateral en m/e 145, 127, 109, 101 de baja intensidad y 83 importante. Por analogía con ecdisona m/e 145 se podía asignar a la ruptura C-17/C-20 de una cadena lateral con dos hidroxilos, m/e 127 y 109 a dos sucesivas pérdidas de agua y m/e 101 a la ruptura C-20/C-22, originando m/e 83 por deshidratación de su único hidroxilo (Fig. 109). Por lo tanto quedaba determinada la estructura de la cadena lateral.

El estudio del espectro de ^1H -RMN del derivado acetilado de XVII mostró la presencia de cuatro acetilos, indicando la presencia de cuatro hidroxilos ace-

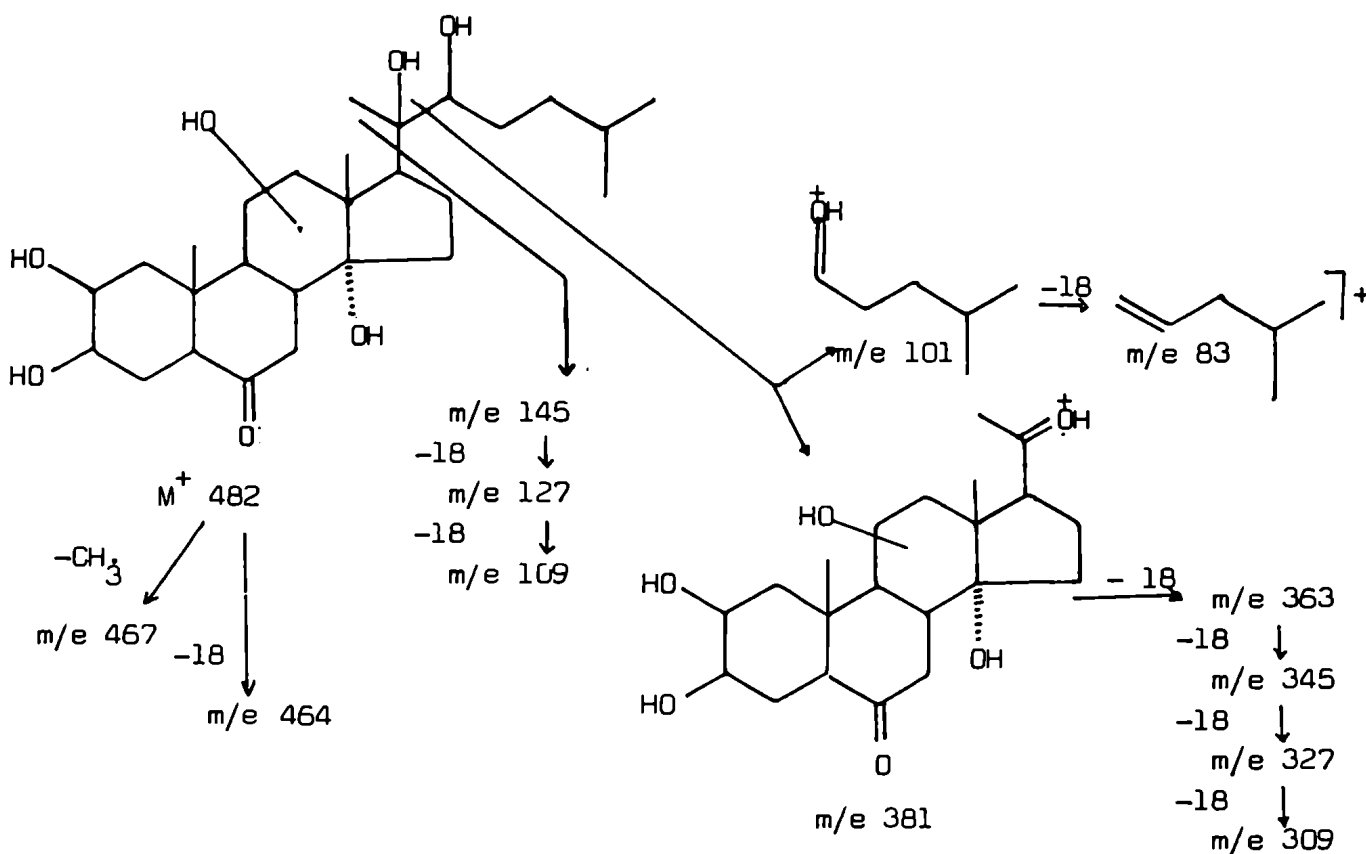


Fig. 109: Fragmentaciones asignadas a XVII.

tilables en XVII, y cuatro señales de metinos α a acetilos, de las cuales, un multiplete en 5,40 ppm, coincidía con el descrito para el H-11 de ajugasterona C (Fig. 110), con un hidroxilo alfa en esa posición.

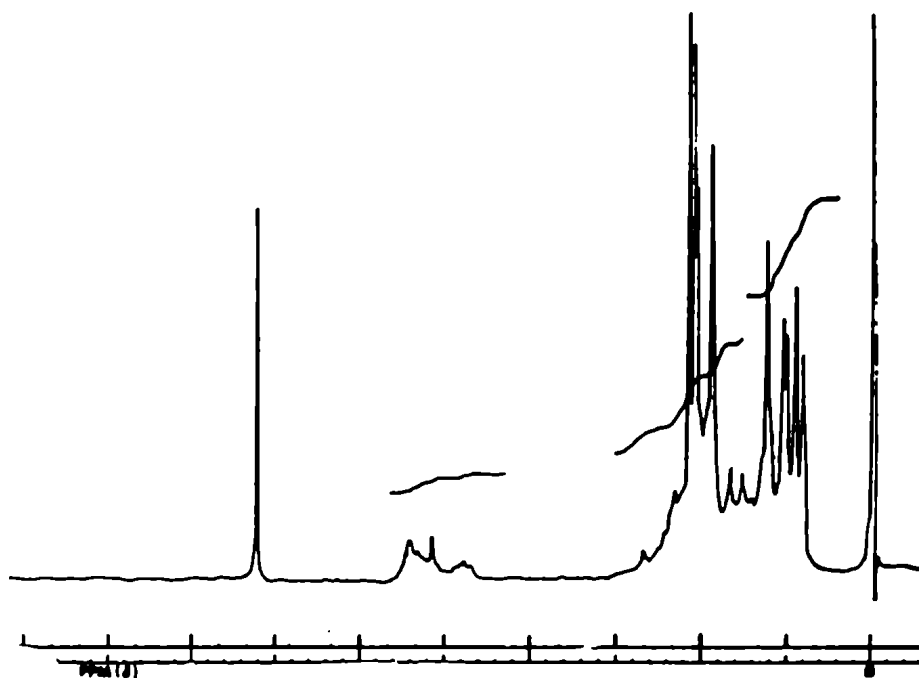


Fig. 110: Espectro de 1H -RMN del derivado acetilado de XVII.

Todos estos resultados condujeron a proponer la estructura de 7,8-dihidro-11-hidroxi- α -pregnenona A (7,8-dihidroajugasterona C) (Fig. 111) para el compuesto XVII, restando la comprobación química de esta asignación.

Se han descrito dos 7,8-dihidroecdisteroides aislados del helecho Cheilanthes ternifolia cuyas estructuras corresponden a 7,8-dihidroecdisona y 7,8-dihidro-25-desoxiecdisona, denominados respectivamente cheilantonas A y B. (95).

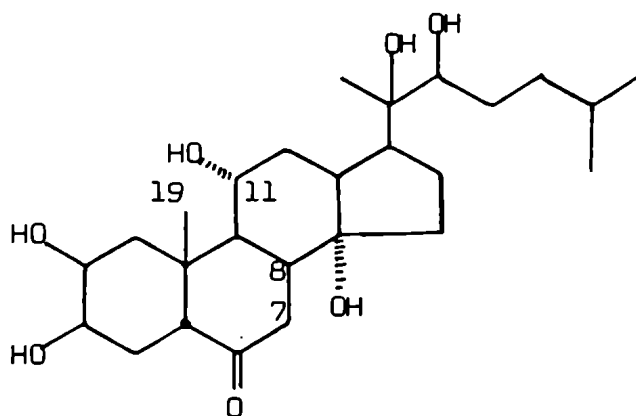


Fig. 111: Estructura propuesta para XVII, correspondiente a 7,8-dihidro-11 α - hidroxiponasterona A.

d) Marcha separativa de alcaloides

El estudio de los alcaloides de Nierembergia hippomanica se realizó mediante una marcha separativa a partir del extracto metanólico, extrayendo con éter etílico y cloroformo a pH 10. La cromatografía en capa delgada (ccd) con distintos sistemas de solventes de los extractos obtenidos, mostraban varias manchas con reacción positiva frente al reactivo de Dragendorff, mientras que en el marco acuoso de la extracción, aun permanecían sustancias con reacción de alcaloides que por ser inextraíbles con solventes orgánicos, se trabajaron como alcaloides cuaternarios (265) como se discutió en la sección a) de este capítulo.

d.1) Extracto etéreo a pH 10.

El rendimiento de este extracto respecto a planta seca fue de 0,07 %. En todos los materiales vegetales estudiados a lo largo de este trabajo se observaron en este extracto esencialmente dos manchas (ccd; sílicagel; Rf 0,30 y 0,76 cloroformo sat. de amoníaco: metanol, 6:4; rev. Dragendorff) pero se advirtió una notable variación en las cantidades relativas de cada uno de ellos, según el origen del material vegetal. Ambos se encontraban en el material proveniente de La Pampa, mientras que en las plantas originarias de Córdoba y Catamarca se hallaba principalmente el alcaloide de mayor Rf. Con referencia al alcaloide de Rf 0,30, vale la pena remarcar su inestabilidad en la etapa separativa que impidió efectuar su estudio.

El aislamiento de los alcaloides de este extracto se llevó a cabo por medio de una columna de alúmina neutra, obteniéndose cuatro fracciones principales, la primera de las cuales era aceitosa y fue analizada por espectrometría de masas acoplada a la cromatografía gaseosa a baja temperatura observándose dos picos (XVIII tr=7,31 minutos y XIX tr=7,77 minutos, en las condiciones indicadas en la Fig. 112).

Todos los fragmentos de los espectros de masas de ambos compuestos comparados entre sí (Figs. 113 y 114) diferían en 14 uma.

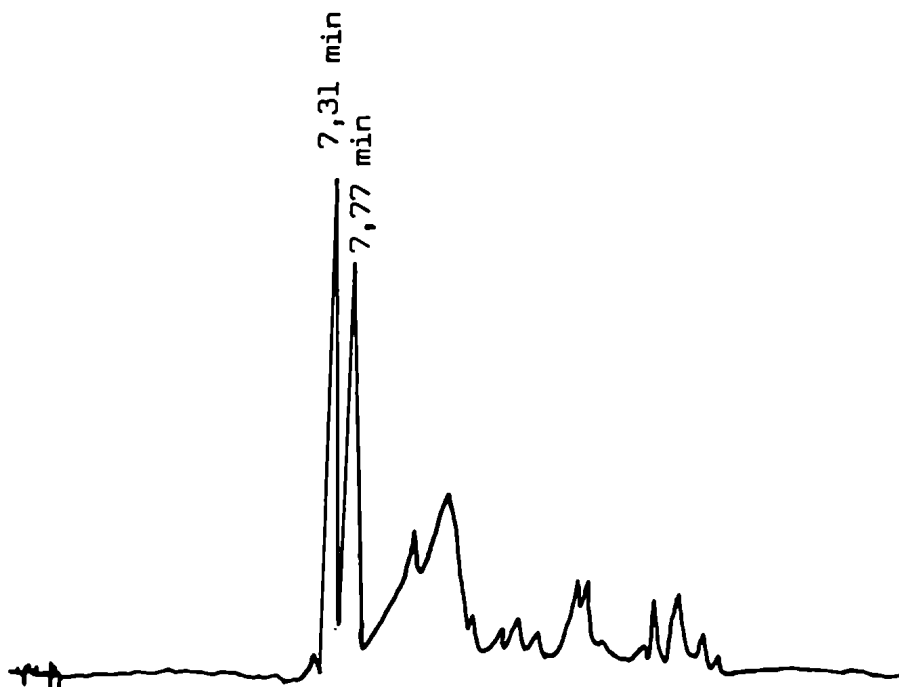


Fig. 112: Cromatograma gaseoso en columna de Apiezon, con N-FID, en condiciones isotérmicas (50°C), de la fracción con los compuestos XVIII y XIX.

El compuesto XVIII presentaba M^+ 127 y pico base en m/e 70 mientras que el XIX mostraba un M^+ 141 y un pico base en m/e 84. La primera pérdida importante para ambos compuestos era $M-CH_3)^+$ (m/e 112 para XVIII y m/e 126 para XIX). La subsiguiente pérdida para ambos era M^+-CH_3-CO (Fig. 115) y en los dos compuestos la pérdida de 57 una a partir de M^+ , conducía al pico base.

El pico base par en m/e 70 en XVIII evidenciaba un núcleo 2-alquilpirrolidínico (216) (Fig. 115), mientras que m/e 84 en XIX correspondería a una N-metil-2-alquilpirrolidina o a una 2-alquimpiperidina (216, 266). La presencia de un ión intenso en m/e 42 en este último espectro apoyaba la primera posibilidad. El compuesto XIX se podía caracterizar, entonces, como higrina (Fig. 115), estructura que justifica todas las rupturas observadas. Por lo tanto se dedujo, que el compuesto XVII correspondería a norhigrina (Fig. 115).

La presencia de higrina, que es el precursor inmediato de los alcaloides del tropano (227, 228) era razonable en una Solanácea como Nierembergia hippomanica pero en cuanto a norhigrina, hasta donde llega nuestro conocimiento, no había

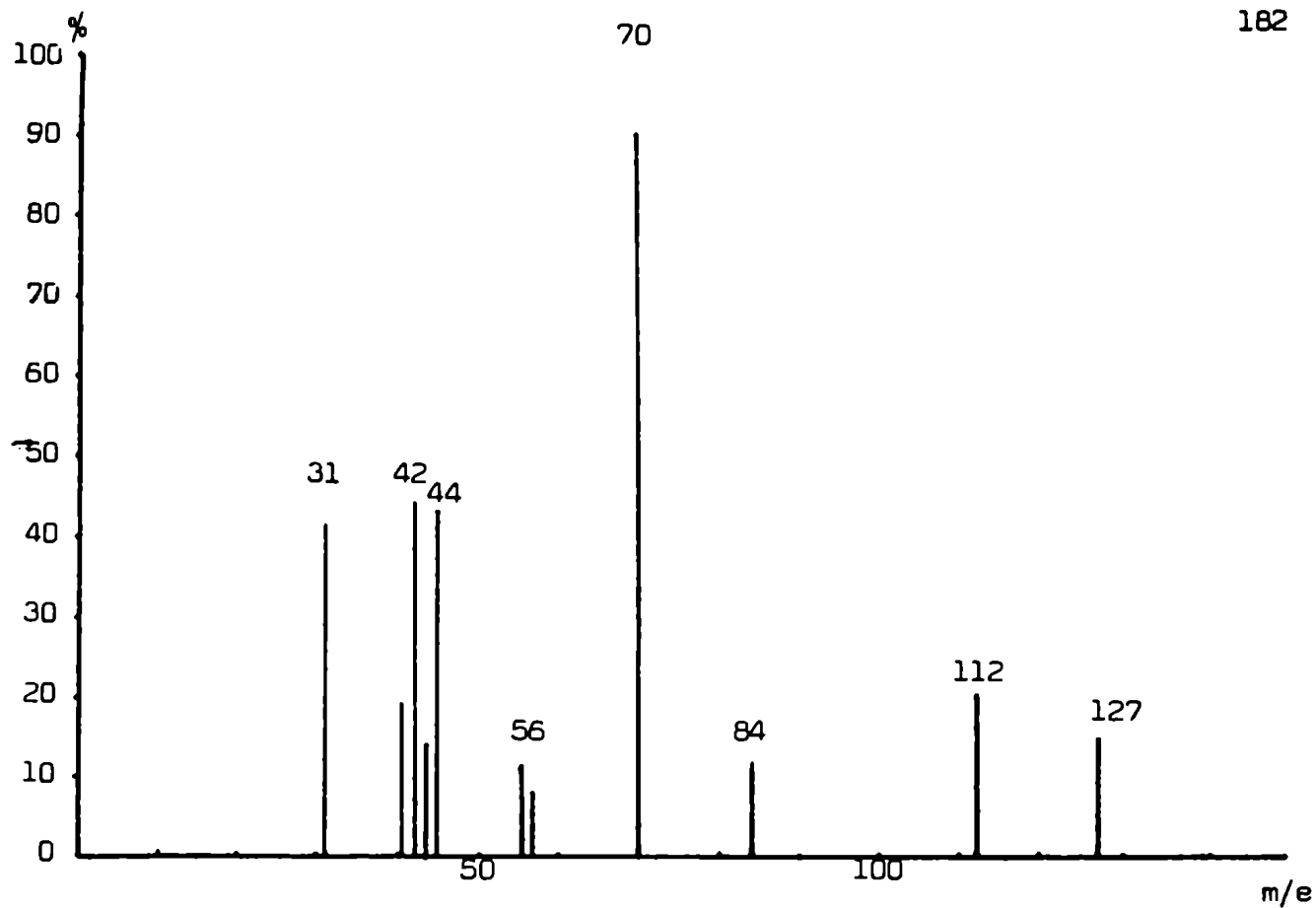


Fig. 113: Espectro de masas de norhigrina (XVIII).

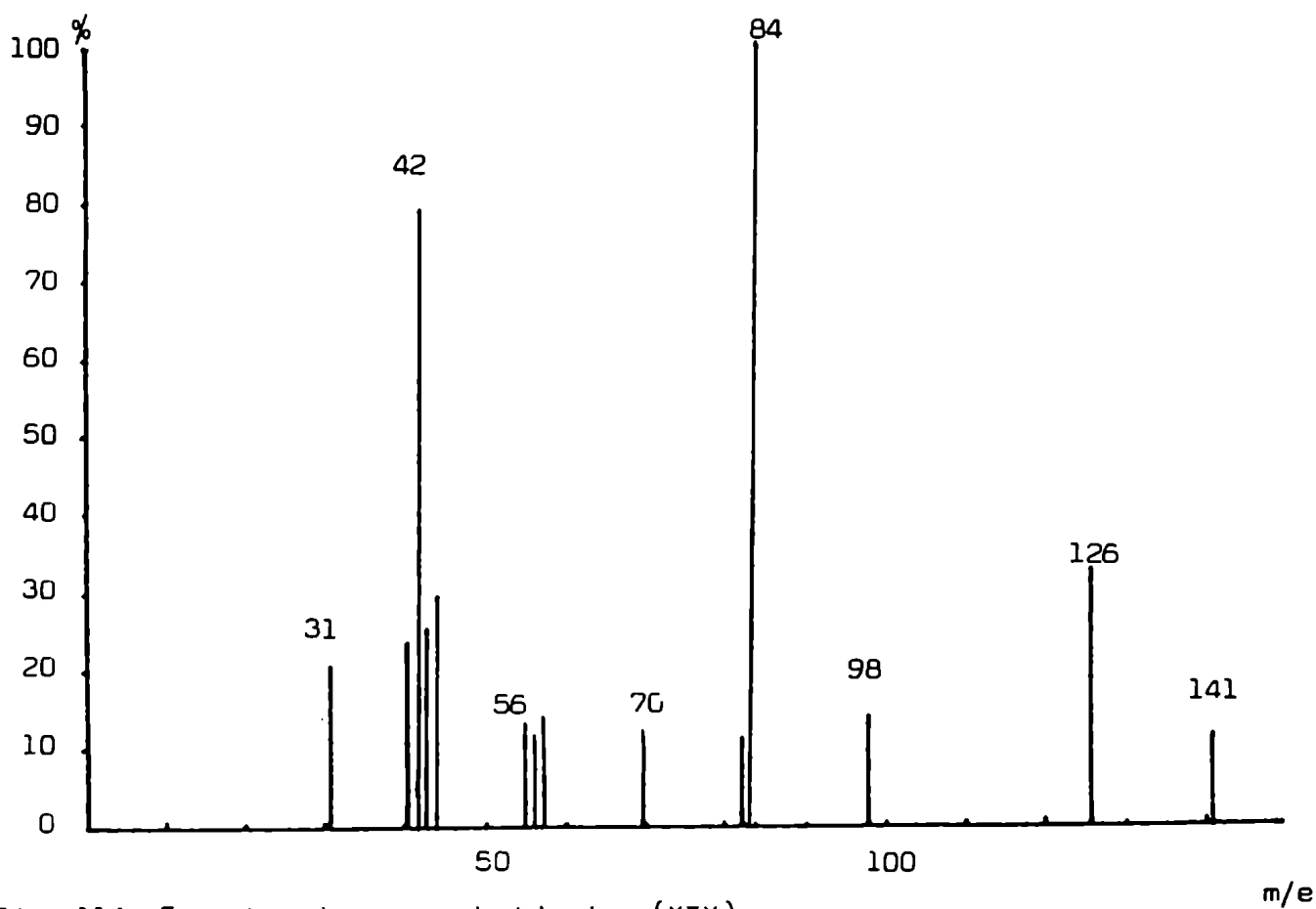


Fig. 114: Espectro de masas de higrina (XIX).

