

## Tesis Doctoral

# Catabolismo del alcaloide hordenina en la planta *Hordeum vulgare* (cebada)

Russo, César Alejandro

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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Russo, César Alejandro. (1982). Catabolismo del alcaloide hordenina en la planta *Hordeum vulgare* (cebada). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n1734\\_Russo](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1734_Russo)

**Cita tipo Chicago:**

Russo, César Alejandro. "Catabolismo del alcaloide hordenina en la planta *Hordeum vulgare* (cebada)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n1734\\_Russo](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1734_Russo)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**CATABOLISMO DEL ALCALOIDE**

**HORDENINA**

**EN LA PLANTA**

***HORDEUM VULGARE* (CEBADA)**

**CÉSAR ALEJANDRO RUSSO**

**- 1982 -**

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CATABOLISMO DEL ALCALOIDE HORDENINA EN LA  
PLANTA *HORDEUM VULGARE* (CEBADA)

CESAR ALEJANDRO RUSSO

Tesis presentada para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1982 -

1734  
ej. 2

A Liliana, por el apoyo.

A Carolina, por la alegría.

A mis padres, por el ejemplo.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Eduardo G. Gros, quien sugiriera el tema de esta tesis y dirigiera su desarrollo, por su apoyo, su dedicación y las enseñanzas de él recibidas, que me permitieron realizar el presente trabajo y sirvieron de ejemplo a mi formación.

También deseo agradecer:

Al Dr. G. Burton y al Lic. A.A. Ghini, por su colaboración permanente y las fructíferas discusiones mantenidas.

A UMYMFOR (CONICET - FCEN), por la realización de las determinaciones instrumentales:

Sr. J.A. Aznárez, por los espectros de masa y las cromatografías gas-líquido acopladas a espectrometría de masa;

Lic. M.M. Rivero, por las cromatografías gas-líquido;

Dr. G. Burton y Sr. C.G. Arabehety, por los espectros de RMN-<sup>13</sup>C.

A la Bioqca. S. Carbone y a la Dra. I. Mastronardi (Instituto de Fisiología "Dr. B.A. Houssay", Facultad de Medicina, UBA), por las determinaciones de actividad de MAO.

Al Dr. C.P. Lantos (Depto. Química Biológica, FCEN, UBA), por facilitarnos el uso del contador de centelleo líquido Tracor Analytic Mark III y el radiocromatógrafo Packard 7201.

A la Dra. R.M. de Lederkremer, por permitirnos el uso de la centrífuga IEC B-20A.

Al Dr. I. Mizrahi (INTA, Castelar), por las semillas de cebada suministradas.

Al Dr. E.L. Michelotti y a la Dra. A.M. Seldes, por la desinteresada colaboración prestada.

A mis compañeros de laboratorio, Dres. G. Bukovits y R. Erra Balsells, y Lic. A. Baldessari, G. Dartayet y H.M. Garraffo, por su apoyo constante, tanto en momentos de alegría como de tristeza.

A todos mis compañeros y personal del Depto. de Química Orgánica, por su permanente cordialidad.

## INDICE

pág.

### Capítulo I

Introducción.....	1
-------------------	---

### Capítulo II

#### Resultados y Discusión

Síntesis de hordenina isotópicamente marcada....	11
Síntesis de hordenina- $\alpha$ - <sup>14</sup> C.....	11
Síntesis de hordenina- $\beta$ - <sup>14</sup> C.....	24
Síntesis de hordenina marcada en los grupos N-metilos.....	26
Sistemas de crecimiento hidropónico de las plantas de <i>Hordeum vulgare</i> .....	30
Método de inoculación del alcaloide hordenina a las plantas de cebada.....	34
Inoculación de hordenina- $\alpha$ - <sup>14</sup> C y estudio de su degradación.....	38
Ensayos preliminares.....	38
Inoculación de hordenina- $\alpha$ - <sup>14</sup> C.....	39
Inoculación de hordenina- $\beta$ - <sup>14</sup> C y estudio de su degradación.....	47
Introducción.....	47
Inoculación de hordenina- $\beta$ - <sup>14</sup> C.....	48
Análisis de las fracciones radiactivas.....	53
Conclusiones.....	69



Inoculación de hordenina (metilo- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ) en homogenatos de raíces de <i>Hordeum vulgare</i> . Estudio de su degradación.....	71
Inoculación de hordenina (metilo- <sup>14</sup> C <sub>2</sub> ) en plantas de <i>Hordeum vulgare</i> y estudio de su degradación.....	80
Conclusiones finales.....	84

Capítulo III

Parte experimental

General.....	86
Material vegetal.....	90
Ensayos de germinación de cebada.....	90
Ensayos de inoculación de distintas dosis de hordenina a plantas de <i>Hordeum vulgare</i> de 8 días de desarrollo.....	97
Síntesis de hordenina isotópicamente marcada....	99
Experiencia con hordenina- $\alpha$ - <sup>14</sup> C.....	133
Experiencia con hordenina- $\beta$ - <sup>14</sup> C.....	144
Experiencia con hordenina (metilo- <sup>14</sup> C <sub>2</sub> ).....	154
Preparación de homogenatos de tejido de raíz de <i>Hordeum vulgare</i> . Estudio de su capacidad para degradar hordenina.....	156
Experiencia con hordenina (metilo- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ).....	159

<u>Resumen</u> .....	160
----------------------	-----

<u>Bibliografía</u> .....	162
---------------------------	-----

CAPITULO I

INTRODUCCION

## GENERALIDADES

La cebada (*Hordeum vulgare*) es un importante cereal, domesticado de razas salvajes que todavía se encuentran en el sudoeste de Asia. Su cultivo se extiende desde el Artico hasta las altas montañas y puede crecer en los oasis de desiertos, ya que tolera mayor concentración salina que la mayoría de los cereales. Aunque la cebada es un cultivo de clima frío, resiste altas temperaturas si la humedad es baja, pero no se adapta a los climas cálidos y húmedos. Se cultiva muy poco en los trópicos, excepto en zonas montañosas como en Méjico, los Andes y el este de Africa. Las zonas de mayor producción son: Europa, el norte de Africa, Etiopía, el Cercano Oriente, la URSS, China, India, Canadá y EEUU. En nuestro país, el cultivo de cebada se extiende por todo el territorio nacional, desde La Quiaca hasta Tierra del Fuego (1).

En orden de importancia, la cebada se utiliza para la alimentación de animales, para la fabricación de maltas para cerveza y para la alimentación humana.

## HISTORIA

La cebada fue uno de los primeros cultivos domesticados en el Cercano Oriente (2). Han aparecido restos arqueológicos de lo que parecen ser formas salvajes en el Eufrates, en Siria, de aproximadamente 8000 años a.C. También hay restos al sur de las alturas del Jordán y en Jarmo, en Irak, de

de unos 6800 años a.C. No ha sido posible determinar si provienen de cosechas salvajes o de los primeros intentos para cultivar el cereal.

La cebada cultivada se encontró en Irán, Siria, Palestina y Turquía, cuya antigüedad oscila entre los 6000 a 7000 años a.C.

La agricultura se desarrolló primero en el Cercano Oriente, en tierras secas y a altura suficiente para tener adecuada cantidad de agua de lluvia. La técnica de la irrigación se desarrolló rápidamente y la cebada fue el principal cultivo de esa época, no sólo en la Mesopotamia, sino también en Egipto. Los restos encontrados indican que en esa época, la cebada era más importante que el trigo para la alimentación humana.

La cebada era el grano más abundante en el Cercano Oriente, y el más barato. Era el dinero de los pobres, la ración de los soldados, los siervos y los esclavos, y el medio de vida de los campesinos griegos. Tenía reputación de ser una comida fuerte, y a los antiguos gladiadores se los llamaba *hordearii* porque se alimentaban con cebada durante su entrenamiento.

De acuerdo con la evidencia arqueológica, la cebada llegó a España 5000 años a.C. y un poco después al Rin. También se extendió a la India, adonde llegó 3000 años a.C., y luego pasó a China. También llegó, en algún momento a Etiopía, donde se transformó en el cultivo dominante.

La cebada llegó al Nuevo Mundo con Colón en su segundo viaje. A comienzos del siglo XVI se introdujo en Méjico.

En Perú tuvo un gran éxito entre los indios, debido a su tolerancia al frío, ya que se adaptó perfectamente al clima de los Andes. Durante el siglo XVIII la cebada se cultivaba en casi todas las colonias españolas, desde el sur de Argentina y Chile hasta California.

#### ALCALOIDES DE *Hordeum vulgare* (cebada)

Los estudios químicos sobre la cebada comenzaron hace muchos años, debido al interés que despertaba la fabricación de cerveza, su análisis y la evaluación de las distintas calidades de cebada, según la cantidad de malta y cerveza que podían producir.

El malta, empleado en la fabricación de cerveza, está constituido por el grano de cebada recién germinado y secado. Debido a la corta duración de la germinación, de 24 a 48 horas dependiendo de la temperatura a la que ésta se realice, la plántula se reduce a unas raicillas que se eliminan fácilmente por fricción (3).

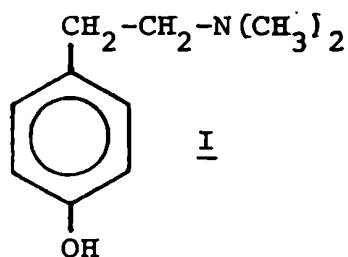
Estas raicillas secas, subproducto de la fabricación del malta, tienen un alto contenido de nitrógeno y por ello se intentó utilizarlas como forraje, pero resultaron ser tóxicas para los animales. Por otro lado, Roux había encontrado que un medio de cultivo preparado con un extracto acuoso de estas raicillas no permitía el desarrollo de ciertos microorganismos, y fue el punto de partida para las aplicaciones terapéuticas de estos extractos contra la disentería y otras afecciones. Como

los resultados de los tratamientos fueron aleatorios, este método fue rápidamente abandonado (4).

Mientras tanto, Lauth, de Carcassonne, le envió a E. Léger estas raicillas para que averiguara si sus propiedades eran debidas a algún principio químico. Estas investigaciones finalizaron con el aislamiento de un alcaloide que Léger denominó hordenina (I), y cuya estructura también determinó (5-9). Casi simultáneamente, Gaebel (10) hizo el mismo descubrimiento.

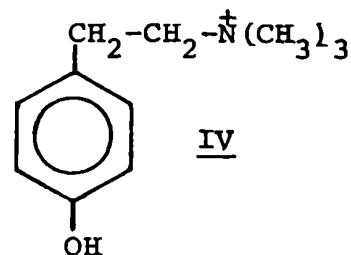
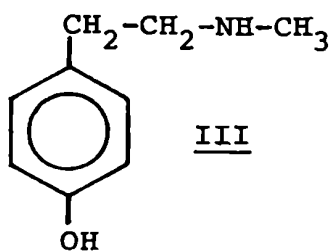
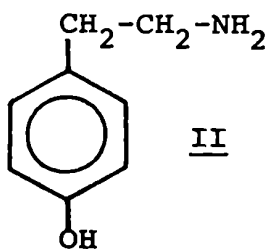
Este compuesto ya había sido encontrado antes en un cactus de México (*Anhalonium fissuratum* Engelm.) por Heffter, que le dio el nombre de anhalina. En un primer momento, se pensó que se trataba de dos alcaloides distintos, hasta que Spaeth, en el curso de un trabajo sobre síntesis de hordenina, demostró que se trataba de la misma sustancia (11).

Posteriormente, han aparecido numerosos trabajos que informan acerca de la presencia de hordenina en distintas familias de plantas (12,13), en algas (14-16) y hongos (17,18), en Amarilidáceas (19-21), Berberidáceas (22), en muchas otras Cactáceas (23-42), también en Cannabináceas (43) y Euforbiáceas (44), en otras Gramíneas (45-48) y Leguminosas (49-51), y también en Liliáceas (52), Rutáceas (22), Asclepiadáceas (53) y Solanáceas (54).

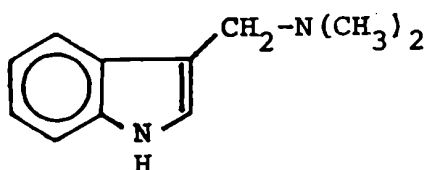


OTROS ALCALOIDES EN CEBADA

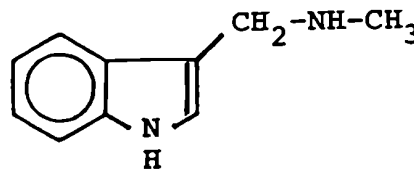
Junto con la hordenina, se han encontrado también otras β-feniletilaminas muy relacionadas, tanto estructural como biosintéticamente (67,68), que son la tiramina (II), la N-metiltiramina (III) y la candicina (IV).



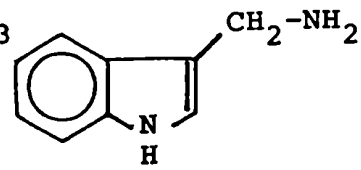
Además de las β-feniletilaminas, en cebada hay alcaloides indólicos, como la gramina (V), el 3-aminometilindol (VI) y el 3-metilaminometilindol (VII); también se han encontrado hordatina A y B, putrescina e histamina (69,70).



V



VII



VI

### PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA HORDENINA

La acción farmacológica de la hordenina fue descrita por primera vez por Heffter (4). En ranas provoca parálisis del sistema nervioso central, sin excitación previa. Camus (55) informó que el compuesto es ligeramente antiséptico y que inhibe algunos fermentos solubles.

Tiene baja toxicidad para mamíferos, y en pequeñas dosis no tiene ningún efecto sobre la circulación sanguínea; dosis mayores causan un aumento en la presión sanguínea y aceleran el pulso; finalmente, dosis muy grandes provocan la muerte por paro respiratorio (12).

Rietschel (12) encontró que el efecto sobre la presión no es de origen central y que la hordenina estimula el músculo cardíaco. Es mucho menos activa que la adrenalina y de acuerdo con Raymond-Hamet (56,57) y Ludueña (12), tiene un efecto similar a la nicotina.



También se sabe que es diurética y se ha usado como remedio contra la diarrea y la disentería (12). Esto puede deberse a que presenta propiedades antibióticas (58,59).

Recientemente (60), se ha encontrado que los ratones de campo rechazan la comida si ésta tiene hordenina, y que su ingestión les provoca lesiones en el riñón (61).

Con respecto a su acción sobre insectos, para las langostas es inhibidor de la ingestión de material vegetal (62, 63) y también inhibe la succión de una solución de sacarosa que la contenga (64).

Todas estas observaciones indican que la hordenina puede tener importancia en agricultura, aún más si se tiene en cuenta que  $\beta$ -feniletilaminas de estructura muy similar son inhibidores de crecimiento de plantas (65).

Por último, ha aparecido un trabajo (66) que informa acerca de la actividad antitumoral e inhibidora de la hordenina contra las células del sarcoma 180.

#### DISTRIBUCION Y BIOSINTESIS DE HORDENINA EN LA PLANTA DE CEBADA

Después de los primeros trabajos de Raoul (71), que determinó la localización y la concentración de hordenina en la planta de cebada, en función de su grado de desarrollo, muchos otros investigadores han estudiado la distribución y la biosíntesis de este derivado de la tiramina. La hordenina, y su precursor inmediato, la N-metiltiramina, no se encuentran en la semilla de cebada sin germinar, pero aparecen en las ra-

ices durante el primer día de la germinación. El nivel de estos alcaloides en las raíces alcanza un máximo entre los 5 y los 11 días (siendo este máximo reproducible para cada variedad de cebada, cultivada en condiciones experimentales constantes). Luego de este máximo, la cantidad de  $\beta$ -feniletilaminas decae hasta que luego de un mes de desarrollo, quedan sólo trazas de ellas (67,68,72,73).

Raoul sugirió que la hordenina se biosintetizaba por sucesivas metilaciones de la tiramina, sin embargo él no logró encontrar N-metiltiramina en las raíces de cebada, la cual fue detectada e identificada años después por Kirkwood y Marion (74). El camino biosintético propuesto por Raoul fue confirmado al aislarse N-metiltiramina y hordenina radiactivas, 4 días después de haber inoculado plántulas de cebada con tiramina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  (75). Posteriormente, se demostró que la fenilalanina (76) y la tirosina (77) son precursores más remotos de la hordenina (ver Figura 1).

También se ha aislado, de raíces de cebada, la enzima que cataliza la metilación de tiramina para dar N-metiltiramina, con S-adenosilmetionina, y se ha comparado su actividad con el nivel de estos alcaloides en la planta (78-80).

Todas estas observaciones nos indican que la hordenina cumple un activo rol metabólico en la cebada, con propósitos desconocidos, pero sólo durante la primera etapa de su desarrollo.

Aun cuando se había trabajado mucho en su biosíntesis, sólo había un trabajo que trataba acerca de su catabolismo

mo en plantas enteras, del año 1956 (81), y cuyos resultados no parecían muy concluyentes. Mucho más recientemente, Meyer y Barz (73,82) estudiaron este tema, pero en cultivos de células, con los problemas de diferencia de comportamiento que éstos pueden tener (135-137).

Dado el interés que despertaba el poder determinar paso a paso el camino de descomposición de la hordenina en la planta de cebada en desarrollo, y que esa velocidad de degradación era lo suficientemente lenta como para tratar de encontrar los intermediarios degradativos, pero lo suficientemente rápida para obtener resultados en tiempos relativamente cortos, fue nuestro propósito estudiar el mencionado proceso catabólico. Para ello se programó utilizar trazadores isotópicos incorporados en el alcaloide para tener puntos de referencia que permitieran detectar los distintos productos en que se transforma el alcaloide para intentar su aislamiento e identificación. Aun en casos en que no fuera posible aislar los productos de degradación, la presencia de una marca facilitaría una tentativa identificación mediante las modernas técnicas cromatográficas y espectroscópicas a nuestro alcance.

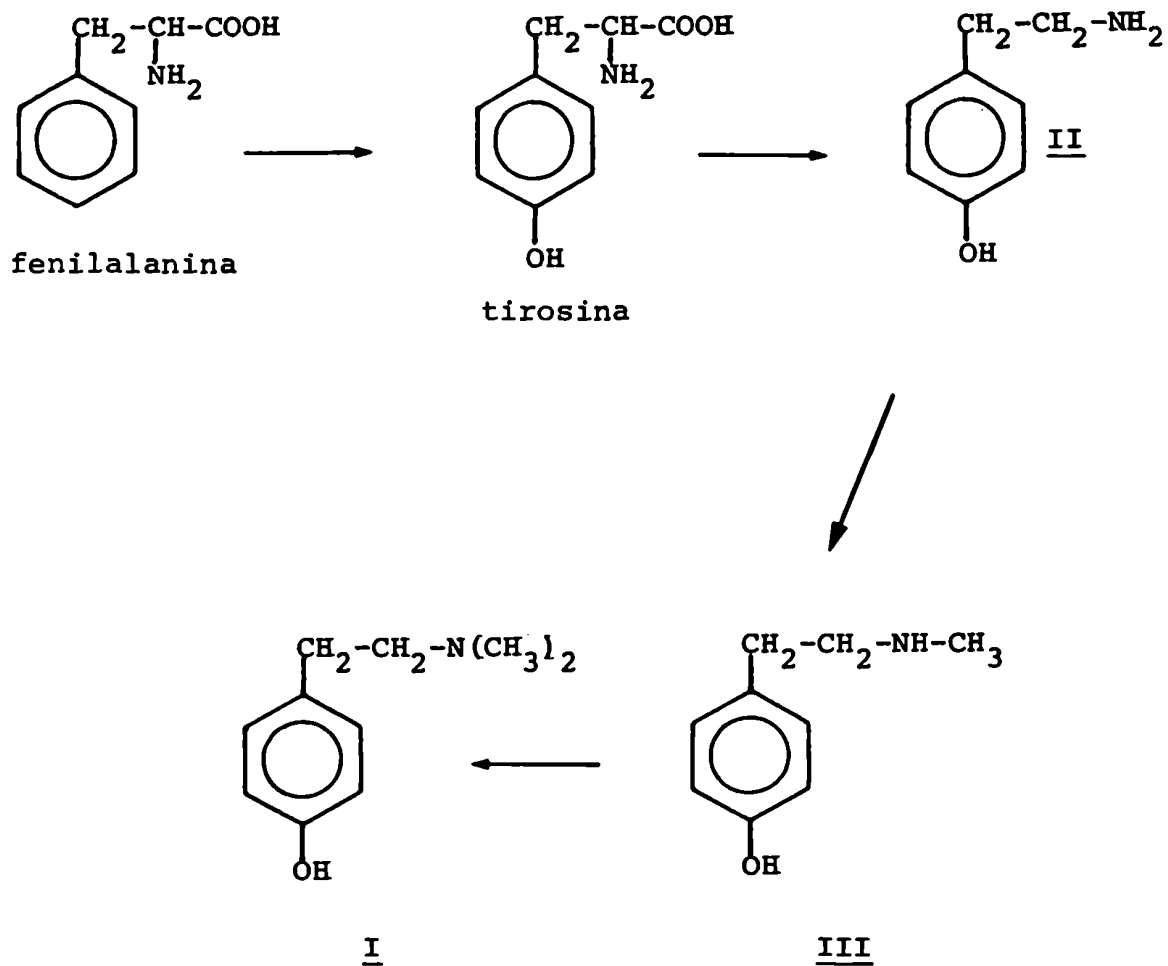


Figura 1: Biosíntesis de hordenina en *Hordeum vulgare*.

CAPITULO II

RESULTADOS Y DISCUSION

## SINTESIS DE HORDENINA ISOTOPICAMENTE MARCADA

Para estudiar el catabolismo del alcaloide hordenina en plantas de cebada, se necesitaba el alcaloide marcado con isótopos radiactivos o de masa en distintas posiciones. En particular, las posiciones de más interés eran los carbonos de la cadena lateral y los de los grupos metilos unidos al nitrógeno.

Primeramente, se sintetizó la hordenina marcada con carbono-14 en el carbono- $\alpha$  al grupo dimetilamino:

### 1. Síntesis de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C (Figura 11):

Las síntesis anteriores que se conocían de la hordenina eran todas de bajos rendimientos (71,84-88), o las secuencias utilizadas no permitían la introducción en la molécula de un átomo de carbono isotópico (por ejemplo, como unidad de un carbono C-1, como el cianuro de potasio). También se habían descrito las síntesis de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C (81) y de hordenina- $\beta$ -<sup>14</sup>C (83), pero en el primer caso, los procedimientos empleados en ese entonces hacían dudar de la certeza en la posición de la marca y, en ambos casos, se pensó que los métodos podían mejorarse.

El producto de partida fue el ácido *p*-hidroxibenzoico (VIII), el que fue convertido cuantitativamente en su éster metílico (IX) por tratamiento con diazometano y cuyo espectro de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H (RMN-<sup>1</sup>H) se puede ver en

la Figura 2.

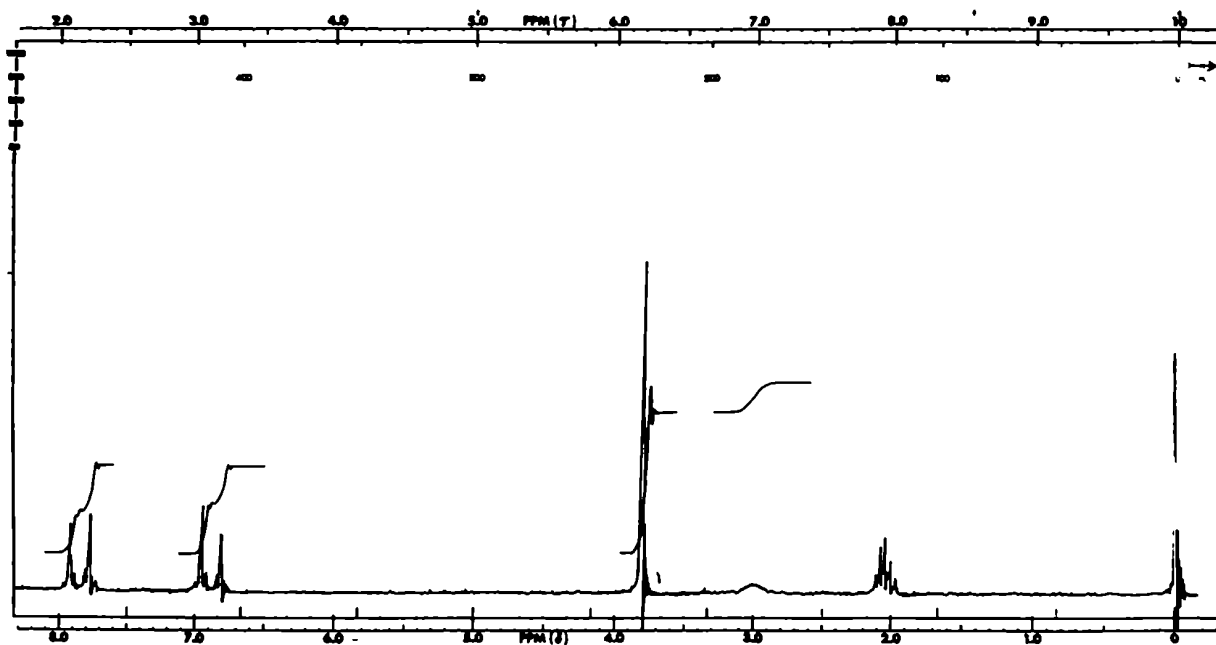


Figura 2: Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de *p*-hidroxibenzoato de metilo (IX).

Posteriormente, se benciló el hidroxilo fenólico, para dar el *p*-benciloxibenzoato de metilo (X) (89,90). Esta reacción fue probada en distintas condiciones para mejorar su rendimiento: se varió la base, la temperatura, el solvente y el tiempo de reacción. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la Tabla 1, en la que puede verse que los más satisfactorios se obtuvieron en acetona anhidra a reflujo, con car-

bonato de potasio como base y catálisis con ioduro de potasio, obteniéndose el compuesto X con un rendimiento del 90%. El espectro RMN-<sup>1</sup>H de este compuesto se puede ver en la Figura 3.

Solvente	Tiempo (h)	Temp. (°C)	Base	Catalizador	Rendimiento (%)
acetofenona	8	160	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	70
metanol	18	25	NaOH	-	-
acetona anh.	24	57	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	50
acetona anh.	24	57	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	KI	90

Tabla 1: Reacciones de bencilación de *p*-hidroxibenzoato de metilo (IX).



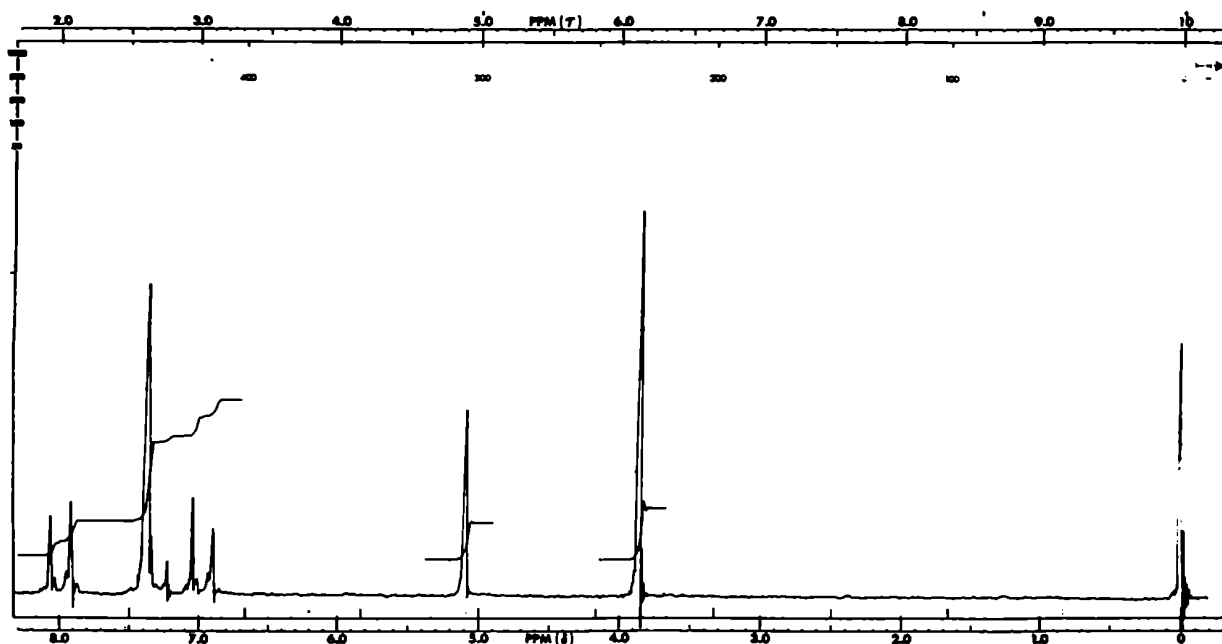


Figura 3: Espectro RMN-<sup>1</sup>H de *p*-benciloxibenzoato de metilo (X).

Posteriormente, este éster se redujo al alcohol *p*-benciloxibencílico (XI) con hidruro de aluminio y litio en éter etílico anhidro. El espectro RMN-<sup>1</sup>H de esta sustancia puede verse en la Figura 4. Esta reacción resultó muy satisfactoria (rendimiento cuantitativo) cuando se la llevó a cabo en condiciones controladas: 15 minutos a reflujo. Al probar en otras condiciones (a menor temperatura: 0°C o temperatura ambiente), se obtuvieron mezclas de productos (que no eran el alcohol buscado) que no fueron analizadas. Si el reflujo se mantenía por más de 15 minutos, el rendimiento de la reacción bajaba, conduciendo también a mezclas.