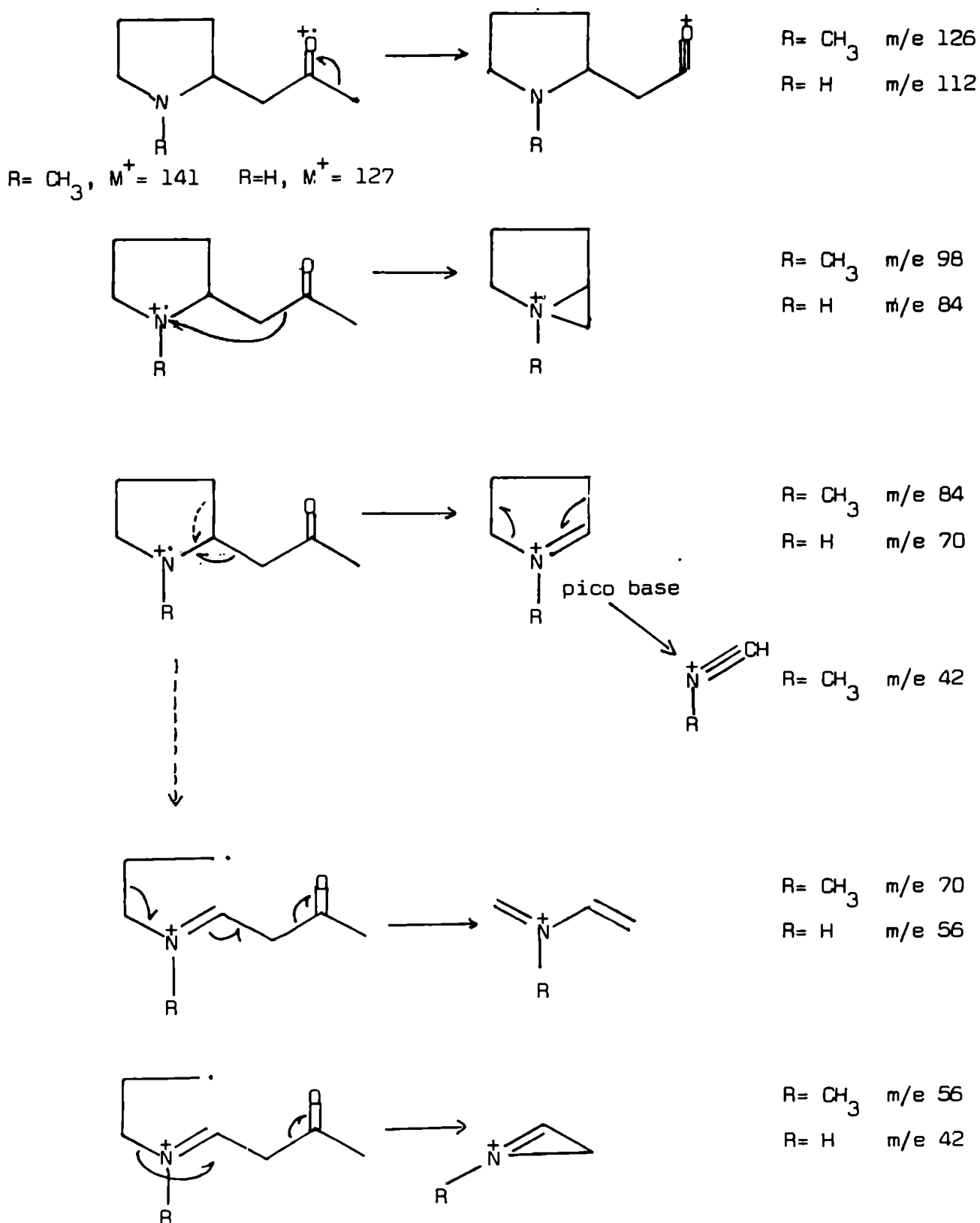


Fig. 115: Asignación de los principales iones de los espectros de masas de higrina ($R = \text{CH}_3$, XIX) y norhigrina ($R = \text{H}$, XVIII).

sido aislada como producto natural. Entonces, para confirmar las estructuras propuestas, se realizó la síntesis de higrina, por condensación del ácido acetondicarboxílico con N-metil-2-pirrolidona, reducida previamente con H_4AlLi (267). Este mismo método para intentar la síntesis de norhigrina, usando 2-pirrolidona, no resultó satisfactorio.

La higrina sintética mostró igual comportamiento cromatográfico y espectroscópico que XIX, confirmando así su estructura.

Los intentos de demetilación de higrina con cloruro de bencenosulfonilo (268) resultaron infructuosos hasta este momento del trabajo, probablemente por la presencia del carbonilo en la cadena lateral.

La segunda fracción de la columna de alúmina presentaba dos sustancias (XX y XXI) aislándose la principal (XXI) que correspondía a la mancha principal del extracto (R_f 0,76; XXI), por nuevas cromatografías en el mismo adsorbente.

El espectro de masas de XXI presentaba pico base en m/e 58 (Fig.116), característico de aminas alifáticas N,N-dimetiladas, no sustituidas en el C alfa (269)

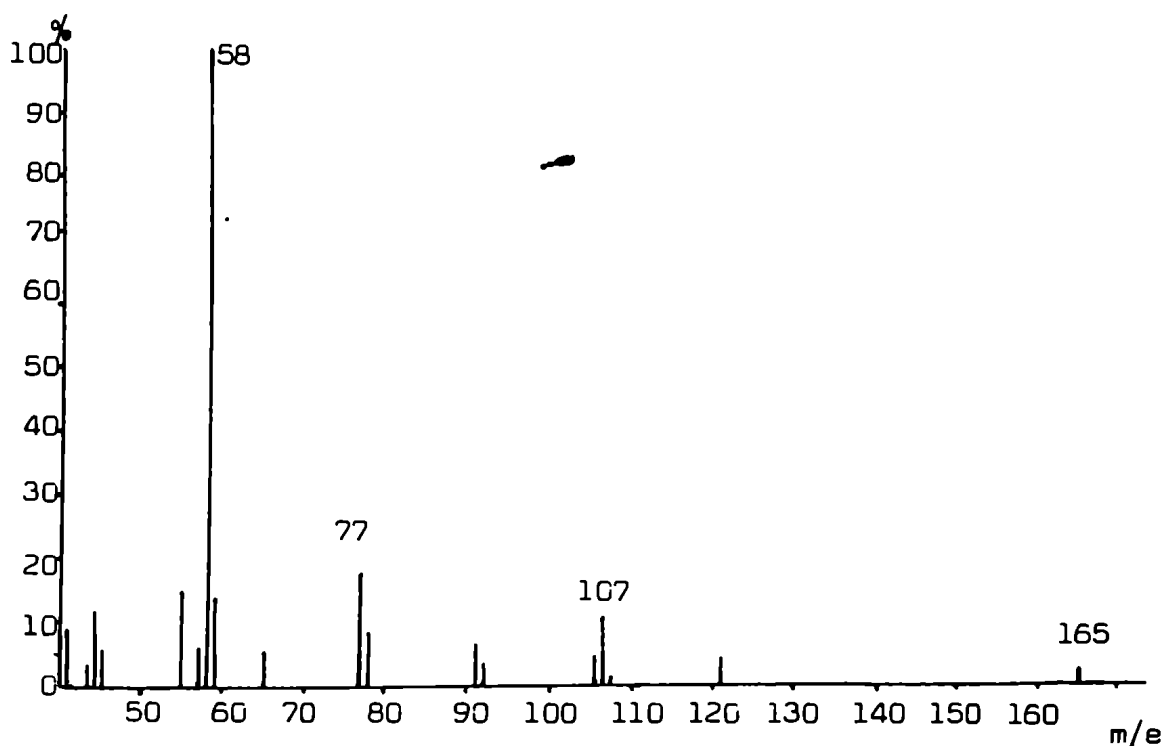


Fig. 116: Espectro de masas de XXI.

El ion molecular era M^+ 165 y presentaba un ión importante en m/e 107 que se asignó a un catión bencílico monohidroxilado (Fig. 117). El espectro de masas indicaba por sus rupturas características que se trataba de una fenetilamina terciaria. La ausencia de M^+-18 permitía suponer que el hidroxilo estaba sobre el anillo aromático y no en el carbono β (Cap. IV).

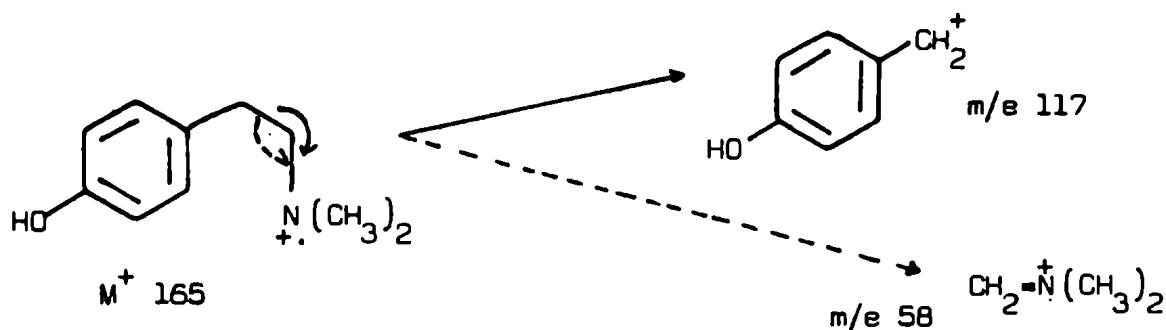


Fig. 117: Fragmentaciones de hordenina (XXI).

Su espectro de $^1\text{H-RMN}$ demostraba un anillo aromático sustituido en para, dos metilenos en un sistema $AA'BB'$, así como un singulete (6H) asignado a los N-metilos (Fig. 118). Todo esto indicaba que se trataba de hordenina (N,N-dimetil-4-hidroxifenetilamina, XXI), confirmado luego por comparación con testigo auténtico.

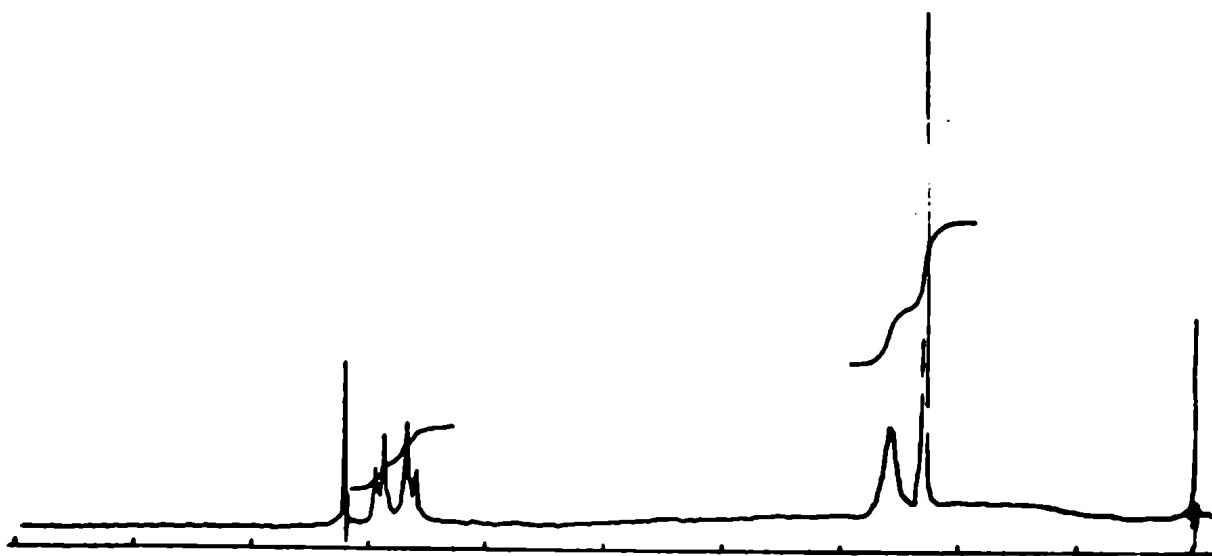


Fig. 118: Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de XXI, en Cl_3CD (100 MHz).

El compuesto XX se obtuvo en fracciones menos polares de las columnas que permitieron aislar hordenina (XXI) y que analizadas por cromatografía gaseosa y por espectrometría de masas con acople al cromatógrafo gaseoso permitieron identificarla como β -feniletilamina (Fig. 119) (Tabla 19).

La fracción 3 de la columna del extracto etéreo a pH 10 se estudió por espectrometría de masas acoplada a la cromatografía gaseosa y entre sus compuestos se identificaron hordenina y N-metiltiramina (XXII) (Fig. 120, Tabla 19).

La última fracción de esta columna presentó como componente principal la 4-hidroxifenetilamina (tiramina, XXIII), también identificada por su espectro de masas característico (Fig. 121, Tabla 19).

Tabla 19: Fragmentos de diagnóstico de las fenetilaminas XX, XXI, XXII y XXIII

	M ⁺	ruptura β	porción nitrogenada
β -feniletilamina (XX)	121	91	30
tiramina (XXIII)	137	107	30
N-metiltiramina (XXII)	151	107	44
hordenina	165	107	58

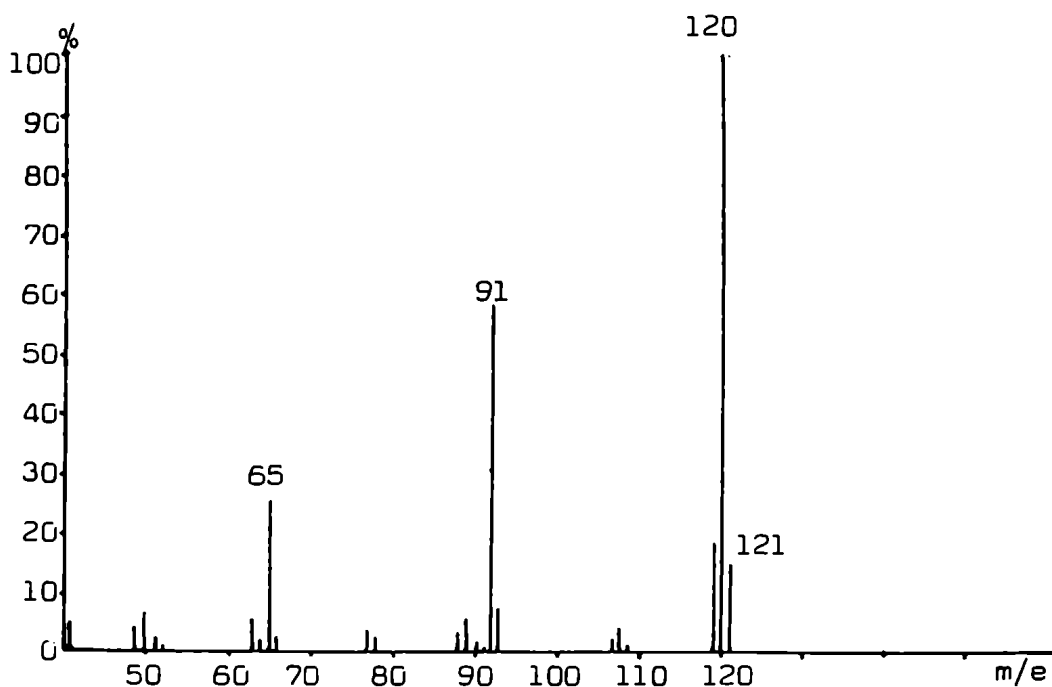


Fig. 119: Espectro de masas de XX.

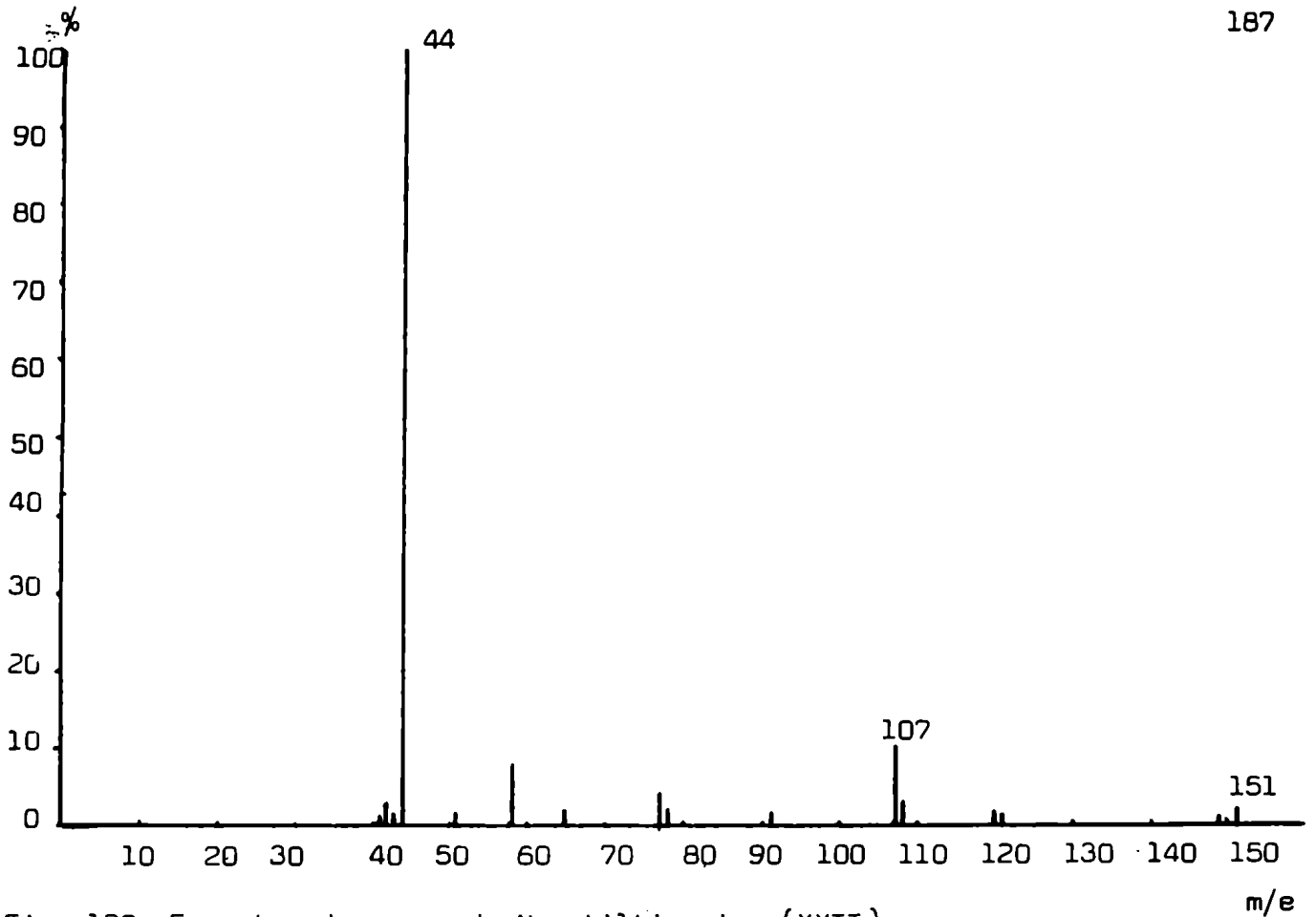


Fig. 120: Espectro de masas de N-metiltiramina (XXII).

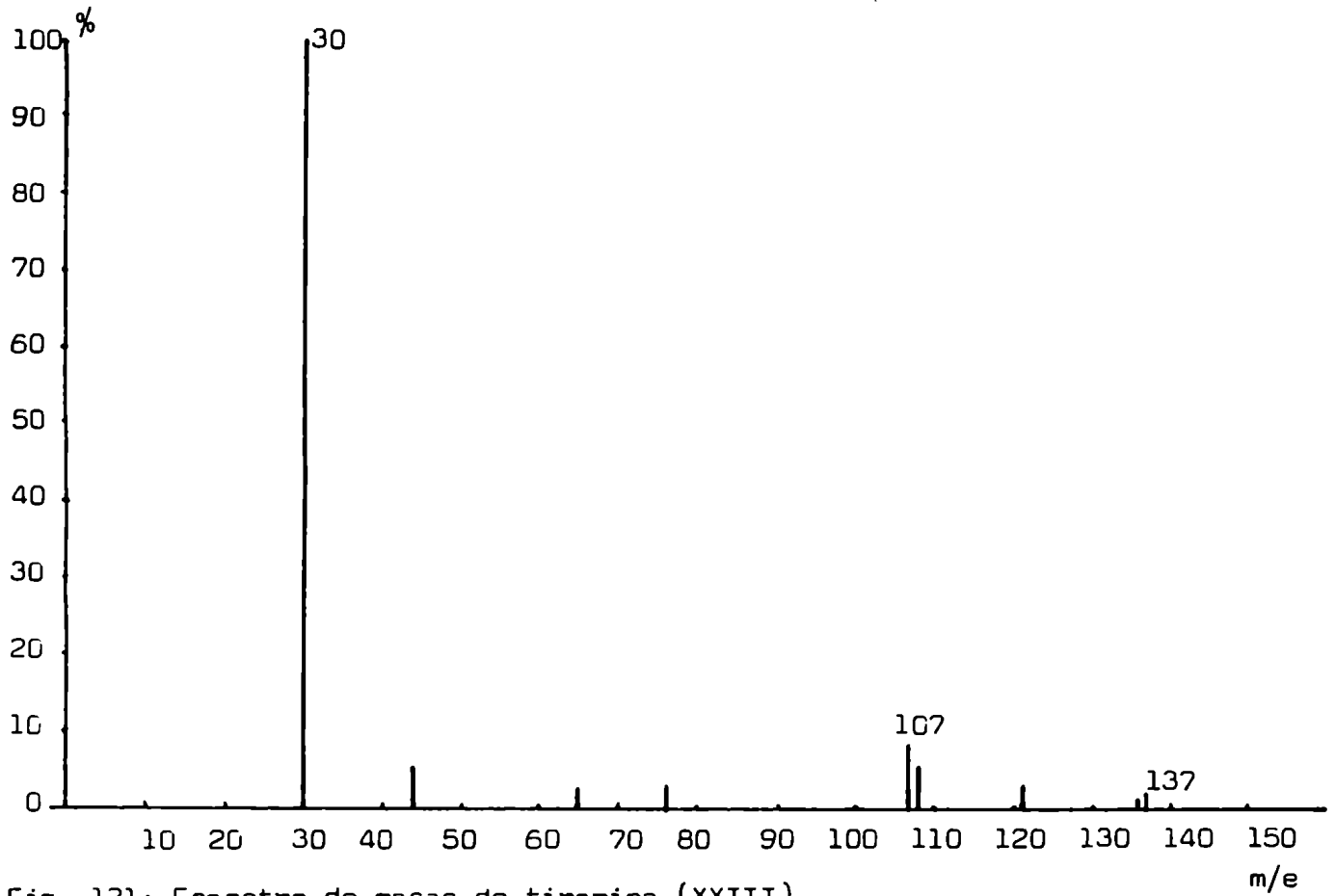


Fig. 121: Espectro de masas de tiramina (XXIII).

d.2) Extracto clorofórmico a pH 10

El rendimiento de este extracto respecto a planta seca fue del 0,02 %. Se lo fraccionó en columna de alúmina neutra y se observó que un buen porcentaje del mismo quedaba retenido en la columna.

Las fracciones obtenidas presentaban varias manchas y se intentó su separación por nuevas columnas de alúmina.

Una de las fracciones estaba constituida principalmente por hordenina (XXI) como se dedujo de su comportamiento cromatográfico y espectro de masas.

La fracción subsiguiente contenía un alcaloide (XXIV) cuyo espectro de masas (Fig. 122) resultó característico del de los alcaloides del tropano, presentando los fragmentos típicos de tropina esterificada en OH-3 (m/e 140, 124, 110, 96, 94, 83, 82 y 42), el ión molecular correspondía a m/e 223, observándose las pérdidas de 99 uma (grupo aciloxi) y 83 uma (grupo acilo) a partir del mismo. Como es característico de este tipo de ésteres, la pérdida de grupo aciloxi (M-99) conducía al pico base (m/e 124).

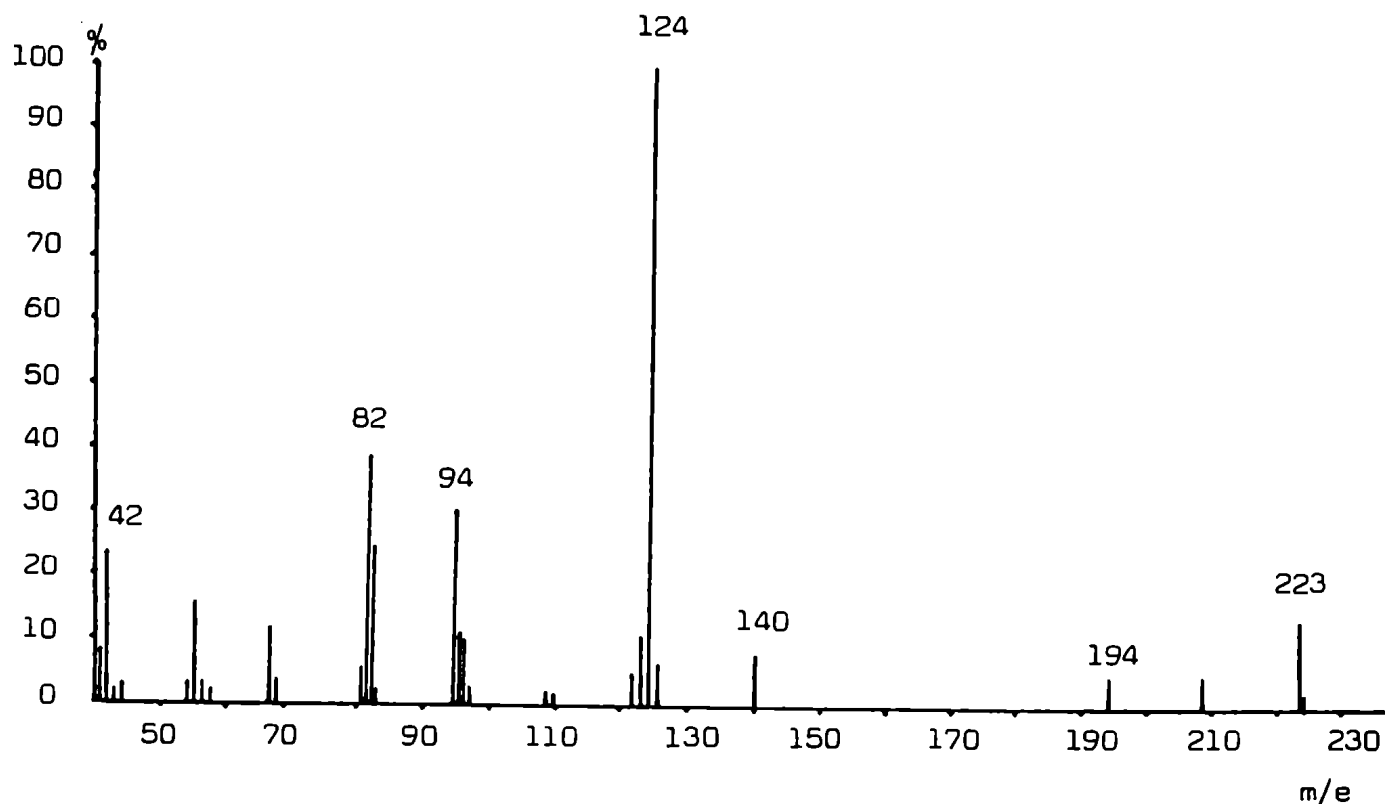


Fig. 122: Espectro de masas de tigloidina (XXIV).

Un grupo acilo de masa 83 provendría de ácidos insaturados de cinco carbonos del tipo de los ácidos tíglico, angélico y senécico que han sido encontrados frecuentemente como esterificantes de la tropina.

Debido a que, ni la naturaleza del grupo acilante ni la estereoquímica del C-3 de la tropina podían establecerse por espectrometría de masas, se realizó la comparación con testigos auténticos de picratos de 3- α -tigloiloxitropina y 3- β -tigloiloxitropina (tigloidina) que se diferenciaban apreciablemente por cromatografía en distintos sistemas de solventes. El alcaloide de Nierembergia hippomanica se halló coincidente con tigloidina (XXIV). La asignación de sus rupturas se observan en la Fig. 123.

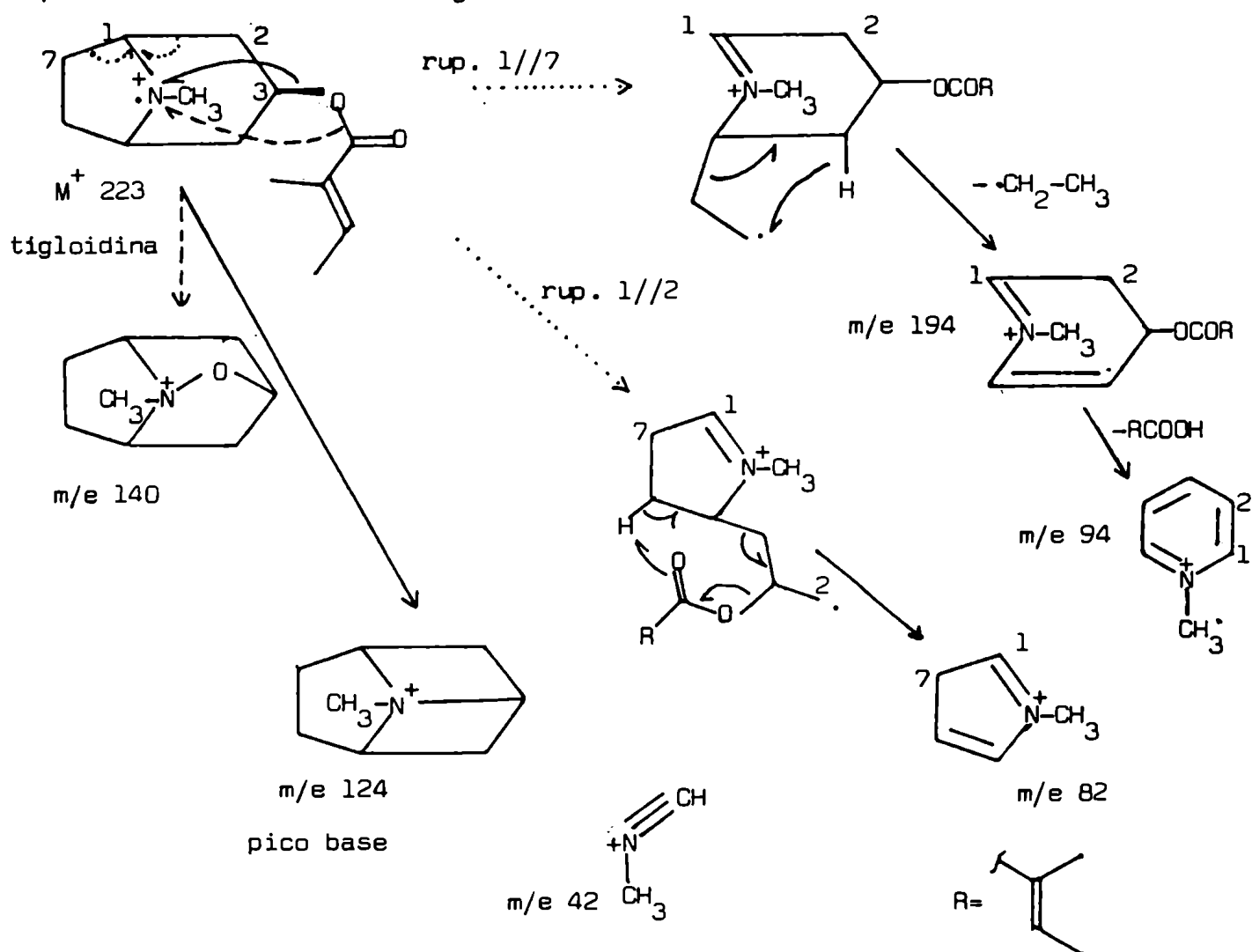


Fig. 123: Esquema de fragmentaciones del espectro de masas de tigloidina (XXIV)

d.3) Alcaloides cuaternarios

Los alcaloides remanentes en la fase acuosa alcalina de las extracciones de las bases se precipitaron como sales de anión complejo de la sal de Reinecke . $(Cr (SCN)_4(NH_3)_2.NH_4)$ a pH 12 y a pH 8. También se probó la precipitación a pH 5 y 1, pero a estos pHs no se obtuvieron precipitados (265).

El precipitado obtenido a pH 12 era el más abundante y para estudiar sus componentes se lo liberó de estas sales por medio de una resina de intercambio aniónica, fuertemente alcalina, Amberlite IRA-400 (forma OH^-), eluyendo con etanol. La fracción así obtenida se separó en columna de alúmina con cloroformo: metanol: ácido acético, 90:10:1, como solvente.

Se obtuvieron varias fracciones, con por lo menos cuatro compuestos, tres de los cuales, luego de su purificación, fueron obtenidos en cantidades del orden del miligramo y por esta causa no se pudo establecer su naturaleza. El cuarto compuesto (XV) se encontraba en cantidades considerables y era evidentemente el alcaloide más abundante de la planta con alrededor del 0,1 %.

El espectro de ^1H-RMN de XV, realizado en D_2O , (Fig. 124) mostraba las siguientes señales: un singulete que integraba para 9H en 3,1 ppm, un multiplete que integraba para 2H en 3,5 ppm y otro multiplete que integraba para 2H en 4,03 ppm acoplado al anterior. Estas señales permitían deducir la estructura del alcaloide cuaternario colina para XV, por los valores de resonancia correspondientes a tres metilos y un metileno directamente unidos a un nitrógeno cuaternario y otro metileno (4,03 ppm) acoplado al anterior y unido a un hidroxilo (225) y resultaron coincidentes con las del espectro registrado (270) para clorhidrato de colina en D_2O .

Se comprobó además su identidad por comparación cromatográfica contra testigo auténtico y además la identidad de su picrato por punto de fusión y punto de fusión mezcla (241-242°C, etanol) (265).

Por carecer de material suficiente, no pudieron determinarse los alcaloides precipitados a pH 8. Vale la pena acotar que algunos de estos alcaloides en ccd,

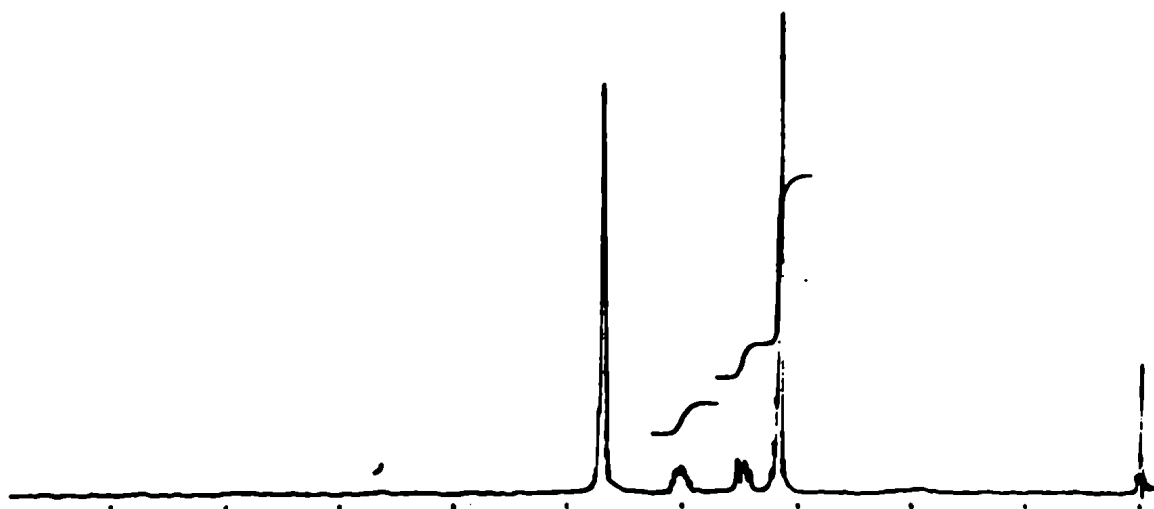


Fig. 124: Espectro de ^1H -RMN de XXV, en D_2O (100 MHz).

presentaban reacción positiva frente al reactivo de Ehrlich (p-dimetilamino-benzaldehído en etanol-ácido clorhídrico), que es un reactivo característico para indoles y otros heterociclos aromáticos.

CAPITULO VI

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

Métodos empleados

Los puntos de fusión (Pf) se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. Los poderes rotatorios ($[\alpha]_D$) fueron medidos en un polarímetro digital Perkin-Elmer, modelo 141, en tubos de 1 dm de longitud, a temperatura ambiente, con los solventes y concentraciones que se indican en cada caso.

Los espectros de absorción ultravioleta (UV) de las sustancias puras se determinaron en un espectrofotómetro Beckman DK-2A, con metanol como solvente.

Los espectros de absorción infrarroja (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 137-B Infracord y los de alta resolución en un aparato Perkin-Elmer 421. Las determinaciones se hicieron en suspensiones de nujol o en pastillas de BrK según se indica.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ($^1\text{H-RMN}$) de 60 MHz se determinaron en un aparato Varian A-60, los de 100 MHz en un Varian XL-100 y los de 300 MHz en un Bruker-300, usando en todos los casos tetrametilsilano como referencia interna. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C ($^{13}\text{C-RMN}$) de 25,2 MHz se realizaron en un Varian XL-100 y los de 75,46 MHz, en un Bruker-300. Los solventes usados se indican en cada caso. Las abreviaturas utilizadas en la descripción de los espectros son: s (singulete), d (doblete), dd (doble doblete), t (triplete), c (cuarteto) y m (multiplete).

Los espectros de masas (EM) fueron determinados en un espectrómetro Varian Mat CH-7 a 70 eV, con inserción directa.

Los cromatogramas gas-líquido con acople al espectrómetro de masas (CGL-EM) se realizaron con un cromatógrafo Varian Aerograph serie 1400, combinado con el espectrómetro mencionado por medio de la computadora Varian Mat Spectro System 166.

Los microanálisis fueron realizados por la Dra. Blanca de Deferrari y la Lic. Marta Marcote, en el laboratorio de microanálisis de UMYMFOR (Dpto. de Química Orgánica, CONICET-FCEN).

Todos los solventes empleados fueron purificados, destilados y secados según Vogel (1966) y evaporados a presión reducida a menos de 40°C. Todas las mezclas están expresadas en relaciones de volúmenes (V/V).

Métodos cromatográficos

a) Cromatografía en capa delgada (ccd).

Se utilizó siempre la técnica ascendente. Se usaron placas de sílicagel G (Merck), de celulosa microcristalina Avicel (FMC Corp. EU), placas Merck de celulosa de 10x20 cm y de 20x20 cm, placas Merck de alúmina de 5x20 cm, placas Merck de sílicagel G de 10x20 cm, placas Merck de sílicagel de alta eficiencia para ccd (HPTLC) y placas de poliamida Woelm. El espesor de la placa para cromatografía analítica fue, en todos los casos, de 250 micrones.

b) Cromatografía en papel

En todos los casos fue descendente. Se realizaron cromatografías analíticas mono y bidimensionales en papel Whatman N° 1.

c) Cromatografía en columna

Se utilizaron los siguientes rellenos para las columnas: sílicagel Davidson para columna, grado 923, malla 100-200 (Davidson Chemical EU); sílicagel H Merck sin soporte, para columnas con presión de aire; alúmina neutra Woelm; polvo de celulosa Whatman Chromedia CF-11; ácido silícico Mallinckrodt; Sephadex LH-20 (Sigma); poliamida Woelm para cromatografía y resinas de intercambio Amberlite IRA 400 (forma OH^-), Dowex 3 (forma OH^-) y Dowex 50 (forma H^+).

d) Cromatografía gas-líquido (CGL)

Se realizó en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett-Packard 5830 A, con las columnas y condiciones indicadas en cada caso.

Las fases de las columnas tenían como soporte Chromosorb W-AWDMCS, malla 60-80, excepto la fase ECNSS-M, cuyo soporte era Chromosorb Q.

Reacciones generales

a) Acetilación

Todas las acetilaciones se realizaron con anhídrido acético en piridina, a temperatura ambiente durante 12 horas. El aislamiento de los productos se realizó por evaporación al vacío de los solventes previa destrucción del exceso de anhídrido acético o bien, volcando la mezcla de reacción sobre hielo-ácido clorhídrico y filtrando el acetato.

b) Metilación

Las metilaciones de ácidos carboxílicos se realizaron disolviendo las muestras en éter etílico anhidro y agregando, a 0°C, diazometano en éter anhidro hasta exceso del reactivo. Al cabo de 10 horas de reacción a temperatura ambiente, se efectuó la concentración a sequedad de la mezcla de reacción y el residuo se tomó con cloroformo.

c) Trimetilsililación

Las muestras a sililar se disolvieron en piridina y se agregaron volúmenes iguales de hexametildisilazano y trimetilclorosilano. Después de 5 minutos, se evaporó a sequedad la mezcla de reacción, se tomó el residuo con cloroformo anhidro y se filtraron las sales inorgánicas formadas.

d) Formación de los alditoles acetilados

Para el estudio de los azúcares productos de hidrólisis, se realizó el OGL de sus alditoles acetilados (186): los monosacáridos se disolvieron en agua o metanol y se redujeron con borohidruro de sodio a temperatura ambiente durante 10 horas. Al cabo de ese tiempo, se evaporó el solvente y se eliminó el exceso de borohidruro por sucesivas evaporaciones con metanol. Los alditoles así obtenidos fueron acetilados con anhídrido acético en piridina como se describió anteriormente y analizados por OGL, en columna de ECNSS-3% en Chromosorb Q-AW DMCS, en condiciones isotérmicas a 180°C.

Material vegetal

Se utilizaron plantas enteras de Nierembergia hippomanica Miers, recolectadas en Chacharramendi, provincia de La Pampa en el mes de mayo de 1978, despues de la floración (Nº de herbario INTA 1324). Otro lote estudiado fue recolectado en La Calera, Dpto. Colón (Córdoba), en septiembre de 1978 y por último se estudiaron ejemplares recolectados en la sierra de Ancasti (Catamarca) a 1000 metros sobre el nivel del mar, en mayo de 1981 (INTA, Estación Experimental Sumalao, Valle Viejo-Catamarca).

Las plantas se secaron en estufa con circulación de aire a 40°C y se molieron.

Estudio preliminar de los componentes de Nierembergia hippomanica

Se realizó una marcha analítica de vegetales (242) detectando alcaloides, fitosteroles, glicósidos de flavonoides, triterpenos pentacíclicos, resultando dudosa la presencia de proantocianidinas y taninos y negativa la de glicósidos cardiotónicos, cianogenéticos, esteroidales, triterpénicos y otras saponinas.

Fraccionamiento del material vegetal

Las plantas enteras secas y molidas fueron extraídas exhaustivamente con éter de petróleo (60-70°C) en Soxhlet, obteniéndose un extracto de éter de petróleo de 2,0 % de rendimiento, y sucesivamente con metanol, obteniendo un extracto metanólico con rendimiento del 8,5 %. Finalmente, el material vegetal remanente se extrajo con agua a 80°C, con agitación magnética (7 %).

Se trabajó sobre el extracto metanólico así obtenido. El mismo, por enfriamiento y reposo, produjo un precipitado inorgánico identificado como sulfato de potasio (0,02 %), por IR (1030 cm^{-1}) y ensayo a la llama. Por concentración a la décima parte de su volumen y reposo, produjo un precipitado orgánico (Precipitado 1, 1,85 %) que fue filtrado y analizado separadamente por cromatografía. Las aguas madres concentradas de este precipitado se sometieron a distintas marchas de aislamiento de familias de compuestos.

Estudio de Precipitado 1

Por cromatografía en columna de sílicagel de 15 g del Precipitado 1, con mezclas de polaridades crecientes de benceno: acetona, acetona: metanol y metanol: agua, se obtuvieron 10 fracciones (Tabla 20).

Tabla 20: Fracciones obtenidas en la separación cromatográfica del Precipitado 1.

<u>Fracción Nº</u>	<u>Rendimiento</u> (% , rto. al Ppt. 1)	<u>Componentes de la fracción</u>
1	0,1	Serie homóloga de hidrocarburos lineales (CGL).
2	1,3	Clorofilas y alcoholes superiores normales (CGL)
3	5,5	Triterpenos pentacíclicos minoritarios (CGL-EM)
4	20,0	Acidos ursólico y oleanólico
5	0,5	Clorofilas y escopoletina.
6	2,5	Flavonoides acilados.
7	35,0	Flavonoide principal (pinocembrina-7-O-neohesperidósido)
8	7,0	Flavonoide principal y glicósidos de flavonoles
9	9,5	Otras sustancias polares y sales inorgánicas
10	12,1	D-manitol

Fracción 1:Serie homóloga de hidrocarburos lineales

De la fracción 1 se obtuvo un precipitado blanco soluble en cloroformo (Cl_3CH) recristalizable de acetona, que fue analizado por CGL en columna de OV-17 en condiciones isotérmicas (260°C) (Tabla 21) y sus componentes fueron identificados por CGL-EM en condiciones de temperatura programada, como hidrocarburos lineales de $\text{C}_{22}\text{H}_{46}$ a $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$, graficándose log de tr vs N° de C (gráfico en pág. 113).

Tabla 21: Hidrocarburos lineales de *Nierembergia hippomanica*.

<u>Compuesto N°</u>	<u>N° de C</u>	<u>tr</u>	<u>log tr</u>	<u>%</u>	<u>M⁺</u>
2	22	0,99	-0,043	5,8	310
3	23	1,21	0,083	5,9	324
5	24	1,51	0,179	10,7	338
6	25	1,89	0,276	12,8	352
7	26	2,39	0,378	13,4	366
8	27	3,03	0,481	9,9	380
9	28	3,87	0,587	7,3	394
10	29	4,94	0,693	4,5	408
11	30	6,34	0,802	3,3	422

Fracción 2:Serie homóloga de alcoholes superiores

Por cromatografía en columna de alúmina con benceno (B) como solvente, se obtuvieron 90 mg de un precipitado que fue recristalizado de metanol (MeOH). La identificación de los componentes se realizó por CGL en columna de SE-30 3% en condiciones isotérmicas (270°C), mostrando una serie homóloga.

Por comparación con una mezcla testigo de alcoholes superiores normales, se halló coincidencia con varios de ellos, lo que permitió caracterizarlos y realizar el gráfico log tr vs N° de C (tabla 22) con alcoholes normales de $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{O}$ hasta $\text{C}_{32}\text{H}_{66}\text{O}$ (gráfico en pág. 113).

Tabla 22: Alcoholes superiores normales de Nierembergia hippomanica.

<u>Nº de C</u>	<u>tr</u>	<u>log tr</u>	<u>%</u>	<u>M⁺</u>	<u>Form. molecular</u>
19	1,13	0,053	1,1	284	C ₁₉ H ₄₀ O
20	1,39	0,143	2,5	298	C ₂₀ H ₄₂ O
21	1,67	0,222	16,5	312	C ₂₁ H ₄₄ O
22	2,13	0,328	1,4	326	C ₂₂ H ₄₆ O
23	2,60	0,415	2,1	340	C ₂₃ H ₄₈ O
24	3,27	0,514	3,3	354	C ₂₄ H ₅₀ O
25	3,99	0,601	6,8	368	C ₂₅ H ₅₂ O
26	5,11	0,708	7,6	382	C ₂₆ H ₅₄ O
27	6,29	0,798	6,0	396	C ₂₇ H ₅₆ O
28	8,07	0,906	8,8	410	C ₂₈ H ₅₈ O
29	9,81	0,991	7,1	424	C ₂₉ H ₆₀ O
30	12,61	1,100	15,5	438	C ₃₀ H ₆₂ O
31	15,43	1,188	16,4	452	C ₃₁ H ₆₄ O
32	19,55	1,290	2,6	466	C ₃₂ H ₆₆ O

Fracción 3:

Fue acetilada en la forma usual y analizada por CGL (SE-30 3 %, isotérmica 290°C). El cromatograma presentó tres picos que correspondían a acetato de β-amirina (acetato de V, tr 8,18 min), acetato de α-amirina (acetato de IV, tr 8,88 min) y diacetato de uvaol (diacetato de III, tr 16,41 min).