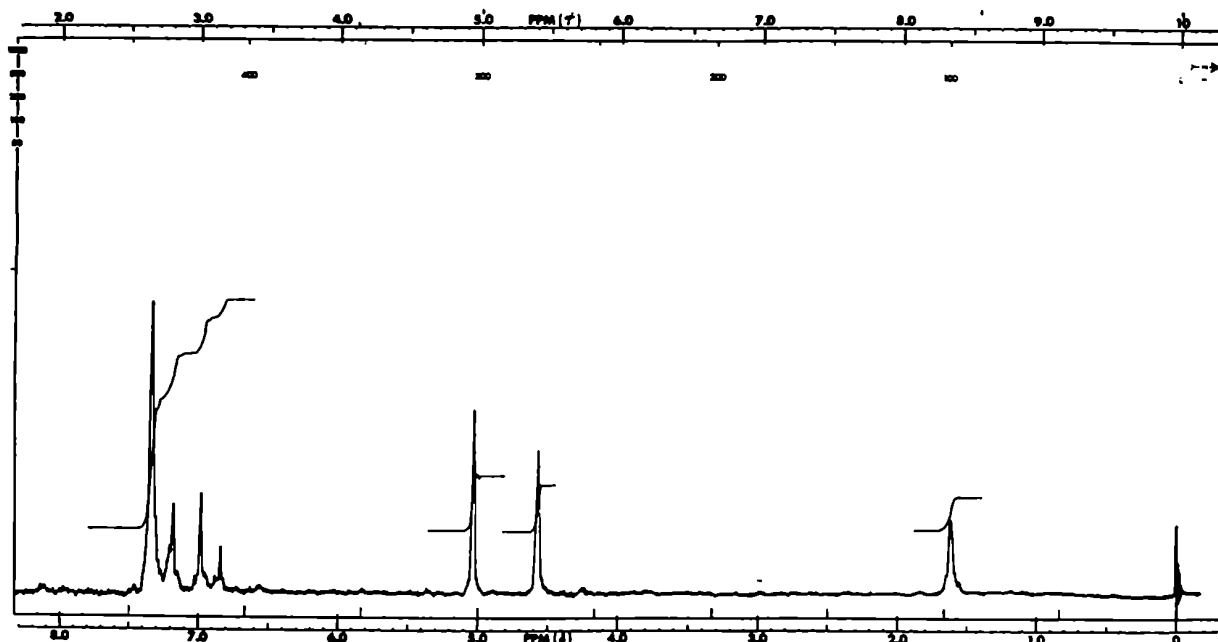


Figura 4: Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del alcohol *p*-benciloxibencílico (XI).

El cloruro de *p*-benciloxibencilo (XII), cuyo espectro RMN- $^1\text{H}$  se puede ver en la Figura 5 (91,92) se sintetizó tratando el alcohol XI con exceso de ácido clorhídrico (c) en éter etílico a temperatura ambiente durante 22 horas, y éste a su vez se transformó en el nitrilo XIII de dos modos, buscando mejorar los rendimientos: en uno de los métodos se emplearon acetona anhidra como solvente, cantidades catalíticas de ioduro de potasio, a reflujo durante varias horas, y cianuro de potasio como nucleófilo (92). Esta reacción tiene muy buen rendimiento (95%) sólo si se realiza con exceso de cianuro de

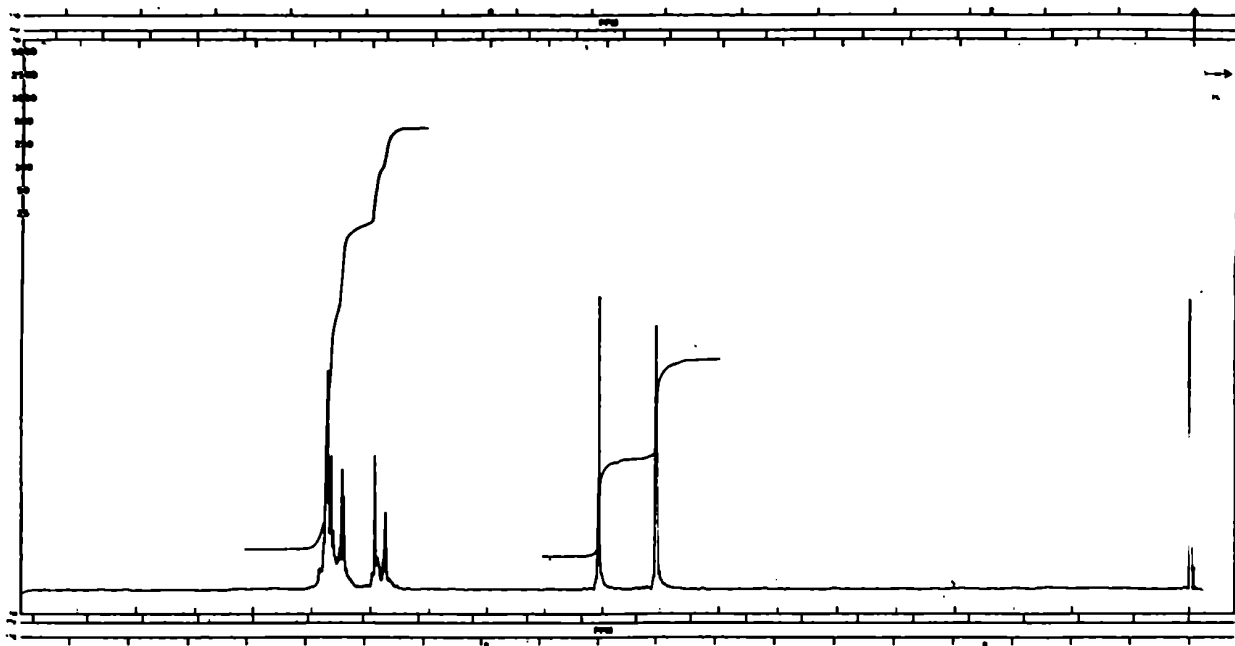


Figura 5: Espectro RMN-<sup>1</sup>H del cloruro de p-benciloxibencilo (XII).

potasio, pero éste decae mucho si el exceso llega a ser sólo del 10%, y es más bajo aún con cantidades equimoleculares de cada reactivo. Esto podría deberse a la disminución de la concentración efectiva de cianuro, por formación de la cianhidrina de la acetona. Mediante el espectro RMN-<sup>1</sup>H de la mezcla de reacción, que puede verse en la Figura 6, se determinó que en condiciones de reacción con 10% de exceso de cianuro, disminuye la formación del nitrilo buscado, queda cloruro sin reaccionar y aumenta el porcentaje de un producto lateral, el alcohol XI. De los valores de integración correspondientes a las seña-

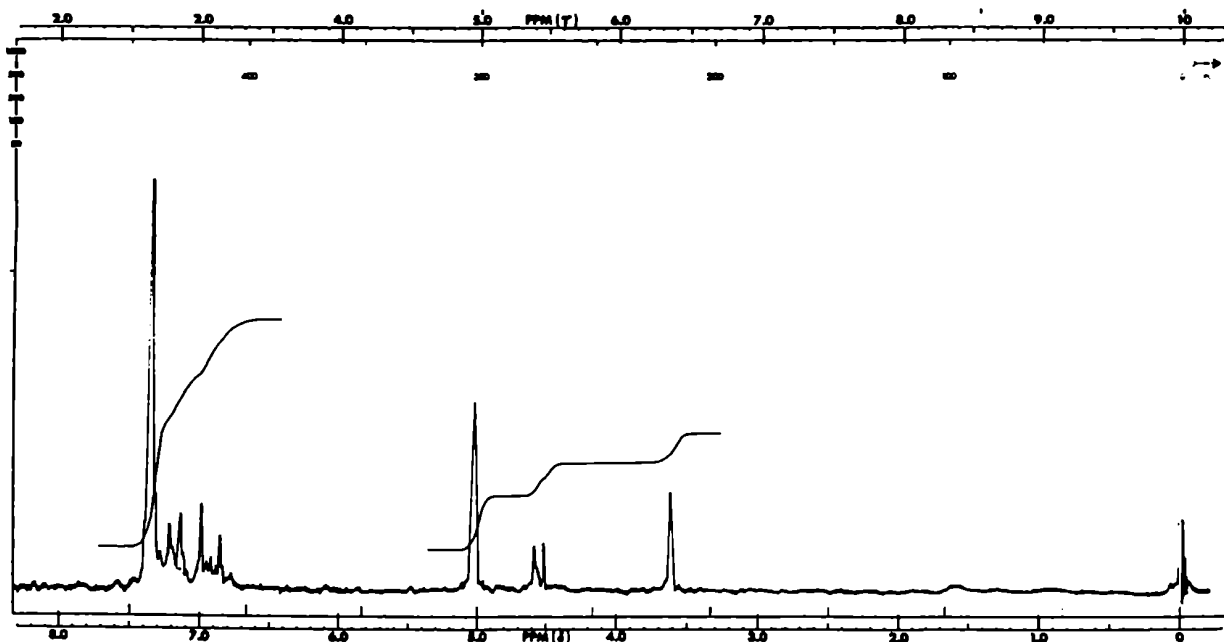


Figura 6: Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la mezcla de reacción de cianuración, realizada con 10% de exceso de cianuro de potasio, en acetona.

les debidas a los grupos  $C_6H_5-CH_2-O-$  (común a las tres estructuras),  $-CH_2OH$ ,  $-CH_2Cl$  y  $-CH_2CN$  a  $\delta$  5,03; 4,60; 4,56 y 3,63 respectivamente, fue posible determinar que con un 10% de exceso de cianuro de potasio por encima de la cantidad estequiométrica, se produjo solamente un 50% del producto buscado, mientras que un 25% del producto de partida había quedado sin reaccionar y otro 25% había sufrido hidrólisis al alcohol correspondiente. Por esta razón, este método no era de utilidad, ya que al utilizar cianuro de potasio marcado con carbono-14, és-

te debía ser el reactivo limitante.

Se probó entonces un cambio de solvente: dimetilsulfóxido, a temperatura ambiente (93,94). Las experiencias realizadas en estas condiciones mostraron que era posible trabajar con cantidades estequiométricas de los reactivos - y también con cianuro de potasio en defecto - sin disminución del rendimiento.

El nitrilo radiactivo resultante, cuyo espectro RMN- $^1\text{H}$  puede verse en la Figura 7, se redujo a amina primaria me-

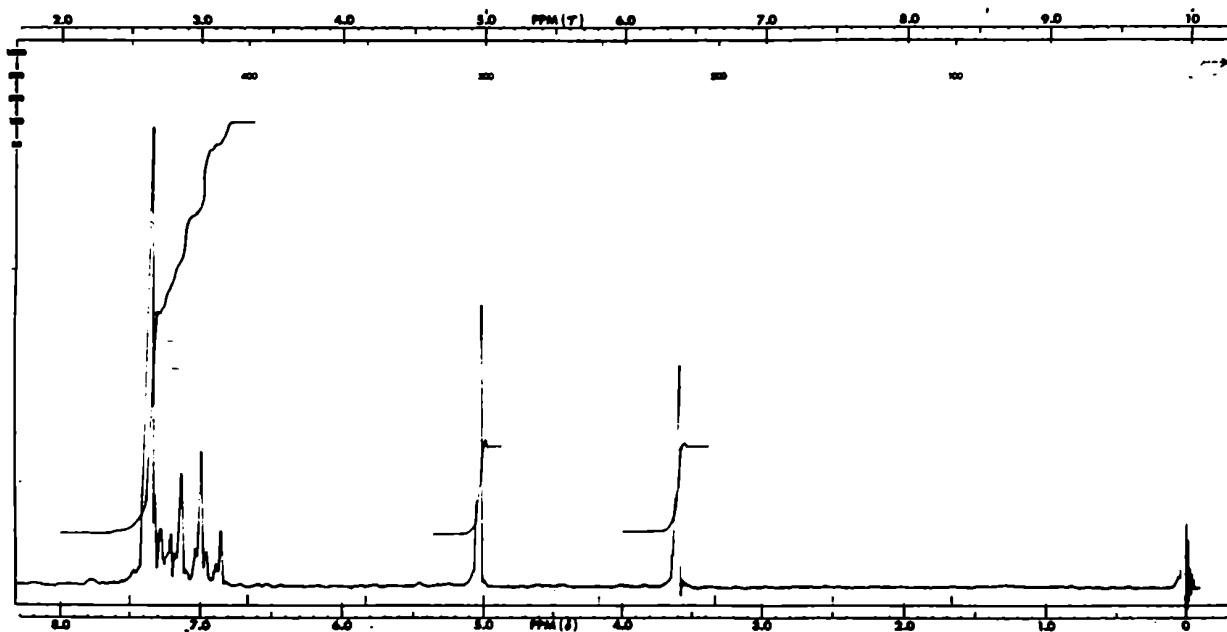


Figura 7: Espectro RMN- $^1\text{H}$  de *p*-benziloxifenilacetoni-trilo (XIII).

diante hidrogenación catalizada por paladio, a presión atmosférica y a temperatura ambiente. En esas mismas condiciones se produce la hidrogenólisis del éter bencílico (95-98). La reacción se hizo en medio ácido para eliminar la amina libre del medio de reacción, ya que de estar ésta presente, la reacción puede proseguir, dando la amina secundaria correspondiente y amoníaco (99). El rendimiento global de la transformación de XII en II fue del 80%. El espectro RMN- $^1\text{H}$  del clorhidrato de tiramina inactivo puede verse en la Figura 8.

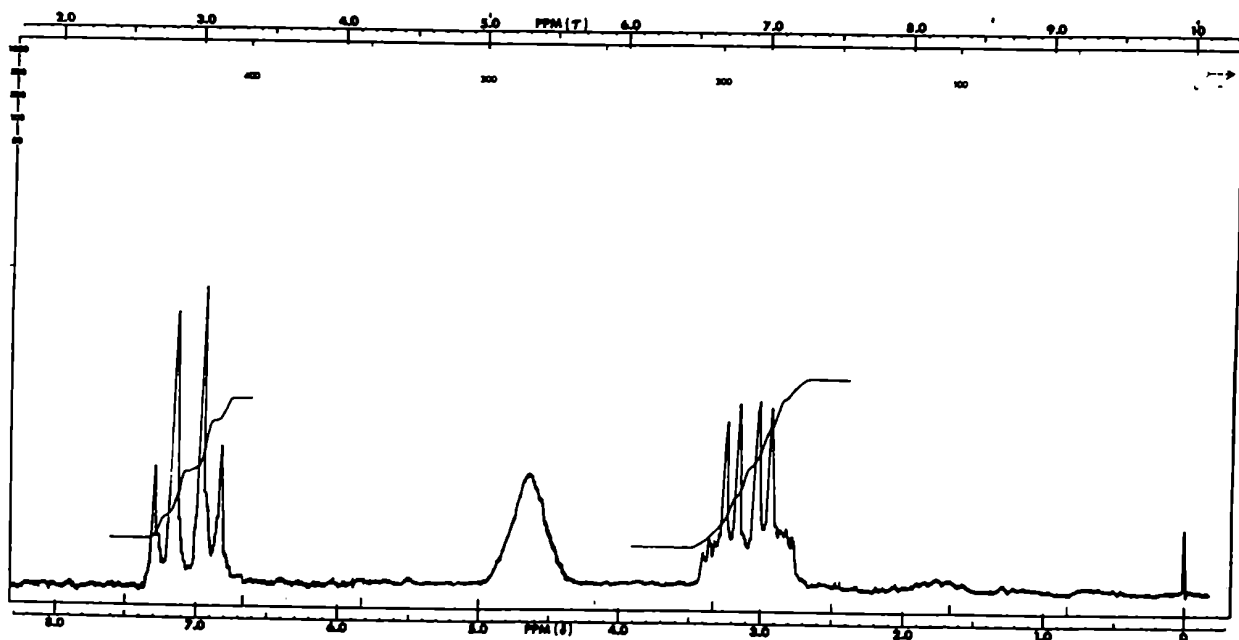


Figura 8: Espectro RMN- $^1\text{H}$  del clorhidrato de tiramina (II).

La tiramina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  (II) así obtenida (como clorhidrato), se metiló en condiciones reductivas (100) con formaldehído e hidrogenación catalítica con paladio, para dar la hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  (I), con un rendimiento del 89% (101), luego de ser purificada por sublimación (ver Figura 11). Rendimiento global másico (a partir de cianuro de potasio) 71%, y rendimiento radioquímico 67%. El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (125) de una muestra inactiva de esta sustancia puede verse en la Figura 9, y los espectros de RMN- $^1\text{H}$  (en metanol- $\text{d}_6$  y en ácido trifluoroacético) en la Figura 10.

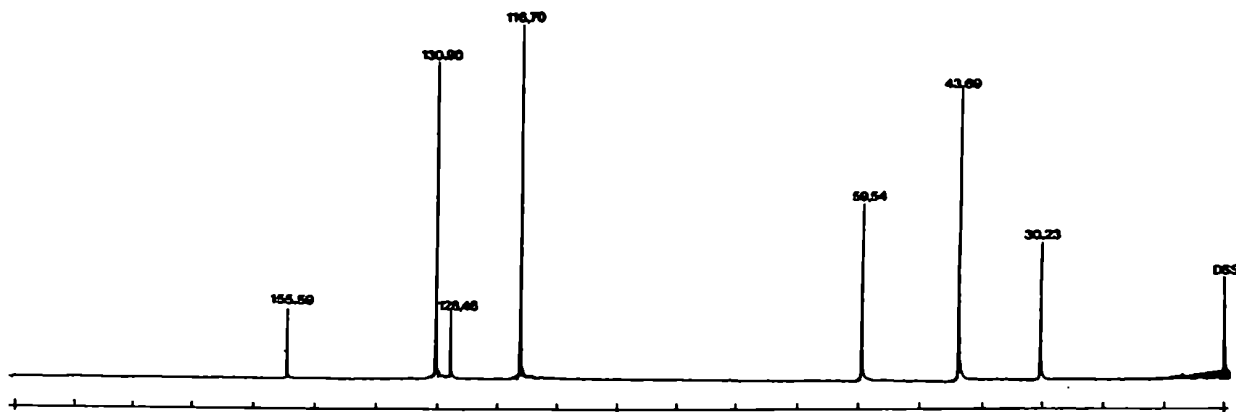


Figura 9: Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de hordenina (I).

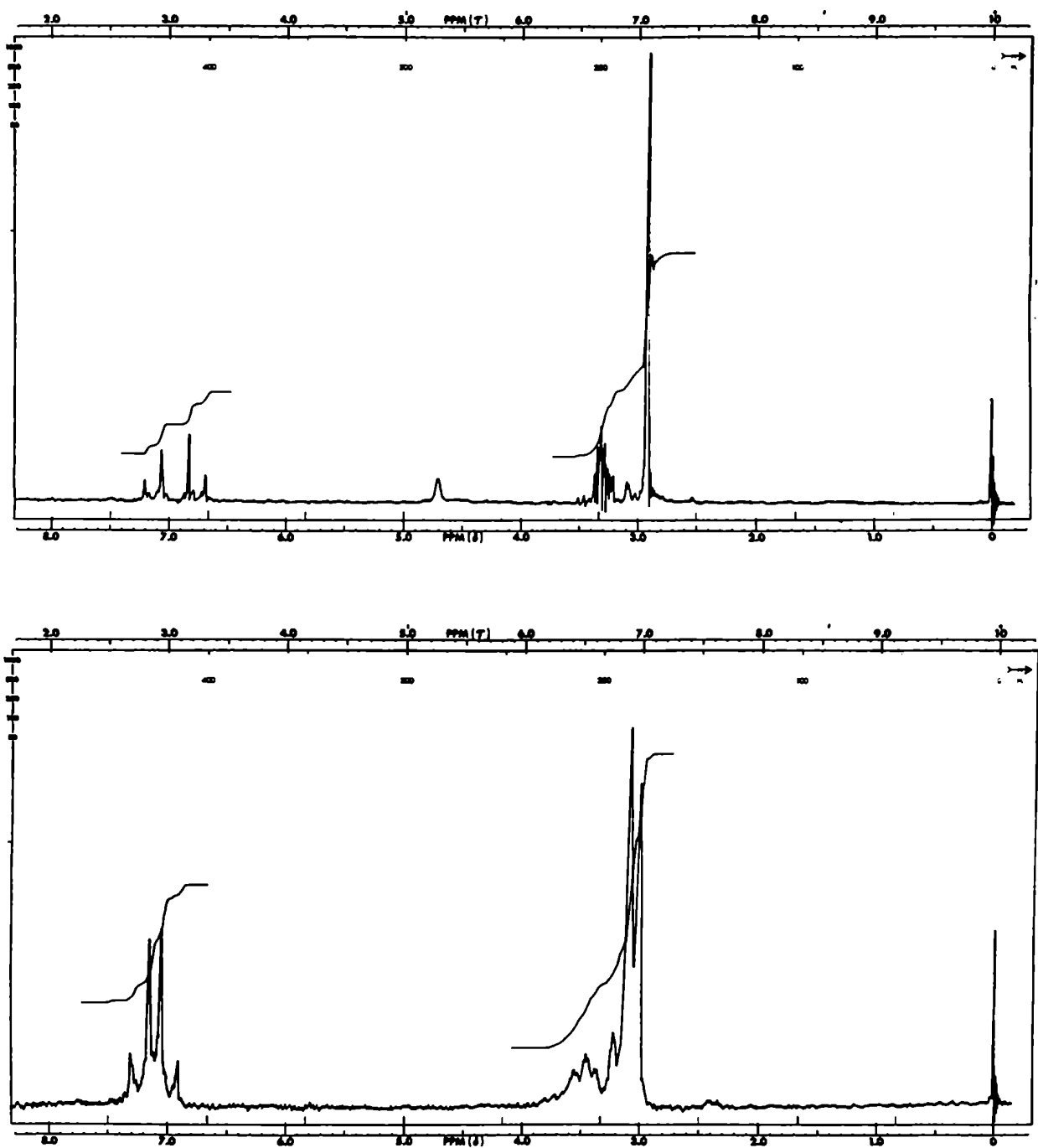


Figura 10: Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de hordenina (I), en metanol- $\text{d}_6$  (arriba), y en ácido trifluoroacético (abajo).



En otra síntesis de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ , se repitió la secuencia anterior pero usando ahora cianuro de sodio- $^{14}\text{C}$ , diluyéndolo con cianuro de potasio inactivo. Esto se hizo dado que el cianuro de sodio es más soluble en dimetilsulfóxido que el cianuro de potasio (126). De esta forma se obtuvo hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  con un rendimiento global másico similar (76% a partir del cianuro), y un rendimiento radioquímico similar al másico, 75%, a partir de 1 mCi.

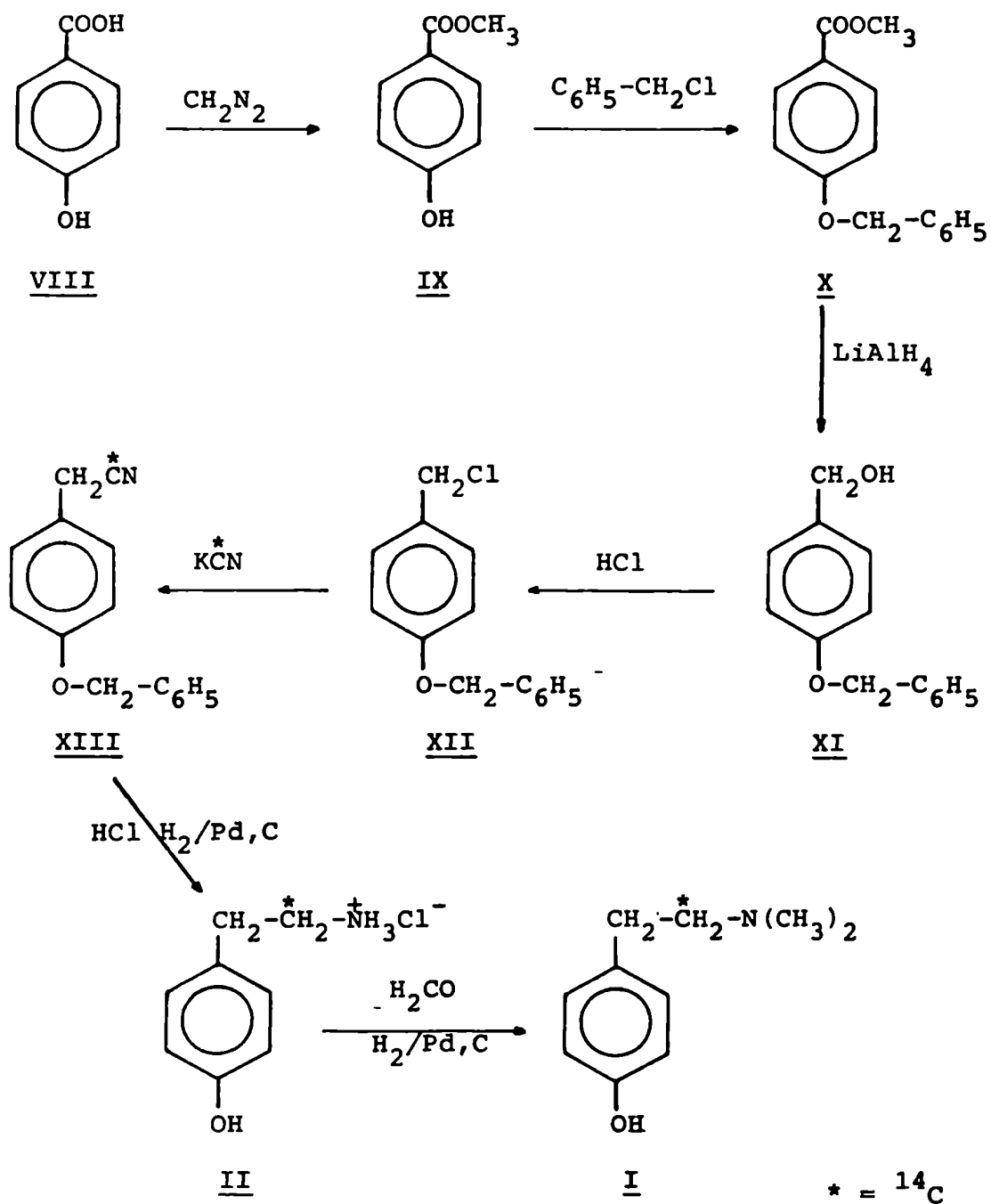
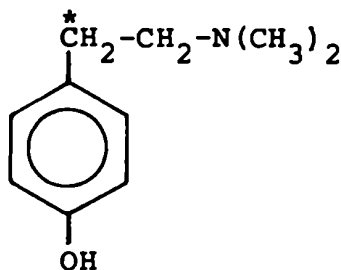


Figura 11: Esquema de sîntesis de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ .

## 2. Síntesis de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ :



Para la síntesis de este producto se pensó en usar la misma ruta empleada para la síntesis de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ , pero partiendo ahora del ácido *p*-hidroxibenzoico marcado con carbono-14 en el carboxilo. El producto radiactivo de que se disponía era el ácido *p*-metoxibenzoico(carboxilo- $^{14}\text{C}$ ), el que se intentó hidrolizar al ácido *p*-hidroxibenzoico. Para estudiar las mejores condiciones de hidrólisis, se usó ácido *p*-metoxibenzoico inactivo. Ante la imposibilidad de llevar a cabo esta hidrólisis con buen rendimiento, con los distintos reactivos y condiciones probados: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido iodhídrico, tricloruro de boro, a distintas temperaturas y concentraciones (98,102), este camino tuvo que ser dejado de lado. Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 2.

Reactivo	Tiempo	Temperatura	Rendimiento
Cl <sub>3</sub> B	24 h	-78°C (1 h)	
		25°C (23 h)	50%
Cl <sub>3</sub> B	120 h	-78°C (1 h)	
		25°C (119 h)	50%
HCl (37%)	20 h	90°C	N.R.
HCl (37%)	17 h	120°C	<10%
HCl (7%)	19 h	120°C	N.R.
HCl (19%)	17 h	120°C	~25%
HBr (48%)	16 h	120°C	-, S.
HBr (48%)	4 h	120°C	N.R.
HI (67%)	20 h	130°C	-, S.
HI (55%)	5 h	90°C	N.R.
HI (55%)	16 h	120°C	-, S.

N.R.: no reaccionó

S.: productos de sustitución en el anillo aromático

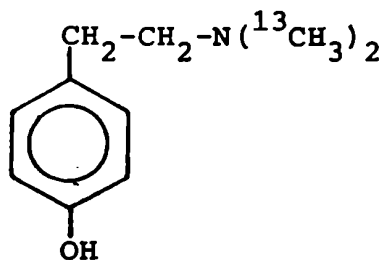
Tabla 2: Reacciones de hidrólisis del ácido *p*-metoxibenzoico al ácido *p*-hidroxibenzoico.

Se decidió entonces obtener el producto requerido a partir de tiramina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ , que es un producto comercial, metilándola reductivamente con formaldehído e hidrogenando catalíticamente con paladio, como se había hecho al sintetizar la hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ . En este caso, el rendimiento másico de la reacción fue del 100%, y el radioquímico llegó al 73% (83,103).

### 3. Síntesis de hordenina marcada en los grupos N-metilos:

Para la marcación de los grupos metilos, se siguió utilizando la reacción de metilación reductiva anteriormente empleada. La idea era reemplazar el formaldehído común por formaldehído marcado, ya fuera con carbono-14 o con carbono-13. Primeramente, se hizo un estudio de los rendimientos de la reacción variando la cantidad de formaldehído agregada, con formaldehído inactivo. Se encontró que los rendimientos seguían siendo altos (90-100%), aún cuando la cantidad de formaldehído agregada fuera la estequiométrica.

#### A) Síntesis de hordenina (metilo- $^{13}\text{C}_2$ ):



Se llevó a cabo con exceso de formaldehído- $^{13}\text{C}$  (90%  $^{13}\text{C}$ ) y se aisló la hordenina marcada. El espectro de masa, que puede verse en la Figura 12, mostró que la sustancia estaba marcada en un 81,8% en ambos metilos, un 16,4% en uno solo de ellos y el 1,8% restante no había resultado marcado.