Diacetato de uvaol (CGL-EM), m/e (%): 526 (M⁺, 2,05), 466 (M⁺-60, 17,5), 276 (RDA, anillos D y E, 12,1), 216 (276-60, 100), 203 (276-CH₂OCOCH₃, 56,4), 249 (anillos A y B, 8,9), 190 (anillos A y B+H-60, 43,1), 189 (anillos A y B-60, 14,8), 133 (203-C-19, C-20, C-21, C-29 y C-30, 26,6)

Se comparó con testigo auténtico por CGL.

Acetatos de α- y β-amirina (acetatos de IV y V): Se identificaron por comparación cromatográfica por CGL y ccd (sílicagel, B/Acetona, 9:1, R_f 0,8) con testigos auténticos.

Fracción 4:

Esta fracción fue purificada por cromatografía en columna seca de silicagel (benceno: acetona (B/Ac), 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4) obteniéndose una fracción principal con $P_f=275-281^\circ\text{C}$ (EtOH, agujas blancas) que resultó ser una mezcla de ácido ursólico (I) y ácido oleanólico (II), cuyos datos espectroscópicos eran:

IR cm^{-1} : 3400 (tensión O-H), 2900 (tensión C-H), 1695 (tensión C=O, ácido), 1450 y 1380 (flexión simétrica y asimétrica del metilo).

EM m/e (%): 456 (M^+ , 0,6), 438 (M^+-18 , 0,65), 248 (RDA, anillos D y E, 73), 207 (fragm. anillos A y B, 19), 203 (248- COOH, 100), 189 (207-18), 133 (203 - C-19,C-20,C-21,C-29 y C-30, 48).

$^1\text{H-RMN}$ (60 MHz, DMSO-d_6) ppm: 0,76 (s, 3H, CH_3 -26), 0,81 (s, 3H, CH_3 -24), 0,92 (s, 3H, CH_3 -25), 0,93 (s, 6H, CH_3 -29 y 30), 0,97 (s, 3H, CH_3 -23), 1,14 (s, 3H, CH_3 -27), 1,27-1,65 (m, $-\text{CH}_2-$ de los ciclos), 4,3 (m, 1H, H-3) y 5,2 (m, 1H, H-12).

La acetilación de la fracción condujo a un monoacetato cuyo espectro $^1\text{H-RMN}$ correspondía al ácido acetiloleanólico.

Acido acetiloleanólico: $^1\text{H-RMN}$ (60 MHz, Cl_3CD) ppm: 0,76 (s, 3H, CH_3 -26), 0,86 (s, 6H, CH_3 -23 y 24), 0,94 (s, 9H, CH_3 -25, 29 y 30), 1,15 (s, 3H, CH_3 -27), 1,0-1,9 (m, $-\text{CH}_2-$ de los ciclos) 1,98 (s, 3H, CH_3 -CO-), 4,5 (m, 1H, H-3), 5,25 (m, 1H, H-12).

La fracción acetilada y metilada fue analizada por CGL (SE-30 3 %, condiciones isotérmicas, 290°C) obteniéndose dos picos: acetilursolato de metilo (tr 12,08 minutos; 9,5 %) y acetiloleanato de metilo (tr 13,49 minutos; 71,6 %). Se comparó con una mezcla de testigos derivatizados. Por cristalización fraccionada de EtOH de los acetilmetil derivados se obtuvo enriquecimiento de la fracción en acetiloleanato de metilo (tr 13,49 min.) (248).

Acetil ursolato de metilo y acetil oleanato de metilo (derivados acetilados y metilados de I y II respectivamente) (CGL-EM): ambos compuestos dieron EM coincidentes.

EM m/e (%): 512 (M^+ ; 1,8), 452 (M^+ -60; 6,0), 437 (M^+ -60-15; 2,2), 262 (ADA, anillos D y E; 93,7), 249 (fragm. anillos A y B; 21,8), 203 (263-COOCH₃; 100), 189 (249-60; 30,7), 133 (203- C-19,C-20,C-21,C-29 y C-30; 57,6), 43 (CH₃CO-; 25,0).

Fracción 5:

Se purificó por columna de sílicagel (B/Ac, 9:1), reuniéndose las fracciones que poseían el compuesto de fluorescencia celeste a 366 nm, identificado como escopoletina (VI) por comparación con testigo: ccd, sílicagel, Rf 0,8, B/Ac, 8:2, y CGL, SE-30 3%, temperatura programada: de 200 a 290°C a 10°/min, tr 3,96.

Escopoletina (VI) (CGL-EM) m/e (%): 192 (M^+ , 100), 177 (M^+ -15; 87,5), 164 (M^+ -28; 30), 149 (M^+ -28-15; 48,2), 136 (M^+ -28-28; 18,7), 121 (M^+ -28-28-15; 22,7), 120 (M^+ -28-28-15-1; 17,0).

Fracción 6:

Esta fracción estaba constituida por los flavonoides acilados minoritarios (X, XI y XII) y por el flavonoide principal de la planta (VII). Debido a que los primeros se encontraban en pequeñas cantidades en esta fracción, se realizó una marcha directa separativa de flavonoides a partir del extracto metanólico para poder estudiarlos (pág. 207).

Fracción 7:

Estaba constituida principalmente por un compuesto (VII), que fue purificado por cromatografía en columna de sílicagel (B/Ac, 1:4) e identificado como pino-cembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII).

Este compuesto es el principal flavonoide de Nierembergia hippomanica y uno de los mayoritarios de la planta.

Pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII):

Pf = 274-276°C (EtOH, agujas blancas) $[\alpha]_D^{20} = -119,6^\circ$ (c 2, piridina)

$C_{27}H_{32}O_{13}$, C=56,57 H=6,04; requerido C=57,45 H=5,67

UV λ máx. : 285 y 328 nm; +AlCl₃ = 308 y 379 nm; +AlCl₃+ClH = 308 y 376 nm; +CH₃ONa = 285 y 358 nm; +CH₃COONa = 285 y 328 nm; +CH₃COONa+BO₃H₃ = 287 y 330 nm.

IR (cm⁻¹) : 3380 (tens. O-H), 2930 (tens. C-H), 1645 (tens. C=O), 1575 (tens. C=C), 1505, 1495, 1425, 1380 (tens. C=C, aromática), 1320, 1275, 1245, 1215, 1175, 1145, 1100 (deform. O-H), 1050 (estiram. C-O, típico de unión glicosídica), 980, 920, 835, 770, 710, 685, 670, 640, 610 y 570 (señales de anillo aromático, estiram. C-C).

¹H-RMN (60 MHz, DMSO-d₆) ppm : 1,15 (d J= 6Hz, 3H, CH₃-6'''), 2,6-3,0 (dc, 2H, H-3); 3,2-4,1 (m, 5H, protones de azúcar); 4,4-4,8 (m, 4H, protones de azúcar), 5,1-5,4 (m, 2H, H-1'' y H-1'''); 5,7 (dd J=4 y 12 Hz, 1H, H-2); 6,13 (d J= 2 Hz, 1H, H-6); 6,19 (d J= 2 Hz, 1H, H-8); 7,5 (m, 5H, H del anillo B); 11,8 (señal ancha, 1H, OH-5).

¹H-RMN (300 MHz, piridina-d₅) ppm: 1,75 (d J= 6 Hz, 3H, CH₃-6'''); 2,80-3,20 (dc, 2H, H-3); 4,10-4,45 (señal compleja, 7H, H de azúcar); 4,54 (dd J= 3 y 10 Hz, 1H, H-3'''); 4,73 (dd J= 10 y 10 Hz, 1H, H-2''); 4,86 (dd J= 1,5 y 3, 1H, H-2'''); 5,40 (dd J= 4 y 12 Hz, 1H, H-2); 5,77 (d J= 10 Hz, 1H, H-1''); 6,32 (d J= 1,5 Hz, 1H, H-1'''); 6,70 (d J=2 Hz, 1H, H-6); 6,73 (d J=2 Hz, 1H, H-8); 7,42 y 7,58 (m, 5H, anillo B)

EM m/e (%): 564 (M⁺, 0,25), 418 (M⁺-oxonio de ramnosa+H, 0,62), 256 (pinocembrina, 100), 255 (256-H, 49,7), 179 (256-77, 77,5), 152 (RDA anillo A, 62,5), 147 (oxonio de ramnosa, 20), 129 (147-18, 27,5), 124 (152-28, 32,5), 85 (62,5), 73 (32,1) 71 (34,2), 60 (25), 57 (33,8), 55 (12,5) 45 (17,5) y 43 (30,3) fragmentos de hidratos de carbono.

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 25,2 MHz) ppm: 17,94 (C-6'''); 42,15 (C-3); 60,4 (C-6'') 68,2 (C-5'''), 69,6 (C-4''), 70,3 (C-2'''), 70,7 (C-3'''), 71,8 (C-4''')

76,1 (C-2" ^a), 76,85 (C-5" ^a), 77,07 (C-3" ^a), 78,5 (C-2), 95,1 (C-6), 96,5 (C-8), 97,4 (C-1"), 100,33 (C-1'''), 103,28 (C-10), 126,60 (C-2' y 6'), 128,0 (C-3' y 5'), 128,53 (C-4'), 138,36 (C-1'), 162,46 (C-9), 162,84 (C-5), 164,83 (C-7), 196,64 (C-4).

¹³C-RMN (75,45 MHz, piridina-d₅) ppm : 18,7 (C-6'''), 42,3 (C-3), 61,77 (C-6"), 69,8 (C-5'''), 70,8 (C-4"), 72,02 (C-2'''), 72,4 (C-3'''), 73,66 (C-4'''), 78,0 (C-2" ^a), 78,5 (C-5" ^a), 78,6 (C-3" ^a), 79,5 (C-2), 96,25 (C-6), 97,7 (C-8), 99,2 (C-1"), 102,37 (C-1'''), 104,3 (C-10), 126,83 (C-2' y 6'), 129,16 (C-3' y 5'), 129,08 (C-4'), 139,1 (C-1'), 163,34 (C-9), 164,1 (C-5), 166,05 (C-7), 196,7 (C-4).

(a): indica que los valores asignados pueden estar intercambiados.

Heptaacetato de pinocembrina-7-O-β-neohesperidósido:

Pf : 119-121°C $\alpha_D^{25} = -64,4^\circ$ (c 3, piridina)

C₄₁H₄₆O₂₀ (C 59,96 %, H 5,47 %; requerido C 57,34 %, H 5,36 %)

UV λ máx. = 267 y 309 nm, + CH₃ONa = 255 (hombro), 275 (hombro), 280, 283 (hombro) y 320 (hombro). No se observaron desplazamientos respecto al espectro en metanol por agregado de AlCl₃, AlCl₃/ClH, CH₃COONa ni CH₃COONa/BO₃H₃.

IR (cm⁻¹): 2850 (tens. C-H), 1750 (tens. C=O, éster), 1620 (tens. C=O, α, β no saturado), 1460 y 1380 (tens. C=C, aromática), 1230 y 1080 (deform. O-H), 1040 (estiram. C-O, unión glicosídica), 890, 845, 775, 760 y 725 (estiram.-C=C, señales de anillo aromático).

¹H-RMN (60 MHz, Cl₃CD) ppm : 1,27 (d, 3H, CH₃-6'''); 2,02, 2,10, 2,17, 2,21 y 2,45 (singuletes, 21H, 7 acetilos), 2,85-3,1 (dq, 2H, H-3), 3,9-4,2 (m, 4H, H-5''', H-2", H-5" y H-6"); 4,7-5,2 (m, 7H, H-1''', H-2''', H-3''', H-4''', H-1", H-3", H-4"), 5,2-5,5 (dd J=4 y 12 Hz, 1H, H-2), 6,32 (d J= 2Hz, 1H, H-6), 6,62 (d J= 2 Hz, 1H, H-8), 7,3 (m, 2H) y 7,46 (m, 3H) protones del anillo B.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, piridina- d_5) ppm : 1,45 (d $J=6$ Hz, 3H, H-6'''), 1,96; 2,01; 2,02; 2,03 y 2,26 (singuletes, 18H, 6 $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2,44 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$ fenólico); 2,8 y 3,15 (dq, 2H, H-3); 4,4-4,6 (m, 5H, H-2'', H-5'', H-6'' y H-5'''); 5,4 (dd, 1H, H-2); 5,45-6,0 (m, 7H, H-1''', H-2''', H-3''', H-4''', H-1'', H-3'' y H-4''); 6,84 (d $J=2$ Hz, 1H, H-6); 6,93 (d $J=2$ Hz, 1H, H-8); 7,25 y 7,50 (m, 5H, anillo B).

EM m/e (%): 563 (1,2), 562 (3,3), 561 (21,1), 331 (4,4) 298 (1,4) 273 (oxonio de ramnosa acetilado, 50,2), 256 (298-42, pinocembrina, 4,0), 255 (256-H, 1,8), 213 (273-60, 18,4), 179 (256-77, 2,2), 171 (273-60-42, 15,5), 169 (331-60-60-42, 30,3; fragm. de glucosa), 153 (171-18, 69,5), 152 (de aglicona, 3,0), 129 (171-42, 2,5), 127 (169-42, 10,5), 124 (de aglicona, 1,2), 111 (129-16, 34,8), 109 (127-18, 15,8), 104 (de aglicona, 1,5), 97 (8,6), 79 (22,0), 69 (4,4), 60 (7,7), 52 (14), 43 ($\text{CH}_3\text{CO-}$, 100), 42 (11,0).

$^{13}\text{C-RMN}$ (25,2 MHz, Cl_3CD) ppm : 17,38 (C-6'''); 20,44; 20,85; 21,04 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 44,71 (C-3); 61,71 (C-6''); 66,73 (C-5''')^a; 68,21 (C-4'')^a; 69,82 (C-2''')^a; 70,7 (C-3''')^a; 72,06 (C-4''')^a; 73,92 (C-2'')^b; 75,64 (C-5'')^b; 76,41 (C-3'')^b; 79,60 (C-2); 98,03 y 98,10 (C-1'' y C-1'''); 102,18 y 105,67 (C-6 y C-8); 106,2 (C-10); 125,94 (C-2' y C-6'); 128,68 (C-4'); 128,84 (C-3' y C-5'); 137,78 (C-1'); 160,50 (C-5); 162,5 (C-9); 169,70 (C-7); 178,6 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 187,8 (C-4).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75,45 MHz, piridina- d_5) ppm: 17,85 (C-6'''); 20,46; 20,70; 21,12 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 45,23 (C-3); 62,49 (C-6''); 67,55 (C-5''')^a; 69,14 (C-4'')^a; 69,38 (C-2''')^a; 70,67 (C-3''')^a; 71,33 (C-4''')^a; 72,76 (C-5'')^b; 74,68 (C-2'')^b; 77,74 (C-3'')^b; 80,01 (C-2); 98,65 y 98,88 (C-1'' y C-1'''); 102,66 (C-6); 106,49 (C-8); 110,30 (C-10); 126,83 (C-2', C-6' y C-4'); 129,11 (C-3' y C-5'); 139,21 (C-1'); 162,51 (C-5); 164,43 (C-9); 169,22 (C-7); 169,94; 170,00; 170,12; 170,36 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 188,79 (C-4).

(a) (b): indica que los valores asignados pueden estar intercambiados.

Trimetilsilil derivado de VII:

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, Cl_3CD) ppm: 1,30(d J=6 Hz, 3H, CH_3 -6'''); 2,7 y 3,0 (dq, 2H, H-3); 3,4 a 4,0 (m, 7H, H de azúcares); 4,91 (d J=1 Hz, 1H, H-1'''); 5,02 (d J=7 Hz, 1H, H-1''); 5,28 (dd J=4 y 12 Hz, 1H, H-2); 6,08 (d J=2 Hz, 1H, H-6); 6,37 (d J=2 Hz, 1H, H-8); 7,32 (m, 5H, anillo B).

EM m/e (%): 741(TMS neohesperidosa, 1,1), 690 (TMS pinocembrina-7-O-glu, 0,8) 651 (741-TMSiOH, 15,0), 451 (TMS ramnosa, 1,5), 400 (TMS pinocembrina, 5,0), 385 (400-15, 7,0), 363 (451+H-TMSiO', 57,0), 328 (aglicona+H-TMSi, 28,0), 313 (aglicona+H-TMSi-15, 10), 291 (363-72, 5,0), 273 (363-TMSiOH, 30,0), 256 (pinocembrina, 1,0), 103 (35), 73 (TMS, 100).

Hidrólisis ácida de pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido :

i) Hidrólisis total: Se llevó a cabo con ClH 2N en metanol, a reflujo durante cuatro horas. Se extrajo la aglicona con acetato de etilo y se la identificó como 5,7-dihidroxi flavanona (pinocembrina) por sus datos espectroscópicos y comparación con testigo. En la fase acuosa se detectaron D-glucosa y L-ramnosa por PC (cromatografía en papel, butanol:piridina:agua, 9:5:8 o 10:4:3, y por CGL de sus alditoles acetilados en columna ECNSS-M 3 %, en condiciones isotérmicas a 180°C, contra los correspondientes testigos.

Pinocembrina (VIII):

Pf : 194-195°C $\alpha_D^{25} = -54,0^\circ$ (c 1, metanol); $-43,4^\circ$ (c 1,9; piridina)

UV λ máx : 228 (hombro), 289 y 328 nm; $+\text{AlCl}_3 = 311$ y 370 nm; $+\text{AlCl}_3/\text{ClH} = 311$ y 370 nm; $+\text{CH}_3\text{ONa} = 243$ (hombro), 280 (hombro), 323 y 360 nm; $+\text{CH}_3\text{COONa} = 290$ y 321 nm; $+\text{CH}_3\text{COONa}/\text{BO}_3\text{H}_3 = 289$ y 324 nm.

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, DMSO-DSS) ppm: centr. 2,8 (dd J= 4 y 16,5 Hz, 1H, H-3 ecuatorial); centr. 3,3 (dd J= 12 y 16,5 Hz, 1H, H-3 axial); centr. 5,6

(dd $J = 4$ y 12 Hz, 1H, H-2), 5,98 (m, 2H, H-6 y H-8); 7,50 (m, 5H, anillo B).

Experimentos de doble resonancia irradiando en 2,8; 3,2; 3,4 y 5,6 ppm, confirmaron los valores aparentes de constantes de acoplamiento del sistema ABX de los protones de C-2 y C-3: $J_{gem.} = 16,5$ Hz.; $J_{anti} = 12$ Hz. y $J_{gauche} = 4$ Hz.

EM m/e (%): 256 (M^+ , 100), 255 (M^+-1 , 56,1), 254 (M^+-2 , 52,0), 228 (M^+-28 , 4,0), 213 (M^+-43 , 3,7), 179 (M^+-77 , 90,7), 152 (RDA, anillo A, 70,6), 124 (152-28, 44,4), 119 (152-43, 24,0), 104 (RDA, anillo B, 12,5), 103 (104-1, 18,5), 96 (16,6), 91 (7,4), 77 (fenilo, 18,5), 69 (18), 55 (3,7), 51 (7,5).

ii) Hidrólisis parcial: pinocembrina-7-O-neohesperidósido fue tratada con ClH concentrado:metanol (1:6) a reflujo durante treinta minutos. Luego de ese tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. En esta fase se encontraban presentes pinocembrina (VIII), pinocembrina-7-O- β -glucósido (IX) (ccd, sílicagel; Rf 0,9 (VIII) y 0,45 (IX); B/Ac 1:2). La purificación del glucósido intermedio IX, se efectuó mediante columna de sílicagel con B/Ac(6:4) como solvente.

Pinocembrina-7-O- β -glucósido (IX):

Pf : 139-140°C (EtOH) $[\alpha]_D^{25} = -66^\circ$ (c 1,6, piridina)

UV λ máx. : 210 (hombro), 284 y 326 nm; $+AlCl_3 = 220, 308$ y 380 nm; $+AlCl_3/ClH = 220, 307$ y 380 nm; $+CH_3ONa = 243, 286$ y 355 nm; $+CH_3COONa = 284$ y 335 nm; $+CH_3COONa/BO_3H_3 = 285$ y 330 nm.

IR (cm^{-1}) : 3300 (tens. O-H), 2910 (tens. C-H), 1640 (tens. C=O), 1580, 1500, 1405, 1380 (tens. C=C aromática), 1300, 1190 (deform. O-H), 1080 (estiram. C-O), 930, 890, 865, 845, 820, 778, 728, 710 y 700 (estiram. C=C, bandas de anillo aromático polisustituido).

1H -RMN (60 MHz, DMSO- d_6) ppm: 2,8 y 3,1 (dc, 2H, H-3); 3,0-3,8 (m, 5H, H del azú-

car); 5,0 (m, 1H, H-1"); 5,3 (dd J= 4 y 12 Hz, 1H, H-2); 6,19 (d J= 2 Hz, 1H, H-6); 6,21 (d J= 2 Hz, 1H, H-8); 7,5 (m, 5H, anillo B).

¹H-RMN (300 MHz, piridina-d₅) ppm: 2,85 y 3,25 (dq, 2H, H-3); 4,15-4,45 (m, 6H, H de azúcar); 5,45 (dd J= 4 y 12 Hz, 1H, H-2); 5,80 (d J=7 Hz, 1H, H-1"); 6,52 (d J=2 Hz, 1H, H-6); 6,57 (d J=2 Hz, 1H, H-8); 7,38 y 7,55 (m, 5H, H del anillo B).

EM m/e (%) : 418 (M⁺, 3,14), 257 (pinocembrina+H, 31,5), 255 (pinocembrina-H, 88,5), 254 (pinocembrina-2H, 45,3), 179 (pinocembrina-77, 100), 152 (RDA, anillo A, 38,8), 124 (152-28, 47,1), 104 (RDA, anillo B, 13,3), 85 (13,5); 73 (38,5); 69 (23,0); 55 (5,2); 45 (18,1); 44 (9,9); 43 (15,2) y 41 (5,3), fragmentos de azúcar.

¹³C-RMN (75,45 MHz, piridina-d₅) ppm: 43,37 (C-3); 62,2 (C-6"); 70,98 (C-4"); 74,60 (C-2"); 78,98 (C-5"); 79,50 (C-3"); 79,65 (C-2); 96,41 (C-6); 97,88 (C-8); 101,41 (C-1"); 104,25 (C-10); 126,82 (C-2' y 6'); 129,01 (C-4'); 129,08 (C-3' y 5'); 139,25 (C-1'); 163,32 (C-9); 164,40 (C-5); 166,68 (C-7); 196,60 (C-4).

Pentaacetato de pinocembrina-7-O-β-glucósido

Pf : 174-175°C (MeOH) $\alpha_D^{25} = -24,8^\circ$ (c 1, piridina)

UV λ máx.: 267 y 309 nm; +CH₃ONa= 280 y 320 nm. No se observaron corrimientos por agregado de AlCl₃; AlCl₃/ClH; CH₃COONa ni CH₃COONa/BO₃H₃.

IR (cm⁻¹) : 2900 (tens. C-H); 1740 (tens. C=O, éster); 1665 (tens. C=O, flavonoide); 1610, 1550, 1460, 1425, 1310 (tens. C=C); 1220 (deform O-H); 1060 (estiram. C-O); 925, 910, 897, 895, 850, 775, 760, 737, 702, 687 (estiram. C=C, bandas de sistema aromático polisustituído).