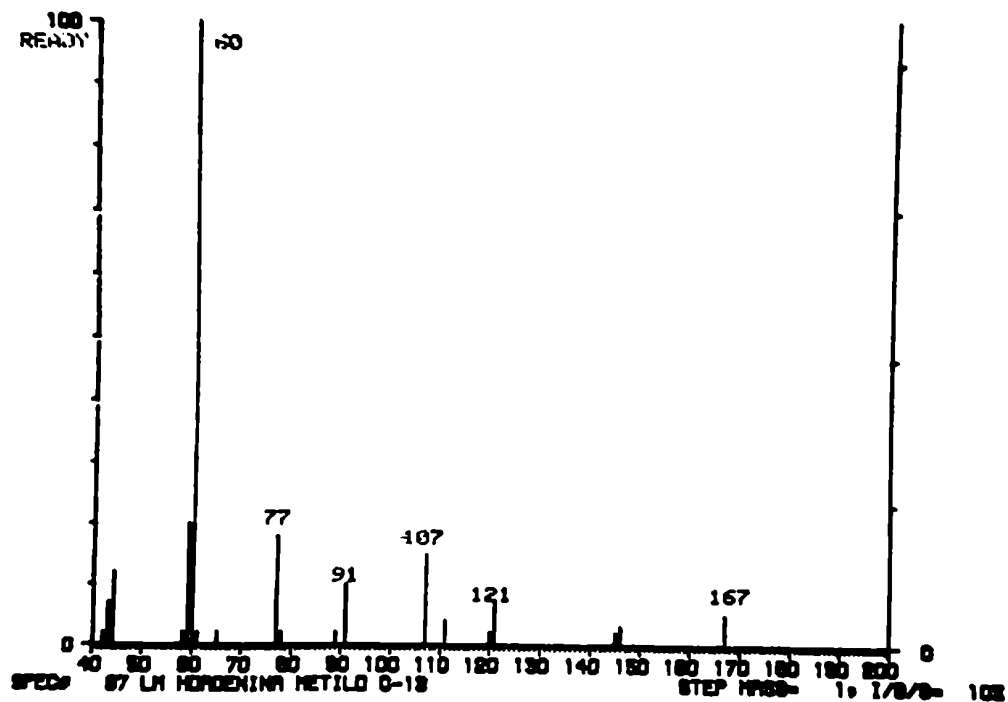


Figura 12: Espectro de masa de hordenina(metilo- $^{13}\text{C}_2$ ).

El espectro RMN- $^{13}\text{C}$  indicó que, además de la señal esperada a 43,73 ppm, aparecía una absorción adicional a 72,60 ppm, que correspondía a un polímero de formaldehído, sublimable en las mismas condiciones que la hordenina (104).

Esta impureza se hidrolizó en medio ácido a temperatura ambiente, y al resublimar, la hordenina resultante estaba pura, como pudo verse en los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y RMN- $^1\text{H}$  (ver Capítulo III, pág. 131). Este último espectro puede verse en la Figura 13.

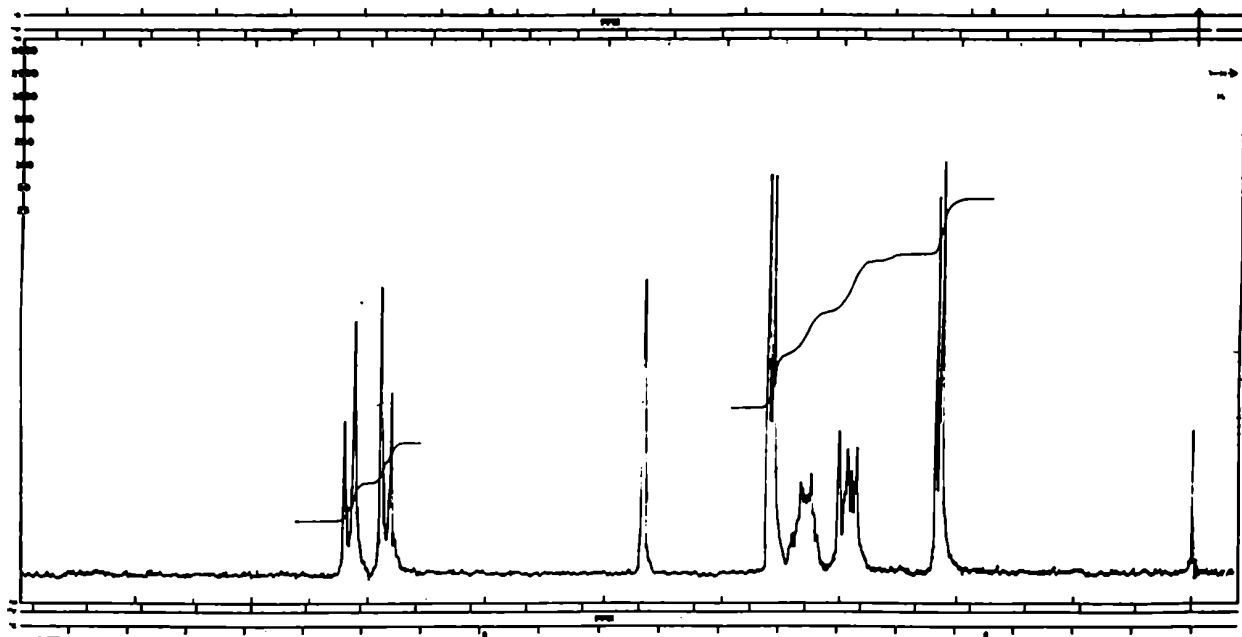
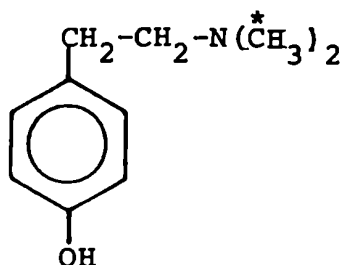


Figura 13: Espectro RMN- $^1\text{H}$  de hordenina (metilo- $^{13}\text{C}_2$ ).

B) Síntesis de hordenina(metilo-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>):



El reactivo radiactivo fue en este caso el formaldehído-<sup>14</sup>C, en solución acuosa, y se introdujo una pequeña modificación en la reacción para aumentar el rendimiento radioquímico: durante las primeras horas de reacción se agregó formaldehído-<sup>14</sup>C más, aproximadamente, el 40% del formaldehído inactivo que se necesitaba para completar la reacción (según los cálculos estequiométricos). Posteriormente, se agregó el formaldehído restante, más un pequeño exceso. De esta manera, el rendimiento másico fue del 100% y el radioquímico del 85% (82)

En general, se ha observado que los rendimientos radioquímicos son, a lo sumo, iguales a los másicos o, generalmente, menores. Es posible que esto se deba a efectos isotópicos, donde las moléculas con carbono-14 reaccionen más lentamente que aquéllas que llevan el carbono-12.

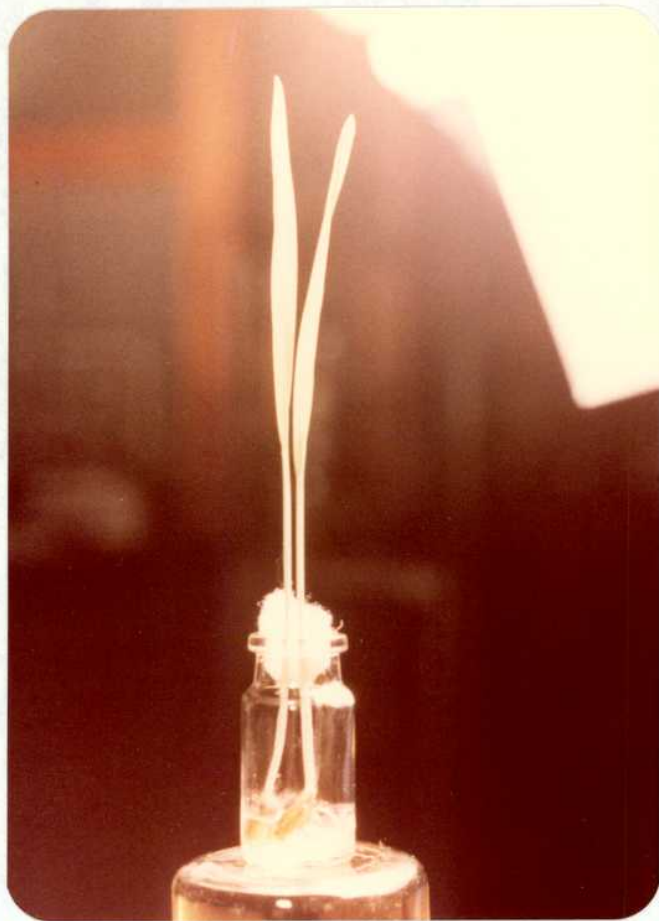


SISTEMAS DE CRECIMIENTO HIDROPONICO DE LAS PLANTAS DE *Hordeum*  
*vulgare*

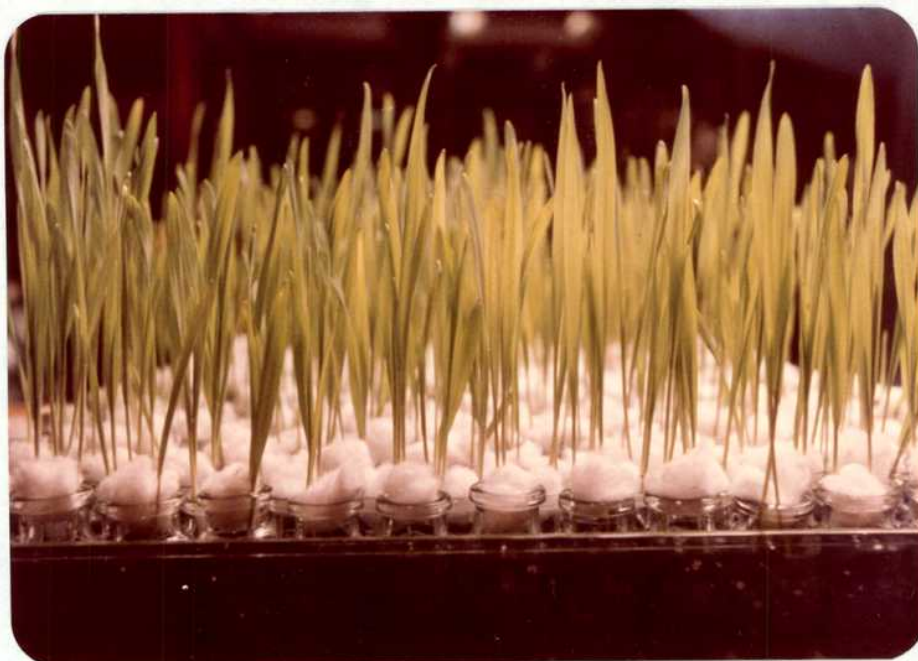
Para la inoculación de la hordenina marcada se necesitaba un sistema para el crecimiento de las plantas que permitiera un buen desarrollo de las mismas durante todo el tiempo que durara la experiencia. Además, se debía evitar el ataque de insectos y la proliferación de microorganismos. Por todo esto, se buscó algún procedimiento hidropónico satisfactorio, dejando de lado el desarrollo en tierra.

Para comenzar la germinación se colocaron las semillas en bandejas con arena lavada y esterilizada por calcinación, humedecidas con la cantidad necesaria de agua destilada. Previamente, se esterilizó la superficie de las semillas sumergiéndolas durante 30 a 60 minutos en una solución al 1% de hipoclorito de sodio o de calcio.

Luego de 4 días de desarrollo, las plántulas se transfirieron a recipientes cilíndricos de vidrio (de 2 cm de diámetro, 4,5 cm de altura y aproximadamente 10 ml de capacidad), previamente esterilizados a 105°C durante 60 minutos, donde se mantuvieron hasta el final de cada inoculación (ver Fotografías 1 y 2). Estos recipientes se utilizaron para asegurar una buena absorción del alcaloide por las raíces de la planta, sin pérdidas ni diluciones innecesarias (los recipientes utilizados eran opacos para eliminar la luz en las raíces).



Fotografía 1: Dos plántulas de *Hordeum vulgare*, de 8 días de desarrollo, en uno de los recipientes de vidrio empleados en las experiencias (se ha retirado el protector para permitir la observación de las raíces).



Fotografía 2: Plántulas de *Hordeum vulgare*, de 8 días de desarrollo, creciendo hidropónicamente, tal como fueron empleadas en las experiencias.

Los primeros ensayos se hicieron entregándoles a las plantas solamente agua destilada, como habían hecho Frank y Marion (81). Sin embargo, se encontró que a los 11 días de desarrollo las plantas se marchitaban.

Para evitar este problema, a partir del 4° día se les agregó una solución salina, con macro y micronutrientes (ver Capítulo III, pág. 96 ), con lo que se logró mantener las plantas en buenas condiciones más allá de los 30 días, lo cual era un tiempo más que suficiente para las distintas inoculaciones.

El agregado de una solución de sacarosa más extractos de levadura no dio buenos resultados, y aumentaba mucho la contaminación.

Otro problema que debió ser solucionado fue evitar el desarrollo de microorganismos en el medio de cultivo contenido en los recipientes de vidrio, luego de unos 10 días de desarrollo. Primero se lo intentó agregando 150 ó 300 ppm de sorbato de potasio, pero esto no condujo a resultados satisfactorios. La causa de la contaminación era que la boca de los frascos quedaba abierta al aire, así que ésta se eliminó fácilmente tapando las bocas con pequeños trozos de algodón, retirándolos solamente para el agregado de solución salina o de la solución del alcaloide marcado, previamente esterilizadas.

Con respecto a la iluminación, se utilizó luz natural suplementada con tubos fluorescentes Sylvania Gro Lux.

Posteriormente, las plántulas se desarrollaron dentro de una cámara de acrílico con circulación forzada de aire, cuya temperatura se reguló a 25°C, y los ciclos de luz y oscuridad se mantuvieron en 14 y 10 horas, respectivamente.

De esta manera se obtuvo siempre un desarrollo comparable de las plantas para todos los ensayos. Para las inoculaciones del alcaloide a plantas enteras se utilizaron siempre plantas de 8 días, en cambio para los homogenatos se usaron las raíces de plantas de 15 días de desarrollo.

Método de inoculación del alcaloide hordenina a las plantas de cebada

Con los antecedentes de los trabajos sobre biosíntesis de hordenina en cebada (75-80) y sobre su catabolismo (81), era sabido que el alcaloide se producía en la raíz y era muy probable que ahí mismo se degradara.

Un buen método de inoculación sería aquel que permitiera la llegada del alcaloide a las raíces de la manera más rápida y efectiva, con un mínimo de alteración de las condiciones de crecimiento de la planta. Asimismo, y tratándose de plantas muy jóvenes y frágiles, se debía evitar cualquier método que pudiera dañarlas seriamente y alterar su crecimiento.

Además, debido a que se trata de un alcaloide de bajo peso molecular y soluble en agua, se podía intentar la inoculación a través de la absorción por las raíces de una solución acuosa del alcaloide.

Para evitar pérdidas y diluciones innecesarias del material radiactivo, las plantas se debían desarrollar en recipientes especiales de vidrio, como ya se indicó.

Para conocer si éste era realmente un buen método para inocular las plantas con hordenina radiactiva o si, por un problema de permeabilidad de membranas, la absorción era muy lenta o directamente nula, se determinó la velocidad de absorción del alcaloide con la ayuda de un trazador radiactivo: hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C. Se inocularon las plantas de 8 días con una cantidad constante de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C y se midió la radiac

tividad remanente en la solución salina a distintos tiempos. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 3 y en la Figura 14.

Esta experiencia demuestra que aproximadamente el 75% de la radiactividad (y por ende, de la hordenina entregada se absorbe en las primeras 4 horas. Debido, seguramente, a un problema de dilución del alcaloide residual, la velocidad de absorción decae, como se observó en experiencias posteriores. Es así que a las 124 horas (ver Tabla 5) se ha absorbido el 80%. En cambio, a las 143 horas o a los 14 días (y luego de haberse concentrado la solución por absorción de agua por las raíces) se obtuvo una absorción casi total del alcaloide: 97% (ver Tabla 4 y Tabla 9).

Con todos estos datos, se decidió que este método de inoculación era adecuado para todas las experiencias.

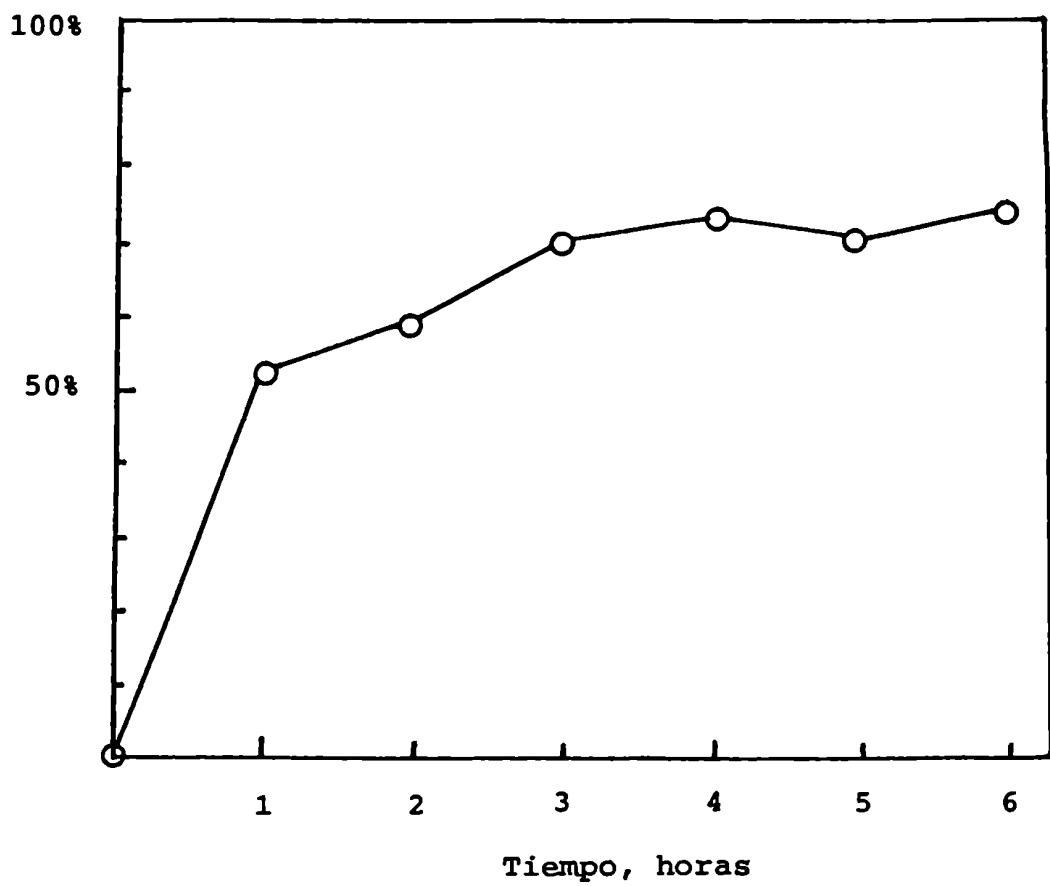


Figura 14: Curva de absorción de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  por las raíces de plantas de cebada de 8 días de desarrollo.

Tiempo	Hordenina entregada	Actividad entregada	Hordenina remanente	Actividad remanente	Absorción
(h)	( $\mu\text{mol}$ )	(dpm)	( $\mu\text{mol}$ )	(dpm)	(%)
0	20,6	$3,59 \times 10^6$	20,6	$3,59 \times 10^6$	0
1	20,6	$3,59 \times 10^6$	9,9	$1,73 \times 10^6$	52
2	20,6	$3,59 \times 10^6$	8,5	$1,49 \times 10^6$	59
3	20,6	$3,59 \times 10^6$	6,3	$1,11 \times 10^6$	69
4	20,6	$3,59 \times 10^6$	5,7	$9,84 \times 10^5$	73
5	20,6	$3,59 \times 10^6$	6,3	$1,08 \times 10^6$	70
6	20,6	$3,59 \times 10^6$	5,4	$9,37 \times 10^6$	74

Tabla 3: Absorción de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  por las raíces de plantas de cebada de 8 días de desarrollo.



## INOCULACION DE HORDENINA- $\alpha$ -<sup>14</sup>C Y ESTUDIO DE SU DEGRADACION

### 1. Ensayos preliminares:

Una vez que se logró mantener las plantas creciendo hidropónicamente durante más de 20 días sin contaminación, se procedió a repetir los ensayos, agregando a los 8 días a la solución salina, una cierta cantidad de hordenina con el objeto de observar si la adición del alcaloide tenía algún efecto perjudicial o tóxico sobre el desarrollo de las plantas. La cantidad de alcaloide fue elegida de acuerdo a las dosis que se pensaban entregar durante las experiencias con material radiactivo.

Las cantidades de hordenina probadas fueron 0,50; 0,33 y 0,17 mg de clorhidrato de hordenina por planta (0,41; 0,27 y 0,14 mg de la base libre ó 2,55; 1,64 y 0,85  $\mu$ mol, respectivamente), y en ningún caso se observó diferencia con los lotes de control que crecían sin hordenina exógena. En estas condiciones, no se observaron efectos tóxicos ni disminución o aumento significativos de la velocidad de crecimiento, luego de 20 días de desarrollo.

Por lo tanto, se concluyó que era posible utilizar ese rango de dosis para inocular las plantas, sin el riesgo de provocar efectos no deseados. Posteriormente, fue publicado un trabajo acerca de los efectos tóxicos e inhibidores de crecimiento de un derivado de la hordenina (su iodometilato) en especies de plantas donde la hordenina no es un componente na-

tural (65).

En estos casos, los lotes utilizados tenían 40 plantas cada uno.

## 2. Inoculación de hordenina- $\alpha$ - $^{14}$ C:

Plantas de 8 días de desarrollo (600), germinadas en las mismas condiciones anteriores, fueron inoculadas adicionando a la solución de desarrollo 118 mg de clorhidrato de hordenina- $\alpha$ - $^{14}$ C (actividad específica:  $1,39 \times 10^9$  dpm/mmol - 0,63 mCi/mmol; dosis: 0,20 mg/planta), por absorción a través de las raíces. Luego de la adición en los recipientes de crecimiento de la solución salina conteniendo el alcaloide marcado, se la dejó llegar casi a sequedad para aumentar la absorción del alcaloide. Luego se continuó con los agregados necesarios de solución salina durante 14 días más, para mantener el volumen inicial y permitir el continuo crecimiento de las plantas.

Al cabo de tiempos fijados, las plantas fueron reti-radas de los recipientes, enjuagadas con agua destilada y este líquido de lavado, junto con el proveniente de la solución salina residual y el del lavado de los recipientes, se llevó a volumen, y se tomó una alícuota para determinar la radiactividad que había quedado sin absorber y que resultó ser el 3,07% de la actividad entregada.

Las plantas se cortaron, separando las partes aéreas de la raíces y se secaron por separado ambas fracciones a 50°C, con circulación de aire, durante 36 horas.

El material vegetal, ya seco y molido en un molinillo, se sometió por separado a extracciones con solventes de polaridad creciente. Previamente se había ensayado la extracción con un lote de control de 250 plantas del mismo grado de desarrollo y se había analizado el comportamiento cromatográfico de los extractos por cromatografía en capa delgada.

Los resultados obtenidos con las extracciones de las raíces y las partes aéreas se pueden ver en la Tabla 4.

Las extracciones con solventes orgánicos fueron realizadas con extractores Soxhlet, las acuosas en cambio, en una sola etapa, controlándose la total extracción de los productos marcados mediante la medición de la radiactividad de los extractos.

Del análisis de la Tabla 4 surge que no hay un extracto principal donde se localice la actividad (ni siquiera hay una gran diferencia entre raíces y partes aéreas) y, lo que es más importante, se ha perdido aparentemente casi el 90% de la radiactividad entregada. Este resultado no estaba de acuerdo con los resultados de Frank y Marion (81), quienes recuperaban el 97% de la actividad entregada como hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ .

## RAICES (10,10 g)

Fracción	Cantidad (g)	Actividad específica (dpm/mg)	Actividad total (dpm)	Incorporación absoluta (%)
Eter de petróleo	0,335	$1,40 \times 10^3$	$4,69 \times 10^5$	0,06
Metanol	0,554	$1,45 \times 10^4$	$8,03 \times 10^6$	0,99
H <sub>2</sub> O (f)	1,400	$9,41 \times 10^3$	$1,32 \times 10^7$	1,62
H <sub>2</sub> O (c)	0,780	$1,36 \times 10^4$	$1,06 \times 10^7$	1,30
Residuo	6,796	$4,14 \times 10^3$	$2,81 \times 10^7$	3,45

## PARTE AEREA (7,96 g)

Fracción	Cantidad (g)	Actividad específica (dpm/mg)	Actividad total (dpm)	Incorporación absoluta (%)
Eter de petróleo	0,416	$5,52 \times 10^2$	$2,30 \times 10^5$	0,03
Metanol	0,980	$9,62 \times 10^3$	$9,43 \times 10^6$	1,16
H <sub>2</sub> O (f)	1,270	$1,40 \times 10^3$	$1,78 \times 10^6$	0,22
Residuo	5,290	$1,88 \times 10^2$	$9,95 \times 10^5$	0,12

Radiactividad remanente en la solución nutriente luego de 14 días:  
 $2,50 \times 10^7$  dpm (equivalente a un 3,07% de la hordenina entregada).

Tabla 4: Resultados de la inoculación de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C

(0,59 mmol - 0,37 mCi) a 600 plantas de *Hordeum vulgare*  
de 8 días de desarrollo, durante 14 días.

Estos autores inocularon plantas de cebada de 6 días de desarrollo con hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C y las dejaron crecer 5 días más (posiblemente, el crecimiento no fuera más allá de los 11 días, ya que solamente se les daba agua destilada y ningún otro nutriente). Según los mismos, ese 97% de la radiactividad estaba distribuido de la siguiente manera: 21% en el extracto metanólico de las raíces y 76% en los extractos básicos (hidróxido de sodio 0,5 N) de las mismas. De toda esta actividad, el 10% correspondía a hordenina sin metabolizar.

Debido a la similitud de ambas experiencias y a la gran diferencia de resultados (no justificable por una variación de 2 días en el desarrollo de la planta, por el tiempo que se dejó el alcaloide en la misma, o por un cambio en la variedad de cebada utilizada), y para confirmar los resultados que aquí se informan, se repitió la experiencia anterior con las siguientes variaciones.

Se introdujeron modificaciones, necesarias para tratar de recuperar casi toda la radiactividad entregada y no apenas un 10% como había ocurrido antes. Se razonó que esa pérdida tenía que deberse a que el carbono  $\alpha$  de la hordenina se ubicaba en una molécula pequeña, como podía ser dióxido de carbono o trimetilamina. Si se trataba de dióxido de carbono, éste se habría eliminado al ambiente durante los 14 días que se dejó el alcaloide en la planta. Entonces, para confirmarlo, se debía recoger el dióxido de carbono eliminado por las plantas. Si en cambio, se trataba de trimetilamina (o de alguna otra molécula pequeña), se podía haber perdido durante el proceso

de secado del material vegetal. Entonces, se eliminaría esta etapa al repetir la experiencia, comenzando las extracciones con metanol directamente.

Para recoger el dióxido de carbono expulsado por las plantas hubo que hacer una serie de modificaciones en el sistema empleado para el crecimiento de las plantas. Estas fueron colocadas en una cámara de vidrio con dos entradas: una para líquidos (solución salina o solución de hordenina radiactiva) y otra para gases, y una salida para gases. La iluminación, la temperatura y el agregado de solución salina se mantuvieron como en la experiencia anterior. Se estableció una circulación forzada de aire filtrado y se recogió el dióxido de carbono como carbonato de bario, con una serie de trampas de solución saturada de hidróxido de bario colocadas en la salida para gases. Previamente, se realizó una experiencia sin usar material radiactivo para controlar que no hubiera pérdidas de gases y la adaptación de las plantas a este nuevo sistema. Además, esto permitió conocer cuál era la cantidad de carbonato de bario que se obtenía en función del tiempo, proveniente de la propia respiración de las plantas y del contenido en el aire.

En estas condiciones, plántulas de 8 días fueron inoculadas con hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C, y a distintos intervalos de tiempo se recogió el carbonato de bario precipitado y se midió su radiactividad, observándose que éste era efectivamente radiactivo.

Cuando la radiactividad expulsada disminuyó notablemente, se dio por terminada la experiencia (6 días). La solu-

ción salina remanente más el agua de lavado de las raíces se llevó a volumen y se determinó la radiactividad de una alícuota, encontrándose que restaba por absorber el 20,3% de la radiactividad entregada.

Los resultados de la medición de radiactividad del carbonato de bario se pueden ver en la Tabla 5, y para una observación directa, en la Figura 15.

Del análisis de los resultados de la Tabla 5 surge claramente que, descontando la cantidad de alcaloide sin metabolizar, el carbono  $\alpha$  de hordenina se elimina como dióxido de carbono. Este resultado confirmó plenamente los de nuestra experiencia anterior, teniendo en cuenta que aquélla duró 14 días y ésta solamente 6 días. No es posible explicar el resultado obtenido por los otros autores (81,107). La pérdida de casi el 90% de la actividad en la primera inoculación se debió a su expulsión como dióxido de carbono.

El resto de la radiactividad se encontró en el extracto metanólico de las raíces, ya que en él había un 9,8% de lo entregado, con lo cual se totaliza un 97% de recuperación de radiactividad. Por otra parte, la actividad encontrada al hacer la extracción de las partes aéreas fue despreciable. Este hecho confirma que se trata de un metabolismo de raíz. No fue posible analizar los componentes activos de ese extracto por la pequeña masa de que se disponía, dejando entonces la investigación de los productos intermedios de la degradación del alcaloide para la inoculación de un trazador marcado en una posición más favorable para este tipo de análisis.

sis. O sea, con la marcación en un carbono que no se elimine tan rápidamente, como posiblemente fuera el carbono unido al anillo aromático.