¹H-RMN (60 MHz, Cl₃CD) ppm : 1,98; 1,99; 2,0; 2,02 (singuletes, 12H, 4 acetilos) 2,3 (s, 3H, acetilo del fenol); centr. 2,9 (dq, 2H, H-3); 4,1-4,3 (m, 3H, H-5" y H-6"); 5,1-5,3 (m, 4H, H-1", 2", 3" y 4"); 5,6 (dd,

1H, H-2); 6,35 (d J=2 Hz , 1H, H-6); 6,60 (d J=2 Hz , 1H, H-8);
centr. 7,4 (m, 5H, H del anillo B).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz , piridina- d_5) ppm: 2,02; 2,03; 2,06; 2,12; 2,42 (singuletes,
15H, 5 $\text{CH}_3\text{CO-}$); 2,85 y 3,15 (dq, 2H, H-3); 4,45-4,55 (m, 3H, H-5"
y H-6"); 5,45 (dd J=4 y 12 Hz., 1H, H-2); 5,60-5,90 (m, 4H, H-1",
H-2", H-3" y H-4"); 6,85 (d J=2 Hz., 1H, H-6); 6,90 (d J=2 Hz.,
1H, H-8); 7,4 y 7,55 (m, 5H, H del anillo B).

EM m/e (%) : 331 (oxonio de glucosa acetilado, 31,0), 271 (331-60, 8,1), 257
(pinocembrina+H, 4,0), 256 (pinocembrina, 3,3), 255 (pinocembrina-
H, 2,5), 229 (271-42, 1,6), 211 (271-60, 2,6), 169 (331-60-60-42,
100), 145 ($(\text{CH}_3\text{CO})_3\text{O}^+$, 4,0), 127 (169-42, 18,8), 109 (169-60, 62,0),
103 ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{OH}^+$, 4,25), 97 (2,8), 85 (7,6), 71 (12,7), 57 (18,9),
43 (CH_3CO^+ , 89,2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75,45 MHz , piridina- d_5) ppm: 20,40; 21,09 ($\text{CH}_3\text{CO-}$) ; 45,17 (C-3);
62,43 (C-6"); 69,02 (C-4"); 71,66 (C-5" ^a); 72,89 (C-2" ^a); 73,24
(C-3" ^a); 79,92 (C-2); 98,29 (C-1"); 103,08 (C-6); 106,44 (C-8);
110,36 (C-10); 126,84 (C-2', 6' y 4'); 129,05 (C-3' y 5'); 139,12
(C-1'); 162,46 (-5); 164,25 (C-9); 169,11 (C-7); 169,53; 169,77;
170,19; 170,31 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 188,73 (C-4).

(a): indica que los valores asignados pueden estar intercambiados.

Fracción 9 :

Esta fracción fue purificada en columna de sílicagel (B/MeOH/H₂O, 10:10:1),
reuniendo las fracciones fenólicas (reacción con Cl₃Fe= verde). El aislamiento
de los dos componentes de esta fracción (XIII y XIV) se llevó a cabo con colum-
nas de Sephadex LH-20, eluyendo con metanol. Uno de estos compuestos (XIII) se
identificó como quercetina-3-O-galactósido (XIII), mientras que el segundo re-
sultó ser un 3-O-diglicósido de quercetina (XIV), cuya caracterización no pudo
completarse, por carecer de suficiente material.

Quercetina-3-O-galactósido (XIII):

ccd: sílicagel; Rf= 0,53; acetato de etilo:MeOH:AcOH, 100:20:1 .

poliamida; Rf= 0,10; H₂O:BuOH:acetona:AcOH, 16:2:1:1 .

Cromatografía bidimensional: papel Whatman N° 1; t-BuOH:AcOH:H₂O, 3:1:1; Rf= 0,64
AcOH 15 % Rf= 0,43

Revelado: NH₃ (vapores), fluorescencia amarilla brillante en 366 nm.

Cl₃Fe 2 % en etanol: color verde (hidroxilos fenólicos).

SbCl₃ 10 % en Cl₃CH: fluorescencia amarilla a 366 nm (flavonol).

UV λ máx: 256, 266 (hombro), 295 y 356 nm; +AlCl₃= 275, 300 (hombro), 330 y 428 nm; +AlCl₃/ClH= 273, 298 (hombro), 353 y 395 nm; +CH₃ONa= 272, 330 y 385; +CH₃COONa= 272, 321 y 383 nm; +CH₃COONa/BO₃H₃= 263 y 370.

Hidrólisis ácida total de quercetina-3-O-galactósido (XIII):

El flavonoide (2 mg) fue hidrolizado calentando a reflujo con ClH 1 N (1 ml) durante 4 horas. Se extrajo la aglicona en medio ácido con acetato de etilo y el resto acuoso fue evaporado a sequedad. La cromatografía analítica contra testigos de azúcares (ccd: celulosa; BuOH;piridina:H₂O, 6:4:3 (dos desarrollos); rev. NO₃Ag/NH₃ y p-anisidina) mostró la presencia de D-galactosa, Rf= 0,51.

Quercetina (aglicona):

ccd: sílicagel; Rf= 0,55 ; B/Ac,2:1

Rf= 0,30 ; Cl₃CH/EtOH,95:5, comparada con testigo.

UV λ máx: 256, 268 (hombro), 288 y 372; +AlCl₃= 272, 306 (hombro) y 450 nm; +AlCl₃/ClH= 266, 292, 355 y 425 nm; +CH₃ONa= 245 (hombro), 285 y 327 nm (descomp.); +CH₃COONa= 255 (hombro), 275, 325 y 350 nm (descomp.); +CH₃COONa/BO₃H₃ (Proced. II)= 258, 275 (hombro), 300 y 388 nm.

EM m/e (%): 302 (M⁺, 100); 301 (M⁺-1, 21,0); 300 (M⁺-2, 16,5); 286 (M⁺-16, 10,0); 273 (M⁺-1-28, 28,0); 245 (273-28, 9,3); 192 (M⁺-(anillo B)-1, 19,5); 154 (RDA (anillo A)+2, 18,0); 153 (RDA (anillo A)+1, 20,5); 152 (RDA (anillo A), 20,0); 137 (fragm. B₂⁺, 61,2); 124 (152-28, 21,0); 109 (137-28, 34,3); 83 (15); 81 (17); 71 (45); 69 (40); 57 (68); 55 (70); 43 (28); 41 (74).

Fracción 10 :

Por recristalización de etanol del jarabe obtenido al evaporar esta fracción se obtuvieron agujas blancas de D-manitol (XV).

D-manitol (XV).

Pf : 166-168°C (EtOH).

UV : no absorbe .

IR (cm^{-1}) : 3330 (ens. O-H), 1420 y 1380 (defom. O-H), 1080 y 1010 (estiram. C-O), 960, 930, 880, 865, 785 y 700 (estiram. C-O y C-C).

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6): centr. 3,6 ppm (m, 4H, H-1 y 6); 4,15 ppm (d J=3 Hz, 2H, H-3 y 4) ; 4,40 ppm (m, 2H, H-2 y 5).

EM m/e (%): 182 (M^+ , 0,5), 164 (M^+-18 , 2,2), 151 (M^+-31 , 1,5), 146 ($M^+-18-18$, 2,5), 133 (151-18, 11,2); 121 (M^+-61 , 25,0), 115 (133-18, 5,5), 103 (121-18, 21,0), 91 (182-91, 7,5), 85 (103-18, 26,8), 73 (91-18, 100), 61 (42,3), 57 (73,7), 43 (53,5).

Hexaacetilmanitol (hexaacetato de XV).

Pf = 120-122°C

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, Cl_3CD) ppm: 4,20 (dq, 4H, H-1 y 6); 5,08 (m, 2H, H-2 y 5); 5,40 (d J= 4 Hz, 2H, H-3 y 4).

En experimentos de doble resonancia, por irradiación en 4,20 ppm, el multiplete en 5,08 se transforma en un dobléte (J= 4Hz) acoplado al de 5,40 ppm. Por irradiación en 5,1 ppm, el doble cuarteto centrado en 4,20 ppm, se transforma en dos dobletes de J= 6,5 Hz (acoplamiento geminal).

EM m/e (%): 434 (M^+ , 0,01), 374 (M^+-60 , 0,5), 359 (374-15, 3,8), 289 (rupt. C-4/C-5, 5,0), 259 (rupt. C-1/C-2-60-42, 7,2); 217 (rupt. C-3/C-4, 9,0), 187 (289-60-42, 11,0), 170 ($M^+-(3\times 60)-(2\times 42)$, 8,0), 157 (217-60), 145 (rupt, C-4/C-5, 14,5), 139 (259-(2x60), 13,0), 115 (217-

60-42, 19,0), 103 (145-42, 8,2), 97 (217-(2x60), 4,5), 85 (145-60, 4,0), 73 (rupt. C-1/C-2, 3,4), 43 (CH_3CO^+ , 100).

Se comparó por CGL contra testigo auténtico de hexaacetilmanitol en columna de ECNSS-M 3 %.

Estudio del extracto de acetato de etilo

Una porción del extracto metanólico suspendida en agua, se extrajo sucesivamente con cloroformo, acetato de etilo y butanol. El extracto de acetato de etilo tenía los compuestos X, XI y XII, encontrados en la fracción 6 de la columna del Precipitado 1, acompañados de dos sustancias terpenoidales (XVI y XVII). El rendimiento del extracto respecto a planta seca era de 0,7 %.

La purificación de los flavonoides acilados X a XII se efectuó por cromatografías iterativas en columnas de mediana presión con sílicagel H con mezclas de B/Ac de polaridad creciente como solvente, reuniendo las fracciones con un solo compuesto principal y reseparando las mixtas. Así se obtuvieron fracciones enriquecidas con los compuestos que se enumeran a continuación, aislados por posterior purificación de cada uno de ellas:

Fracción 1: aproximadamente 6 sustancias con reacción cromogénica de terpenos obtenidos en cantidades insuficientes para su estudio, 1%.

Fracción 2: pinocembrina-7-O- β -(2'''-O-acetil) neohesperidósido (XII), 14%,
Rf= 0,47.

Fracción 3: pinocembrina-7-O- β -(3'''-O-acetil) neohesperidósido (XI), 30 %,
Rf= 0,40.

Fracción 4: 7,8-dihidro-11-hidroxiponasterona A (XVII), 2 %, Rf= 0,37.

Fracción 5: pinocembrina-7-O- β -(6''-O-acetil) neohesperidósido (X), 7%, Rf= 0,34.

Fracción 6: ecdisterona (XVI), 4 %, Rf= 0,24.

Fracción 7: pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII) 41 %, Rf= 0,12.

Los porcentajes de las fracciones están referidos al extracto y los Rfs. a la cromatografía analítica en sílicagel con B/Ac, 1:2, como solvente.

Pinocembrina-7-O- β -(2'''-O-acetil) neohesperidósido (XII):

Pf = 133-135°C (benceno/acetona) $[\alpha]_D^{25} = -62,2^\circ$ (c 0,2, piridina)

UV λ máx.: 285 y 328 nm; +AlCl₃ = 308 y 379 nm; +AlCl₃/ClH = 308 y 376 nm;
+CH₃ONa = 285 y 358 nm; +CH₃COONa = 285 y 328 nm; +CH₃COONa/BO₃H₃ =
285 y 328 nm. (superponible al de pinocembrina-7-O-neohesperidósido)

IR (cm⁻¹): 3300 (tens. O-H), 2860 (tens. C-H), 1720 (tens. C=O, éster), 1630
(tens. C=O, flavonoide), 1580, 1547, 1500, 1450, 1375 (tens. C=C,
aromática), 1300, 1240, 1170, 1120 (deform. O-H), 1075 (estiram.
C-O), 990, 950, 890, 850, 810, 770, 740 y 700 (estiram. C=C, seña-
les de anillo aromático polisustituído).

¹H-RMN (60 MHz, DMSO-d₆) ppm: 1,18 (d J = 6 Hz, 3H, H-6'''); 2,03 (s, 3H, CH₃CO)
2,60 y 3,0 (dq, 2H, H-3); 3,0-4,0 (m, 9H, H de azúcares); 4,4-5,2
(m, 3H, H-1'', H-1''' y H-2'''); 5,7 (dd J = 4 y 12 Hz, 1H, H-2);
6,13 (d J = 2 Hz, 1H, H-6); 6,19 (d J = 2 Hz, 1H, H-8); 7,47 (m, 5H,
H del anillo B).

¹H-RMN (300 MHz, piridina-d₅) ppm: 1,75 (d J = 6 Hz, 3H, H-6'''), 2,0 (s, 3H,
CH₃CO-); 2,91 y 3,25 (dq J gem = 17 Hz, J anti = 12 Hz, J gauche = 4 Hz,
2H, H-3); 4,1-4,1 (m, 7H, H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-4''' y H-5'''),
4,64 (dd J = 3,5 y 6,5 Hz, 1H, H-3'''); 4,73 (dd J = 6,5 y 6,5 Hz,
1H, H-2''); 5,40 (dd J = 4 y 12 Hz, 1H, H-2); 5,69 (d J = 6,5 Hz, 1H,
H-1''); 6,04 (dd J = 1,5 y 3,5 Hz, 1H, H-2'''); 6,25 (d J = 1,5 Hz,
1H, H-1'''); 6,62 (d J = 2 Hz, 1H, H-6); 6,68 (d J = 2 Hz, 1H, H-8),
7,43 y 7,60 (m, 5H, H del anillo B).

EM m/e (%): 606 (M⁺, 0,5); 257 (pinocembrina+H, 35,0); 256 (pinocembrina, 100),
255 (pinocembrina+H, 67,2); 238 (256-18, 1,5); 189 (oxonio de mo-
noacetilramnosa, 42,3); 179 (pinocembrina-77, 94,8); 171 (189-18,
41,0); 153 (171-18, 37,0); 152 (RDA, anillo A, 70,5); 147 (189-42,
14,2); 129 (189-60, 52,0); 124 (152-28, 42,0); 111 (129-18, 34,7);

104 (RDA, anillo B, 23,0); 97 (18,1), 95 (22,3), 91 (33,3), 85 (46,5), 73 (39,8), 71 (36,1), 69 (38,3), 60 (30,0), 57 (42,5), 55 (40,5), 43 (CH_3CO^+ , 90,0) y 41 (41,5), fragmentos de azúcar.

$^{13}\text{C-RMN}$ (25,2 MHz, DMSO-d_6) ppm: 17,79 (C-6'''); 20,65 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 42,07 (C-3); 60,33 (C-6''); 68,2 (C-5'''); 68,48 (C-3'''); 69,6 (C-4''); 72,07 (C-2''' y C-4'''); 76,4 (C-2''^a); 76,5 (C-5''^a); 76,8 (C-3''^a); 78,5 (C-2); 95,1 (C-6); 96,4 (C-8); 97,04 (C-1'' y C-1'''); 103,32 (C-10); 126,6 (C-2' y 6'); 128,0 (C-3' y 5'); 128,51 (C-4'); 142,0 (C-1'); 162,46 (C-9); 162,85 (C-5); 164,72 (C-7); 169,56 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 196,66 (C-4).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75,45 MHz, piridina- d_5) ppm: 18,57 (C-6'''); 21,05 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 42,50 (C-3); 61,78 (C-6''); 69,83 (C-5'''); 70,90 (C-4''); 70,17 (C-3'''); 73,79 (C-2''' y C-4'''); 77,79 (C-2''^a); 78,35 (C-5''^a); 78,54 (C-3''^a); 79,40 (C-2); 96,28 (C-6); 97,70 (C-8); 99,14 (C-1'''); 99,20 (C-1''); 104,36 (C-10); 126,83 (C-2' y 6'); 129,10 (C-4'); 129,30 (C-3' y 5'); 139,10 (C-1'); 163,38 (C-9); 164,10 (C-5); 165,99 (C-7); 171,08 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 196,80 (C-4).

(a): indica que los valores asignados pueden estar intercambiados.

Acetilación de XII: El producto obtenido resultó idéntico (ccd, IR y $^1\text{H-RMN}$ superponibles) con heptaacetato de pinocembrina-7-O-neohesperidósido.

Desacetilación de XII: El flavonoide disuelto en metanol con agregado de una solución 1,8 N de metóxido de sodio, se dejó reaccionar 20 minutos a 0°C.

Luego de ese tiempo, la solución fue neutralizada con ácido acético, diluida con agua y extraída con acetato de etilo. El producto obtenido resultó idéntico a pinocembrina-7-O-neohesperidósido.

Trimetilsilil derivado de XII:

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, Cl_3CD) ppm: 1,21 (d $J=6$ Hz, 3H, H-6'''); 2,06 (s, 3H, CH_3CO); centr. 2,85 (dq, 2H, H-3); 3,30-4,10 (m, 7H, H de azúcares);

4,96 (d $J = 2$ Hz , 1H, H-1'''); 5,07 (d $J = 7$ Hz , 1H, H-1''); 5,12 (dd $J_{ee} = 2$ Hz , $J_{ea} = 4$ Hz , 1H, H-2'''); 5,30 (dd $J = 4$ y 12 Hz ; 1H, H-2); 6,03 (d $J = 2$ Hz , 1H, H-6); 6,35 (d $J = 2$ Hz , 1H, H-8); 7,36 (m, 5H, H del anillo B).

EM m/e (%): 711 (TMS monoacetilneohesperidosa, 2,0); 689 (TMS pinocembrina-7-glucósido, 1,2); 651 (711-60, 0,9); 621 (711-TMSiOH, 13,0); 561 (621-60, 5,2); 471 (561-TMSiOH, 6,0); 421 (TMS acetilramnosa-H, 4,3); 400 (TMS pinocembrina, 5,0); 385 (400-15, 7,3); 333 (421+H-TMSiOH, 52,1); 328 (400+H-TMSi, 28,3); 313 (328-15, 10,5); 273 (333-60, 32,0); 261 (333-TMSi+H, 8,1); 256 (pinocembrina, 1,0); 243 (333-TMSiOH, 98,2); 103 (ROA, anillo B, 7,5); 73 (TMSi, 100).

Hidrólisis ácida de XII: Se llevó a cabo de igual modo que con pinocembrina-7-O-neohesperidósido. Los productos obtenidos fueron caracterizados como pinocembrina, D-glucosa y L-ramnosa.

Pinocembrina-7-O- β -(3'''-O-acetil) neohesperidósido (XI):

Pf : 138-141°C

UV : superponible al de pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII).

IR (cm^{-1}): 3300 (tens. O-H); 2850 (tens. C-C); 1720 (tens. C=O, éster); 1630 (tens. C=O del flavonoide); 1575, 1510, 1450, 1380 (tens. C=C, aromática); 1360, 1305, 1250, 1115 (deform. O-H); 1075 (estiram. C-O); 990, 945, 895, 840, 800, 775, 738 y 703 (estiram. C=C, señales de anillo aromático polisustituído).

$^1\text{H-RMN}$ (60 MHz, DMSO- d_6) ppm: 1,20 (d $J = 6$ Hz , 3H, H-6'''); 2,0 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$); 2,8 y 3,35 (dq, 2H, H-3); 3,30-4,0 (m, 9H, H de azúcares); 4,40-5,20 (m, 3H, H-1'', H-1''' y H-3'''); 5,70 (dd $J = 4$ y 12 Hz, 1H, H-2); 6,15 (d $J = 2$ Hz , 1H, H-6); 6,19 (d $J = 2$ Hz , 1H, H-8); 7,47 (m, 5H, H del anillo B).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, piridina- d_5) ppm: 1,80 (d $J=6$ Hz, 3H, H-6'''); 2,02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$); centri: 3,05 (dq, 2H, H-3); 4,0-4,45 (m, 7H, H de azúcar); 4,54 (dd dos $J_{aa}=9$ Hz., 1H, H-2''); 5,0 (dd $J_{ee}=1,5$ Hz., $J_{ae}=3$ Hz. 1H, H-2'''); 5,40 (dd $J=4$ y 12 Hz., 1H, H-2); 5,73 (d $J=10$ Hz., 1H, H-1''); 5,83 (dd $J=3$ y 10 Hz., 1H, H-3'''); 6,34 (d $J=1,5$ Hz. 1H, H-1'''); 6,63 (d $J=2$ Hz., 1H, H-6); 6,68 (d $J=2$ Hz., 1H, H-8); 7,40 y 7,56 (m, 5H, H del anillo B).

EM m/e (%): 606 (M^+ , 0,3); 256 (pinocembrina, 100); 255 (pinocembrina-H, 71,0); 189 (oxonio de monoacetilramnosa, 47,5); 179 (pinocembrina-77, 89,8); 171 (189-18, 40,5); 152 (RDA, anillo A, 64,0); 147 (189-42, 16,2); 129 (189-60, 55,0); 124 (152-28, 43,7); 111 (129-18, 32,0); 104 (RDA, anillo B, 17,6); 95 (25,0); 91 (34,3); 85 (35,5); 73 (41); 71 (30,1); 60 (45,5); 43 (87,6), fragmentos de azúcar.

$^{13}\text{C-RMN}$ (25,2 MHz, DMSO- d_6) ppm: 17,83 (C-6'''); 21,04 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 42,13 (C-3); 60,34 (C-6''); 68,27 (C-5'' y C-2'''); 69,50 (C-4'' y C-4'''); 74,20 (C-3'''); 76,40 (C-2''^a); 76,5 (C-5''^a); 78,5 (C-3''^a y C-2); 95,10 (C-6); 96,4 (C-8); 97,04 (C-1''); 100,36 (C-1'''); 103,32 (C-10); 126,60 (C-2' y 6'); 128,0 (C-5' y 3'); 128,53 (C-4'); 138,40 (C-1'); 162,48 (C-9); 162,85 (C-5); 164,71 (C-7); 170,05 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 196,66 (C-4).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75,45 MHz, piridina- d_5) ppm: 18,80 (C-6'''); 21,06 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 43,00 (C-3); 62,00 (C-6''); 69,86 (C-5'''); 70,10 (C-2'''); 70,70 (C-4'''); 71,08 (C-4'''); 76,50 (C-3'''); 78,30 (C-2''^a); 78,90 (C-3'' y 5''^a); 79,44 (C-2); 96,19 (C-6); 97,80 (C-8); 99,00 (C-1''); 102,66 (C-1'''); 104,30 (C-10); 126,80 (C-2' y 6'); 128,99 (C-4'); 129,11 (C-3' y 5'); 139,36 (C-1'); 163,35 (C-9); 164,40 (C-5); 166,11 (C-7); 170,84 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 196,61 (C-4).

Acetilación de XI: Por acetilación se obtuvo un producto idéntico al heptaacetato de pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido (ccd, IR y $^1\text{H-RMN}$ superponibles).

Desacetilación de XI: se realizó del modo descrito anteriormente y nuevamente condujo a la obtención de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII).

Trimetilsilil derivado de XI:

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, Cl_3CD) ppm: 1,18 (d J=6 Hz, 3H, H-6'''); 2,06 (s, 3H, CH_3CO); centr. 2,9 (dq, 2H, H-3); 3,45-4,10 (m, 9H, H del azúcar); 4,85-5,10 (m, 3H, H-1''', H-1'' y H-3'''); 5,25 (dd J=4 y 12 Hz, 1H, H-2); 6,03 (d J=2 Hz, 1H, H-6); 6,30 (d J=2 Hz, 1H, H-8); 7,34 (m, 5H, H del anillo B).