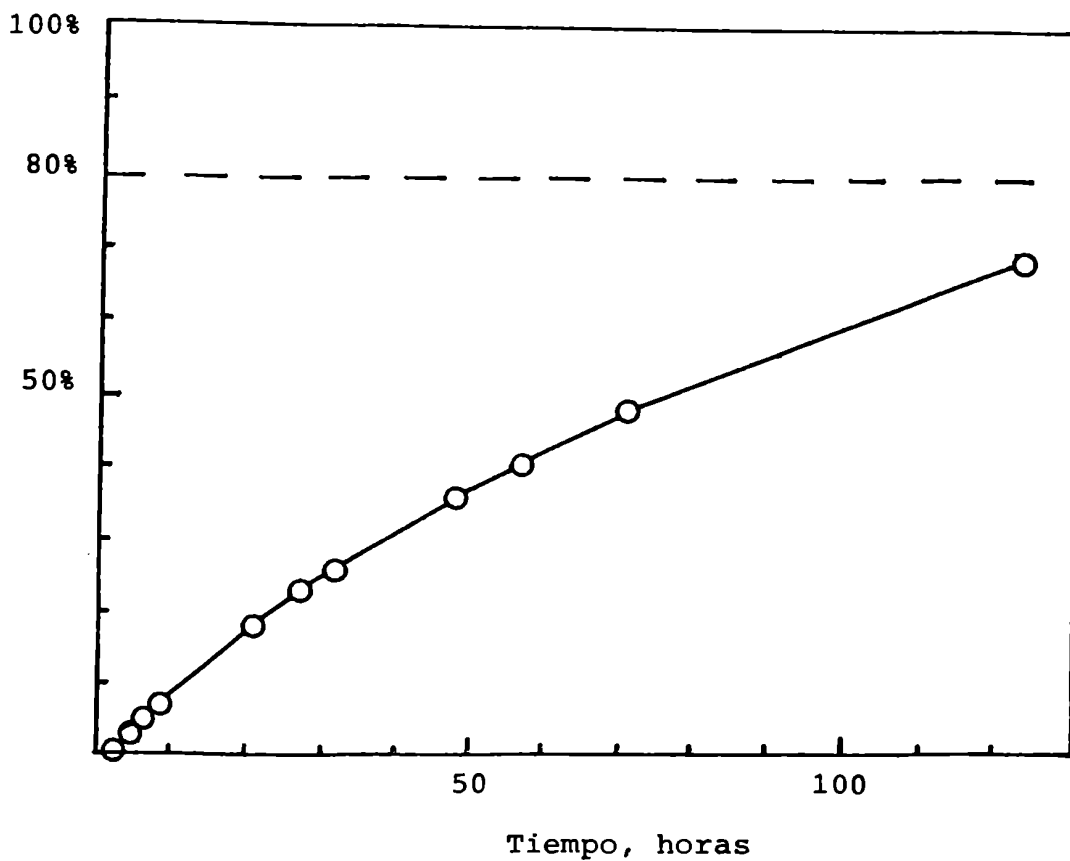


Figura 15: Curva de expulsión de  $^{14}\text{CO}_2$  en función del tiempo, por plantas de *Hordeum vulgare* de 8 días de desarrollo, inoculadas con hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ .



Tiempo total (h)	BaCO <sub>3</sub> (mg)	Actividad específica (dpm/mg)	Actividad (dpm)	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> total (μmol)	Formación de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (μmol/h)	Recuperación de actividad (%)
2,0	801	2,29 x 10 <sup>3</sup>	1,83 x 10 <sup>6</sup>	1,0	0,5	0,8
4,0	165	1,86 x 10 <sup>4</sup>	3,07 x 10 <sup>6</sup>	2,8	0,9	2,2
6,0	166	2,81 x 10 <sup>4</sup>	4,65 x 10 <sup>6</sup>	5,5	1,4	4,3
8,0	161	3,11 x 10 <sup>4</sup>	4,99 x 10 <sup>6</sup>	8,4	1,5	6,5
20,5	993	2,51 x 10 <sup>4</sup>	2,49 x 10 <sup>7</sup>	22,8	1,2	17,7
26,5	500	2,17 x 10 <sup>4</sup>	1,09 x 10 <sup>7</sup>	29,1	1,1	22,6
30,8	337	1,94 x 10 <sup>4</sup>	6,54 x 10 <sup>6</sup>	32,9	0,9	25,5
47,6	1241	1,74 x 10 <sup>4</sup>	2,16 x 10 <sup>7</sup>	45,6	0,8	35,2
56,6	616	1,67 x 10 <sup>4</sup>	1,03 x 10 <sup>7</sup>	51,4	0,6	39,8
71,2	835	1,96 x 10 <sup>4</sup>	1,64 x 10 <sup>7</sup>	60,6	0,6	47,2
124,0	2632	1,67 x 10 <sup>4</sup>	4,41 x 10 <sup>7</sup>	86,0	0,5	67,0

Tabla 5: Formación de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> en plantas de *Hordeum vulgare*, luego de la administración de hordenina-α-<sup>14</sup>C (21,1 mg - 128 μmol; actividad específica: 1,74 x 10<sup>9</sup> dpm/mmol). Radiactividad remanente en la solución nutriente luego de 124 h: 4,52 x 10<sup>7</sup> dpm (correspondiente al 20,3% de la radiactividad entregada, equivalente a 26 μmol de hordenina-α-<sup>14</sup>C).

## INOCULACION DE HORDENINA- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ Y ESTUDIO DE SU DEGRADACION

### 1. Introducción:

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las inoculaciones de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  a plantas de cebada de 8 días de desarrollo, que demostraron la transformación total del carbono marcado en dióxido de carbono, se planeó una nueva experiencia con otro trazador radiactivo: hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ , que posee la marca en el otro carbono de la cadena alifática del alcaloide.

Se decidió marcar la posición  $\beta$  al grupo dimetilamino de hordenina porque a primera vista presentaba una serie de ventajas. La primera de ellas era que la marca en esa posición, vecina al carbono que se elimina por oxidación a dióxido de carbono, podría permitir aislar metabolitos intermedios sin pérdida de la radiactividad, aun cuando la cadena lateral tuviera uno solo o ambos carbonos. Otra posible ventaja era que mientras la unión de tipo bencílica entre C- $\alpha$  y C- $\beta$  se rompe, era mucho menos probable que se fracturara la unión entre el C- $\beta$  y el anillo aromático, lo cual permitiría seguir el curso metabólico del mismo.

Por otra parte, debido a que la absorción del alcaloide por raíz es muy rápida, y observando la expulsión de dióxido de carbono radiactivo (ver Tabla 5 y Figura 15; en páginas 46 y 45, respectivamente) proveniente de la inoculación de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ , se pensó que el intervalo de tiempo más ade-

cuado para finalizar esta nueva experiencia debía estar entre las 20 y las 30 horas desde la inoculación del trazador radiactivo. El razonamiento seguido fue el siguiente: en unas pocas horas (4 a 6) se había absorbido la mayor parte del alcaloide, y a las 30 horas ya se había eliminado como dióxido de carbono el 25% del carbono  $\alpha$  de la hordenina entregada. Por lo tanto, quedaría aún un 75% de metabolitos conteniendo el carbono  $\alpha$  de hordenina (incluyendo la hordenina sin absorber). Ya que se buscaban metabolitos intermedios de la degradación de hordenina a dióxido de carbono, además del destino de la otra porción de la molécula (anillo aromático y carbono  $\beta$ ), éste fue el intervalo de tiempo elegido para efectuar los nuevos ensayos.

La síntesis de la hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  fue realizada por metilación reductiva de tiramina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  (ver Capítulo II, pág. 24 y Capítulo III, pág. 128).

## 2. Inoculación de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ :

La experiencia se realizó en las mismas condiciones que la primera inoculación de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ . Se tomaron 400 plantas de cebada de 8 días de desarrollo colocadas en los recipientes de vidrio ya descritos y se inocularon con 157 mg de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  disueltos en la solución nutriente (dosis: 0,39 mg de base libre por planta - actividad específica:  $4,30 \times 10^8$  dpm/mmol ó 0,19 mCi/mmol - actividad total entregada:  $4,08 \times 10^8$  dpm).

Luego de 24 horas, se cortaron las plantas, separando partes aéreas y raíces, y lavándolas con agua destilada.

El líquido de lavado se juntó con la solución nutriente remanente y se midió su volumen; luego se midió la radiactividad de una alícuota de esa solución, determinándose que correspondía al 25,7% de la actividad entregada como hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ . Las plantículas habían absorbido el 74,3% de la hordenina entregada, valor que resultaba coherente con las determinaciones de velocidad de absorción del alcaloide por raíz, anteriormente realizadas.

Para confirmar si la radiactividad remanente en solución era debida a hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  sin absorber y no a algún otro metabolito que contuviera a ese C- $\beta$ , excretado por las raíces, se realizó la siguiente experiencia. La solución nutriente remanente, más los líquidos de lavado se llevó a pH 1 (para evitar pérdidas de bases) con ácido clorhídrico y se liofilizó. El residuo se neutralizó con solución de hidróxido de amonio y se llevó nuevamente a sequedad a presión reducida. En estas condiciones no se pierden bases (hordenina y otras  $\beta$ -feniletilaminas relacionadas) porque la presión desciende sólo hasta 30 Torr, en cambio al liofilizar la presión llega a ser de 0,05 Torr. A continuación, el residuo se sublimó en las mismas condiciones que las utilizadas para la purificación de la hordenina. De esta forma se recuperaron 35 mg de una sustancia de similar comportamiento cromatográfico (en cromatografía en capa delgada - CCD) que hordenina, y cuya identidad fue confirmada por espectrometría de masa (EM). La actividad específica

del producto era la misma que la de la hordenina de partida:  $4,30 \times 10^8$  dpm/mmol. Este resultó ser el único producto activo de esa solución y su actividad total ( $9,12 \times 10^7$  dpm) representaba el 87% de la radiactividad no absorbida, con lo cual se confirmó que la radiactividad remanente en la solución salina era debida solamente a hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  sin absorber. El residuo de la sublimación no mostró un nivel de radiactividad significativo. Este ensayo no se pudo realizar en las experiencias anteriores por la pequeña masa de hordenina remanente de que se disponía, dado el mayor tiempo empleado en dichas experiencias.

El análisis del material vegetal cosechado, sin secar, se realizó de la siguiente manera. Por separado, se molieron en mortero, con ayuda de arena lavada, las raíces y partes aéreas y luego se sometieron, también por separado, a extracciones con metanol en sendos extractores Soxhlet. Conviene recalcar que el intervalo de absorción del alcaloide fue de 24 horas, pero se considera que el tiempo para la degradación fue ligeramente mayor: 26 horas, ya que el primero finaliza al extraer las plantas de la solución nutriente y el segundo al inactivar el sistema enzimático degradativo, lo que debe ocurrir recién durante el tratamiento con metanol. La diferencia entre ambos intervalos, 2 horas, fue el tiempo necesario para cortar, lavar, moler y poner a extraer las 400 plántulas empleadas en la experiencia.

Como el residuo proveniente de la extracción metanólica de las raíces todavía mostraba un significativo porcenta-

je de radiactividad, se hizo una extracción con agua. Este procedimiento no se siguió con las partes aéreas porque su residuo de extracción con metanol tenía muy poca actividad.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6.

Fracción	Cantidad (g)	Actividad específica (dpm/mg)	Actividad total (dpm)	Incorporación absoluta (%)
<b>Raíces</b>				
Metanol	2,28	$7,76 \times 10^4$	$1,77 \times 10^8$	43,4
Agua	0,68	$3,12 \times 10^4$	$2,12 \times 10^7$	5,2
Residuo	1,81	$4,27 \times 10^4$	$7,73 \times 10^7$	18,9
<b>Parte aérea</b>				
Metanol	0,93	$1,30 \times 10^4$	$1,21 \times 10^7$	3,0
Residuo	1,62	$7,48 \times 10^2$	$1,21 \times 10^6$	0,3

Radiactividad remanente en la solución salina luego de 24 horas:  $1,05 \times 10^8$  dpm (25,7% de la radiactividad entregada como hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ ).

**Tabla 6:** Resultados de la inoculación de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  (0,95 mmol - 0,18 mCi) a 400 plantas de *Hordeum vulgare* de 8 días de desarrollo, durante 26 horas.

### 3. Análisis de las fracciones radiactivas:

Se analizaron las 3 fracciones provenientes de los tejidos de raíz. Estas 3 fracciones contenían el 95% de la radiactividad incorporada. Las fracciones eran: el extracto metanólico de las raíces, el extracto acuoso de las mismas y el residuo insoluble de estas extracciones.

#### A) Análisis del extracto metanólico:

Este extracto fue llevado a sequedad a presión reducida y se eliminaron los lípidos tratando al residuo 2 veces con éter de petróleo. Los extractos etéreos se juntaron, se evaporó el solvente a presión reducida y se determinó la actividad del residuo, siendo ésta despreciable. Luego, el remanente del extracto original se fraccionó por cromatografía en columna de sílicagel, eluyendo con cloruro de metileno y cantidades crecientes de metanol, hasta llegar a metanol puro y por último con una mezcla de 97% de metanol y 3% de ácido clorhídrico (c). Cada fracción de la columna fue controlada por cromatografía en capa delgada (CCD) y por medición de su radiactividad, reservándose solamente aquellas fracciones que tenían un nivel de radiactividad significativo. El perfil de elución de las fracciones activas de esta columna puede verse en la Figura 16.



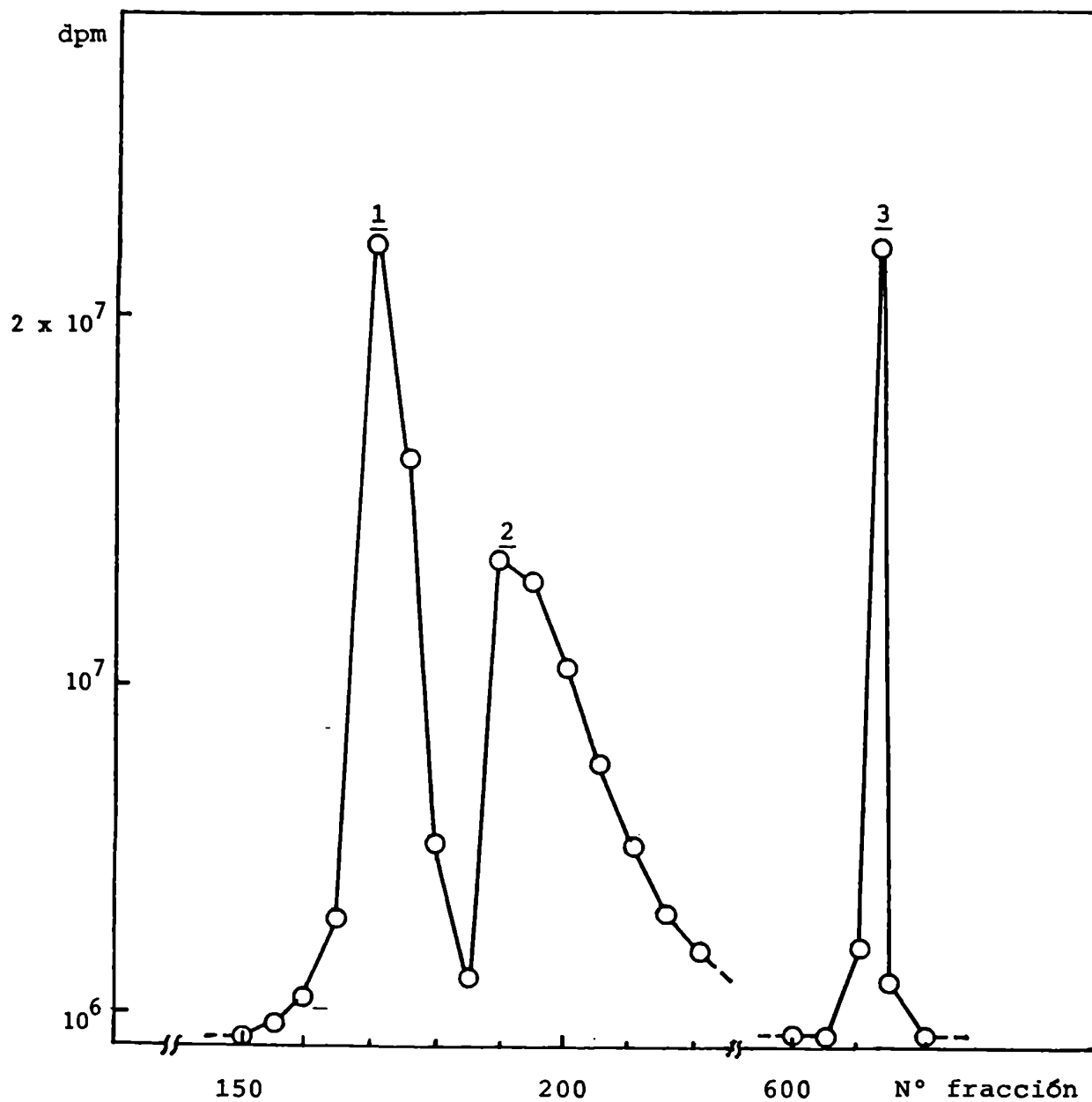


Figura 16: Separación por cromatografía en columna de las fracciones radiactivas del extracto metanólico de las raíces de *Hordeum vulgare*, inoculadas con hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ .

De las fracciones marcadas con 1, 2 y 3 (en la Figura 16) fue posible aislar hordenina, tiramina y el ácido *p*-hidroxibenzoico, respectivamente, identificados por comparación con patrones en cromatografía en capa delgada (CCD) y por EM, y, en el caso de hordenina, también por cromatografía gas-líquido (CGL) y por cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa (CGL-EM) de su derivado trimetilsililado. El cromatograma (obtenido por corriente iónica total) y el espectro de masa correspondientes, pueden verse en las Figuras 17 y 18, respectivamente. Los resultados del análisis de estas fracciones se encuentran resumidos en la Tabla 7 (pág. 68).

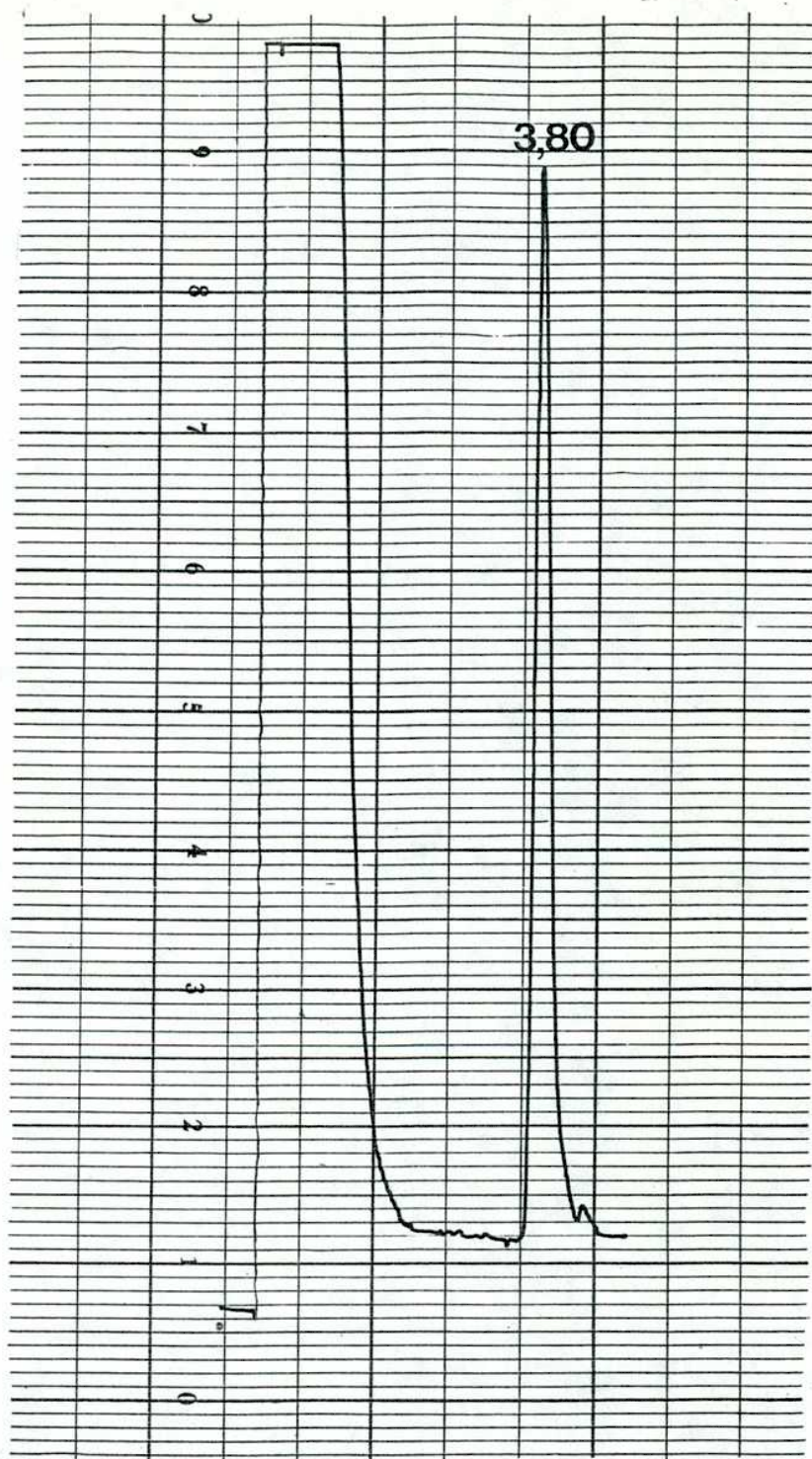


Figura 17: Cromatograma, obtenido por registro de la corriente iónica total, de la fracción 1 trimetilsililada (tiempo de retención, en minutos).

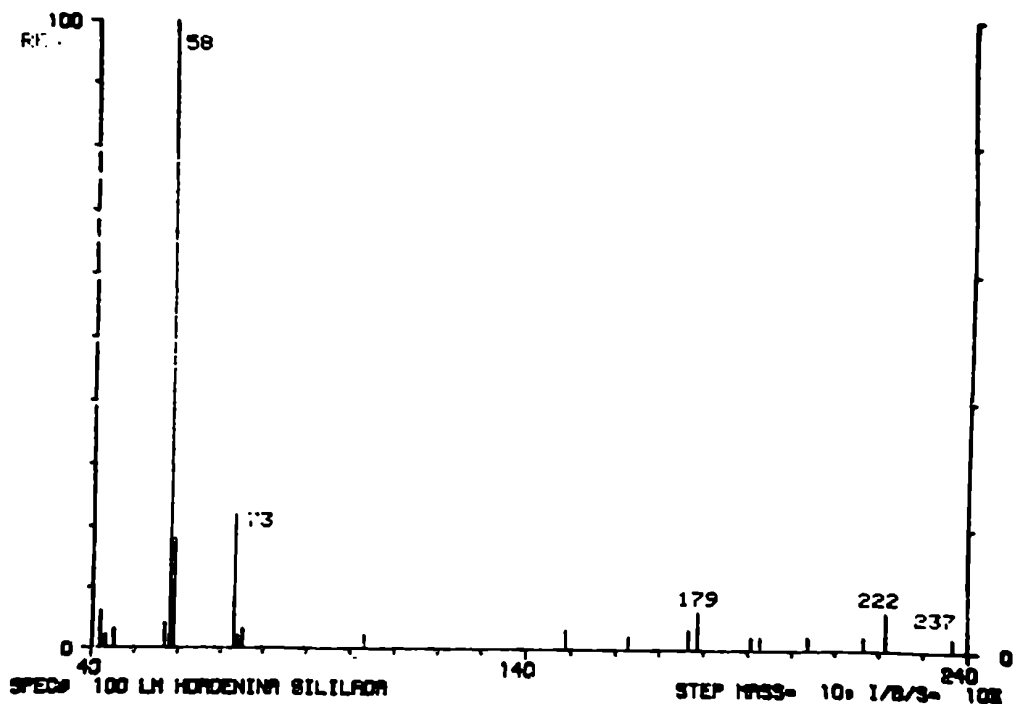


Figura 18: Espectro de masa de O-trimetilsililhordenina, obtenido en el máximo del pico cromatográfico de la Figura 17.

Del análisis de esos valores (Tabla 7) surgen algunas conclusiones interesantes. En primer lugar, entre las 3 sustancias se recupera sólo el 70,9% de la radiactividad inicial del extracto metanólico. El casi 30% faltante no puede atribuirse totalmente a pérdidas de material en los distintos pasos de purificación y deja un margen para la presencia de

metabolitos intermedios entre tiramina y el ácido *p*-hidroxibenzoico que, debido quizás a su baja concentración, no se pudieron aislar.

Ha sido descrita la presencia en organismos superiores e inferiores (no en plantas) de una enzima, la monoaminoxidasa (MAO), que cataliza la reacción de desaminación oxidativa. En particular, de un microorganismo se ha aislado la tiramina oxidasa, la que cataliza la transformación de tiramina en *p*-hidroxifenilacetaldehído, que podría haber sido uno de los intermediarios en la degradación (138). En nuestro caso, la búsqueda de una MAO por el método de Krajl (139) condujo a resultados negativos.

Dicho compuesto puede luego haberse sucesivamente oxidado a *p*-hidroxifenilacético, *p*-hidroximandélico y *p*-hidroxibenzaldehído, que serían asimismo intermediarios posteriores en la conversión de tiramina en *p*-hidroxibenzoico.

Varios de estos productos fueron detectados en estudios comparativos utilizando cultivos de células (82,137).

Por otra parte, considerando las actividades específicas, es dable observar que la del ácido *p*-hidroxibenzoico es la menor, lo cual sería indicativo de que el mismo está metabólicamente y estructuralmente más alejado de la hordenina que la tiramina, la que para su formación, sólo necesita de un par de desmetilaciones de la hordenina.

Finalmente, comparando la actividad específica de la hordenina aislada con la de la hordenina inoculada, se observa que la dilución de ésta es solamente 1,73; lo cual significa

que la cantidad de hordenina endógena es aproximadamente similar a la cantidad de hordenina inoculada.

El hecho de que no haya sido posible aislar N-metiltiramina, que fue buscada especialmente, puede tener su origen en dos causas: que la desmetilación de hordenina no es secuencial, lo cual parece poco probable, o que la segunda desmetilación es mucho más rápida que la primera y entonces la concentración de N-metiltiramina sería muy pequeña. Esta indeterminación fue resuelta con la inoculación de hordenina(metilo- $^{13}\text{C}_2$ ) como se discutirá más adelante.

B) Análisis del extracto acuoso:

El extracto acuoso mostraba un 5,2% de la actividad total entregada y se procedió a su análisis, en busca de las sustancias responsables de esa radiactividad. La solución se llevó a pH 1 con ácido clorhídrico y se eliminó el solvente por liofilización. El análisis por CCD del residuo mostró la presencia de hordenina y tiramina (por comparación con patrones). Para averiguar cuál o cuáles de los productos de ese extracto eran radiactivos, se midió la radiactividad a lo largo de toda la capa delgada, encontrándose que ésta estaba igualmente distribuida entre las zonas correspondientes a hordenina y a tiramina. No se encontró radiactividad en el origen ni en otras zonas.

Se procedió entonces al aislamiento de ambas sustancias y así confirmar su identidad. Esto se logró neutralizando

el residuo y sublimando, primero en las condiciones de purificación de hordenina (105-110°C y 0,0005 Torr), obteniéndose 7,0 mg de un sólido blanco que resultó ser idéntico a hordenina (por CCD y EM). Al aumentar la temperatura a 140-150°C sublimó otro producto que, también por CCD y EM, se identificó como tiramina (7,2 mg). Estos resultados también se encuentran resumidos en la Tabla 7 (pág. 68). La actividad específica de estos dos productos fue casi la misma que en el extracto metanólico, lo que parecería indicar que, en ambos casos, los alcaloides provienen de la misma fuente (los provenientes del extracto acuoso, en realidad, eran ligeramente más activos). Esto, que a primera vista resulta lógico, es, sin embargo, motivo de atención debido a la distinta solubilidad de ambas sustancias en metanol, lo cual indicaría alguna diferencia en la forma en que los alcaloides están ligados al tejido vegetal particular, ya que una parte fue extraíble por metanol y otra no.

C) Análisis del residuo de extracción:

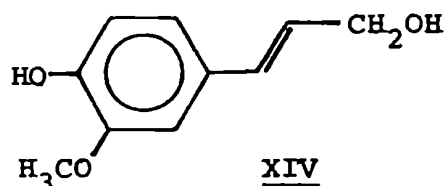
El residuo sólido remanente de las extracciones con metanol y con agua todavía contenía una fracción importante de la radiactividad total entregada (18,9%). Este residuo estaba formado por los materiales estructurales de las raíces de la planta: polisacáridos, proteínas y lignina. Parecía poco probable que el alcaloide aromático se hubiera transformado en un azúcar, y según Frank y Marion (81) no había recarboxilación

de la tiramina para dar el aminoácido tirosina y con él marcar las proteínas. Por lo tanto, la única sustancia que quedaba con posibilidades de llevar la marcación era la lignina. Además, los mismos autores sugerían una cierta incorporación de la marcación de la hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  en la lignina, resultado que, como ya se indicó anteriormente, no se pudo confirmar (ver Capítulo II, pág. 38, y Capítulo III, pág. 133).

Se dividió entonces el residuo en 4 partes y se realizaron distintos ensayos sobre el mismo.

#### C<sub>1</sub>) Aislamiento de lignina:

La lignina es un material muy complejo de peso molecular mayor que 10.000. Las diferencias químicas y estructurales que existen entre la lignina y las otras dos clases de polímeros naturales, los polisacáridos y las proteínas, son muy profundas: la lignina es casi totalmente insoluble en los solventes comunes, no es hidrolizable fácilmente en sus monómeros y carece de la estructura regular característica de los otros dos polímeros. En general, se la describe como un polímero estático de unidades de oxifenilpropano. Proviene del acoplamiento de unidades de alcohol coniferílico (XIV):





y otros monómeros relacionados (en general de estructura  $C_6-C_3$ ). La enzima responsable de la polimerización parece ser una peroxidasa, por un mecanismo radicalario, que justifica los distintos tipos de uniones observadas entre los monómeros (108,109).

Como la lignina es insoluble en su estado natural, el aislamiento de la misma para su estudio representa un gran problema en la química de la lignina. Para ciertos propósitos, sin embargo, no es necesario aislar la lignina en estado puro ya que las diferencias químicas entre ella y los polisacáridos permiten hacer los ensayos solamente con un producto libre de material extraíble. Sin embargo, cuando se hace necesaria una separación de los componentes para obtener una lignina libre de impurezas, aparecen problemas debidos a los cambios estructurales que pueden ocurrir en la lignina durante el proceso de purificación (108).

Para confirmar entonces que el resto de la radiactividad estaba en la lignina, se decidió aislarla por el método descrito por Bondi y Meyer (110), quienes estudiaron la lignina de distintas Gramíneas.

Con este propósito, se tomaron 400 mg del residuo de extracción y se sometieron al proceso de purificación descrito por esos autores, que consistió en un tratamiento con hidróxido de sodio 0,5 N a 80°C durante 12 horas con agitación continua y luego filtración. Sobre el residuo se repitió el tratamiento dos veces más. La solución básica se concentró a presión reducida a la tercera parte de su volumen original y luego se acidificó con ácido sulfúrico, donde se produjo la

precipitación de la lignina. Para purificar este producto crudo, se lo disolvió en la mínima cantidad de hidróxido de sodio 1,25 N y se agregaron 4 volúmenes de etanol y luego ácido sulfúrico para neutralizar. Esta suspensión resultante se centrifugó y se separó el sobrenadante. Al evaporar el etanol, precipitó la lignina. Este proceso de purificación se repitió una vez más y luego se determinó la actividad de la lignina resultante, cuya masa era de 133 mg. La radiactividad medida resultó ser de  $1,28 \times 10^5$  dpm/mg, lo que teniendo en cuenta la fracción de la masa total empleada para aislarla, significa que la lignina de raíz contenía casi el 100% de la actividad del residuo inicial. Posteriormente, se realizó un segundo aislamiento de lignina a partir de otros 400 mg del residuo insoluble, obteniéndose casi la misma cantidad de lignina que en el caso anterior (135 mg), cuya actividad específica era aproximadamente igual ( $1,25 \times 10^5$  dpm/mg).

En vista de estos resultados, se realizaron análisis sobre este material y sobre el residuo original sin aislar la lignina. En ambos casos, los resultados obtenidos fueron similares.

El primer análisis realizado fue la búsqueda de residuos de ácido *p*-hidroxibenzoico que estuvieran esterificando los grupos hidroxilo de la lignina. Esta búsqueda tenía su justificación en el hecho de que ya se había aislado este ácido en uno de los extractos (y por lo tanto era un constituyente que el vegetal podía utilizar), y en los trabajos de Smith (111), quien ya había encontrado el ácido *p*-hidroxibenzoico en

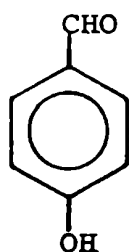
muestras de lignina. En un ensayo de posibilidades y siguiendo la técnica de hidrólisis básica, seguida de acidificación y extracción con éter etílico, descrita por este autor, fue posible aislar e identificar (por CCD y EM) una fracción de ácido *p*-hidroxibenzoico de actividad específica igual a  $1,58 \times 10^8$  dpm/mmol. Debido a la pequeña cantidad de producto que se aisló en ese ensayo preliminar, se realizó un tratamiento similar pero partiendo de 800 mg del residuo insoluble, de donde se pudieron aislar sin inconvenientes 6,0 mg del ácido buscado. Teniendo en cuenta que la masa total del residuo era de 1,81 g, se calculó el dato de 13,2 mg de ácido *p*-hidroxibenzoico que está en la Tabla 7. La pregunta que surgió con estos resultados fue la siguiente, ¿por qué no se hidrolizó y liberó el ácido durante el aislamiento de la lignina? La respuesta es que debió haberse hidrolizado, pero que no se separó de la lignina, siendo arrastrado por ésta durante su precipitación, teniendo en cuenta además que el agua es un buen solvente de recristalización para este ácido.

La prueba de que no se había separado se encontró en la recuperación de actividad de la lignina. Si se hubiera perdido algo de ácido *p*-hidroxibenzoico debería haberse observado una disminución de la actividad recuperada del orden del 20%, que corresponde a la actividad total que tiene el ácido aislado de la lignina, hecho que no se produjo.

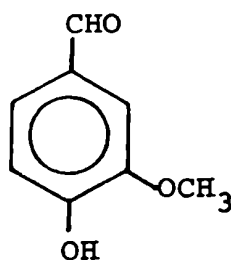
La actividad específica de esta fracción de ácido *p*-hidroxibenzoico ( $1,58 \times 10^8$  dpm/mmol) es comparable a la actividad del ácido aislado en el extracto metanólico

( $1,69 \times 10^8$  dpm/mmol). La primera es ligeramente menor, lo que indicaría, como es lógico, que esta fracción de ácido *p*-hidroxibenzoico se encuentra un poco más adelante en el camino metabólico y podría haberse diluido con producto endógeno.

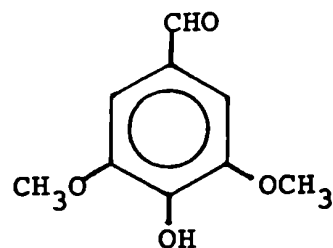
El segundo análisis realizado sobre la lignina (o sobre el residuo original) consistió en una oxidación alcalina con nitrobenzeno. Con esta reacción se obtienen aldehídos: *p*-hidroxibenzaldehído (XV), vainillina (XVI) y siringaldehído (XVII)



XV



XVI



XVII

que varían en número y proporción según la familia y la especie de planta. En el caso de las Gramíneas (110), se obtienen solamente *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina, en una proporción de alrededor del 20% respecto de la cantidad total de lignina presente.

Para esta determinación se usó el micrométodo de Stone y Blundell (112), en recipientes herméticos de acero inoxidable de 2 ml de capacidad (para que resistieran las condiciones de la reacción: hidróxido de sodio 2 N a 160°C). La identidad de los aldehídos producidos se confirmó por cromato-

grafia en papel (CP), revelando con solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina y comparando con sustancias patrón (vainillina y *p*-hidroxibenzaldehído). La cantidad de cada aldehído presente se determinó espectrofotométricamente, luego de eluidos, mediante la comparación con las curvas de calibración correspondientes construidas con soluciones de concentración conocida de *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina.

Para averiguar si alguno de estos aldehídos era radiactivo, se midió la radiactividad de un papel cromatográfico ya desarrollado, donde se había cromatografiado la mezcla de reacción, previamente neutralizada, junto con patrones de *p*-hidroxibenzaldehído y vainillina. De esta manera se pudo determinar que un 19,4% de la radiactividad estaba localizado en la zona correspondiente al *p*-hidroxibenzaldehído y que el 80,6% restante quedaba en el origen. La zona correspondiente a vainillina no mostró actividad.

De la cantidad total de lignina procesada (la determinación también se puede hacer con el residuo de extracción, sin aislar la lignina), sólo se produce un 20% de aldehídos (estimado espectrofotométricamente) y en relación 1:1. El porcentaje total de aldehídos está de acuerdo con las observaciones anteriores de Bondi y Meyer (110), no así la proporción de cada uno. Estos autores encontraron una relación vainillina: *p*-hidroxibenzaldehído 2:1, mientras que los resultados que aquí se indican muestran una relación 1:1. Hay que aclarar, sin embargo, que estos autores trabajaron con *Hordeum murinum* y no con *Hordeum vulgare*.

La actividad específica estimada del p-hidroxibenzal dehído ( $3,04 \times 10^7$  dpm/mmol) fue la más baja de todas las encontradas, lo que parecería indicar que la lignina se trata del producto más alejado metabólicamente, de la hordenina.

Los resultados obtenidos en los análisis de las fracciones radiactivas, se encuentran resumidos en la Tabla 7.

Fracción	Producto identificado	Cantidad (mg)	Actividad específica (dpm/mmol)	Actividad total (dpm)
Metanol	hordenina	33,1	$2,48 \times 10^8$	$4,97 \times 10^7$
	tiramina	37,5	$1,97 \times 10^8$	$5,38 \times 10^7$
	ácido <i>p</i> -hidro- xibenzoico	18,0	$1,69 \times 10^8$	$2,20 \times 10^7$
Agua	hordenina	7,0	$2,50 \times 10^8$	$1,06 \times 10^7$
	tiramina	7,2	$2,02 \times 10^8$	$1,06 \times 10^7$
Residuo	<i>p</i> -hidroxiben- zaldehído*	60,2	$3,04 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$
	ácido <i>p</i> -hidro- xibenzoico	13,2	$1,58 \times 10^8$	$1,51 \times 10^7$

\* La masa de *p*-hidroxibenzaldehído fue estimada por su absorción al UV (ver Capítulo III, pág. 153) y por lo tanto fue estimada también su actividad específica.

Tabla 7: Productos aislados e identificados de distintas fracciones de las raíces de *Hordeum vulgare* inoculadas con hordenina- $\beta$ - $^{14}$ C.

#### 4. Conclusiones:

La inoculación de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  permitió sacar las siguientes conclusiones. Antes de la pérdida del C- $\alpha$  como dióxido de carbono se debe haber producido una N-desmetilación total del alcaloide, no pudiéndose determinar si se produce en etapas o en un solo paso, para formar tiramina. Esta amina sufrió una degradación oxidativa de su cadena lateral, perdiéndose el carbono  $\alpha$  como dióxido de carbono y quedando un residuo  $\text{C}_6\text{-C}_1$  que finalmente produce el ácido *p*-hidroxibenzoico.

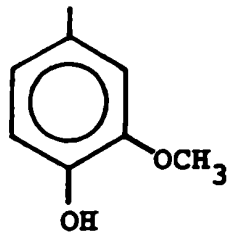
En una etapa intermedia de la degradación de la cadena lateral de la hordenina, debe haberse producido una estructura  $\text{C}_6\text{-C}_1$  (quizás *p*-hidroxibenzaldehído) que pasa a formar parte de la lignina de raíz. Paralelamente, parte de esta unidad  $\text{C}_6\text{-C}_1$  se sigue oxidando para dar el ácido *p*-hidroxibenzoico, que fue encontrado tanto libre como esterificando hidroxilos de lignina.

Este caso sería entonces una excepción a la regla que decía que todos los precursores de lignina debían tener la estructura  $\text{C}_6\text{-C}_3$ , como se había probado en los distintos trabajos sobre la biosíntesis de la lignina (108).

Sin embargo, existen antecedentes indicativos de que unidades  $\text{C}_6\text{-C}_1$ , como el ácido *p*-hidroxibenzoico o la vainillina, pueden actuar como intermediarios en la formación de



restos guayacilo:



con lo que resultan en buenos precursores de lignina (113).

INOCULACION DE HORDENINA (METILO-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>) EN HOMOGENATOS DE RAICES  
DE *Hordeum vulgare*. ESTUDIO DE SU DEGRADACION

Para dilucidar si la desmetilación de la hordenina que conduce a tiramina era secuencial o en un solo paso, se planeó observar, mediante una técnica no destructiva, el proceso de desmetilación a medida que éste se iba produciendo. La técnica utilizada debía tener la suficiente sensibilidad para poder detectar intermediarios, ya que, de los resultados de la inoculación de hordenina- $\beta$ -<sup>14</sup>C se sabía que si la N-metiltiramina estaba presente, lo estaría en una concentración bastante menor que la correspondiente a hordenina o a tiramina. Al mismo tiempo, era necesario que la técnica de detección empleada no destruyera el sistema enzimático de degradación del alcaloide y permitir así una observación de la variación del proceso en el tiempo y sus consecuencias sobre la cinética del mismo.

Estos propósitos se verían satisfechos empleando la RMN-<sup>13</sup>C (127) para observar el proceso degradativo del alcaloide marcado con <sup>13</sup>C en ambos grupos N-metilos (ver Capítulo II, pág. 26 y Capítulo III, pág. 130).

Se necesitaba además que el ensayo se llevara a cabo con el sistema enzimático de la planta en un medio adecuado para realizar la experiencia en un tubo de RMN. Debido a ello, se probaron homogenatos de tejido de raíz, parcialmente purificados. La actividad de los homogenatos fue controlada mediante su capacidad para degradar hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C a dióxido de carbono. Estos homogenatos se prepararon en solución reguladora

de fosfato de sodio (0,1 M) de pH 7,2 con tejido de raíces de plantas de 15 días, desarrolladas en las mismas condiciones anteriores (ver Capítulo II, pág. 30 y Capítulo III, pág. 95 ). Para ese objetivo, las raíces fueron disgregadas en licuadora en presencia de la solución reguladora, la mezcla fue luego homogeneizada por ultrasonido y finalmente centrifugada. Todas estas operaciones se realizaron a temperaturas inferiores a 5°C. La solución resultante fue usada para los ensayos de inoculación del alcaloide radiactivo, incubando a 30°C. Como, dada su dilución, la cantidad de alcaloide que podía degradar este tipo de homogenato era insuficiente para obtener una buena señal en el espectro RMN-<sup>13</sup>C, fue necesario concentrarlo por ultrafiltración a través de una membrana. Los homogenatos de tejido de raíz concentrados podían admitir una suficiente cantidad de inóculo como para poder estudiar la marcha del proceso por RMN-<sup>13</sup>C.

Los resultados de las inoculaciones se presentan en la Tabla 8.

Medio de incubación	Cantidad y Actividad de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ ( $\mu\text{mol/ml}$ )      ( $\text{dpm/ml}$ )		Actividad remanente <sup>(a)</sup> ( $\text{dpm/ml}$ )	Cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ <sup>(b)</sup> ( $\mu\text{mol/ml}$ )
Solución reguladora	0,35	$4,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	0
Homogenato original	0,35	$4,2 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	0,29
Homogenato concentrado	3,00	$3,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	1,3
Homogenato regenerado	0,30	$3,5 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$	0,25
Residuo de centrifugación	0,35	$4,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	0

(a) Correspondiente a todos los metabolitos presentes que contienen el C- $\alpha$  de hordenina.

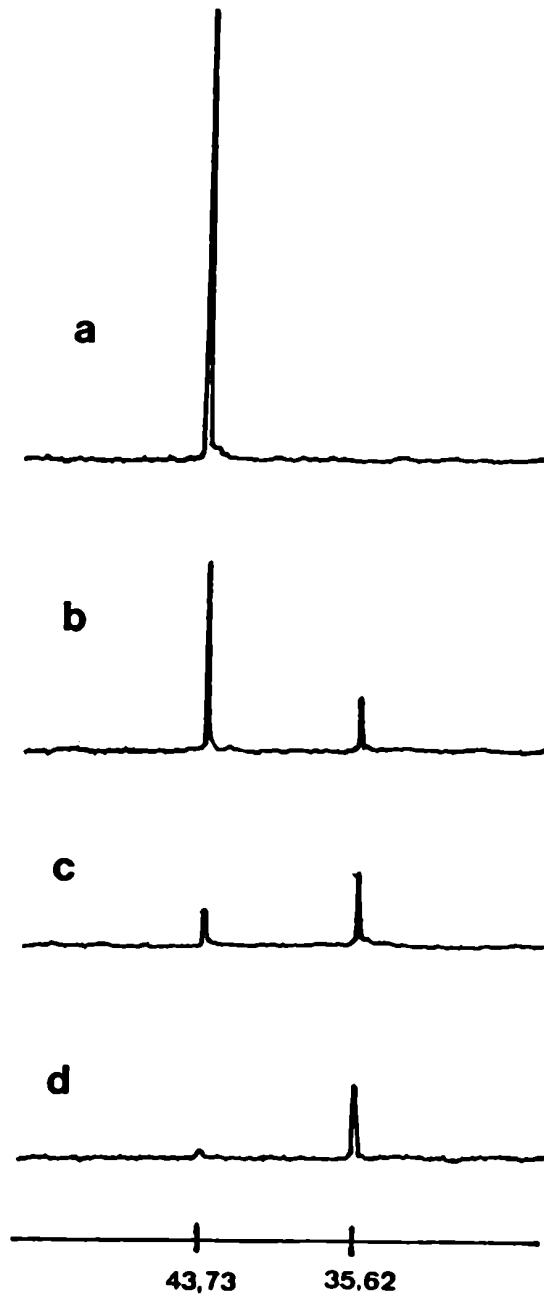
(b) Valores calculados.

Tabla 8: Degradación de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  a  $^{14}\text{CO}_2$  por homogenatos de raíces de *Hordeum vulgare* a  $30^\circ\text{C}$  durante 14 h.

Del análisis de los resultados presentados en la Tabla 8 surge que el homogenato original elimina como dióxido de carbono el 83% del C- $\alpha$  de la hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  entregada y lo mismo hace el homogenato regenerado. Este último se preparó mezclando en las proporciones adecuadas el homogenato concentrado con el filtrado obtenido en el proceso de ultrafiltración. El homogenato concentrado (10 veces) no mostró 10 veces más actividad, sino que sólo procesó un 43% de la hordenina entregada, lo que corresponde a un aumento de actividad del orden del 500%. Esto significa que el proceso de concentración provoca la disminución de la actividad, aunque no de manera irreversible, ya que el homogenato regenerado vuelve a tener la capacidad original. Esta pérdida de actividad no puede atribuirse a una desnaturalización enzimática por el proceso de concentración, ya que en este caso ésta sería irreversible; más bien puede deberse a la pérdida de cofactores de bajo peso molecular que atraviesan la membrana de ultrafiltración. Esta pérdida de actividad, si bien es considerable, no impidió que el homogenato pudiera ser utilizado para las experiencias proyectadas, ya que al concentrar 10 veces la actividad aumenta 5 veces. La caída de actividad se hizo más marcada con el homogenato concentrado 20 veces usado finalmente en la experiencia de RMN- $^{13}\text{C}$ , la cual, aunque tomó algo más de tiempo, también pudo realizarse.

Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  con desacoplamiento total de  $^1\text{H}$  se registraron a distintos tiempos. Al comienzo de la experiencia se detectó solamente una señal a 43,73 ppm corres-

pondiente a los grupos  $-N(^{13}\text{CH}_3)_2$ . La intensidad de esta señal fue decreciendo con el tiempo y simultáneamente apareció y fue creciendo una segunda señal a 35,62 ppm, que fue asignada al grupo  $-NH-^{13}\text{CH}_3$ . Algunos de estos espectros se presentan en la Figura 19. Luego de 48 horas, la señal correspondiente a hormona desapareció, indicando que la remoción de uno de los grupos N-metilos fue completa. La representación gráfica de las intensidades de ambas señales en función del tiempo se muestra en la Figura 20.



**Figura 19:** Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  de la incubación de hordenina (metilo- $^{13}\text{C}_2$ ) en homogenatos de raíces de *Hordeum vulgare*. a) 0 h; b) 21,17 h; c) 33,46 h; d) 46,83 h.

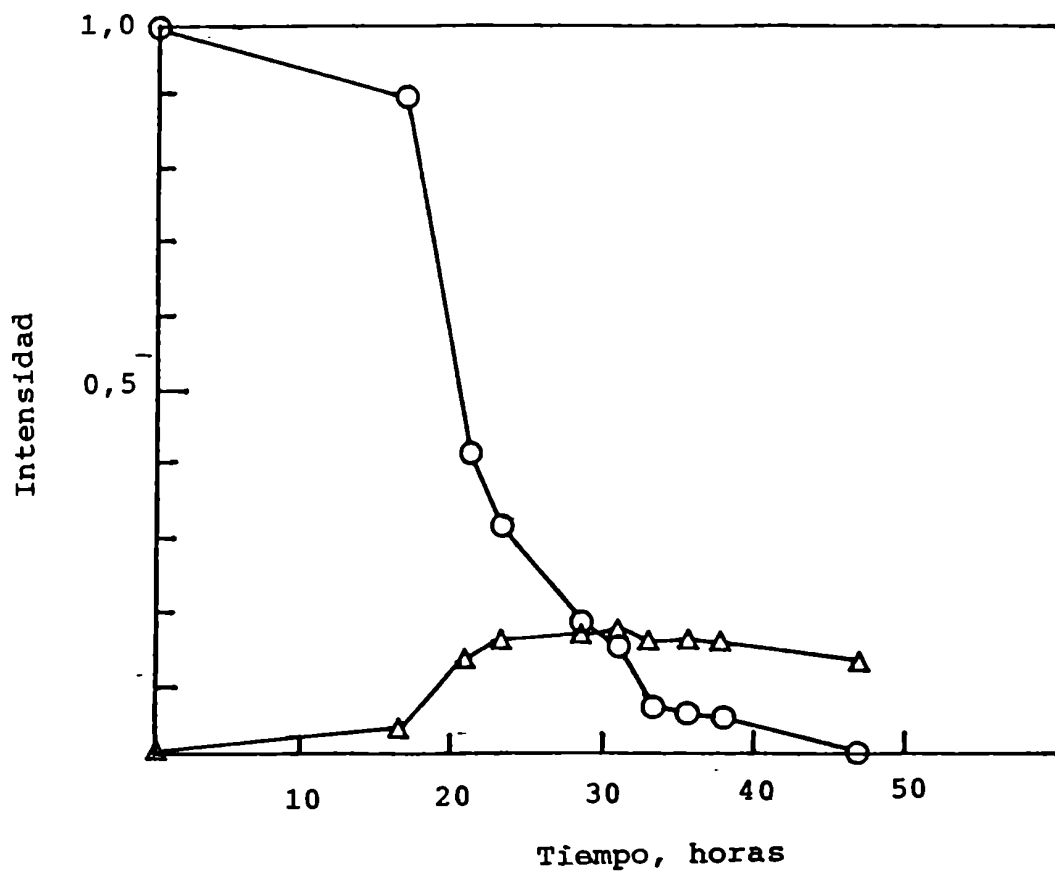


Figura 20: Intensidad de las absorciones de los grupos  $-N-^{13}\text{CH}_3$  de hordenina (O) y N-metiltiramina ( $\Delta$ ) en función del tiempo.



Estos resultados indican que la desmetilación de hordenina a tiramina no se produce en una sola etapa, sino que como ya había sido propuesto por otros autores (81,82), involucra dos pasos: formación inicial de N-metiltiramina y degradación de ésta a tiramina (que en esta experiencia no puede detectarse porque no lleva marcación). No hay duda, sin embargo, de que esta amina realmente se produce porque fue aislada durante el análisis de los productos radiactivos provenientes de la inoculación de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  (ver Capítulo II, pág. 53).

De la observación de la Figura 20 puede deducirse que la segunda desmetilación fue más rápida que la primera y que el producto intermedio, la N-metiltiramina, no alcanza un valor de concentración comparable al de hordenina. Esto podría explicar por qué el intermediario no fue detectado durante el análisis de las fracciones radiactivas provenientes de la inoculación de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  (ver Capítulo II, pág. 59).

La ausencia de otro tipo de señal al final de la experiencia, que mostrara el destino final de los grupos  $^{-13}\text{CH}_3$  podría tener tres causas. Una provendría de postular la dispersión de los grupos metilos entre muchos productos distintos, con la consecuente dilución. También podría suponerse la pérdida de estos grupos metilos como dióxido de carbono, cuya señal de resonancia (o la del ion bicarbonato) sería muy difícil de observar en las condiciones en que fue realizada la experiencia debido al alto valor de su tiempo de relajación longitudinal ( $T_1$ ). Finalmente, tampoco se puede descartar la incor-

poración de estos grupos metilos en compuestos de alto peso molecular, como por ejemplo, protefnas, cuyas señales de resonancia tampoco serían observables en las condiciones experimentales empleadas, debido al pequeño tiempo de relajación transversal ( $T_2$ ) de estos carbonos (128).

INOCULACION DE HORDENINA (METILO-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>) EN PLANTAS DE *Hordeum*  
*vulgare* Y ESTUDIO DE SU DEGRADACION

Para tratar de determinar cuál era el destino final de los grupos N-metilos, hecho que no había podido dilucidarse con la inoculación de hordenina (metilo-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>) en homogenatos de raíces, se decidió marcar la misma posición (los grupos N-metilos) con carbono-14. La síntesis de hordenina (metilo-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>) ya fue descrita anteriormente (ver Capítulo II, pág. 29 y Capítulo III, pág. 131).

Una de las posibilidades que se había postulado con los resultados obtenidos con hordenina (metilo-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>) era que los grupos N-metilos se eliminaran como dióxido de carbono, cuya señal de resonancia era muy difícil de observar en las condiciones en que se realizó la experiencia.

Para confirmar si el dióxido de carbono era realmente el destino final de estos carbonos, se hicieron desarrollar las plantas en un sistema similar al empleado durante la inoculación de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C, para recoger el dióxido de carbono expulsado por las plantas como carbonato de bario (ver Capítulo II, pág. 38).

La experiencia presente fue realizada en condiciones similares a la anterior. La única diferencia introducida fue que se evitó el agregado de solución nutriente en días subsiguientes a la inoculación para lograr aumentar la absorción del alcaloide radiactivo.

Se tomaron 50 plantas de 8 días de desarrollo y se inocularon con 18,2 mg (110  $\mu$ mol) de hordenina (metilo- $^{14}\text{C}_2$ ) (actividad específica:  $1,50 \times 10^9$  dpm/mmol), disueltos en 25 ml de solución salina nutriente. El dióxido de carbono se fue recogiendo como carbonato de bario a distintos tiempos durante 6 días y se midió su radiactividad.

Los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla 9 y en la Figura 21, que permite una observación más directa.

Estos resultados muestran claramente la conversión casi total de los carbonos metílicos en dióxido de carbono, con lo que quedan totalmente descartadas las otras dos posibilidades enunciadas anteriormente, durante la discusión de los resultados de la inoculación de hordenina (metilo- $^{13}\text{C}_2$ ), o sea la incorporación en proteínas o la dilución de la marca en distintos productos.

El carbonato de bario recogido tenía el 94,6% de la radiactividad entregada. Al analizar la solución nutriente remanente al finalizar la experiencia, se encontró que ésta tenía una radiactividad residual correspondiente al 3,4% de la hordenina entregada.

Al hacer sendos extractos metanólicos con las raíces y las partes aéreas de las plantas se encontró que mientras que en el primero había un 1,7% de la radiactividad entregada, el segundo era prácticamente inactivo.

Entre las tres fracciones recogidas, el carbonato de bario, el resto de solución nutriente y el extracto metanólico de las raíces, se recuperó el 99,7% de la radiactividad entre-

gada.

Estos resultados tampoco están de acuerdo con los obtenidos por Meyer y Barz (82) con cultivos de células, quienes no encontraron una transformación significativa de hordenina(metilo- $^{14}\text{C}_2$ ) en dióxido de carbono radiactivo.

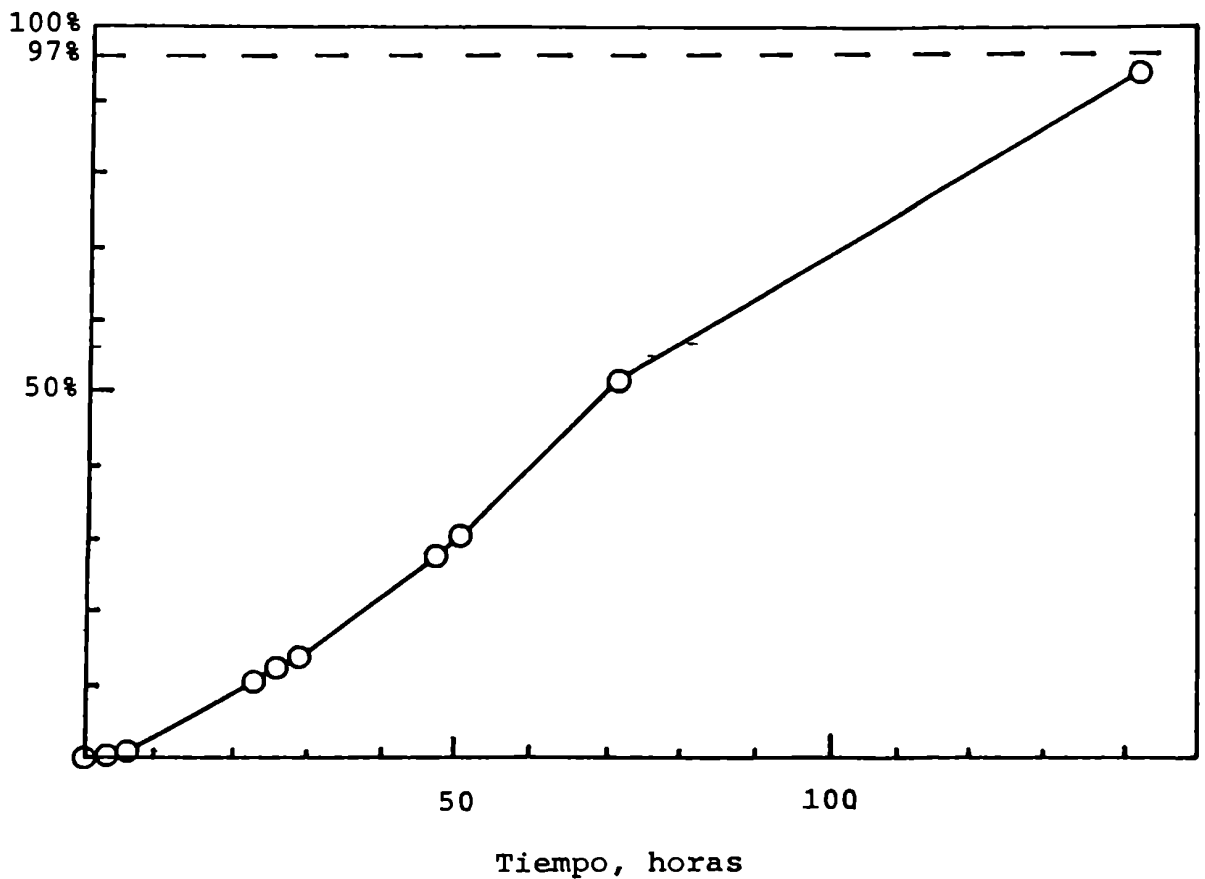


Figura 21: Curva de expulsión de  $^{14}\text{CO}_2$  en función del tiempo, por plantas de *Hordeum vulgare* de 8 días de desarrollo, inoculadas con hordenina(metilo- $^{14}\text{C}_2$ ).