EM m/e (%): 711 (TMS monoacetilneohesperidosa, 1,3); 690 (TMS pinocembrina-7-O-glucósido-TMSiO+H, 1,0); 651 (711-60, 1,5); 621 (711-TMSiOH, 14,0); 561 (621-60, 7,0); 471 (561-TMSiOH, 2,0); 421 (TMS acetilramnosa, 2,6); 400 (TMS pinocembrina, 2,0); 385 (400-15, 6,5); 333 (421+H-TMSiO, 55,5); 328 (400+H-TMS, 37,0); 313 (328-15, 19,6); 273 (333-60, 40,2); 261 (333-TMSi+H, 10,0); 256 (pinocembrina, 1,5); 243 (333-TMSiOH, 98,0); 201 (273-TMSi, 30,5); 73 (TMSi, 100).

Hidrólisis ácida total de XI: Los productos obtenidos resultaron ser pinocembrina (5,7-dihydroxiflavanona), D-glucosa y L-ramnosa, tal como se habían caracterizado en los anteriores glicósidos.

Pinocembrina-7-O- β -(6''-O-acetil) neohesperidósido (X):

UV: tanto el espectro en metanol como con los reactivos de desplazamiento, resultaron superponibles con los de pinocembrina-7-O-neohesperidósido (VII).

$^1\text{H-RMN}$ (60 MHz, DMSO-d_6) ppm: 1,15 (d J=6,5 Hz., 3H, H-6'''); 1,95 (s, 3H, CH_3CO -); 2,9 (m, 2H, H-3); 3,0-4,4 (m, 10H, H de azúcares), 4,6 (m, 1H, H-1''); 5,12 (m, 1H, H-1'''); 5,7 (dd J=4 y 12 Hz., 1H, H-2); 6,15 (m, 2H, H-6 y H-8); 7,5 (m, 5H, H del anillo B).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, piridina- d_5) ppm: 1,78 (d J=6 Hz, 3H, H-6'''); 1,98 (s, 3H, CH_3CO -); 2,90 y 3,30 (dq, 2H, H-3); 4,0-5,0 (m, 10H, H de azúcares);

5,45 (dd $J = 4$ y 12 Hz, 1H, H-2); 5,73 (d $J = 10$ Hz, 1H, H-1"); 6,38 (d $J = 1,5$ Hz, 1H, H-1'''); 6,67 (d $J = 2$ Hz, 1H, H-6); 6,72 (d $J = 2$ Hz, 1H, H-8); 7,40 y 7,55 (m, 5H, H del anillo B).

$^{13}\text{C-AMN}$ (25,2 MHz, DMSO- d_6) ppm: 17,93 (C-6'''); 20,80 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 42,18 (C-3); 62,30 (C-6"); 68,30 (C-5'''); 70,05 (C-4"); 70,33 (C-3'''^a); 70,44 (C-2'''^a); 71,84 (C-4'''); 73,66 (C-5"); 76,14 (C-2''^b); 76,96 (C-3''^b); 78,70 (C-2); 95,26 (C-6); 96,55 (C-8); 97,38 (C-1''); 100,42 (C-1'''); 103,35 (C-10); 126,60 (C-2' y 6'); 126,88 (C-3' y 5'); 128,5 (C-4'); 138,37 (C-1'); 162,55 (C-9); 162,83 (C-5); 164,63 (C-7); 169,65 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 196,71 (C-4).

$^{13}\text{C-AMN}$ (75,45 MHz, piridina- d_5) ppm: 18,61 (C-6'''); 20,80 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 43,50 (C-3); 64,20 (C-6"); 69,90 (C-5'''); 71,27 (C-4"); 72,30 (C-3'''^a); 72,71 (C-2'''^a); 74,02 (C-4'''); 75,61 (C-5"); 77,55 (C-2''^b); 79,00 (C-3''^b); 79,60 (C-2); 96,40 (C-6); 97,78 (C-8); 99,46 (C-1"); 102,45 (C-1'''); 104,46 (C-10); 126,83 (C-2' y 6'); 129,08 (C-4', C-3' y C-5'); 139,00 (C-1'); 163,35 (C-9); 164,50 (C-5); 166,08 (C-7); 170,10 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 196,64 (C-4).

(a) (b): indica que los valores asignados pueden estar intercambiados.

Acetilación de X: Produjo el heptaacetato de pinocembrina-7-O-neohesperidósido.

Desacetilación de X: Por desacetilación se obtuvo pinocembrina-7-O-neohesperidósido.

Trimetilsilil derivado de X:

$^1\text{H-AMN}$ (60 MHz, Cl_3CD) ppm: 1,16 (d $J = 6$ Hz, 3H, H-6'''); 1,90 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$); 2,8 y 3,2 (dq, 2H, H-3); 3,4-4,1 (m, 8H, H de azúcar); 4,35 (m, 2H, H-6"); 4,90 (m, 1H, H-1'''); 5,10 (d $J = 8$ Hz, 1H, H-1"); 5,40 (dd $J = 4$ y 12 Hz, 1H, H-2); 6,10 (d $J = 2$ Hz, 1H, H-6); 6,30 (d $J = 2$ Hz, 1H, H-8); 7,35 (m, 5H, H del anillo B).

EM m/e (%): 711 (TMS monoacetilneohesperidosa, 4,3); 651 (711-60, 1,0); 621 (711-TMSiOH, 4,0), 620 (711-H-TMSiOH, 5,2); 579 (621-42, 3,0); 561 (621-60, 1,9); 489 (621-42-TMSiOH, 3,8); 451 (TMS ramnosa-H, 9,0); 400 (TMS pinocembrina, 3,3); 385 (400-15, 3,1); 363 (451+H-TMSiO, 27,5); 328 (400+H-TMSi, 3,5); 313 (328-15, 3,7); 273 (363-TMSiOH, 16,0); 147 (oxonio de ramnosa, 25,0); 95 (24,0); 93 (66,7); 73 (TMS, 100).

Hidrólisis ácida total de X: Se obtuvieron como productos pinocembrina, D-glucosa y L-ramnosa.

Comprobación química de las estructuras de los flavonoides acilados XI y XII.

i) Metilación con triflato de metilo de una mezcla de los flavonoides XI y XII:

Una mezcla de los flavonoides XI y XII (30 mg), previamente secada dos días al vacío a 60°C con P_2O_5 , fue disuelta en 6 ml de $PO_4(CH_3)_3$ y se le agregaron 450 microlitros de 2,6-diterbutilpiridina y 300 microlitros de trifluormetansulfonato de metilo ($F_3C-SO_2-OCH_3$). La mezcla se mantuvo a 50°C, con agitación durante 2,5 horas. Al cabo de ese tiempo, se le agregaron 20 ml de cloroformo y 80 ml de agua, separándose la fase clorofórmica (incolora). Esta fase fue seca con SO_4Na_2 , concentrada y purificada en columna de Sephadex LH-20 con metanol como eluyente.

La fracción de los flavonoides acilados permetilados, fue hidrolizada por calentamiento a 80 °C a reflujo durante 10 horas, con 5 ml de SO_4H_2 10 N/ ácido acético glacial(1:19). Los azúcares metilados se extrajeron, juntamente con la aglicona, con acetato de etilo. Este extracto se purificó (dos veces), con resina de intercambio aniónica débil AG3x4A (Dowex 3, forma OH^-) eluyendo con metanol. El residuo, disuelto en 0,2 ml de agua, alcalinizado con amoníaco, fue tratado de la manera descripta al comienzo de este capítulo para formar los correspondientes alditoles acetilados. Estos alditoles parcialmente metilados acetilados se analizaron por CGL y CGL-EM en columna de ECNSS-M 3% en condicio-

nes isotérmicas a 140 °C en CGL y en condiciones de temperatura programada de 140 hasta 180°C en CGL-EM.

El cromatograma gas-líquido mostró tres compuestos identificados como:

3,4-dimetil-1,2,5-triacetilramnitol:

T_g (tiempo de retención relativo al de 1,5-diacetil-2,3,4,6-tetrametilglucitol)

$T_g = 0,89$

EM (CGL-EM) m/e (%): 189 (rupt. C-3/C-4 (C-1,2 y 3), 20,2); 131 (rupt. C-3/C-4 (C-4,5 y 6), 76,2); 129 (189-60, 54,2); 99 (129-30, 16,1); 89 (131-42, 42,3); 87 (129-42, 26,3); 71 (131-60, 6,5); 43 (CH_3CO^+ , 100).

2,4-dimetil-1,3,5-triacetilramnitol:

$T_g = 0,96$

EM (CGL-EM) m/e (%): 233 (rupt. C-4/C-5, 27,1); 201 (233-32, 14,6); 173 (233-60, 3,8); 161 (233-30-42, 6,6); 127 (201-42-32, 13,4); 117 (rupt. C-2/C-3 (C-1 y 2), 100); 101 (173-30-42, 45,0); 45 (10,6).

1,2,5-triacetil-3,4,6-trimetilglucitol:

$T_g = 2,0$

EM (CGL-EM) m/e (%): 189 (rupt. C-3/C-4 (C-1,2 y 3), 21,8); 161 (rupt. C-3/C-4 (C-4,5 y 6), 19,0); 129 (189-60 y 161-32, 100); 101 (161-60, 14,6); 99 (189-60-30, 9,5); 87 (189-60-42, 23,0); 71 (161-60-30, 10,5); 57 (12,3); 55 (13,1); 45 (25,0); 43 (83,9); 41 (20,3).

ii) Síntesis de metilramnitoles testigos

Se llevó a cabo por metilación parcial de metil ramnósido con yoduro de metilo en metanol, con agregado de Ag_2O como catalizador (metilación de Purdie (180, 271) , separación posterior de los metil ramnósidos con distintos grados de metilación, hidrólisis y la secuencia ya descrita para la obtención de ramnitoles con distintos esquemas de metilación.

Obtención del metil ramnósido (272):

Se agregaron 0,55 g de resina de intercambio catiónica Dowex 50 (forma H^+), equilibrada previamente en metanol, sobre 1,0 g de L-ramnosa disuelta en 5,4 ml de metanol anhidro, dejando reaccionar durante una noche, a reflujo, con agitación. Luego de ese tiempo, se filtró la resina y, por concentración a sequedad, se obtuvo el metil ramnósido como un jarabe que no pudo cristalizarse y, al que, luego de liofilización, se sometió a la metilación de Purdie.

Metilación de Purdie (180, 271):

Se disolvió el metil ramnósido en 4,5 ml de metanol anhidro y luego se agregó, con agitación, 3,4 g de Ag_2O recientemente preparado y 1,8 ml de CH_3I . Se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante 4 horas y pasado ese tiempo, se filtró la mezcla de reacción. Las sales de plata, insolubles, se refluaron con cloroformo y estos extractos se reunieron al filtrado y, en conjunto, se evaporaron a sequedad. Así fueron obtenidos, metil ramnósidos con distintos grados de metilación, que se separaron en columna de sílicagel con cloroformo: metanol(97:3) como solvente.

Cada fracción de esta columna se hidrolizó con SO_4H_2 0,2 N durante 3 horas a reflujo. Luego de llevar la mezcla de hidrólisis a pH levemente alcalino, se redujeron los azúcares parcialmente metilados de cada fracción, acetilando a continuación esos alditoles.

Las distintas fracciones de alditoles parcialmente metilados y acetilados obtenidas, se analizaron por OGL y OGL-EM. En una de ellas se encontraba una mezcla de 2,3-dimetil-1,4,5-triacetilramnitol y 3,4-dimetil-1,2,5-triacetilramnitol (T_g 0,99 y 0,89 respectivamente) como compuestos mayoritarios. Este último resultó totalmente coincidente con uno de los ramnitales obtenidos por metilación, hidrólisis, reducción y acetilación de la mezcla de flavonoides acetilados XI y XII. El primero, no coincidía con el otro ramnitol obtenido de los flavonoides naturales, ni en cuanto a su T_g , ni en su espectro de masas. Por consiguiente, el segundo ramnitol proveniente de los flavonoides se caracterizó como 2,4-dimetil-1,3,5-triacetilramnitol.

Ecdisterona (XVI):

La fracción del extracto de acetato de etilo enriquecida con el compuesto terpenoidal XVI, fue sometida a purificación en columna de alúmina neutra, eluyendo con metanol, condiciones en que las sustancias de naturaleza flavonoidica quedaban retenidas, y posterior columna de sílicagel con acetato de etilo:metanol(9:1) como solvente, aislándose de este modo el compuesto XVI, ecdisterona.

Ecdisterona

Pf : 235-240°C (B/Ac)

UV λ máx.: 242 nm (metanol).

: 240 y 300 nm (luego del tratamiento con MeOH/ClH a 70°C, 15 min.)

IR (cm^{-1}): 3560 (tens. O-H); 2860 (tens. C-H); 1660 y 1640 (tens. C=O y C=C respectivamente del sistema 7-en-6-ona); 1460, 1445, 1380 (flex. asimétrica y simétrica de metilo); 1320, 1270, 1230 1215 (deform. O-H); 1075, 1060, 1030 (estiram. C-O); 885 y 682 (absorc. de doble enlace).

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, acetona- d_6) ppm : 0,90 (s, 3H, CH_3 -19); 0,93 (s, 3H, CH_3 -18); 1,18 (s, 9H, CH_3 -21, 26 y 27); 1,0-2,0 (m, 16H, metilenos); centr. 2,3 (m, 2H, metinos); 3,10-3,85 (m, 3H, H-2, H-3 y H-22); 5,65 (d $J=4$ Hz, 1H, H-7).

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, piridina- d_5) ppm: 1,04 (s, 3H, CH_3 -19); 1,18 (s, 3H, CH_3 -18); 1,37 (s, 6H, CH_3 -26 y 27); 1,56 (s, 3H, CH_3 -21); 1,70-2,60 (m, 14H, metilenos); centr. 2,95 (m, 2H, metinos); 3,50 (t, 1H, H-17); 3,82 (dd $J=3$ y 6 Hz, 1H, H-22); 4,18 (m, 2H, H-2 y 3); 6,18 (d $J=4$ Hz, 1H, H-7).

EM m/e (%): 462 (M^+ -18, 2,0); 444 (462-18, 8,3); 429 (444-15, 10,0); 426 (444-18, 36,5); 411 (426-15, 5,2); 408 (426-18, 17,0); 393 (408-15, 9,5); 363 (M^+ -117 (cad. lat.), 27,6); 345 (363-18, 79,2); 344 (363-18-1, 73,0); 327 (345-18, 66,6); 309 (327-18, 17,0); 301 (M^+ -(C-20 a C-27)-

18, 20,3); 300 (M^+ -(C-20 a C-27)-18-1, 39,0); 285 (300-15, 24,5); 173 (C-17 a C-27)-H, 31,2); 161 (C-20 a C-22, 10,0); 143 (161-18, 30,5); 125 (143-18, 18,0); 117 (C-22 a C-27, 4,5); 99 (117-18, 100); 81 (99-18, 69,0); 71 (22,5); 69 (27,8); 59 (30,2); 57 (18,0); 56 (16,1); 55 (28,7); 43 (93,8).

$^{13}\text{C-RMN}$ (25,2 MHz , piridina- d_5) ppm: 17,63 (C-18); 20,80 (C-11); 21,17 (C-21); 24,12 (C-19); 27,09 (C-12); 29,54 y 29,75 (C-26 y 27); 31,34 (C-15 a); 31,66 (C-16 a); 32,13 (C-4); 34,14 (C-9); 37,44 (C-1); 38,38 (C-10); 42,19 (C-24); 47,77 (C-13); 49,74 (C-17 y C-23); 51,05 (C-5); 67,72 (C-2 b); 67,85 (C-3 b); 69,48 (C-25); 76,65 (C-20); 77,28 (C-22); 83,90 (C-14); 121,20 (C-7); 165,96 (C-8); 203,52 (C-6).

(a) (b): indica que los valores asignados pueden estar intercambiados.

Triacetato de ecdisterona (2,3,22-triacetoxiecdisterona)

$^1\text{H-RMN}$ (60 MHz , Cl_3CD) ppm: 0,85 (s, 3H, CH_3 -18); 1,03 (s, 3H, CH_3 -19); 1,20 y 1,21 (2 s, 6H, CH_3 -26 y 27); 1,24 (s, 3H, CH_3 -21); 1,20-2,20 (m, 16H, metilenos); 1,97 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$); 2,08 (s, 6H, 2 $\text{CH}_3\text{CO-}$); 2,34 (m, 1H, H-5); 2,50 a 2,90 (m, 1H, H-17); 3,12 (m, 1H, H-9); 4,80 (dd $J=4$ y 8 Hz , 1H, H-22); 5,25 (m, 2H, H-2 y H-3); 5,80 (d $J=2\text{Hz}$, 1H, H-7).

EM m/e (%): 528 (M^+ -60-18, 4,5); 510 (528-18, 16,0); 495 (510-15, 7,6); 492 (510-18, 8,5); 477 (492-15, 3,0); 450 (510-60, 2,2); 437 (510-(C-24 a C-27), 5,3); 385 (M^+ -(C-20 a C-27)-18, 10,0); 334 (437-1-60-42, 11,0); 185 (C-20 a C-27)-18, 7,6); 173 (11,1); 167 (185-18, 6,7); 125 (185-60, 14,7); 123 (C-22 a C-27)-18-18, 10,5); 99 (C-22 a C-27-60, 13,6); 81 (99-18, 30,3); 79 (11,0); 69 (41,5); 67 (11,7); 59 (14,8); 55 (25,3); 43 (CH_3CO^+ , 100).

7,8-dihidro-11-hidroxioponasterona A (XVII):

Se obtuvo de la fracción 4 del extracto de acetato de etilo. Su aislamiento requirió una columna de alúmina neutra como se describió para ecdisterona (XVI) y la purificación se realizó por medio de una columna de sílicagel con acetato de etilo:metanol(98:2; 95:5 y 90:10) como solventes.

UV = no absorbe.

IR (cm^{-1}) : 3350 (tens. O-H); 2870 (tens. C-C); 1695 (tens. C=O); 1445 y 1375 (flex. asimétrica y simétrica del metilo); 1265, 1230, 1215 y 1200 (deform. O-H); 1095 (estiram. C-O); 1010 (estiram. C-O); 860 (estiram. C-C).

$^1\text{H-RMN}$ (60 MHz , piridina- d_5) ppm: 0,82 (d $J= 6$ Hz , 6H, CH_3 -26 y 27); 1,23 (s, 3H, CH_3 -18); 1,40 (s, 3H, CH_3 -19); 1,53 (s, 3H, CH_3 -21); 1,4-3,5 (multipletes, 18H, metilenos y metinos de esqueleto); 4,3; 4,6 y 4,7 (multipletes, 4H, H-2, H-3, H-11 y H-22).

EM m/e (%) : 467 (M^+ -15, 2,2); 464 (M^+ -18, 5,1); 428 (M^+ -(3x18), 2,1); 413 (428-15, 2,0); 381 (M^+ -C-22 a C-27, 3,7); 363 (381-18, 84,0); 345 (363-18, 40,5); 327 (345-18, 28,2); 309 (327-18, 15,5); 285 (8,1); 267 (10,2); 189 (12,0); 157 (C-17 a C-27-H, 11,4); 145 (C-20 a C-27, 40,5); 127 (145-18, 9,0); 109 (127-18, 32,5); 101 (C-22 a C-27, 2,0); 83 (101-18, 75,0); 71 (35,6); 67 (33,0); 55 (100); 43 (94).

Tetraacetato de XVII:

$^1\text{H-RMN}$ (60 MHz , Cl_3CD) ppm: 0,83 (s, 3H, CH_3 -18); 0,90 (s, 3H, CH_3 -19); 1,05 (d $J= 6$ Hz , 6H, CH_3 -26 y 27); 1,21 (s, 3H, CH_3 -21); 1,90; 1,98; 2,02 y 2,08 (4 singuletes, 12H, 4 CH_3CO -); 1,2-2,7 (m, metilenos y metinos de esqueleto); 4,80 (m, 1H, H-22); 5,15 y 5,30 (m, 2H, H-2 y H-3); 5,40 (m, 1H, H-11).

Marcha separativa para el estudio de los alcaloides de la planta.

El filtrado del Precipitado 1 proveniente del extracto metanólico, fue concentrado y volcado sobre 1 litro de solución de ClH 0,1 N, dejándolo reposar y filtrando el precipitado así obtenido.

La solución acuosa ácida se extrajo sucesivamente con éter etílico y cloroformo. La fase acuosa de estas extracciones se llevó a pH 10 con amoníaco y se extrajo nuevamente a ese pH con éter etílico y cloroformo.

Se llevó, luego, la fase acuosa a pH 12 con CO_3K_2 y se precipitaron los alcaloides cuaternarios como sales del anión complejo de la sal de Reinecke ($\text{Cr}(\text{SCN})_4(\text{NH}_3)_2\text{NH}_4$). Se obtuvo un reineckato a pH 12 (rosado) como un precipitado muy abundante que se filtró. El filtrado se llevó a pH 8, y se repitió el tratamiento con la sal de Reinecke, obteniéndose un reineckato a pH 8 mucho menos abundante que fue filtrado. El filtrado fue llevado luego, sucesivamente a pH 5 y pH 1 y fue repetido el tratamiento con la sal de Reinecke, pero no se obtuvieron reineckatos a ninguno de estos pHs.

Los reineckatos obtenidos se trataron con resina de intercambio aniónica fuertemente alcalina Amberlite IRA 400 (forma OH^-) para obtener los alcaloides cuaternarios como sus hidróxidos y así liberarlos del anión complejo que permitió su separación.

Estudio del extracto etéreo a pH 10. (0,07 % respecto a planta seca).

Se realizó la separación de sus componentes mediante una columna de alúmina neutra con mezclas de benceno-cloroformo, cloroformo-metanol y metanol-agua de polaridades crecientes. Se obtuvieron de este modo cuatro fracciones principales, que se estudiaron como se detalla a continuación:

Fracción 1: Fue analizada por CGL y CGL-EM, identificándose entre sus componentes norhigrina (XVIII) e higrina (XIX); Tiempos de retención 7,31 y 7,77 respectivamente, en CGL en columna de Apiezon (con N-FID) en condiciones isotérmicas a 50°C .

Norhigrina (XVIII):

EM (CGL-EM) m/e (%): 127 (M^+ , 4,5); 112 (M^+-15 , 19,2); 84 (M^+-43 , 15,0); 70 (M^+-57 , ión pirrolidinio, 100); 56 ($CH_2=\overset{+}{N}H-CH=CH_2$, 10,5); 44 (40,3); 42 ($CH_2-\overset{+}{N}H=CH$, 44,0); 31 (43,0).

Higrina (XIX):

EM (CGL-EM) m/e (%): 141 (M^+ , 12,5); 126 (M^+-15 , 33,0); 98 (M^+-43 , 15,2); 84 (M^+-57 , ión N-metilpirrolidinio, 100); 70 ($CH_2=\overset{+}{N}(CH_3)-CH=CH_2$, 9,3); 56 ($CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)=CH$, 12,0); 44 (34,0); 42 ($CH=\overset{+}{N}-CH_3$, 88,5); 31 (20).