Tiempo total (h)	BaCO <sub>3</sub> (mg)	Actividad específica (dpm/mg)	Actividad (dpm)	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> total (μmol)	Formación de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (μmol/h)	Recuperación de actividad (%)
2,5	150	2,32 x 10 <sup>3</sup>	3,49 x 10 <sup>5</sup>	0,2	0,1	0,2
5,0	57	6,41 x 10 <sup>3</sup>	3,65 x 10 <sup>5</sup>	0,5	0,1	0,4
22,8	1070	1,52 x 10 <sup>4</sup>	1,63 x 10 <sup>7</sup>	11,2	0,6	10,2
26,0	118	2,70 x 10 <sup>4</sup>	3,19 x 10 <sup>6</sup>	13,4	0,7	12,1
28,5	70	2,80 x 10 <sup>4</sup>	1,96 x 10 <sup>6</sup>	14,7	0,5	13,3
46,8	507	4,68 x 10 <sup>4</sup>	2,37 x 10 <sup>7</sup>	30,4	0,9	27,6
50,5	99	5,72 x 10 <sup>4</sup>	5,66 x 10 <sup>6</sup>	34,1	1,0	31,0
72,0	587	5,85 x 10 <sup>4</sup>	3,43 x 10 <sup>7</sup>	56,9	1,1	51,7
143,0	1855	3,84 x 10 <sup>4</sup>	7,12 x 10 <sup>7</sup>	104,0	0,7	94,6

Tabla 9: Formación de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> en plantas de *Hordeum vulgare*, luego de la administración de hordenina (metilo-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>) (18,2 mg - 110 μmol; actividad específica: 1,50 x 10<sup>9</sup> dpm/mmol). Radiactividad remanente en la solución nutriente luego de 143 h: 5,69 x 10<sup>6</sup> dpm (correspondiente al 3,4% de la radiactividad entregada, equivalente a 3,7 μmol de hordenina).

### CONCLUSIONES FINALES

Con los resultados obtenidos en las distintas experiencias realizadas, es posible proponer un camino metabólico para el alcaloide hordenina en plantas de *Hordeum vulgare*.

La degradación comienza por un proceso de desmetilación en dos etapas, produciendo N-metiltiramina y a continuación tiramina; los carbonos de los grupos N-metilos se eliminan como dióxido de carbono.

La tiramina resultante continúa degradándose, oxidativamente, eliminándose el carbono  $\alpha$  al grupo amino también como dióxido de carbono.

La otra porción de la molécula de hordenina, que lleva el anillo aromático, se ha transformado en una unidad  $C_6-C_1$  (¿quizás *p*-hidroxibenzaldehído?). Una parte de ella pasa a formar parte de la lignina de raíz y otra se oxida al ácido *p*-hidroxibenzoico, que se encuentra tanto libre como esterificando grupos hidroxilos de la lignina de raíz.

Todo este camino se encuentra resumido en la Figura 22.

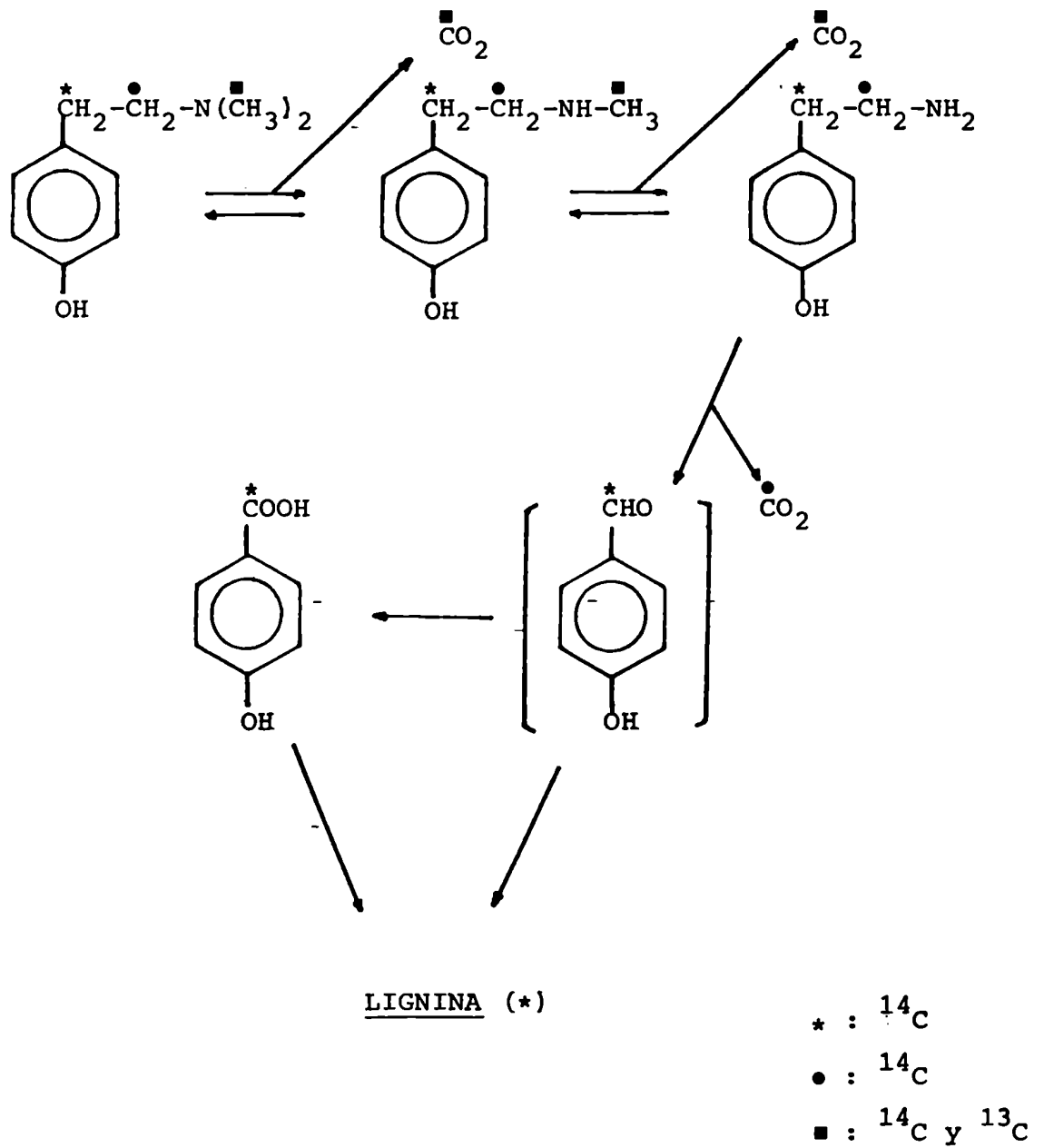


Figura 22: Posible camino metabólico de hordenina en plantas de *Hordeum vulgare*.



CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

## GENERAL

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

Los espectros de absorción en el infrarrojo (IR) se realizaron en dispersión en Nujol, excepto en los casos en que se indica lo contrario, con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 421 o con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 137, Infracord.

Los espectros de absorción en el ultravioleta (UV) se realizaron en solución de etanol 95% con un espectrofotómetro Beckman DK-2A.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN- $^1\text{H}$ ) se realizaron a 60 MHz con un espectrómetro Varian A-60 y a 100 MHz con un espectrómetro Varian XL-100-15, los solventes deuterados utilizados se indican en cada caso, en todas las determinaciones se utilizó tetrametilsilano (TMS) o 3-trimetilsililpropanosulfonato de sodio (DSS) como referencia interna. Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (RMN- $^{13}\text{C}$ ) se realizaron a 25,2 MHz en un espectrómetro Varian XL-100-15, trabajando con transformada de Fourier, con una computadora 620/L-100 y una unidad de discos magnéticos Sykes 7000.

Los desplazamientos químicos se expresan en  $\delta$  (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz; las señales se indican en cada caso como s: singulete, d: doblete, dd: doble doblete, c: cuarteto, m: multiplete, o ba: banda ancha.

Los espectros de masa (EM) se realizaron a 70 eV en

un espectrómetro de masa Varian-MAT CH-7A, comandado por una computadora Varian-MAT Data System 166, con unidades de salida TRC Tektronix 4010 e impresora Tektronix 4631 o en un espectrómetro Hewlett-Packard 5995 comandado por una computadora Hewlett-Packard 9825; en todos los casos los espectros se determinaron por introducción directa de la muestra en la fuente de iones.

Las mediciones de radiactividad se realizaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3003 o en un Tracor Analytic Mark III. Las muestras se disolvieron en una mezcla de 1 ml de agua y 14 ml de una solución centelleadora de dioxano que contenía 100 g de naftaleno, 7,0 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 300 mg de 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno (dimetil-POPOP) por cada 1000 ml; o en 15 ml de una solución centelleadora de tolueno que contenía 4,0 g/l de PPO y 250 mg/l de dimetil-POPOP, según se indica en cada caso.

Las cromatografías gas-líquido (CGL) fueron realizadas en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5830 A con detector de ionización de llama, equipado con columnas de vidrio de 1,80 m de longitud y 2 mm de diámetro interno, que contenían como fase fija OV-17 3% sobre Chromosorb W-AW-DMCS (80-100). La temperatura del horno se varió desde 120° hasta 220°C, a razón de 10°C/m.

La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CGL-EM) se realizó en un cromatógrafo Varian 1400 equipado con una columna de vidrio de 1,8 m de longitud, rellena con la misma fase fija empleada en la cromatografía gaseosa común. Este cromatógrafo estaba acoplado a un espectrómetro de masa

Varian-MAT CH-7A y todo el sistema era comandado por una computadora Varian-MAT Data System 166.

Las cromatografías en capa delgada (CCD) se realizaron utilizando como fase fija sílicagel-G (Merck) y como reveladores vapores de yodo, solución de ninhidrina 0,1% en etanol (129), o la observación de la coloración a la luz ultravioleta de 254 nm, en las cromatografías analíticas. En las cromatografías preparativas (espesor: 1 mm) se empleó sílicagel PF 254+366, observando a la luz ultravioleta de 254 y 366 nm. Los sistemas de desarrollo utilizados fueron: 1) cloruro de metileno-dioxano-agua (2:1:1), fase inferior; 2) cloroformo-etanol (99:1); 3) cloruro de metileno; 4) cloruro de metileno-metanol (98:2); 5) benceno-acetona (95:5); 6) benceno-acetona (9:1); 7) cloroformo-metanol-hidróxido de amonio 2 N (40:15:2); 8) éter de petróleo (fracción 60-80°C); 9) éter de petróleo (fracción 60-80°C)-benceno (1:1); 10) benceno; 11) cloruro de metileno-metanol (95:5); 12) cloruro de metileno-metanol (4:1); 13) cloruro de metileno-metanol-hidróxido de amonio (c) (175:75:1).

La cromatografía en columna se realizó utilizando como adsorbente sílicagel Davison (malla 100-200).

La cromatografía en papel (CP) se realizó utilizando papel Whatman N° 1, desarrollando con una mezcla de éter de petróleo (fracción 100-120°C)-éter n-butílico-agua (6:1:1), fase superior, y revelando con solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina en etanol (112). La medición de la radiactividad distribuida sobre el papel cromatográfico se determinó con un instrumento Packard 7201, equipado con un contador Geiger, registrador e in-

tegrador.

El Protosol (marca registrada de New England Nuclear) empleado en la disolución de tejidos vegetales es una solución 0,5 M de una sal de amonio cuaternario.

El hidróxido de Hyamine (marca registrada de Rohm & Haas) empleado en la determinación de actividad del dióxido de carbono, es una solución 1 M de hidróxido de p-(diisobutil)cre-soxietoxietildimetilbencilamonio en metanol.

Los cianuros de potasio y de sodio marcados con carbono-14 fueron adquiridos al Commissariat a l'Energie Atomique, Francia.

El clorhidrato de tiramina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  y el formaldehído- $^{14}\text{C}$  fueron adquiridos a The Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra.

El formaldehído- $^{13}\text{C}$  fue comprado a Merck, Sharp & Dohme Canada Limited, Montreal, Canadá.

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

## MATERIAL VEGETAL

Las semillas de *Hordeum vulgare* (cebada) utilizadas eran de la variedad MAGNIF 102 INTA cosechadas durante 1978 y 1979. Esta variedad de cebada cervecera fue desarrollada por el INTA y proviene del cruzamiento de la variedad nacional MATERIA HEDA con la variedad norteamericana QUINN, realizado en 1954.

En 1968, y luego de realizadas durante varios años las pruebas de resistencia a enfermedades, pureza varietal, rendimiento y calidad industrial, se decidió inscribir a esta variedad en los registros del Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación, con el nombre comercial de MAGNIF 102 INTA (114).

## ENSAYOS DE GERMINACION DE CEBADA

### 1. Condiciones generales de germinación y desarrollo

El crecimiento de las plantas se realizó en una cámara de acrílico, con circulación forzada de aire caliente. Su temperatura interna se reguló a  $25^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  en el centro de la cámara, siendo la temperatura en el nivel inferior de  $23^{\circ}\text{C}$ .

Las plantas recibieron luz natural, suplementada con dos tubos fluorescentes Sylvania tipo Gro Lux, de 20 W cada uno. Los ciclos de luz y oscuridad se regularon mediante un reloj interruptor, en 14 y 10 horas, respectivamente (117).

## 2. Prueba de poder germinativo

200 semillas (9,0 g - peso promedio del grano: 45 mg, lit.: 42,6 mg (114)), se sumergieron durante 60 minutos en agua y luego se sembraron en una bandeja de 50 cm x 70 cm de acero inoxidable llena con tierra. En estas condiciones, 185 plantas crecieron normalmente durante 45 días, con agregados periódicos de agua para mantener la humedad de la tierra.

Este método, aunque permite el desarrollo de las plantas, no parecía ser muy adecuado para la inoculación del alcaloide por la gran cantidad de microorganismos presentes que pudieran falsear los resultados, además de los problemas mecánicos de dilución del alcaloide en la tierra que dificultarían una buena absorción por las raíces.

## 3. Germinación y desarrollo en agua destilada

120 semillas de cebada (5,4 g) se sumergieron durante 40 minutos en una solución al 1% de hipoclorito de calcio y luego se lavaron con agua destilada.

A continuación se sembraron sobre arena lavada y calcinada y se humedeció el sistema con agua destilada. Luego de 24 horas ya habían germinado 113 plántulas, lo que equivale a un 94% de germinación. Durante los días siguientes se mantuvo la humedad del sistema mediante agregados periódicos de agua destilada. A los 5 días de desarrollo las plantas se transfirieron a 50 recipientes especiales de vidrio (ver Capítulo II,

pág. 30 ), que contenían 0,5 ml de agua destilada cada uno. En 30 de los recipientes se colocaron 2 plantas en cada uno y en otros 20, solamente una. Estas plantas continuaron creciendo normalmente con agregados periódicos de agua destilada hasta completar el volumen original, hasta el día 11, día en el que se marchitaron. Este sistema fue dejado de lado porque no permitió el desarrollo de las plantas durante un tiempo suficientemente largo como para realizar experiencias prolongadas.

#### 4. Germinación y desarrollo en hidroponia, con agregado de solución nutriente

a) 120 semillas se esterilizaron por inmersión en una solución acuosa al 1% de hipoclorito de calcio durante 40 minutos y se sembraron en arena lavada y calcinada, humedecida con agua destilada.

Luego de 4 días de desarrollo, se tomaron 80 plántulas y se transfirieron a 40 recipientes de vidrio descriptos anteriormente (ver Capítulo II, pág. 30 ) que contenían 2 ml de una solución nutriente (105) compuesta por sustancias orgánicas e inorgánicas, previamente esterilizada (ver Tabla 10).

En estas condiciones, las plantas se desarrollaron normalmente durante 15 días, pero también aumentó mucho la contaminación con microorganismos.



Sustancia	Concentración
MgSO <sub>4</sub>	360,0 mg/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	200,0 mg/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200,0 mg/l
KCl	80,0 mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,5 mg/l
ZnSO <sub>4</sub>	1,5 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5 mg/l
KI	0,8 mg/l
MnCl <sub>2</sub>	5,9 mg/l
MoO <sub>3</sub>	0,5 µg/l
CuSO <sub>4</sub>	2,5 µg/l
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2,5 mg/l
Sacarosa	20,0 g/l
Extracto de levadura	25,0 mg/l
(8% N)	

Tabla 10: Composición de la solución nutriente utilizada en los primeros ensayos de germinación hidropónica de *Hordeum vulgare*.

b) En dos experiencias similares a la anterior, se probó la eficacia del sorbato de potasio para reprimir el desarrollo de microorganismos, agregando a la solución nutriente 150 ó 300 ppm de esa sustancia.

El grado de desarrollo alcanzado por las plantas fue similar al primer ensayo (15 días), pero también fue similar el desarrollo de microorganismos, por lo que el uso de esta sustancia fue dejado de lado.

c) En trabajos publicados sobre temas de Botánica (115,116) se informaba acerca de formas de cultivo de cebada en arena y en solución nutriente más concentrada. En vista de esto, se decidió concentrar la solución entregada y eliminar las sustancias orgánicas de la misma, a fin de evitar riesgos de contaminación. La composición de esta solución se puede ver en la Tabla 11.

Se tomaron entonces 100 semillas de cebada (4,5 g) y se esterilizaron como en ocasiones anteriores por inmersión en una solución acuosa al 1% de hipoclorito de calcio durante 40 minutos. A continuación se sembraron sobre arena lavada y calcinada, humedecida con agua destilada.

A los 5 días de desarrollo se tomaron 80 plántulas y se las transfirió a 40 recipientes de vidrio esterilizados por calentamiento a 105°C durante una hora, que contenían 0,5 ml cada uno de la solución salina más concentrada. Para tratar de eliminar aún más los riesgos de contaminación se colocó en la boca de cada recipiente un trozo de algodón, retirándolo sola-

mente para los agregados periódicos de solución salina.

Con respecto a estos agregados, se realizaron cada 2 ó 3 días, completando el volumen original de 0,5 ml.

En estas condiciones, las plantas se desarrollaron normalmente durante más de 30 días, sin marchitarse.

Por otro lado, no se detectó contaminación en ninguno de los recipientes, con lo cual se consideró que este sistema era adecuado para intentar las inoculaciones de hordenina.

#### 5. Conclusiones acerca del proceso de germinación y desarrollo

Durante los primeros 5 días de desarrollo las plántulas se mantuvieron en bandejas de plástico con arena lavada y calcinada, manteniendo el nivel de humedad con el agregado de agua destilada. A partir del 5° día, si las plantas se destinaban a ser inoculadas se transferían a unos recipientes de vidrio cilíndricos y opacos (anteriormente descritos, ver Capítulo II, pág. 30 ) y se comenzaba a suministrar la solución salina nutriente.

Si las plantas se iban a usar como material para preparar los homogenatos, se las dejaba desarrollar en las bandejas de plástico hasta que alcanzaran el grado de desarrollo pretendido, agregando la solución salina a las bandejas a partir del 5° día.

Sustancia	Concentración
$\text{MgSO}_4$	1,8 g/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,0 g/l
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	1,0 g/l
KCl	0,40 g/l
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	83 mg/l
$\text{MnCl}_2$	30 mg/l
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	16 mg/l
$\text{ZnSO}_4$	7,5 mg/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	7,5 mg/l
KI	3,8 mg/l
$\text{CuSO}_4$	13 $\mu\text{g/l}$
$\text{MoO}_3$	2,5 $\mu\text{g/l}$

**Tabla 11:** Composición de la solución salina empleada en el desarrollo hidropónico de plantas de *Hordeum vulgare*.

ENSAYOS DE INOCULACION DE DISTINTAS DOSIS DE HORDENINA A PLAN-  
TAS DE *Hordeum vulgare* DE 8 DIAS DE DESARROLLO

Con el objeto de determinar si se presentaba algún efecto perjudicial para las plantas al entregarles distintas dosis de hordenina en la solución nutriente, se tomaron 160 plantas de 8 días de desarrollo (germinadas en las condiciones descritas anteriormente), que crecían en 80 recipientes de vidrio con 0,5 ml de solución salina en cada uno.

Las plantas se dividieron en 4 lotes iguales, reservándose uno como lote de control y a los otros 3 se les entregó una cierta cantidad de clorhidrato de hordenina disuelto en la solución salina.

Para ello se tomaron 50 mg de clorhidrato de hordenina y se disolvieron en 15 ml de solución salina (pH de la solución resultante: 7 (130)). A 20 recipientes, conteniendo 2 plantas cada uno, se les agregaron 0,3 ml de esa solución (1 mg de clorhidrato de hordenina. Dosis: 0,50 mg/planta, equivalente a 0,41 mg de base libre/planta o a 2,5  $\mu$ mol/planta). A otros 20 recipientes se les agregaron 0,2 ml de la solución (correspondiente a 0,67 mg de clorhidrato de hordenina y a una dosis de 0,33 mg/planta, o 0,27 mg de base libre, o 1,7  $\mu$ mol por planta). Finalmente a otros 20 recipientes se les colocó solamente 0,1 ml de la solución (0,33 mg de clorhidrato de hordenina. Dosis: 0,17 mg/planta, equivalente a 0,14 mg de base libre o a 0,8  $\mu$ mol/planta).

Posteriormente se completó el volumen de cada reci-

piente a 0,5 ml, incluyendo a los 20 recipientes con 40 plantas dejadas como lote de control.

Las plantas crecieron normalmente durante 15 días más, hasta que fueron cosechadas. No se observó aumento ni disminución de la velocidad de crecimiento de los lotes que tenían hordenina respecto del lote que no tenía hordenina exógena.

SINTESIS DE HORDENINA ISOTOPICAMENTE MARCADA

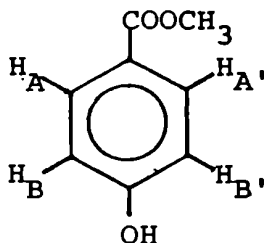
1. Síntesis de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  | 4-(2-dimetilaminoetil-2- $^{14}\text{C}$ )  
fenol|:

1.1. p-Hidroxibenzoato de metilo:

Acido p-hidroxibenzoico comercial (94 mg, p.f.: 214-216°C, lit. (118): 214,5-215,5°C) se disolvió en 20 ml de éter etílico anhidro a 0°C. A continuación se agregó gota a gota una solución de diazometano en éter etílico anhidro, con agitación continua, hasta que la mezcla de reacción tomó un color amarillo permanente. Una vez alcanzado este punto se finalizó el agregado de diazometano y se mantuvo la mezcla de reacción a 0°C con agitación durante 1 hora más. El exceso de diazometano se destruyó por agregado de agua y se evaporó el éter a presión reducida, obteniéndose un sólido blanco (103 mg, rendimiento: 99%), homogéneo en CCD (sistema 1), que se recristalizó de metanol, p.f.: 128-130°C, lit. (118): 131°C.

IR: 3300, 1700, 1620, 1520, 1285, 1160, 950, 830, 750  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN- $^1\text{H}$  (acetona- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  3,02 (ba, 1H, -OH); 3,82 (s, 3H, -COOCH $_3$ ); 6,90 (d, J= 8,5 Hz, 2H, H $_B$  y H $_{B'}$ ); 7,87 (d, J= 8,5 Hz, 2H, H $_A$  y H $_{A'}$ ).



1.2. p-Benciloxibenzoato de metilo:Método A (90):

p-Hidroxibenzoato de metilo (273 mg) se mezcló con 282 mg de carbonato de potasio (anhidro) y 0,5 ml de acetofenona. La mezcla se calentó con agitación a 160°C; a continuación se agregaron 207  $\mu$ l (227 mg) de cloruro de bencilo, en pequeñas porciones durante 1 hora.

La mezcla de reacción se mantuvo a 160°C durante 7 horas más y a continuación se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo se tomó con benceno a ebullición, filtrándose la solución en caliente. El benceno se evaporó a presión reducida y el residuo se recristalizó de metanol, obteniéndose 303 mg (rendimiento: 70%) de un sólido blanco, homogéneo en CCD (sistema 2), p.f.: 96-98°C, lit.: 90°C (90)

99°C (119).

IR: 1720, 1610, 1270, 1240, 1160, 1100, 1000, 830, 750, 720, 670  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3,87 (s, 3H, -COOCH<sub>3</sub>); 5,10 (s, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 6,98 (d, J= 9 Hz, 2H, H<sub>B</sub> y H<sub>B'</sub>); 7,37 (s, 5H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7,99 (d, J= 9 Hz, 2H, H<sub>A</sub> y H<sub>A'</sub>).

EM (m/z, %): 242 (8, M<sup>+</sup>), 211 (2), 91 (100), 65 (9).

Método B:

p-Hidroxibenzoato de metilo (39 mg) se disolvió en 20 ml de acetona anhidra y se agregaron 30  $\mu$ l (33 mg) de cloru



ro de bencilo y 86 mg de carbonato de potasio anhidro. La mezcla se llevó a ebullición y se controló el avance de la reacción tomando alícuotas de la mezcla a distintos tiempos y analizándolas por CCD (sistema 2).

A las 17 y a las 24 horas de reflujo se estimó que la reacción había progresado en un 20%. A las 48 horas de reflujo la relación entre reactivo y producto era aproximadamente 1:1, por lo que este método fue dejado de lado ya que era muy lento.

Método C (120,121):

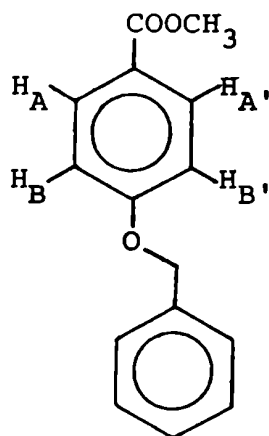
C<sub>1</sub>) *p*-Hidroxibenzoato de metilo (44 mg) se disolvió en 3 ml de una solución de hidróxido de sodio en metanol (4 mg/ml). Se eliminó el solvente a presión reducida para aislar el fenóxido y al residuo sólido se lo disolvió en metanol (10 ml) y se agregaron 31  $\mu$ l (34 mg) de cloruro de bencilo. La mezcla de reacción se dejó durante la noche a temperatura ambiente con agitación. Luego de este lapso de tiempo se estimó el progreso de la reacción por CCD (sistema 2), encontrándose que ésta no se había producido.

C<sub>2</sub>) *p*-Hidroxibenzoato de metilo (33 mg) se disolvió en 2,2 ml de solución de hidróxido de sodio en metanol (4 mg/ml), para generar el ion fenóxido, y a continuación se agregaron 25  $\mu$ l (27 mg) de cloruro de bencilo. La mezcla se dejó a temperatura ambiente con agitación durante 18 horas y al cabo de

ese tiempo, la CCD analítica (sistema 2) de la mezcla mostró solamente los productos de partida, con lo que no se había producido la reacción buscada.

Método D:

A una solución de 98 mg de p-hidroxibenzoato de metilo en 20 ml de acetona anhidra, se le agregaron 100 mg de carbonato de potasio anhidro, 2 mg de ioduro de potasio anhidro y 75  $\mu$ l (83 mg) de cloruro de bencilo. Esta mezcla se llevó a ebullición y se controló el avance de la reacción por CCD analítica (sistema 2). A las 7 horas de reflujo se estimó un 80% de conversión, pero la mezcla de reacción se mantuvo a ebullición durante 24 horas, buscando una conversión mayor. Al cabo de ese tiempo, se enfrió el sistema y se eliminaron las sales por filtración, lavando el precipitado 2 veces con 10 ml de acetona cada vez. Los filtrados combinados se llevaron a sequedad y el residuo obtenido se tomó con 50 ml de cloruro de metileno. Esta solución se lavó con agua (25 ml), con hidróxido de sodio 0,1 N (25 ml) y luego nuevamente con agua (25 ml). Finalmente se secó sobre sulfato de magnesio anhidro durante 15 minutos y luego de eliminar el agente desecante por filtración, se eliminó el solvente por evaporación. El residuo blanco cristalino (141 mg, rendimiento 90%), homogéneo en CCD (sistemas 2 y 3), se recristalizó de metanol, p.f.: 96-98°C, idéntico al producto obtenido por el método A.



### 1.3. Alcohol p-benciloxibencílico:

La reducción del p-benciloxibenzoato de metilo al alcohol p-benciloxibencílico se realizó con hidruro de aluminio y litio en éter etílico anhidro. La reducción se probó en las siguientes condiciones:

A) a 0°C:

Se disolvieron 47 mg de p-benciloxibenzoato de metilo en 20 ml de éter etílico anhidro y a esta solución se agregaron 40 mg de hidruro de aluminio y litio, y la mezcla se mantuvo a 0°C con agitación durante 24 horas. A distintos tiempos se tomaron alícuotas que se analizaron luego de destruir el exceso de hidruro (por agregado de agua y luego ácido sulfúrico 15%), por CCD (sistema 2), encontrándose que a las 24 horas la reacción sólo había progresado en un 50%.

B) a temperatura ambiente:

*p*-Benciloxibenzoato de metilo (45 mg) se disolvió en 20 ml de éter etílico anhidro. A continuación se agregaron 35 mg de hidruro de aluminio y litio y luego se mantuvo la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 44 horas, tomando alícuotas de la misma a distintos tiempos para controlar el progreso de la reacción. Estas alícuotas, como en el caso anterior, fueron analizadas por CCD (sistema 2), luego de destruir el exceso de hidruro de aluminio y litio agregando agua y ácido sulfúrico 15% en cantidades apropiadas.

El análisis cromatográfico mostró la aparición de distintos productos de reacción y además, aparentemente, una reacción incompleta, ya que a las 44 horas aún parecía quedar reactivo sin reaccionar.

Esta mezcla compleja de productos (38 mg) fue aislada destruyendo el exceso de hidruro de aluminio y litio con agua y luego ácido sulfúrico 15%, y luego extrayendo 3 veces con 25 ml de cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó una vez con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Finalmente, se evaporó el solvente y se obtuvo una mezcla sólida que no fue analizada, dada la presencia de no menos de 4 componentes.

C) en éter etílico a ebullición:

*p*-Benciloxibenzoato de metilo (30 mg) se disolvió en 10 ml de éter etílico anhidro y se agregaron 32 mg de hidruro de aluminio y litio, realizando las ope

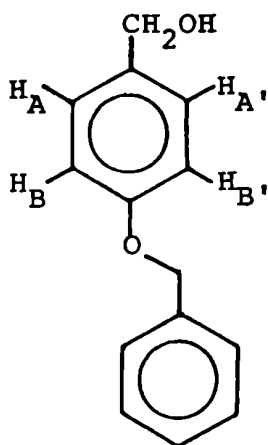
raciones bajo atmósfera de nitrógeno seco. El sistema se calentó hasta que el éter etílico entró en ebullición y se mantuvo a esa temperatura durante 2 horas. Se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción cada 30 minutos para controlar el desarrollo de la misma, por CCD (sistema 2) luego de destruir el exceso de hidruro de aluminio y litio como en los casos anteriores. Se encontró que a los 30 minutos la reacción era total, formándose casi exclusivamente un solo producto. Al transcurrir más tiempo, comenzaron a aparecer otros productos cuya proporción crecía con el tiempo; sin embargo, estas impurezas estaban en mucha menor proporción que a otras temperaturas.

A las 2 horas se finalizó el calentamiento y se destruyó el exceso de hidruro de aluminio y litio como en ocasiones anteriores, agregando agua y ácido sulfúrico 15%. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo 2 veces con 25 ml de éter etílico. Las soluciones etéreas se juntaron, se lavó la solución resultante 2 veces con 20 ml de agua cada vez y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro durante 15 minutos y se eliminó el solvente por evaporación a presión reducida, previa eliminación del agente desecante por filtración. Se obtuvo un residuo blanco cristalino (20 mg) que fue recristalizado de ciclohexano, p.f.: 84-86°C, lit.(91): 86-87°C.

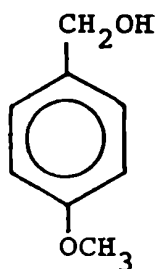
IR: 3300, 1600, 1500, 1240, 1000, 820, 740, 695  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,63 (ba, 1H,  $-\text{OH}$ ); 4,59 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ); 5,05 (s, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{O}-$ ); 6,90 (d,  $J=8$  Hz, 2H,  $\text{H}_B$  y  $\text{H}_B'$ ); 7,25 (parcialmente superpuesta con la señal siguiente, no se puede medir la constante de acoplamiento, 2H,  $\text{H}_A$  y  $\text{H}_A'$ ); 7,35

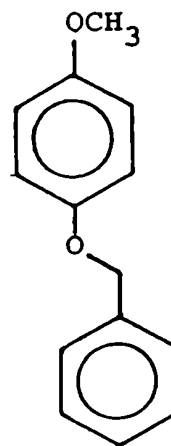
(s, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-).



Este espectro de RMN-<sup>1</sup>H fue asignado por comparación con los espectros de RMN-<sup>1</sup>H del alcohol *p*-metoxibencílico (XVIII) y del *p*-benciloxianisól (XIX).



(XVIII)



(XIX)

EM (m/z, %): 214 (M<sup>+</sup>, 15), 91 (100), 65 (9).

Posteriormente se comprobó que la atmósfera de nitrógeno era innecesaria. Se tomaron 165 mg de *p*-benciloxibenzoato de metilo y se disolvieron en 30 ml de éter etílico anhidro. A

esta solución se le agregaron 130 mg de hidruro de aluminio y litio, en pequeñas porciones. La mezcla se calentó a reflujo durante 15 minutos y al cabo de ese lapso el hidruro en exceso se destruyó por agregado de éter etílico saturado con agua, luego algunos pequeños trozos de hielo y finalmente ácido sulfúrico 15%. La mezcla se extrajo 3 veces con 25 ml de éter etílico cada vez, los extractos orgánicos combinados se lavaron con 2 porciones de 30 ml de agua y finalmente se secaron sobre sulfato de sodio anhidro durante 15 minutos. Al eliminar el solvente por evaporación, previa filtración para eliminar el agente desecante, se obtuvo un sólido blanco cristalino (145 mg, rendimiento: 100%), homogéneo en CCD (sistema 2), indistinguible del producto obtenido según el método anterior.

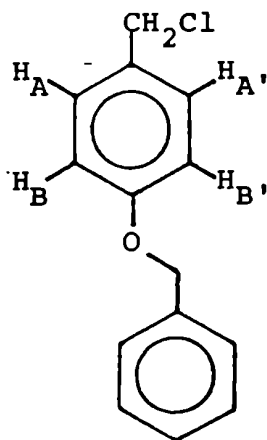
#### 1.4. Cloruro de p-benciloxibencilo (91,92):

Alcohol p-benciloxibencílico (144 mg) se disolvió en 10 ml de éter etílico y a esta solución se le agregaron 0,2 ml de ácido clorhídrico (c). La mezcla se mantuvo con agitación durante 22 horas a temperatura ambiente. En ese momento se agregaron 10 ml de agua, y la fase acuosa se extrajo 3 veces con 25 ml de éter etílico cada vez. Los extractos etéreos combinados se lavaron 2 veces con 10 ml de solución saturada de carbonato de potasio cada vez y luego con 2 porciones de 25 ml de agua. Finalmente, la solución etérea se secó sobre carbonato de potasio anhidro durante 15 minutos y luego se filtró para eliminar el agente desecante.

Al evaporar el éter, quedó como residuo un producto blanco cristalino (157 mg, rendimiento: 100%), homogéneo en CCD (sistema 2), que fue recristalizado de ciclohexano, p.f.: 75-77°C, lit.(91): 79-80°C.

IR: 1610, 1520, 1250, 1050, 840, 745, 700  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4,56 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Cl}$ ); 5,03 (s, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{O}-$ ); 6,93 (d,  $J=9$  Hz, 2H,  $\text{H}_\text{B}$  y  $\text{H}_\text{B}'$ ); 7,23 (parcialmente superpuesta con la señal siguiente, no se puede medir la constante de acoplamiento, 2H,  $\text{H}_\text{A}$  y  $\text{H}_\text{A}'$ ); 7,35 (s, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5-$ ).  
EM (m/z, %): 234 ( $\text{M}+2^{+\cdot}$ , 4), 233 ( $\text{M}+1^{+\cdot}$ , 2), 232 ( $\text{M}^{+\cdot}$ , 12), 197 (3), 92 (7), 91 (100), 65 (8).



### 1.5. p-Benciloxifenilacetoniitrilo:

#### Método A (92):

A<sub>1</sub>) Cloruro de *p*-benciloxibencilo (157 mg) se disolvió en 10 ml de acetona anhidra y a esta solución se agregaron 10 mg de ioduro de potasio anhidro y 72 mg de cianuro de pota-



sio anhidro (65% de exceso respecto de la cantidad estequiométrica necesaria). La mezcla se llevó a ebullición y se mantuvo a reflujo durante 16 horas, se enfrió, se filtraron las sales y se eliminó la acetona por evaporación a presión reducida. El residuo sólido amarillento se tomó con 50 ml de benceno y se lavó con agua caliente (3 x 30 ml). Luego, la solución bencénica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y posteriormente se eliminó el benceno por evaporación a presión reducida. El residuo blanco cristalino obtenido (146 mg, rendimiento: 97%), homogéneo en CCD (sistema 5), fue recristalizado de ciclohexano, p.f.: 68-69°C, lit.(122): 68,5-69°C.

IR: 2250, 1620, 1580, 1510, 1250, 815, 745, 700  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3,61 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ ); 5,03 (s, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{O}-$ ); 6,93 (d,  $J = 9$  Hz, 2H,  $\text{H}_B$  y  $\text{H}_B$ ); 7,23 (parcialmente superpuesta con la señal siguiente, no se puede medir la constante de acoplamiento, 2H,  $\text{H}_A$  y  $\text{H}_A$ ); 7,35 (s, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5-$ ).  
EM (m/z, %): 223 ( $\text{M}^+$ , 6), 91 (100).

A<sub>2</sub>) Cloruro de *p*-benciloxibencilo (41 mg) se disolvió en 10 ml de acetona anhidra y se agregaron 13 mg de cianuro de potasio anhidro (10% de exceso por sobre la cantidad estequiométrica) y 2 mg de ioduro de potasio anhidro. La mezcla se llevó a ebullición y se mantuvo el reflujo durante 17 horas. Al cabo de este tiempo la mezcla de reacción era amarillenta. El análisis por CCD (sistema 5) indicó una reacción incompleta (quedaba reactivo sin reaccionar), además de la formación de otros productos (entre ellos parecía estar el alcohol

*p*-benciloxibencílico, producto de la hidrólisis del reactivo). La mezcla de reacción se trató de la misma forma que en A<sub>1</sub>, filtrando las sales, tomando con benceno, lavando y finalmente evaporando el benceno a presión reducida. Se obtuvo un residuo sólido amarillento (39 mg) que fue analizado por RMN-<sup>1</sup>H:

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 3,63 (s, ~1H, -CH<sub>2</sub>CN); 4,56 (s, ~1/2H, -CH<sub>2</sub>Cl); 4,60 (s, ~1/2H, -CH<sub>2</sub>OH); 5,03 (s, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 6,80-7,45 (m, 9H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>- + -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-).

Del análisis de los valores de la integración de los protones metilénicos surgió que se había producido un 50% del producto buscado, un 25% del producto de partida había quedado sin reaccionar y el 25% restante se había hidrolizado al alcohol correspondiente.

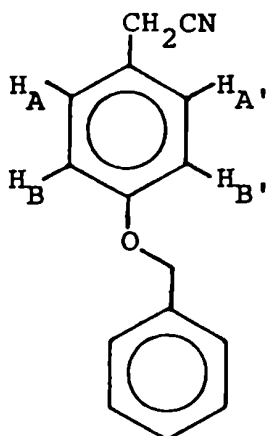
Esta mezcla fue separada por cromatografía en capa delgada preparativa, desarrollando con el sistema 6. Mediante la elución de la banda apropiada, fue posible aislar 22 mg del nitrilo buscado (rendimiento: 56%), que fueron recristalizados de ciclohexano y cuyas propiedades físicas (p.f., IR, RMN-<sup>1</sup>H) fueron idénticas a las del producto obtenido según el método A<sub>1</sub>.

#### Método B (93,94):

B<sub>1</sub>) Cloruro de *p*-benciloxibencilo (141 mg) se disolvió en 10 ml de dimetilsulfóxido anhidro y recientemente destilado y se agregaron 45 mg de cianuro de potasio anhidro (10% de exceso sobre la cantidad estequiométrica). La mezcla se man

tuvo con agitación a 40°C durante 2,5 horas y luego se volcó sobre 50 ml de agua. La fase acuosa se extrajo con 4 porciones de 40 ml de cloruro de metileno y los extractos orgánicos combinados se lavaron con 4 porciones de 30 ml de agua (para eliminar totalmente el dimetilsulfóxido). La fase orgánica se secó durante 15 minutos sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se eliminó el solvente por evaporación a presión reducida. El residuo sólido, blanco cristalino (137 mg, rendimiento: 100%), homogéneo en CCD (sistema 5) fue recristalizado de ciclohexano y sus constantes físicas (p.f., IR, RMN-<sup>1</sup>H, EM) resultaron idénticas a las del producto obtenido según el método A<sub>1</sub>.

B<sub>2</sub>) Cloruro de *p*-benciloxibencilo (47 mg, 8% de exceso respecto de la cantidad estequiométrica) se disolvió en 3 ml de dimetilsulfóxido anhidro y recientemente destilado y se agregaron 42 mg de cianuro de potasio anhidro. La mezcla se trató como en el caso B<sub>1</sub>, obteniéndose 47 mg de un producto blanco cristalino, apenas impurificado con un poco de producto de partida, según el análisis por CCD (sistema 5). Este producto, sin más purificación, se reservó para probar el paso siguiente.



1.6. Clorhidrato de tiramina |4-(2-aminoetil)fenol| (95-99):

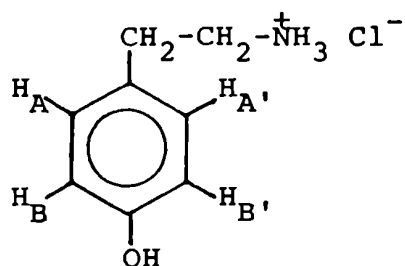
*p*-Benciloxifenilacetónitrilo (133 mg) se disolvió en 20 ml de etanol absoluto. A esta solución se agregaron 0,18 ml de ácido clorhídrico (c) y 20 mg de paladio (10% sobre carbón). Esta mezcla se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 24 horas, hasta que cesó el consumo de hidrógeno. Se eliminó el catalizador por filtración, el que a su vez fue lavado con 2 porciones de 10 ml de etanol. La mezcla de reacción fue analizada por CCD (sistemas 6, 7 y 12), encontrándose que era homogénea y que revelaba tanto con iodo como con solución de ninhidrina, esto último indicativo de la presencia de una amina primaria, y con la misma relación de frentes ( $R_f$ ) que la tiramina comercial.

La solución etanólica se concentró a un tercio de su volumen y luego se agregaron porciones de cloruro de metileno y éter de petróleo (fracción 60-80°C) hasta que se formó un

precipitado blanco cristalino que se separó por filtración (87 mg, rendimiento: 84%).

IR: 3100, 1620, 1500, 1230, 840  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  2,70-3,40 (m, sistema AA'BB' (131), 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 6,92 (d,  $J=9$  Hz, 2H,  $\text{H}_B$  y  $\text{H}_{B'}$ ); 7,23 (d,  $J=9$  Hz, 2H,  $\text{H}_A$  y  $\text{H}_{A'}$ ).



EM ( $m/z$ , %) (132): 137 ( $\text{M}^+ - \text{HCl}$ , 41), 108 (100), 107 (83), 91 (13), 77 (58).

#### 1.7. Hordenina |4-(2-dimetilaminoetil)fenol|:

##### Método A (Reacción de Eschweiler-Clark) (81):

Tiramina (30 mg), liberada por extracción continua durante 24 horas con éter etílico de una solución acuosa amoniacal de clorhidrato de tiramina, se disolvió en 0,5 ml de ácido fórmico (90%) y 0,3 ml de formaldehído (35%). La mezcla se mantuvo a ebullición durante 20 horas y luego se agregaron 0,5 ml de ácido clorhídrico (c) y se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo se tomó con 5 ml de hidróxido de amonio (c) y nuevamente se evaporó el solvente a presión reducida.

Finalmente, el residuo se sublimó a 110°C y 0,001 Torr, obteniéndose 5 mg de una sustancia que no pudo ser identificada, pero que su espectro RMN-<sup>1</sup>H (en CDCl<sub>3</sub>) mostraba las siguientes señales: δ 2,45 (s); 6,80 (d, J= 9 Hz); 7,00 (d, J= 9 Hz).

Estas señales podrían asignarse a grupos N-metilos y a un anillo aromático *para*-disustituído, respectivamente. Debido a la pequeña cantidad de sustancia de que se disponía no fue posible obtener los datos de integración en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H.

Método B (100, 123):

Clorhidrato de tiramina (40 mg) se disolvió en 10 ml de metanol y se agregaron 70 µl de formaldehído (35%) y 10 mg de paladio (10% sobre carbón). Esta mezcla se hidrogenó a temperatura ambiente y a presión atmosférica durante 17 horas, hasta que cesó el consumo de hidrógeno. El catalizador se eliminó por filtración y fue lavado 2 veces con porciones de 5 ml de metanol. La solución metanólica se llevó a sequedad, evaporando el solvente a presión reducida, y el residuo se tomó con 25 ml de metanol y se volvió a eliminar el solvente por evaporación. Este proceso se repitió 4 veces para eliminar totalmente el paraformaldehído. Finalmente, se tomó el residuo con 2 ml de hidróxido de amonio (c) y nuevamente se llevó a sequedad y el nuevo residuo obtenido se sublimó a 100-105°C y  $5 \times 10^{-4}$  Torr, obteniéndose 34 mg de un sólido blanco cristalino, homogéneo en CCD (sistemas 7 y 13), que revelaba con iodo

pero no con nínhidrina (no era una amina primaria). Rendimiento: 89%.

IR: 3100, 2700, 1620, 1520, 1240, 840  $\text{cm}^{-1}$ .

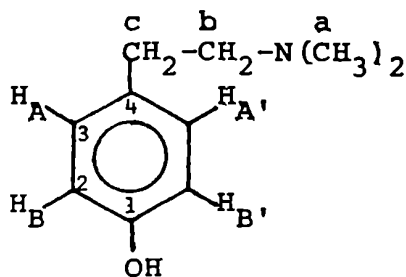
RMN- $^1\text{H}$  (ácido trifluoroacético):  $\delta$  3,08 (d,  $J=5$  Hz,  $-\overset{\dagger}{\underset{\text{H}}{\text{N}}}(\text{CH}_3)_2$ );

3,00-3,80 (m, sistema AA'BB' (131,140),  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , superpuesto con la señal anterior), estos 2 grupos de señales integran para 10 protones; 7,02 (d,  $J=9$  Hz, 2H,  $\text{H}_B$  y  $\text{H}_{B'}$ ); 7,21 (d,  $J=9$  Hz, 2H,  $\text{H}_A$  y  $\text{H}_{A'}$ ).

RMN- $^1\text{H}$  (metanol- $\text{d}_4$ ):  $\delta$  2,92 (s,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 2,70-3,50 (m, sistema AA'BB' (131,140), superpuesto con la señal anterior y con la absorción del solvente,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), estos 2 grupos de señales integran, aproximadamente, para 10 protones; 6,80 (d,  $J=9$  Hz; 2H,  $\text{H}_B$  y  $\text{H}_{B'}$ ); 7,15 (d,  $J=9$  Hz, 2H,  $\text{H}_A$  y  $\text{H}_{A'}$ ).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$ ) (125):  $\delta$  30,23 (C-c); 43,69 (C-a); 59,54 (C-b); 116,70 (C-2); 128,46 (C-4); 130,90 (C-3); 155,59 (C-1). Este espectro fue asignado por comparación con los desplazamientos químicos de los carbonos del etilbenceno, la N,N-dimetilbutilamina y considerando los efectos de los sustituyentes sobre los desplazamientos químicos de los carbonos aromáticos (133).

EM (m/z, %) (132): 165 ( $\text{M}^+$ , 6), 121 (9), 107 (14), 91 (9), 77 (18), 65 (7), 58 (100).



1.8. p-Benciloxifenilacetoni-trilo-1-<sup>14</sup>C (101):

Cloruro de p-benciloxibencilo (314 mg) se disolvió en 20 ml de dimetilsulfóxido anhidro y recientemente destilado y a esta solución se agregaron 81 mg de cianuro de potasio-<sup>14</sup>C (1 mCi) y la mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 90 minutos. Luego, se volcó sobre agua (100 ml) y se extrajo con 4 porciones de 50 ml de cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó 5 veces con porciones de 50 ml de agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Al evaporar el solvente se obtuvo un sólido blanco cristalino (315 mg), idéntico según CCD (sistema 5), p.f. e IR al p-benciloxifenilacetoni-trilo inactivo. Actividad específica: 0,63 mCi/mmol.

1.9. Clorhidrato de tiramina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C | 4-(2-aminoetil-2-<sup>14</sup>C) fenol | (101):

p-Benciloxifenilacetoni-trilo-1-<sup>14</sup>C (313 mg) se disolvió en etanol absoluto (30 ml) y se agregaron 0,36 ml de ácido clorhídrico (c) y 20 mg de paladio (10% sobre carbón). La mezcla se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtró para eliminar el catalizador y éste fue lavado con 2 porciones de 1 ml de etanol. El filtrado se concentró a unos 3 ml y por adición de cloruro de metileno y éter de petróleo (fracción 60-80°C) se separó un producto blanco cristalino (173 mg), identificado como clorhidrato de tiramina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C, por comparación con una



muestra conocida inactiva (por CCD, sistema 7, revelando con iodo y con ninhidrina, por IR y por EM). Actividad específica: 0,62 mCi/mmol. Rendimiento másico: 81% (a partir de cianuro de potasio).

1.10. Hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  | 4-(2-dimetilaminoetil-2- $^{14}\text{C}$ ) fenol | (101):

Clorhidrato de tiramina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  (172 mg) se disolvió en 20 ml de metanol que contenía 0,3 ml de solución de formaldehído (35%). Se agregaron 20 mg de paladio (10% sobre carbón) y la mezcla se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 16 horas. El catalizador se filtró y se lavó con 2 porciones de 1 ml de metanol. Al evaporar el solvente, quedó un residuo que se tomó nuevamente con 25 ml de metanol y se volvió a evaporar el solvente a presión reducida. Este proceso se repitió 4 veces hasta eliminar totalmente el paraformaldehído. El último residuo (176 mg) se tomó con 2 ml de hidróxido de amonio (c) y finalmente se evaporó el solvente. El residuo final se purificó por sublimación ( $5 \times 10^{-4}$  Torr, 100-105°C), obteniéndose 145 mg (rendimiento másico: 89%) de un sólido blanco cristalino de actividad específica constante: 0,63 mCi/mmol. Sus propiedades físicas (CCD en el sistema 7, IR y EM) eran idénticas a las de hordenina inactiva.

Posteriormente se repitió esta misma secuencia de reacciones a partir de cloruro de *p*-benciloxibencilo (321 mg), cianuro de sodio- $^{14}\text{C}$  (1 mCi, 1 mg) y cianuro de potasio inacti

vo (80 mg). De esta forma se obtuvieron: *p*-benciloxifenilaceto nitrilo-1-<sup>14</sup>C (308 mg; 0,81 mCi/mmol); clorhidrato de tiramina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C (161 mg, 0,80 mCi/mmol; rendimiento másico en 2 pasos, a partir de cianuro: 75%); hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C (0,78 mCi/mmol; 155 mg; rendimiento: 100%).

## 2. Síntesis de hordenina- $\beta$ -<sup>14</sup>C | 4-(2-dimetilaminoetil-1-<sup>14</sup>C) fenol:

### 2.1. Hidrólisis del ácido *p*-metoxibenzoico:

#### A) con tricloruro de boro (102):

A<sub>1</sub>) Acido *p*-metoxibenzoico comercial (162 mg) se disolvió en 4 ml de cloruro de metileno y el sistema se enfrió a -78°C en baño de hielo seco y acetona. Se agregaron luego 3 ml de tricloruro de boro y se mantuvo la mezcla a esa temperatura durante 1 hora, con agitación ocasional. Al cabo de ese lapso de tiempo se dejó llegar el sistema hasta la temperatura ambiente, y se lo dejó durante 23 horas a esa temperatura. Se eliminaron el solvente y el exceso de tricloruro de boro por evaporación a presión reducida y el ácido bórico formado se eliminó tomando el residuo con 4 ml de metanol y evaporándolo a presión reducida. Este proceso se repitió 4 veces.

El análisis por CCD (sistema 11) indicó que la reacción no había sido completa, sino que sólo había progresado en un 50%. Debido al tratamiento con metanol también se había producido una esterificación parcial de los ácidos (*p*-metoxibenzoico y *p*-hidroxibenzoico) dando los correspondientes ésteres

metílicos, como pudo confirmarse mediante la comparación con sustancias conocidas. El tratamiento con diazometano de esta mezcla de reacción, previamente disuelta en éter etílico anhidro, la transformó en una mezcla aproximadamente equimolecular de *p*-metoxibenzoato de metilo y *p*-hidroxibenzoato de metilo. Esta mezcla se separó disolviéndola en 50 ml de cloruro de metileno y lavando con solución de hidróxido de sodio 10% (30 ml). La fase orgánica se lavó luego con 2 porciones de 20 ml de agua, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. Se obtuvo un residuo líquido incoloro (85 mg), que cristalizó al cabo de 24 horas, homogéneo en CCD (sistema 11), con el mismo comportamiento cromatográfico que *p*-metoxibenzoato de metilo y con el mismo espectro IR.

IR (fase líquida): 1700, 1620, 1520, 1450, 1250, 1100, 1000, 840  $\text{cm}^{-1}$ .

La solución acuosa básica anterior se llevó a pH 1 con ácido clorhídrico (c) y se extrajo 3 veces con porciones de 50 ml de cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con 2 porciones de 30 ml de agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se filtró. Al eliminar el solvente por evaporación quedó un residuo blanco cristalino (79 mg), homogéneo en CCD (sistema 11), que se recrystalizó de metanol y cuyas propiedades físicas (p.f., IR) eran iguales a las del *p*-hidroxibenzoato de metilo.

A<sub>2</sub>) Se repitió el ensayo anterior, pero durante más tiempo, para determinar si se podía incrementar el rendimiento de la reacción. Se tomaron 160 mg de ácido *p*-metoxibenzoico y se disolvieron en 4 ml de cloruro de metileno. Se enfrió la solución a -78°C en baño de hielo seco y acetona y se agregaron 3 ml de tricloruro de boro. La mezcla de reacción se mantuvo a -78°C durante 1 hora, con agitación ocasional, y luego se la dejó llegar a temperatura ambiente y se la mantuvo en esas condiciones durante 5 días.

Al cabo de ese tiempo, se eliminaron el solvente y el exceso de tricloruro de boro por evaporación a presión reducida; el ácido bórico formado se eliminó por evaporaciones sucesivas con metanol (4 evaporaciones con 4 ml cada vez).

El análisis por CCD (sistema 11) del residuo de las evaporaciones mostró que estaba formado por los mismos 4 compo-nentes que en el ensayo anterior, con aproximadamente la misma distribución porcentual (indicando un 50% de hidrólisis y un 50% de esterificación de los ácidos correspondientes), por lo que esta mezcla no fue analizada más en detalle.

B) con ácido clorhídrico (98):

B<sub>1</sub>) Acido *p*-metoxibenzoico (136 mg) se mezcló con 5 ml de ácido clorhídrico (c) y se mantuvo a 90°C con agita-ción durante 20 horas. A continuación, la mezcla de reacción se llevó a sequedad por evaporación a presión reducida y el residuo se analizó por CCD (sistema 11), encontrándose que

correspondía a la sustancia de partida y que no se había producido la reacción esperada.

B<sub>2</sub>) Se tomaron 150 mg de ácido *p*-metoxibenzoico y se mezclaron con 1 ml de ácido clorhídrico (c). Esta mezcla se calentó a 120°C en un tubo cerrado durante 17 horas, con agitación ocasional. Al cabo de este tiempo se dejó enfriar el sistema hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción (un aceite de color anaranjado oscuro) se transfirió a un balón, lavando con 3 porciones de 3 ml de metanol. La solución resultante se llevó a sequedad por evaporación a presión reducida, obteniéndose un residuo sólido oscuro (10 mg) que, analizado por CCD (sistema 11) mostró que era una mezcla de varias sustancias. Entre éstas, podía estar el ácido *p*-hidroxibenzoico pero no se encontró nada de la sustancia de partida. Además, había otra sustancia con fluorescencia de color anaranjado al ser irradiada con luz UV de 366 nm. En vista de esto, y de la cantidad de que se disponía, esta mezcla no fue analizada.

B<sub>3</sub>) Acido *p*-metoxibenzoico (162 mg) se mezcló con 0,2 ml de ácido clorhídrico (c) y 0,8 ml de agua. Esta mezcla se mantuvo a 120°C en un tubo cerrado, con agitación ocasional, durante 19 horas. Al cabo de este tiempo, se enfrió el sistema y la mezcla se transfirió a un balón con la ayuda de 4 porciones de 5 ml de metanol. En este caso, la mezcla de reacción era límpida e incolora. Al eliminar el solvente y el exceso de ácido clorhídrico por evaporación a presión reducida, se obtu-

vo un residuo sólido blanco (160 mg), el que, analizado por CCD (sistema 11), mostró que estaba formado casi exclusivamente por la sustancia de partida y un pequeño porcentaje de otra sustancia, que podría haber sido el ácido *p*-hidroxibenzoico, producto de la hidrólisis. En vista de estos resultados, esta mezcla no fue analizada más en detalle.

B<sub>4</sub>) Acido *p*-metoxibenzoico (210 mg) se mezcló con 0,5 ml de ácido clorhídrico (c) y 0,5 ml de agua. Esta mezcla se mantuvo a 120°C durante 17 horas, en un tubo cerrado, con agitación ocasional. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción tomó un color anaranjado. Los productos de la reacción fueron aislados como en los ensayos anteriores, transfiriendo la mezcla a un balón, con ayuda de 4 porciones de 3 ml de metanol. La solución se llevó a sequedad por evaporación a presión reducida y el residuo obtenido (196 mg), al ser analizado por CCD (sistema 11), mostró que estaba formado por lo menos por 3 sustancias: una parecía ser la sustancia de partida (aproximadamente en un 50%), otra, el ácido *p*-hidroxibenzoico (aproximadamente en un 25%) y finalmente una tercera, que tenía fluorescencia de color anaranjado al ser irradiada con luz UV de 366 nm (también en una proporción aproximada del 25%).

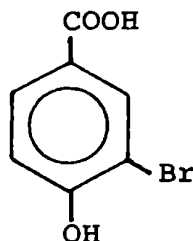
Como el rendimiento en el producto buscado era muy bajo, esta mezcla no fue analizada más en detalle.

C) con ácido bromhídrico (98):

C<sub>1</sub>) Acido *p*-metoxibenzoico (80 mg) se mezcló con 1 ml de ácido bromhídrico 48% y esta mezcla se mantuvo a 120°C con agitación durante 16 horas. Al cabo de este tiempo, la mezcla se llevó a pH 4 mediante el agregado de solución de hidróxido<sup>o</sup> de sodio (40%) y finalmente solución de ácido clorhídrico 0,1 N. Al enfriar la solución acuosa, precipitó un sólido ligeramente amarillento (15 mg) cuyo espectro RMN-<sup>1</sup>H mostraba la ausencia de grupos metoxilo y una absorción en la zona aromática mucho más compleja que la esperada, por lo que se confirmó que no se trataba del ácido *p*-hidroxibenzoico, sino de un aromático 1,2,4-trisustituído.

RMN-<sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>): δ 7,12 (d, J= 9 Hz, ~1H); 7,92 (dd, J= 9 y 2 Hz, ~1H); 8,18 (d, J= 2 Hz, ~1H) y otras absorciones más pequeñas en la misma zona debidas a impurezas.