Síntesis de higrina: Se llevó a cabo por condensación del ácido acetondicarboxílico con el alcohol resultante de la reducción de N-metil-2-pirrolidona con H_4LiAl , a pH 7 y temperatura ambiente, durante 40 horas (267).

Síntesis del ácido acetondicarboxílico

Fue realizada según la técnica descripta (273). Se hizo reaccionar a $-5^\circ C$, 78 ml de ácido sulfúrico fumante con 35 g de ácido cítrico, agregado en pequeñas porciones. Luego del agregado, se permitió alcanzar la temperatura ambiente a la mezcla de reacción y entonces, se calentó en baño de agua a $30^\circ C$ hasta que cesó el desprendimiento gaseoso. El aislamiento del producto se realizó por agregado de hielo molido a la mezcla de reacción enfriada a $0^\circ C$ y filtración rápida del precipitado blanco de ácido acetondicarboxílico formado. Este compuesto es estable alrededor de una semana en desecador (Rend. 68,0%).

Síntesis de higrina y cuscohigrina (267).

Se disolvieron 10,9 g de N-metil-2-pirrolidona en éter anhidro y se agregaron 2,0 g de H_4LiAl , dejándolos reaccionar durante 1 hora a reflujo en baño de agua. Entonces, se enfrió la mezcla a $0^\circ C$ y se agregó lentamente, una solución de 10,02 g de ácido acetondicarboxílico en 700 ml de solución tampón de fosfatos a pH 7. Se neutralizó finalmente con NaOH 1 N, hasta llevar a pH 7-8 y se eliminó el éter etílico a presión reducida.

Después de 40 horas de reacción a temperatura ambiente, se llevó a pH 2 con ClH 2 N y se descarboxiló el producto de reacción calentando la mezcla de reacción a 85°C en baño de agua. Finalizado el desprendimiento gaseoso, se concentró a mitad de volumen y se extrajo con 4x50 ml de éter etílico en medio ácido, para luego alcalinizar con amoníaco y extraer nuevamente con éter etílico (7x50 ml) en medio alcalino. Este extracto fue secado sobre SO_4Na_2 anhidro y concentrado. Contenía los alcaloides higrina y cuscohigrina que fueron separados por destilación al vacío (higrina, Pe: 60-64°C a 15-20 Torr., Rend.= 20,5%; cuscohigrina, Pe: 106-110°C). La higrina sintética resultó idéntica al compuesto XIX de Nierembergia hippomanica (tr en CGL y espectro de masas).

La síntesis de norhigrina por un camino análogo a partir de 2-pirrolidona resultó infructuosa.

Fracción 2:

Constituida por las fenetilaminas β -feniletilamina (XX) y hordenina (XXI), que fueron separadas por nuevas cromatografías en columna de alúmina neutra con acetato de etilo:metanol, 99:1, 98:2, 95:5 y 90:10, como solventes. Las fracciones iniciales de esta columna poseían β -feniletilamina (XX), que se identificó por CGL y CGL-EM. Las siguientes eran ricas en hordenina (XXI), que resultó ser el principal alcaloide del extracto etéreo a pH 10.

β -feniletilamina (XX)

tr= 5,23 en CGL en columnas de OV-101 en condiciones de temperatura programada de 50 a 250°C a 10°C/min.

EM m/e (%): 121 (M^+ ; 8,6), 120 (M^+-1 ; 100), 119 (M^+-2 , 22,5), 91 (bencilo; 57,0), 65 (91-CH=CH⁺; 25,0), 51 (9,7), 50 (4,6) 41 (4,0), 39 (20,5).

Hordenina (XXI)

tr= 8,59 minutos (en CGL en columnas de OV-101, en las condiciones descriptas para β -feniletilamina).

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, $\text{Cl}_3\text{CO/MeOH-d}_4$) ppm: 2,33 (s, 6H, N-metilos); 2,62 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 6,68 y 6,94 (dos dobletes $J=8$ Hz, sustitución para aromática).

EM m/e (%): 165 (M^+ , 3,2); 121 ($\text{M}^+-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, 5,1); 107 (hidroxibencilo, 11,0); 91 (bencilo, 7,4); 77 (fenilo, 20,1); 58 ($\text{CH}_2=\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_2$, 100); 55 (14,3); 44 (10,7); 39 (8,9).

Se confirmó además la estructura por comparación con testigo auténtico.

Fracción 3 :

Se analizó por CGL y CGL-EM, identificándose entre sus componentes hordenina (XXI) y N-metiltiramina (XXII).

N-metiltiramina

EM m/e (%): 151 (M^+ , 1,5); 149 (M^+-2 , 0,6); 121 (M^+-30 , 1,13); 120 (M^+-30-1 , 1,6); 108 (rupt. β con reord., 2,6); 107 (rupt. β , hidroxibencilo, 9,2); 91 (1,2); 78 (1,1); 77 (4,2); 65 (1,2); 58 (7,4); 51 (1,7); 44 ($\text{CH}_2=\overset{+}{\text{N}}\text{H}(\text{CH}_3)$, 100); 43 (1,4); 42 (3,0); 41 (0,7).

Fracción 4 :

Estaba constituida principalmente por tiramina, como se dedujo por CGL-EM y comparación con testigo.

Tiramina (4-hidroxi- β -feniletilamina)(XXIII).

Tr = 5,76 min en CGL en columna de SE-30 3 % en las siguientes condiciones de temperatura programada: 130°C (1 min.) hasta 150°C a 10°C/min.

En estas condiciones, hordenina tiene un Tr= 6,10 min.

EM m/e (%): 137 (M^+ , 1,2); 136 (M^+-1 , 1,0); 121 (M^+-NH_2 , 1,1); 108 (rupt. β con reord., 5,5); 107 (hidroxibencilo, 7,5); 77 (3,0); 65 (1,5); 44 (5,0); 30 ($\text{CH}_2=\overset{+}{\text{N}}\text{H}_2$, 100).

Estudio del extracto clorofórmico a pH 10 (0,02 % respecto a planta seca).

La separación de sus componentes se llevó a cabo por medio de una columna de alúmina neutra con cloroformo y mezclas de polaridades crecientes de cloroformo y metanol, como solventes.

Entre sus componentes se identificó la fenetilamina hordenina (XXI) y el alcaloide del tropano tigloidina (XXIV).

En ccd en sílicagel con acetona:agua:amoníaco(90:7:3) como solvente, hordenina tiene un $R_f = 0,85$ y tigloidina $R_f = 0,75$.

Tigloidina (3 β -tigloiloxitropina)

Tr= 10,38 min. en CGL en columnas de OV-101 en condiciones de temperatura programada de 50°C a 250°C a 10°C/min.

ccd, sílicagel, acetona:H₂O:NH₃, 90:7:3, $R_f = 0,75$ coincidente con el de un testigo de picrato de tigloidina. En estas condiciones un testigo de picrato de 3 α -tigloiloxitropina presentó un $R_f = 0,42$, mientras la base tropina tenía $R_f = 0,36$.

ccd, sílicagel, acetato de etilo:MeOH:NH₃, 15:5:1 ; tigloidina, $R_f = 0,80$; 3 α -tigloiloxitropina, $R_f = 0,45$ y tropina $R_f = 0,38$. Se usaron además placas de sílicagel de alta resolución.

EM m/e (%): 223 (M⁺, 18,4); 140 (M⁺-83 (acilo), 7,2); 124 (M⁺-99 (aciloxi), 100); 110 (N-metil-hidroxipiridinio, 12,3); 96 (C₆H₁₀N⁺, 11,6); 95 (C₆H₉N⁺, 12,6); 94 (C₆H₈N⁺, 29,5); 83 (C₅H₉N⁺, 29,1); 82 (C₅H₈N⁺, 44,2); 67 (15,3); 55 (16,6); 42 (CH⁺N-CH₃, 25,0).

Estudio de los alcaloides cuaternarios

Reineckato a pH 12 (0,1 % , respecto a planta seca).

Los alcaloides liberados con resina Amberlite IRA-400 (forma OH⁻), eluyendo con etanol, se separaron en columna de alúmina neutra con cloroformo:MeOH:

ácido acético(90:10:1) como solvente, obteniéndose colina (XV).

Colina (XV)

ccd, celulosa, EtOH:NH₃, 4:1, Rf= 0,60 comparado contra testigo de cloruro de colina.

ccd, celulosa, acetato de etilo:butanol:ácido acético:H₂O, 8:2:3:2, Rf= 0,53.

¹H-RMN (100 MHz, D₂O) ppm: 3,18 (s, 9H, (CH₃)₃N⁺); 3,5 (m, 2H, -CH₂-N⁺(CH₃)₃);
4,03 (m, 2H, -CH₂-OH).

Picrato de colina

Formado por agregado de ácido pícrico en etanol a una solución etanólica de XV y recristalizado de etanol, dió agujas amarillas Pf= 240-242°C, no observándose depresión al realizar el punto de fusión mezcla con el picrato del testigo.

RESUMEN

El objeto de este trabajo ha sido el estudio químico de Nierembergia hippomanica Miers. (Familia Solanaceae), una planta argentina con reconocida actividad tóxica para el ganado.

Se realizó principalmente el estudio del extracto metanólico, debido a que esta fracción presentó toxicidad en ensayos farmacológicos preliminares.

En la presente Tesis, se desarrollan los siguientes temas:

1) Introducción a la familia Solanaceae, con la más reciente distribución taxonómica, según el Ing. A. Hunziker.

Características fitoquímicas de la familia y descripción del género Nierembergia, con los antecedentes de estudios químicos y farmacológicos de la especie que es el objeto de esta Tesis.

2) Descripción de las familias de compuestos encontradas en esta planta (compuestos terpénicos: triterpenos pentacíclicos y ecdisteroides; compuestos fenólicos: glicósidos de flavonoides y glicósidos acilados de flavonoides; alcaloides: fenetilaminas y alcaloides del tropano).

La misma ha sido realizada, considerando las estructuras conocidas de cada grupo de compuestos cuando resultara necesario, la distribución en el reino vegetal y, especialmente, los métodos espectroscópicos utilizados en su elucidación estructural (UV, IR, EM, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN). Este último análisis, permitirá una mejor comprensión de la discusión de los resultados de esta Tesis.

También se han descripto brevemente las propiedades farmacológicas de las familias que las presentan.

3) Discusión de la contribución de este trabajo al conocimiento de esta planta argentina, que corresponde al aislamiento e identificación de los siguientes compuestos:

- a) Hidrocarburos lineales desde $\text{C}_{22}\text{H}_{46}$ hasta $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$.
- b) Alcoholes superiores normales desde $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{O}$ hasta $\text{C}_{32}\text{H}_{66}\text{O}$.
- c) Triterpenos pentacíclicos: ácido ursólico (I), ácido oleanólico (II),

uvaol (III), α -amirina (IV) y β -amirina (V).

- d) Una cumarina: escopoletina (VI)
- e) Flavonoides: pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII), quercetina-3-O-galactósido (XIII).
- f) Flavonoides acilados: pinocembrina-7-O- β -(6''-O-acetil) neohesperidósido (X), pinocembrina-7-O- β -(3'''-O-acetil) neohesperidósido (XI) y pinocembrina-7-O- β -(2'''-O-acetil) neohesperidósido (XII).
- g) Un hexitol: manitol (XV)
- h) Ecdisteroides: ecdisterona (XVI) y 7,8-dihidroajugasterona C (XVII).
- i) Alcaloides pirrolidínicos: norhigrina (XVIII) e higrina (XIX).
- j) Fenetilaminas: β -feniletilamina (XX), hordenina (XXI), N-metiltiramina (XXII) y tiramina (XXIII).
- k) Alcaloide del tropano: 3 β -tigloiloxitropina (Tigloidina, XXIV).
- l) Alcaloide cuaternario: colina (XXV).

4) Confirmación química de las estructuras asignadas a los glicósidos acetilados aislados e identificados en esta planta. Para ello, se utilizó un método de metilación que evitara la pérdida de los sustituyentes lábiles a bases y que asegurara metilación total. Este método no había sido usado hasta el momento en el campo de los flavonoides acilados y los resultados demuestran que es muy adecuado para determinar la posición de acilación de un glicósido de flavonoide.

5) Confirmación de la presencia de higrina (XIX) en la planta por síntesis de este compuesto.

6) Descripción de pinocembrina-7-O- β -glucósido (IX) un glicósido de pinocembrina cuyos datos espectroscópicos no habían sido registrados y que se obtuvo por hidrólisis parcial de pinocembrina-7-O- β -neohesperidósido (VII).

Se describen como nuevos productos naturales a norhigrina, 7,8-dihidroajugasterona C (7,8-dihidro-11 α -hidroxiponasterona A), pinocembrina-7-O- β -(2'''-O-acetil) neohesperidósido, pinocembrina-7-O- β -(3'''-O-acetil) neohesperidósido.

sido y pinocembrina-7-O- β -(6"-O-acetil) neohesperidósido.

Las estructuras de los compuestos norhigrina y 7,8-dihidroajugasterona C fueron asignadas en base a sus datos espectroscópicos, mientras que las de los flavonoides acilados fueron además confirmadas químicamente por un método que resulta de utilidad general para este tipo de compuestos.

En el capítulo de discusión se analizan los espectros ultravioleta, infrarrojo, de masas, de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN de los compuestos aislados y purificados así como de sus derivados acetilados o trimetilsililados según los casos.

En la parte experimental, además de los datos espectroscópicos de cada compuesto, se consignan los métodos separativos utilizados.

María Dolores González

He. J. B. K. L. f.

Bibliografía

- 1) R. von Wettstein; "Die Natürliche Pflanzen Familien", 4 (3b), 4-38; eds: G. A. Engley y K. A. E. Prantl (1891).
- 2) A. T. Hunziker; The Biology and Taxonomy of the Solanaceae, Linnean Society Symposium Series, Nº 7, pág. 49; eds: J. G. Hawkes, R.N. Lester y A.D. Skelding (1979).
- 3) R. Hegnauer; "Chemotaxonomie der Pflanzen", Vol. 6, pág 403; Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1973).
- 4) R. N. Chakravarti, S. Datta y M. N. Mitra; *Experientia*, 20, 200 (1964).
- 5) O. E. Edwards y N. F. Elmore; *Canad. J. Chem.*, 40, 256 (1962).
- 6) A. J. N. Bolt y R. E. Clarke; *Phytochemistry*, 9, 819 (1970).
- 7) K. Schreiber y G. Oske; *Tetrahedron*, 20, 2575 (1964).
- 8) P. A. S. Canham y F. L. Warren; *J. South African Chem. Inst. N S*, 3, 9 y 63, (1950).
- 9) M. Silva ; *J. Pharm. Sci.*, 51, 289 (1962).
- 10) I. Z. Gal; *Pharmazie*, 22, 120 (1967).
- 11) A. Yarden y D. Lavie; *J. Chem. Soc. (C)*, 2925 (1962).
- 12) S. M. Kupchan, W. K. Anderson. P. Bollinger, R.W. Doskotch, R.M. Smith, J. A. Saenz Renaud, H. K. Schnoes y D. H. Smith; *J. Org. Chem.*, 34, 3858 (1969).
- 13) G. Adam y M. Hesse; *Tetrahedron*, 28, 3527 (1972).
- 14) R. Tschesche, K. Annen y P. Welzel, *Tetrahedron*, 28, 1909 (1972).
- 15) L. Ramachandra Row, K. Sambhi Reddy, N. Subrahmanya Sarma, T. Matsuura y K. Nakashima; *Phytochemistry*, 19, 1175 (1980).
- 16) J. E. A. Verett y T.J. Mabry; *Phytochemistry*, 10, 2199 (1971).
- 17) J. B. Harborne y J. J. Corner; *Biochem. J.*, 81, 242 (1961).
- 18) H. Kala; *Planta Med.*, 6, 186 (1958); *Chem. Abstr.*, 53, 4435 (1959).
- 19) R. H. F. Manske; "The Alkaloids", Vols. I, VI, IX, XI y XII, Academic Press, Nueva York y Londres (1950-1970).
- 20) R. F. Raffauf; "A handbook of alkaloids and alkaloid-containing plants", Wiley-Interscience (1970).

- 21) N. Wellendorf; J. Pharm. Pharmacol., 14, 157 (1962).
- 22) S. Danert; Pharmazie, 9, 249 (1954).
- 23) G. Verzár-Petri y S. Sarkany; Planta Med., 9, 15 (1961).
- 24) J. Rivas; Chem. Abstr., 48, 4777 (1954).
- 25) R. R. Paris y A. Saint-Firmin; Compt. Rend., 264 D, 825 (1967).
- 26) K. Bodendorf y H. Kummer; Pharm. Zentralhalle, 101, 620 (1962).
- 27) H. Staub; Helv. Chem. Acta, 45, 2297 (1962).
- 28) A. Romeike; Naturwissenschaften, 53, 82 (1966).
- 29) B. K. Moza; Indian J. Chem., 7, 414 (1969).
- 30) S. W. Zito y J. D. Leary; J. Pharm. Sci., 55, 1150 (1966).
- 31) W. C. Evans y P. G. Treagust; Phytochemistry, 12, 2505 (1973).
- 32) W. C. Evans y K. P. Anne Ramsey; Phytochemistry, 20, 497 (1981).
- 33) H. B. Schröter; Naturwissenschaften, 45, 338 (1958).
- 34) K. Mothes y H. B. Schröter; Arch. Pharm., 294, 99 (1961).
- 35) B. Wolters; Arch. Pharm., 297, 748 (1964).
- 36) B. Wolters; Planta Med., 13, 189 (1965).
- 37) S. Echegaray; Bol. Acad. Nac. Ciencias, Córdoba, 3, 164 (1879).
- 38) P. Lavenir y J. A. Sánchez; Trabajos del Museo de Farmac. de la Fac. de Ciencias Médicas, N° 11 (1906).
- 39) A. Doering; Bol. Acad. Nac. Ciencias, Córdoba, 20, 295 (1915).
- 40) J. Comín y E. G. Gros; Comunicación 6-23. XII Sesiones Qcas. Arg., Córdoba, (Abril 1967).
- 41) A. E. Ragonese; Rev. Fac. Agronomía Univ. Nac. La Plata, 31, 133 (1955).
- 42) P. A. Morgante; El Caballo, 1, 35 (1935).
- 43) S. Sonzini Astudillo; Tesis, Univ. Nac. de Córdoba, 1938.
- 44) M. L. y D. K. Kulshreshtha y R. P. Rastogi; Phytochemistry, 11, 2369 (1972).
- 45) P. Pant y R. P. Rastogi; Phytochemistry, 18, 1095 (1979).
- 46) H. Holtzen; Arch. Pharm.; 291, 308 (1958).
- 47) S. Allard y G. Ourisson; Tetrahedron, 1, 277 (1957).
- 48) S. K. Agarwal y R. P. Rastogi; Phytochemistry, 13, 2623 (1974) y referencias citadas.

- 49) H. Budzikiewicz y C. Djerassi; J. Am. Chem. Soc., 85, 3688 (1963).
- 50) L. Ogunkoya; Phytochemistry, 20, 121 (1981).
- 51) R. M. Silverstein y G. C. Bossley; "Spectrometric Identification of Organic Compounds", John Wiley and Sons Inc., Nueva York, Londres y Sidney (1964).
- 52) N. S. Bhacca y G. C. Williams; "Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry", Holden-Day Inc., San Francisco, Londres y Amsterdam (1964).
- 53) D. G. Buckley, G. H. Green, E. Ritchie y W. C. Taylor; Chem and Ind., 298, (1971).
- 54) J. Karliner y C. Djerassi; J. Org. Chem., 31, 1945 (1966).
- 55) B. Tursch, R. Savoie, R. Ottinger y G. Chiurdoglu; Tetrahedron Letters, 539 (1967).
- 56) S. I. M. Kodama y M. Surogawa; Tetrahedron Letters, 3989 (1967).
- 57) H. T. Cheung y D. G. Williamson; Tetrahedron, 25, 119 (1969).
- 58) J. M. Lehn y G. Ourisson; Bull. Soc. Chim. Fr., 1137 (1962).
- 59) P. V. Demarco, E. Farkas, D. Doddrell, L. M. Banavara y E. Wenkert; J. Am. Chem. Soc., 90, 5480 (1968).
- 60) N. S. Bhacca y D. H. Williams; Tetrahedron Letters, 3127 (1964).
- 61) R. G. Wilson y D. H. Williams; Tetrahedron, 25, 155 (1969).
- 62) J. M. Sanders y D. H. Williams; Chem Comm., 422 (1970).
- 63) C. C. Hinckley; J. Am. Chem. Soc., 91, 5160 (1969).
- 64) P. V. Demarco, R. B. Lewis y E. Wenkert; J. Am. Chem. Soc., 92, 5734 (1970).
- 65) P. V. Demarco, R. B. Lewis y E. Wenkert; J. Am. Chem. Soc., 92, 5737 (1970).
- 66) D. M. Doddrell, P. W. Khong y K. G. Lewis; Tetrahedron Letters, 2381 (1974).
- 67) K. Tori, S. Seo, A. Shimaoka y Y. Tomita; Tetrahedron Letters, 4227 (1974).
- 68) Y. Tomita, S. Seo y K. Tori; Tetrahedron Letters, 7 (1975).
- 69) C. G. Levi y G. L. Nelson; "Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 para Químicos Orgánicos", Ed. Bellaterra S.A. (1976).
- 70) D. G. Wenzel y G. Y. Koff; J. Am. Pharm. Assoc., 45, 372 (1956).
- 71) E. Heftmann; "Steroid Biochemistry", Cap. 3, pág. 24, Academic Press, Nueva York y Londres (1970).

- 72) A. Butenand y P. Karlson; Z. Naturforsch., 9b, 389 (1954).
- 73) H. Hoffmeister, C. Rufpr, P. Karlson y G. Spiteller; Chem. Ber., 98, 2339, 2353, 2361, 2383, 2394 y 2406 (1965).
- 74) H. Hoffmeister y H. F. Grützmacher; Tetrahedron Letters, 4017 (1966).
- 75) J. M. Geuns; Phytochemistry, 17, 1 (1978).
- 76) J. B. Siddall, A. D. Cross y J. H. Fried; J. Am. Chem. Soc, 88, 862 (1966).
- 77) F. Hampshire y D. H. S. Horn; Chem. Comm., 37 (1966).
- 78) D. H. S. Horn, E. J. Middleton y J. A. Wunderlich; Chem. Comm., 905 (1966).
- 79) P. Hocks y R. Wiechert; Tetrahedron Letters, 2989 (1966).
- 80) M. J. Thompson, J. N. Kaplanis y R. T. Yamamoto; Steroids, 8, 605 (1966).
- 81) K. Nakanishi; Chem. Comm., 915 (1966).
- 82) M. N. Galbraith y D. H. S. Horn; Chem. Comm., 905 (1966).
- 83) S. Imai, E. Murata, S. Fujioka, M. Koreeda y K. Nakanishi; Chem. Comm., 546 (1969).
- 84) V. Herout, F. Sorm y J. Jizba; Tetrahedron Letters, 1689 (1967).
- 85) L. Canónica, B. Danielli y G. Ferrari; Phytochemistry, 14, 525 (1975).
- 86) K. Nakanishi; Chem. Comm., 352 (1970).
- 87) G. Fraenkel; Proc. Roy. Soc. B 118, 1 (1935).
- 88) K. Nakanishi, M. Koreeda, M. L. Chang y H. Y. Hsu; Tetrahedron Letters, 1105 (1968).
- 89) M. Koreeda y K. Nakanishi; Chem. Comm., 315 (1970).
- 90) T. Takemoto, Y. Hikino, S. Arihara y H. Hikino; Tetrahedron Letters; 2475 (1968).
- 91) M. J. Thompson, J. N. Kaplanis, W. E. Robinson y R. T. Yamamoto; Chem. Comm., 650 (1967).
- 92) G. Heinrich y H. Hoffmeister; Tetrahedron Letters, 6063 (1968).
- 93) J. Jizba, V. Herout y F. Sorm; Tetrahedron Letters, 5139 (1967).
- 94) L. Canónica, B. Danielli, I. Weisz-Wincze y G. Ferrari; Chem. Comm, 1060 (1972).
- 95) H. Faux, M. N. Galbraith, D. H. S. Horn, E. J. Middleton y J. A. Thompson; Chem. Comm., 243 (1970).

- 96) I. Imai, M. Hori, S. Fujioka, E. Murata, M. Goto y K. Nakanishi; Tetrahedron Letters, 3883 (1968).
- 97) I. Imai, M. Hori, D. Fujioka, E. Murata, M. Goto y K. Nakanishi; Tetrahedron Letters, 3887 (1968).
- 98) T. Takemoto, Y. Hikino, K. Nomoto y H. Hikino; Tetrahedron Letters, 4061 (1968).
- 99) S. Imai, S. Fujioka, E. Murata y K. Otsuka; Chem. Comm., 82 (1969).
- 100) T. Takemoto, Y. Hikino, K. Nomoto y H. Hikino; Tetrahedron Letters, 3191 (1967).
- 101) S. Imai, S. Fujioka, E. Murata y K. Otsuka; Tetrahedron Letters, 4929 (1968).
- 102) S. Imai, T. Toyosato, Y. Sato, S. Fujioka, E. Murata y M. Goto; Chem. Pharm. Bull (Japón), 17, 335 (1969).
- 103) A. T. Sipahimalani, A. Banerje y M. S. Chada; Chem. Comm, 693 (1972).
- 104) H. H. Sauer, R. Benett y E. Heftmann; Phytochemistry, 7, 2027 (1968).
- 105) W. S. Lockley, R. Boid, G. Lloyd-Jones, H. H. Rees y T. W. Goodwin; Chem. Comm., 346 (1975).
- 106) M. N. Galbraith, D. H. S. Horn y E. J. Middleton; Chem. Comm., 203 (1973).
- 107) Y. Tomita, E. Sakurai; Chem. Comm., 434 (1974).
- 108) E. Breitmaier ; "¹³C-Spectroscopy", eds. G. M. y H. Weinheim, Verlag-Chimie 1974 (Pág. 215).
- 109) J. B. Harborne; "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", Academic Press, Londres y Nueva York, 1967.
- 110) L. Hörhammer, L. Stich y H. Wagner; Naturwissenschaften, 46, 359 (1959).
- 111) C. Kaiser, L. Birkofer; Z. Naturforsch., 17 b, 359 (1962).
- 112) J. B. Harborne; Experientia, 19, 7 (1963).
- 113) L. Birkofer, C. Kaiser y H. Kosmol; Z. Naturforsch., 20 b, 605 (1965).
- 114) L. Birkofer; Justus Liebig Ann. Chem., 725, 196 (1969).
- 115) S. Tagaki, M. Yanaki, K. Masuda y M. Kubota; Chem Abstr. 86, 13815 v (1977).
- 116) S. Tagaki, M. Yanaki, K. Masuda, M. Kubota y J. Minami; Chem. Abstr., 86, 136329 x (1977).

- 117) H. Horowitz y I. Asen; *Phytochemistry*, 16, 147 (1977).
- 118) C. Karl, P. A. Pedersen y C. Schwarz; *Phytochemistry*, 16, 1117 (1977).
- 119) C. Karl y G. Muller; *Phytochemistry*, 15, 1084 (1976).
- 120) K.F. Blinova y Be Thi Thuan; *Chem. Abstr.*, 88, 34488 x (1977).
- 121) T. Mabry, H. Geiger, U. Lang y G. Vander Velde; *Phytochemistry*, 17, 336 (1978).
- 122) T. Mabry, H. Geiger, U. Lang y G. Vander Velde; *Phytochemistry*, 11, 1095 (1972).
- 123) R. Raymond; *Lloydia*, 40, 591 (1977).
- 124) G. Kitanov, K. F. Blinova y K. H. Akhtardzhieb; *Chem. Abstr.*, 91, 189772 w (1979).
- 125) N. Ohta, G. Kuwata, H. Akahori, T. Watanabe; *Chem. Abstr.*, 91, 120396 j (1979).
- 126) N. Ohta, G. Kuwata, H. Akahori, T. Watanabe; *Chem. Abstr.*, 93, 219365 b (1980).
- 127) W.M. Chari, M. Jordan, H. Wagner y P.W. Thies; *Phytochemistry*, 16, 1110 (1977).
- 128) G.G. Zapesochnaya, S. Z. Ivanova, S. A. Medvedeva y N. A. Tyukovkina; *Chem. Abstr.*, 89, 110250 b (1978).
- 129) G. G. Zapesochnaya, S. Z. Ivanova, S. A. Medvedeva y N.A. Tyukovkina; *Chem. Abstr.*, 89, 110251 c (1978).
- 130) S. Z. Ivanova; *Chem. Abstr.*, 91, 2494 s (1979).
- 131) G. G. Zapesochnaya, V. I. Sheikenko y S. Z. Ivanova; *Chem. Abstr.*, 93, 110567 t (1980).
- 132) G. G. Zapesochnaya, S. Z. Ivanova, S. A. Medvedeva y N. A. Tyukovkina; *Chem. Abstr.*, 89, 110252 (1978).
- 133) G. G. Zapesochnaya, S. Z. Ivanova y V. I. Sheikenko; *Chem. Abstr.*, 93, 110559 (1980).
- 134) G. G. Zapesochnaya, S. Z. Ivanova, N. A. Tyukovkina, V. I. Sheikenko, T. T. Pangarova y S. A. Medvedeva; *Symp. Papers, IUPAC Int. Symp. Chem. Nat. Prod. 11th* (1978); *Chem. Abstr.*, 92, 76869 k (1980).
- 135) G. G. Zapesochnaya y G.P. Shnyakina; *Chem. Abstr.*, 90, 200279 (1979).

- 136) G. G. Zapesochnaya y G. P. Shnyakina; Chem. Abstr., 84, 150897 (1976).
- 137) M. M. Konopleva, V.I. Glyzin, L. P. Svainova y V. L. Shelyuto; Chem. Abstr. 92, 76867 (1980).
- 138) G. G. Zapesochnaya y S. Z. Ivanova; Chem. Abstr., 72, 90813 f (1969).
- 139) T. J. Mabry, K. R. Markham y M. B. Thomas; "The systematic Identification of Flavonoids", Parte II, Springer-Verlag, Nueva York, Heidelberg y Berlín (1970).
- 140) T. J. Mabry; Rev. Latin. Quím., 6, 105 (1975).
- 141) H. Budzikiewicz, C. Djerassi y D. H. Williams; "Structural Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry", Vol 2: Steroids, terpenoids, sugars, Holden-Day, San Francisco, Londres y Nueva York (1964).
- 142) R. D. Schmid; Tetrahedron, 28, 3259 (1972).
- 143) R. D. Schmid; Phytochemistry, 12, 2269 (1973).
- 144) R. D. Schmid, P. Varenne y R. Paris; Tetrahedron, 28, 5037 (1972).
- 145) H. Wagner y O. Seligmann; Tetrahedron, 29, 3029 (1973).
- 146) H. Wagner y O. Seligmann; Lloydia, 36, 146 (1973).
- 147) H. Schels, H. D. Zinmeister y K. Pflieger; Phytochemistry, 16, 1019 (1977).
- 148) H. Schels, H. D. Zinmeister y K. Pflieger; Phytochemistry, 17, 523 (1978).
- 149) R. G. Wilson, J. H. Bowie y D. H. Williams; Tetrahedron, 24, 1407 (1968).
- 150) M. O. Kigawa y N. Kawano; Chem. and Ind., 850 (1973).
- 151) T. J. Mabry, K. R. Markham y M. B. Thomas; "The Systematic Identification of Flavonoids", Parte III, Springer-Verlag, Nueva York, Heidelberg y Berlín (1970).
- 152) F. A. Bovey; "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Academic Press, Nueva York y Londres (1969).
- 153) R. U. Lemieux y J. D. Stevens; Canad. J. Chem., 43, 2059 (1965).
- 154) H. Rösler, T. J. Mabry, M. F. Cranmer y J. Kagan; J. Org. Chem., 30, 4636, (1965).
- 155) P. Joseph-Nathan, J. Mares, Ma. C. Hernández y J. N. Schoolery; J. Magnetic Resonance, 16, 447 (1974).

- 156) B. Ternai y K. R. Markham; *Tetrahedron*, 32, 565 (1976).
- 157) B. Ternai y K. R. Markham; *Tetrahedron*, 32, 2607 (1976).
- 158) R. G. S. Ritchie, N. Cyr, B. Karsch, J. A. Koch y A. S. Perlin; *Canad. J. Chem.*, 53, 1424 (1975).
- 159) H. F. Aly, H. Geiger, U. Schucker, H. Waldrum, G. Vander Velde y T. J. Mabry; *Phytochemistry*, 14, 1613 (1975).
- 160) N. Yamorka, T. Usui, K. Matsuda, K. Tuzimura y S. Seto; *Tetrahedron Letters*, 2047 (1971).
- 161) P. Carlson, H. J. Jennings y I. C. P. Smith; *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 8081 (1974).
- 162) B. Ternai, K. R. Markham, H. Geiger y T. J. Mabry; *Tetrahedron*, 34, 1389 (1978).
- 163) P. A. J. Goren y M. Mazurek; *Canad. J. Chem.*, 53, 1272 (1975).
- 164) J. B. Harborne; *Phytochemistry*, 4, 107 (1965).
- 165) S. Hattori en "The Chemistry of Flavonoid Compounds", ed. por T. A. Geissman, pág. 317, Pergamon Press, Oxford, (1962).
- 166) J. B. Harborne; *Phytochemistry*, 3, 151 (1964).
- 167) D. W. Fox, W. L. Savage y S. H. Wender; *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 2504 (1953).
- 168) K. Venkatamaran en "The Chemistry of Flavonoid Compounds", ed. por T. A. Geissman, pág. 70, Pergamon Press, Oxford (1962).
- 169) R. M. Horowitz y B. Gentili; *Tetrahedron*, 19, 773 (1963).
- 170) M. C. Mc Closkey y G. H. Coleman; *J. Org. Chem.*, 10, 184 (1945).
- 171) H. M. Hurst y J. B. Harborne; *Phytochemistry*, 6, 1 (1967).
- 172) Y. Abé y K. Hayashi; *Bot. Mag. Tokyo*, 69, 577 (1956).
- 173) G. Zémpfen y A. Gerecs; *Ber.*, B 71, 2520 (1938).
- 174) P. Karrer y G. Meuron; *Helv. Chim. Acta*, 15, 507 y 1212 (1932).
- 175) B. V. Chandler y K. A. Harper; *Austr. J. Chem.*, 14, 586 (1961).
- 176) R. Bognár, I. Farkas Szabó, I. Farkas y H. Gross; *Carb. Res.*, 5, 241 (1967).
- 177) G. Zémfen y A. Gerecs; *Ber.*, 67, 2049 (1934).
- 178) W. S. Denham y H. Woodhouse; *J. Chem. Soc. (London)*, 103, 1735 (1913).

- 179) N. W. Haworth; J. Chem. Soc (London), 107, 8 (1915).
- 180) T. Purdie y J. C. Irvine; L. Chem. Soc., (London), 83, 1021 (1903).
- 181) R. Kuhn, H. Trischmann y I. Löw; Angew. Chem., 67, 32 (1955).
- 182) S. Hakomori; J. Biochemistry (Tokyo), 55, 205 (1964).
- 183) E. J. Corey y M. Chaykovsky; J. Am. Chem. Soc., 84, 866 (1962).
- 184) D. M. W. Anderson y G. M. Cree; Carb. Res., 2, 162 (1966).
- 185) K. Sjöberg; Tetrahedron Letters, 6383 (1966).
- 186) H. Björndal, C. A. Helleqvist, B. Lindberg y S. Svensson; Angew. Chem. Int. Ed., 9, 610 (1970).
- 187) H. O. Bouveng, P. J. Garregg y B. Lindberg; Chem. and Ind., 1727 (1958).
- 188) I. O. Mastronardi, S. M. Flemati y E. G. Gros; Carb. Res., 3, 177 (1966).
- 189) C. D. Beard, K. Baum y V. Grakauskas; J. Org. Chem., 38, 3673 (1973).
- 190) J. Arnap, L. Kenne, B. Lindberg y J. Lönnngren; Carb. Res., 44, C-5 (1975).
- 191) J. M. Berry y L. D. Hall; Carb. Res., 47, 307 (1976).
- 192) J. M. Berry y L. D. Hall; Carb. Res., 35, C-4 (1974).
- 193) P. Prehm; Carb. Res., 78, 372 (1980).
- 194) C. P. Wong, L. M. Jackman y R. G. Portman; Tetrahedron Letters, 921 (1974).
- 195) V. Gutman; Angew. Chem., Ed. Eng., 9, 843 (1970).
- 196) A. N. Belder y B. Norrman; Carb. Res., 8, 1 (1968).
- 197) H. O. Bouveng, P. Garregg y B. Lindberg; Acta Chem. Scand., 14, 742 (1960).
- 198) H. O. Bouveng; Acta Chem. Scand., 15, 78 (1961); Ibid., 15, 96 (1961).
- 199) W. R. Leigh y Z. S. Krzeminski; J. Chem. , 1700 (1966).
- 200) L. Hough y J. K. N. Jones en "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol. I, Secc. I, Parte 6, ed. por R. L. Wistler y M. L. Wolfrom, Academic Press, Nueva York y Londres (1962).
- 201) J. E. Hodge y B. T. Hofreiter en "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol I, Secc IV, Parte 115, ed. por R. L. Wistler y M. L. Wolfrom, Academic Press, Nueva York y Londres (1962); Z. Dische; ibid., Vol. 1, Secc. V.
- 202) H. Björndal, B. Lindberg y S. Svensson; Acta Chem. Scand., 21, 1801 (1967).
- 203) J. H. Sloneker en "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol VI, Secc I, Parte 4, ed. por R. L. Wistler y J. N. B. Miller, Academic Press, Nueva

York y Londres (1962).

- 204) H. Björndal, B. Lindberg y S. Svensson; *Carb. Res.*, 5, 433 (1967).
- 205) T. A. Smith; *Phytochemistry*, 16, 9 (1977).
- 206) S. Agurell; *Lloydia*, 32, 206 (1969).
- 207) W. Forth, D. Henschler y W. Rummel; "Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxicologie", Wissenschaft Verlag, Bibliographisches Institut (1977).
- 208) C. S. Evans, E. A. Bell y E. S. Johnson; *Phytochemistry*, 18, 2022 (1979).
- 209) G. J. Kapadia y M. B. E. Fayez; *J. Pharm. Sci.*, 59, 1699 (1970).
- 210) J. Lundström y S. Agurell; *Tetrahedron Letters*, 3371 (1969).
- 211) S. Agurell; *Lloydia*, 32, 40 (1969).
- 212) J. G. Bruhn, U. Svensson y S. Agurell; *Acta Chem. Scand.*, 24, 3775 (1970).
- 213) L. Reti en "The Alkaloids" Vol. III, ed. por R. H. F. Manske, Academic Press, Nueva York y Londres (1955).
- 214) C. A. Russo y E. G. Gros; *Phytochemistry*, 20, 1763 (1981).
- 215) H. G. Boit; "Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960", Akademie Verlag, Berlin (1961).
- 216) M. Hesse y H. O. Bernhard; "Alkaloide ausser Indol-, Triterpen- und Steroidalkaloide", Verlag Chemie, Vol. 3, (1975).
- 217) K. M. Kelley Hornemann, J. M. Neal y J. L. Mc Laughlin; *J. Pharm. Sci.*, 61, 41 (1972).
- 218) G. J. Kapadia y H. M. Fales; *Chem. Comm.*, 1688 (1968).
- 219) J. M. Neal, P. T. Sato, W. N. Howald y J. L. Mc Laughlin; *Science*, 176, 1131 (1972).
- 220) C. R. Creveling y J. W. Daly; *Nature*, 216, 190 (1967).
- 221) J. Reisch, H. Alfer, N. Jantos y J. Mollmann; *Acta Pharm. Suec.*, 5, 393 (1968).
- 222) M. Donike; *J. Chromatog.*, 42, 103 (1969).
- 223) M. Donike; *J. Chromatog.*, 78, 273 (1973).
- 224) M. Donike; *J. Chromatog.*, 103, 91 (1975).
- 225) J. A. Bruhn y S. Agurell; *J. Pharm. Sci.*, 63, 574 (1974).

- 226) H. W. Liebisch, A. S. Radwan y H. R. Schütte; *Ann.*, 741, 163 (1969); D.G. O'Donovan y A. F. Keogh; *J. Chem. Soc.*, 223 (1969).
- 227) F. E. Baralle y E. G. Gros; *Chem. Comm.*, 721 (1969).
- 228) E. Leete; *Phytochemistry*, 8, 413 (1969).
- 229) S. H. Hedges y R. B. Herbert; *Phytochemistry*, 20, 2064 (1981).
- 230) M. Litter; "Compendio de Farmacología", Ed. "El Ateneo", Bs. As. (1973).
- 231) E. C. Blossey, H. Budzikiewicz, M. Ohassi, G. Fodor y C. Djerassi; *Tetrahedron*, 20, 585 (1964).
- 232) W. C. Evans y V. A. Major; *J. Chem. Soc.(C)*, 1621 (1966).
- 233) P. J. Beresford y J. G. Wooley; *Phytochemistry*, 13, 2511 (1974).
- 234) J. Parello, P. Longevialle, W. Vetter y J.A. Mc. Closkey; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2787 (1963).
- 235) M. Karplus; *J. Chem. Phys.*, 30, 11 (1959).
- 236) K. L. Williamson y W. S. Johnson; *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 4264 (1961).
- 237) E. Wenkert, J. S. Bindra, D. W. Cochran y F. M. Shell; *Acc. Chem. Res.*, 7, 46 (1974).
- 238) R. S. Jones y A. A. Boulton; *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 58, 222 (1980).
- 239) I. Pato Castel; *Medicine Argentina*, 24 (Primera Serie) 1810 (1980).
- 240) G. S. Rao; *J. Pharm. Pharmacol.*, 22, 544 (1970).
- 241) S. Ghosal, R. S. Srivastava, S. K. Bhattacharya y P. K. Debnath; *Planta Med.*, 23, 321 (1972).
- 242) "Marcha Analítica para la Investigación Química de Plantas", Dpto. de Química Orgánica" FCEN, UBA, 1964.
- 243) H. Thies, F. W. Reuter; *Naturwissenschaften*, 41, 230 (1954); D. Vágujfalvi; *Planta Med.*, 8, 34 (1960).
- 244) J. Seibl; "Espectrometría de masas", Cap. 5, Ed. Alhambra (1973).
- 245) R. P. Cook; *Analyst*, 86, 373 (1961).
- 246) J. R. Dyer; "Aplicaciones de Espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos", Ed. Prentice-Hall International (1973).

- 247) A. G. González y J. L. Toste; *Anales de Fís. y Quím.*, 50 B, 597 (1954).
- 248) N. Ikekawa en "Methods in Enzymology", Vol. 15, pág. 220, ed. S. Colowick, Academic Press, Nueva York (1969).
- 249) X. A. Domínguez; "Métodos en Investigación Fitoquímica", Ed. Limusa (1973).
- 250) T. A. Geissman; "The Chemistry of Flavonoid Compounds", Pergamon Press, Londres (1962).
- 251) T. Kondo, H. Ito y T. Miyoshi; *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 29, 110 (1955).
- 252) M. Hasegawa; *J. Jpn. For. Soc.*, 38, 107 (1956).
- 253) M. Hasegawa y T. Shirato., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 450 (1957).
- 254) M. Hasegawa; *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1738 (1957).
- 255) J. P. Kutney, W. D. C. Warnock y B. Gilbert; *Phytochemistry*, 9, 1977 (1970).
- 256) A. B. Pomilio y E. G. Gros; *Phytochemistry*, 18, 1410 (1979).
- 257) V. T. Ranakrishnan y J. Kagan; *J. Org. Chem.*, 35, 2901 (1970).
- 258) H. Wagner, G. Aurnhaumer, L. Hörhammer, L. Farkas y M. Nógrádi; *Chem. Ber.*, 102, 785 (1969); B. H. Koeppen; *Tetrahedron*, 24, 4963 (1968).
- 259) J. B. Conchie y G. A. Levvy en "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol. II, Secc. VII, parte 87, ed. por R. L. Wistler y M. L. Wolfrom, Academic Press Nueva York y Londres (1962).
- 260) L. Hörhammer, H. Wagner, K. Hein; *J. Chromatog.*, 13, 235 (1964).
- 261) W. H. Parker y B. A. Bohm; *Phytochemistry*, 14, 553 (1975).
- 262) T. J. Mabry, K. R. Markham y M. B. Thomas; "The Systematic Identification of Flavonoids", Parte I, pág. 3, Springer-Verlag, Nueva York, Heidelberg y Berlín (1970).
- 263) E. Steinegger y D. Sonanini; *Chem. Abstr.*, 66 95361 y 95362 (1967).
- 264) G. von Unruh y G. Spiteller, *Tetrahedron*, 26, 3329 (1970).
- 265) S. Ghosal, P.K. Banerjee y S. K. Banerjee; *Phytochemistry*, 9, 429 (1970).
- 266) H. Budzikiewicz, C. Djerassi y D. H. Williams; "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day, San Francisco (1967).
- 267) F. Galinovsky, A. Wagner y R. Weiser; *Monatsch*, 82, 551 (1951).
- 268) A. M. Urzúa y J. H. Comín; *An. Asoc. Quím. Arg.*, 64, 295 (1976).

- 269) H. Budzikiewicz, C. Djerassi y D. H. Williams; "Structural Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry", Vol. 1, Alkaloids, Holden-Day, San Francisco, Londres, Amsterdam (1964).
- 270) "The Sadtler Standard Spectra" Espectro de ^1H -RMN N° 6803, Sadtler Research Laboratories Inc., E.U. (1976).
- 271) E. V. Evtushenko , Y. Ovodor y S. Ovodor; Chem. Abstr., 84, 150895 (1976).
- 272) G. N. Bollenback en "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. II, pág. 326, Academic Press, Nueva York y Londres (1963).
- 273) R. Adams, H. M. Chiles y C. F. Rassweiler en "Organic Synthesis", Collec., Vol. 1, pág, 10, ed.por A. H. Blatt y H. Gilman, J. Wiley and Sons Inc. (1941).