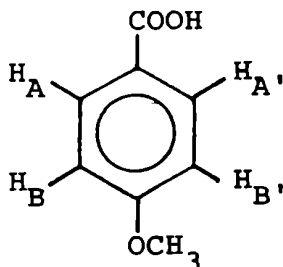
Posiblemente se tratara del ácido 3-bromo-4-hidroxibenzoico:



(Al evaporar la solución acuosa remanente, no fue posible aislar ninguna otra sustancia orgánica).

C<sub>2</sub>) Acido *p*-metoxibenzoico (300 mg) se mezcló con 0,4 ml de ácido bromhídrico 48% en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se mantuvo a 120°C durante 4 horas con agitación. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con 10 ml de agua y se enfrió. De esta forma precipitó un sólido blanco (250 mg), que fue separado por filtración. El análisis por CCD (sistema 11) y por RMN-<sup>1</sup>H mostró que se trataba del ácido de partida.

RMN-<sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O): δ 3,84 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 6,85 (d, J= 9 Hz, 2H, H<sub>B</sub> y H<sub>B'</sub>); 7,92 (d, J= 9 Hz, 2H, H<sub>A</sub> y H<sub>A'</sub>).

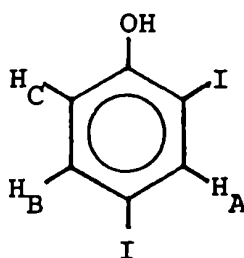


D) con ácido iodhídrico (98):

D<sub>1</sub>) Acido *p*- metoxibenzoico (120 mg) se mezcló con 5 ml de ácido iodhídrico 67% y la mezcla se mantuvo a 125-130°C durante 20 horas, con agitación continua. Al cabo de este tiempo, la mezcla se volcó sobre 50 ml de agua y se neutralizó por agregado de solución de hidróxido de potasio (10%) y luego de ácido clorhídrico (4%). Al enfriar, precipitó un sólido ligeramente amarillento que se separó por filtración (110 mg).



Este producto, homogéneo en CCD (sistema 11), no era el ácido de partida. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostró las siguientes señales (en CDCl<sub>3</sub>): δ 5,40 (ba, 1H, -OH); 6,78 (d, J= 9 Hz, 1H, H<sub>C</sub>); 7,52 (dd, J= 9 y 2 Hz, 1H, H<sub>B</sub>); 7,93 (d, J= 2 Hz, H<sub>C</sub>); indicando un anillo aromático 1,2,4-trisustituído. Posiblemente se tratara del 2,4-diidodofenol:

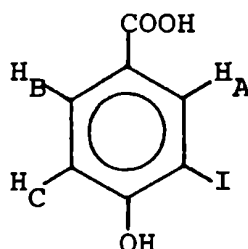


IR: 3300, 1610, 1510 y 820 cm<sup>-1</sup>.

En vista del esquema de sustitución aromática y de la ausencia de grupo carbonilo (por IR), este compuesto no fue analizado más en detalle.

Al evaporar totalmente la solución remanente luego de separar la sustancia anterior, se obtuvo un residuo formado por una sustancia orgánica muy impurificada con sales. Este residuo se tomó con metanol (2 x 0,5 ml) y se filtró. Al evaporar el metanol se obtuvo un residuo (70 mg) que, analizado por CCD (sistema 11), mostró estar formado por una sustancia distinta a la aislada anteriormente, que no era el ácido de partida. El espectro RMN-<sup>1</sup>H mostró las siguientes absorciones (en 50% D<sub>2</sub>O + 50% metanol-d<sub>4</sub>): δ 6,98 (d, J= 8 Hz, 1H, H<sub>C</sub>); 7,87 (dd, J= 8 y 2 Hz, 1H, H<sub>B</sub>); 8,35 (d, J= 2 Hz, 1H, H<sub>A</sub>).

En vista del esquema de sustitución aromática y de los desplazamientos químicos observados, posiblemente se tratara del ácido 4-hidroxi-3-iodobenzoico:

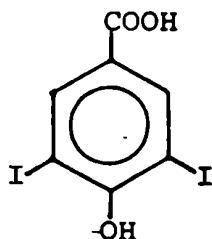


Debido a esto, este producto no fue analizado más en detalle.

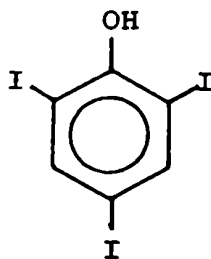
D<sub>2</sub>) Acido *p*-metoxibenzoico (205 mg) se mezcló con 4 ml de ácido iodhídrico (55%) y la mezcla se mantuvo a 90°C con agitación continua durante 5 horas. Al volcar esta mezcla sobre 50 ml de agua (a aproximadamente 5°C) se produjo un precipitado blanco que se separó por filtración y que resultó ser el ácido de partida (165 mg), según se determinó por CCD (sistema 11) y por RMN-<sup>1</sup>H.

D<sub>3</sub>) Acido *p*-metoxibenzoico (253 mg) se mezcló con 7 ml de ácido iodhídrico (55%) y la mezcla se mantuvo a 120°C durante 16 horas, con agitación continua. La mezcla de reacción se volcó sobre 10 ml de agua a 5°C y se llevó a pH básico con solución de hidróxido de sodio (20%), y finalmente a pH 4 con agregados de ácido clorhídrico (4%). Se dejó cristalizar durante

te 20 horas a 5°C y luego se filtró el precipitado formado, obteniéndose un sólido cristalino, ligeramente amarillento (320 mg), cuyo espectro RMN-<sup>1</sup>H (en acetona-d<sub>6</sub>) mostró las siguientes absorciones: δ 7,00-8,50 (ba, ~2H); 8,42 (s, ~2H); más una señal debida a una impureza a δ 8,08 (s), cuya intensidad era un 15% de la de δ 8,42. Esta mezcla podría tratarse del ácido 4-hidroxí-3,5-diiodobenzoico:



impurificado con una pequeña proporción de 2,4,6-triiodofenol:



Este espectro se asignó mediante la comparación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de estas dos sustancias y de otras estructuralmente relacionadas (134).

En vista de que en esta reacción se había sustituido el anillo aromático nuevamente, estos productos no fueron ana-

lizados más en detalle.

## 2.2. Preparación de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ (103):

Clorhidrato de tiramina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  en solución acuosa (5 ml; 0,9 mg; 250  $\mu\text{Ci}$ ) se diluyó con 165 mg de clorhidrato de tiramina inactivo y a esta mezcla se agregaron 10 ml de etanol, 10 mg de paladio (10% sobre carbón) y 0,3 ml de solución de formaldehído (35%). Se hidrogenó luego a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 16 horas. Al cabo de este tiempo se eliminó el catalizador por filtración y se lo lavó con etanol (4 x 5 ml). Los líquidos de lavado y la mezcla de reacción se juntaron y se evaporó el solvente. El residuo se tomó con 5 ml de metanol y se eliminó nuevamente el solvente por evaporación. Este proceso se repitió 3 veces más hasta eliminar totalmente el paraformaldehído producido, debido al exceso de formaldehído empleado en la reacción. El residuo se tomó con 1 ml de hidróxido de amonio (c) y 5 ml de etanol y se eliminó el solvente por evaporación. El residuo se sublimó a 110°C y 0,001 Torr obteniéndose 156 mg de un sólido blanco, homogéneo en CCD (sistema 13), que revelaba con iodo pero no con solución de ninhidrina, confirmándose que se trataba de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  por comparación de su espectro IR con el de una muestra conocida de hordenina. Actividad específica: 0,19 mCi/mmol; rendimiento másico: 100%.

3. Síntesis de hordenina marcada en los grupos N-metilos:

3.1. Metilación del clorhidrato de tiramina con distintas cantidades de formaldehído:

A) La reacción con un exceso de formaldehído del 80% respecto de la cantidad estequiométrica ya fue descripta anteriormente (ver, por ejemplo, pág. 128), donde se obtuvo un rendimiento del 100%.

B) Clorhidrato de tiramina (64 mg) y 0,1 ml de solución de formaldehído (32,7%), valorada por medición de su densidad e índice de refracción y por titulación con sulfito de sodio (104), se mezclaron en 10 ml de metanol. En este caso la cantidad de formaldehído empleada corresponde a un exceso del 56%. Esta mezcla se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente con 10 mg de paladio (10% sobre carbón) como catalizador, durante 16 horas.

Al aislar el producto de reacción como en ocasiones anteriores (ver, por ejemplo, pág. 128) se obtuvo un sólido blanco, homogéneo en CCD (sistema 13) que fue purificado por sublimación a 110°C y 0,001 Torr (58 mg). Se confirmó que se trataba de hordenina por IR y por CCD (sistema 13). Rendimiento: 95%.

C) Al repetir el ensayo anterior con 88 mg de clorhidrato de tiramina y 0,09 ml de solución de formaldehído (32,7%), que corresponde a un exceso del 3%, en 6 ml de meta-

nol, se obtuvieron 77 mg de hordenina purificada por sublimación. Su estructura se confirmó por IR y por CCD (sistema 13). En este caso, el rendimiento fue del 92%.

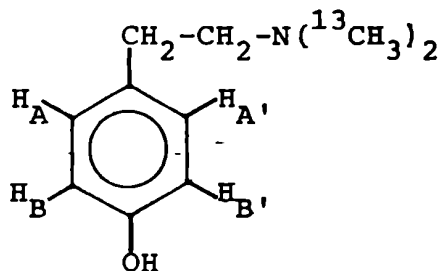
### 3.2. Síntesis de hordenina(metilo- $^{13}\text{C}_2$ ):

Clorhidrato de tiramina (107 mg) se disolvió en 10 ml de metanol y a la solución se agregaron 10 mg de paladio (10% sobre carbón) y 0,5 ml de solución de formaldehído- $^{13}\text{C}$  (14,6%; 90%  $^{13}\text{C}$ ). La mezcla se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 16 horas. Al cabo de este tiempo, por CCD (sistema 13), se confirmó que la reacción era total. Se eliminó el catalizador por filtración, se lo lavó con metanol (2 x 3 ml) y se agregaron 2 ml de hidróxido de amonio (c) al filtrado. Se eliminó el solvente por evaporación y el residuo se sublimó a 110°C y 0,001 Torr, obteniéndose un producto blanco cristalino cuyo espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (en  $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$ , pH 7) mostró las siguientes señales:  $\delta$  43,73 ( $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , ver pág. 115) y 72,60, asignada a un polímero de formaldehído sublimable en las mismas condiciones que la hordenina (104). Esta impureza se hidrolizó disolviendo la mezcla en 10 ml de metanol y ácido clorhídrico (c) (95:5) y dejándola a temperatura ambiente durante 12 horas. Esta solución se trató luego con hidróxido de amonio (c) hasta pH básico y se eliminaron los solventes por evaporación a presión reducida. El residuo obtenido se sublimó nuevamente (110°C y 0,001 Torr) lo que produjo 100 mg de hordenina(metilo- $^{13}\text{C}_2$ ). Rendimiento: 98%.

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  2,70-3,50 (m, zona AA'BB' de un sistema AA'BB'XX',  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{}^{13}\text{CH}_3)_2$ ); 2,90 (d,  $^3\text{J}_{\text{C,H}} = 4$  Hz,  $^{12}\text{CH}_3-\text{N}-^{13}\text{CH}_3$ ); 2,90 (d,  $^1\text{J}_{\text{C,H}} = 143$  Hz,  $^{12}\text{CH}_3-\text{N}-^{13}\text{CH}_3$ ); 2,90 (dd,  $^1\text{J}_{\text{C,H}} = 143$  Hz y  $^3\text{J}_{\text{C,H}} = 4$  Hz,  $-\text{N}(\text{}^{13}\text{CH}_3)_2$ ); 6,85 (d,  $\text{J} = 8$  Hz, 2H,  $\text{H}_\text{B}$  y  $\text{H}_\text{B}'$ ); 7,18 (d,  $\text{J} = 8$  Hz, 2H,  $\text{H}_\text{A}$  y  $\text{H}_\text{A}'$ ).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  43,73 ( $-\text{N}(\text{}^{13}\text{CH}_3)_2$ ).

EM (m/z, %): 167 (5), 121 (7), 107 (15), 91 (10), 77 (18), 60 (100), 59 (20), 58 (2).



### 3.3. Síntesis de hordenina(metilo- $^{14}\text{C}_2$ ):

Clorhidrato de tiramina (108 mg) se disolvió en 15 ml de metanol y a esta solución se agregó el contenido de una ampolla de solución acuosa de formaldehído- $^{14}\text{C}$  (2%; 38,4  $\mu\text{l}$ ; 500  $\mu\text{Ci}$ ) y además 40  $\mu\text{l}$  de solución acuosa de formaldehído inactivo (32,7%) y 20 mg de paladio (10% sobre carbón). La mezcla se hidrogenó a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 4 horas. En ese momento, se agregaron 90  $\mu\text{l}$  de solución de formaldehído inactivo (32,7%) y se continuó hidrogenando durante 12 horas más. Al cabo de este tiempo se con

tróló, por CCD (sistema 13), que la reacción se hubiera completado. Se filtró el catalizador y se lo lavó con metanol (3 x 2 ml) y los líquidos de lavado se juntaron con la mezcla de reacción. Se eliminó luego el solvente por evaporación a presión reducida y el residuo se tomó nuevamente con metanol, el cual fue otra vez eliminado por evaporación. Este procedimiento se repitió 3 veces más. Finalmente, el último residuo se tomó con 1 ml de hidróxido de amonio (c) y se evaporó el solvente. El residuo resultante se sometió a una purificación por sublimación (110°C y 0,001 Torr) obteniéndose 103 mg de hordenina(metilo-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>) (rendimiento: 100%) cuya identidad fue confirmada por comparación de su espectro IR con el de una muestra auténtica de hordenina. Actividad específica:  $1,50 \times 10^9$  dpm/mmol; 0,68 mCi/mmol.



EXPERIENCIA CON HORDENINA- $\alpha$ -<sup>14</sup>C (107)

A) Determinación del porcentaje de absorción del alcaloide por raíz en función del tiempo:

El ensayo de absorción de hordenina por plantas de *Hordeum vulgare* se realizó sobre 20 plantas de 8 días de desarrollo creciendo en sendos recipientes de vidrio ya descritos anteriormente (ver Capítulo II, pág. 30), que contenían aproximadamente 1 cm de altura de vermiculita lavada y esterilizada, que estaba embebida en 2 ml de solución salina. A cada una de estas plantas se le entregó 0,1 ml de una solución acuosa de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C que contenía 3,4 mg hordenina/ml, lo que equivalía a 0,34 mg hordenina/planta ó 20,6  $\mu$ mol/planta. La actividad específica de la hordenina entregada era de 0,78 mCi/mmol ( $1,74 \times 10^9$  dpm/mmol), o sea que se entregaron  $3,59 \times 10^7$  dpm totales a cada planta. Este último valor también se determinó midiendo la actividad de un blanco (recipiente sin planta), realizado con vermiculita y 2 ml de solución salina, tomado al final de la experiencia.

A cada hora después de la inoculación, se tomaron 3 ejemplares y se determinó la actividad remanente en solución. Para ello, se retiró la planta, cuyas raíces se lavaron con agua destilada, se filtró la solución salina y se lavó el recipiente y la vermiculita con agua destilada. Las soluciones acuosas se juntaron y se llevaron a volumen en un matraz aforado de 25 ml. De esta solución se tomó 1 ml con pipeta aforada, que

se transfirió a un recipiente especial para medición de radiactividad por centelleo líquido. A ese recipiente se le agregó también la solución centelleadora de dioxano (14 ml). Este procedimiento se repitió cada hora, durante 6 horas, y también se hizo lo mismo con el blanco. Los resultados, expresados en la Tabla 3 y en la Figura 14, se presentan en las páginas 37 y 36, respectivamente.

B) Inoculación del trazador y búsqueda de los productos de degradación:

B<sub>1</sub>) Inoculación y cosecha del material vegetal:

Para la realización de este ensayo se tomaron 600 plantas de *Hordeum vulgare* de 8 días de desarrollo, que crecían en 300 recipientes de vidrio, y se inocularon por absorción a través de la raíz con 118 mg de clorhidrato de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C. Para ello se preparó una solución acuosa que contenía 3,9 mg de clorhidrato de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C/ml y se agregó a cada recipiente un volumen de 0,1 ml de solución. La hordenina empleada tenía una actividad específica de  $1,39 \times 10^9$  dpm/mmol (0,63 mCi/mmol). En consecuencia, se entregaron en total  $8,14 \times 10^8$  dpm, con una dosis de hordenina por planta de 0,16 mg de base libre. Las plantas se mantuvieron durante 14 días más en las condiciones de desarrollo ya descritas y finalmente fueron retiradas de los recipientes. La solución salina remanente de cada recipiente se guardó, junto con el agua proveniente del lavado de las raíces

para determinar la cantidad de hordenina remanente en solución, o sea sin absorber.

Esta solución acuosa se llevó a volumen (1 l) y se tomó una alícuota (1 ml) que, junto con 14 ml de solución centelleadora de dioxano, fue transferida a un recipiente especial para determinar su radiactividad. Se encontró que tenía  $2,50 \times 10^4$  dpm, o sea que en 1 l había  $2,50 \times 10^7$  dpm, lo que corresponde al 3,07% de la cantidad de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  entregada.

Las 600 plántulas, lavadas con agua destilada, se separaron, una por una, en parte aérea y raíz y se secaron ambas porciones por separado en estufa con circulación de aire a  $50^\circ\text{C}$  durante 36 horas. Idéntico proceso se llevó a cabo con el material proveniente de 250 plántulas más, que crecieron como lote de control durante el mismo tiempo, pero sin agregado de hordenina.

Luego de secarlas en estufa, las fracciones se molieron en un molinillo y se pesaron, obteniéndose los siguientes resultados:

<u>Lote de control:</u>	Parte aérea:	3,03 g
(250 plantas)	Raíces:	3,90 g
<u>Lote radiactivo:</u>	Parte aérea:	7,96 g
(600 plantas)	Raíces:	10,10 g

B<sub>2</sub>) Extracción del material vegetal inactivo:

Con el material vegetal del lote de control se hicieron ensayos de extracción y de comportamiento de los extractos en CCD para aplicar las observaciones obtenidas al estudio de las fracciones radiactivas.

Primero se extrajo (por separado, parte aérea y raíces) con 100 ml de éter de petróleo (fracción 60-80°C) durante 46 horas en Soxhlet. Los extractos secos de raíces (168 mg) y de partes aéreas (145 mg) fueron analizados cualitativamente por CCD, encontrándose que los sistemas 8, 9 y 10 eran adecuados para separar los extractos en sus componentes por una cromatografía en columna.

Los residuos vegetales de la extracción anterior se extrajeron a continuación (en Soxhlet) con 100 ml de metanol durante 48 horas, obteniéndose los correspondientes extractos metanólicos, que una vez secos pesaron 390 mg el proveniente de raíz, y 476 mg el de partes aéreas. El análisis por CCD mostró que los sistemas de desarrollo 11 y 12 eran adecuados para una separación de los componentes de los extractos por cromatografía en columna.

B<sub>3</sub>) Extracción del material vegetal activo:

De mane-  
ra análoga a la realizada con el lote de control, se realiza-  
ron las extracciones sobre el material vegetal radiactivo (por  
separado, parte aérea y raíces). Se comenzó extrayendo con

éter de petróleo (fracción 60-80°C) durante 60 horas (reemplazando el solvente cada 24 horas y midiendo la radiactividad de cada fracción) y luego se siguió extrayendo con metanol durante 66 horas (también reemplazando el solvente cada 24 horas y midiendo la radiactividad de cada fracción). Cada extracción se dio por terminada cuando la radiactividad extraída por solvente fresco era despreciable comparada con la radiactividad de la fracción anterior.

Al evaporar los solventes a presión reducida, se obtuvieron los siguientes residuos:

Parte aérea:	éter de petróleo:	416 mg
	metanol:	980 mg
Raíces:	éter de petróleo:	335 mg
	metanol:	554 mg

La radiactividad total de cada uno de estos extractos era la siguiente:

Parte aérea:	éter de petróleo:	$2,30 \times 10^5$ dpm
		$5,52 \times 10^2$ dpm/mg
metanol:		$9,43 \times 10^6$ dpm
		$9,62 \times 10^3$ dpm/mg
Raíces:	éter de petróleo:	$4,69 \times 10^5$ dpm
		$1,40 \times 10^3$ dpm/mg
metanol:		$8,03 \times 10^6$ dpm
		$1,45 \times 10^4$ dpm/mg

El material vegetal residual de las extracciones anteriores se extrajo a continuación con 200 ml de agua a temperatura ambiente, durante 48 horas, con agitación continua (por separado, raíces y parte aérea). Los extractos se separaron por filtración y al evaporar el solvente a presión reducida se obtuvieron los siguientes residuos:

Parte aérea: 1,270 g

Raíces: 1,400 g

cuya radiactividad era:

Parte aérea:  $1,78 \times 10^6$  dpm  
 $1,40 \times 10^3$  dpm/mg

Raíces:  $1,32 \times 10^7$  dpm  
 $9,41 \times 10^3$  dpm/mg

El residuo insoluble de las raíces se trató luego con 180 ml de agua a 80°C durante 48 horas, con agitación continua. El extracto se separó por filtración y se eliminó el solvente por evaporación a presión reducida, obteniéndose un residuo de 780 mg, cuya radiactividad era de  $1,06 \times 10^7$  dpm ó  $1,36 \times 10^4$  dpm/mg

B<sub>4</sub>) Determinación de la radiactividad de los residuos insolubles:

- Parte aérea:

Se tomaron 5 mg del residuo insoluble seco proveniente de la extracción acuosa y se trataron con

0,4 ml de Protosol durante 3 horas, con agitación ocasional, a 50°C, en un recipiente de vidrio especial para determinaciones de radiactividad por centelleo líquido. A continuación se agregaron 15 ml de solución centelleadora de tolueno y se midió la radiactividad, encontrándose que tenía 118 dpm/mg, lo que corresponde a una actividad total de  $9,95 \times 10^5$  dpm.

- Raíces:

Se realizó de la misma manera que la determinación anterior, pero con 9 mg de residuo y 0,6 ml de Protosol (a la misma temperatura y durante el mismo tiempo). Se encontró que tenía  $4,14 \times 10^3$  dpm/mg, que corresponde a una actividad total de  $2,81 \times 10^7$  dpm.

C) Inoculación del trazador y captación del dióxido de carbono expelido:

C<sub>1</sub>) Prueba de captación de dióxido de carbono:

Para esta experiencia, se tomaron 50 plántulas de 5 días de desarrollo y se transfirieron a un recipiente cerrado de vidrio, ya descrito (ver Capítulo II, pág. 43 ) que contenía vermiculita lavada y esterilizada. Las plantas se mantuvieron en el sistema durante 10 días, con los agregados necesarios de solución salina nutriente. Se estableció una circulación forzada de aire, recogién dose el dióxido de carbono (del aire y el expulsado por las plantas) como carbonato de bario, con 4 trampas en

serie de solución saturada de hidróxido de bario. Cada 24 horas se filtró el carbonato de bario precipitado, obteniéndose un promedio de 60 mg/h (valor muy variable, ya que dependía de la estabilidad del flujo de aire a través del sistema). Las plántulas resistieron tanto la transferencia como la permanencia dentro del sistema sin problemas.

C<sub>2</sub>) Inoculación del trazador radiactivo:

Repitiendo

el mismo ensayo anterior, se tomaron 50 plántulas de 5 días de desarrollo y se transfirieron al mismo sistema anterior, donde se las mantuvo con agregados periódicos de solución salina nutriente. Cuando las plantas tenían 8 días de desarrollo fueron inoculadas con una solución de 21,1 mg de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C (1,74 x 10<sup>9</sup> dpm/mmol; 2,23 x 10<sup>8</sup> dpm totales) en 50 ml de solución salina (dosis: 0,42 mg/planta). A distintos intervalos de tiempo se recogió por filtración el carbonato de bario precipitado. El ensayo duró 6 días.

Luego de ese tiempo, se recogió la solución salina remanente y se lavaron las plantas y la vermiculita con agua destilada. Estas soluciones se juntaron (2,5 l) y se tomó 1 ml para determinar la actividad remanente en solución, que era de 1,81 x 10<sup>4</sup> dpm/ml, o sea 4,52 x 10<sup>7</sup> dpm (20,3% de lo entregado).

Las raíces de estas 50 plantas, sin secar, se molieron en mortero con ayuda de un poco de arena y se sometieron a una extracción con 100 ml de metanol en Soxhlet, durante 30 ho



ras. Este extracto se llevó a volumen (100 ml) y de él se tomó una alícuota (0,1 ml), que fue evaporada en el recipiente especial de vidrio para medir su radiactividad, en una corriente de nitrógeno. Por el método usual de medición se determinó que tenía  $2,18 \times 10^4$  dpm, lo que corresponde a  $2,18 \times 10^7$  dpm totales (9,8% de lo entregado). Este extracto no fue analizado.

C<sub>3</sub>) Determinación de la radiactividad del carbonato de bario:

Se realizó por 2 métodos, y su exactitud se comprobó con muestras de carbonato de bario de actividad conocida.

- Método 1 (124):

Se colocaron 5-10 mg de carbonato de bario en un pequeño crisol de vidrio, en el fondo de un tubo de vidrio con un brazo lateral, en el que se colocó 1 ml de ácido sulfúrico (c). Este sistema se conectó a un balón, en el cual había 0,5 ml de tolueno y 0,1 ml de hidróxido de Hyamine (ver Figura 23). Se hizo vacío en el sistema, abriendo las llaves A, B y C hasta que el tolueno entró en ebullición (0,1 Torr o menos) y luego se cerró la llave C. A continuación se congeló la mezcla contenida en el balón por inmersión del mismo en nitrógeno líquido. Cuando la mezcla estuvo totalmente congelada, se abrió la llave C y se continuó evacuando el sistema por 10 minutos más y luego se cerraron las 3 llaves.

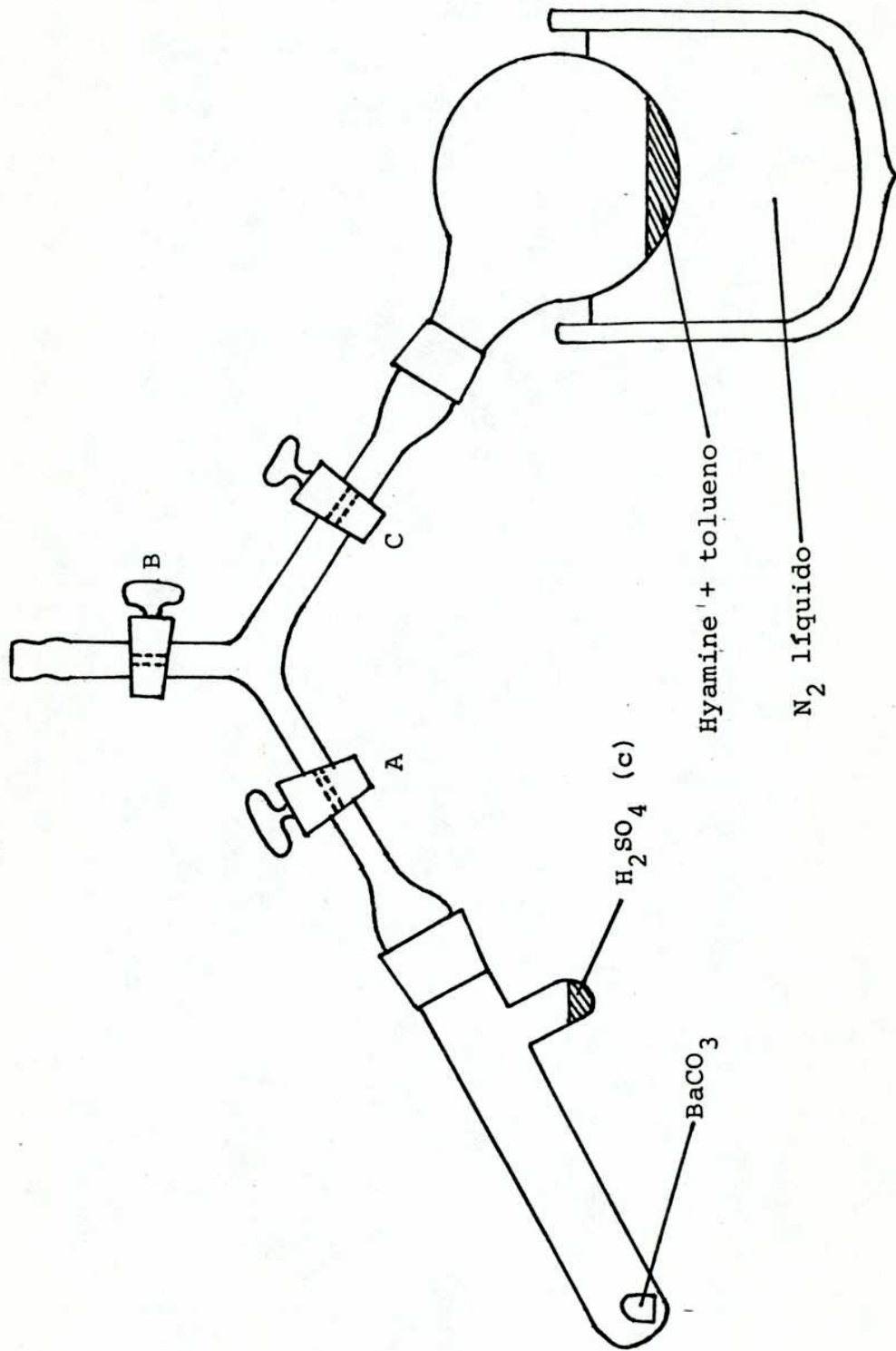


Figura 23: Esquema del sistema empleado en la determinación de la radiactividad del carbonato de bario.

Posteriormente, permitiendo que el ácido sulfúrico (c) entrara en contacto con el carbonato de bario, se liberó el dióxido de carbono. Abriendo las llaves A y C se condensó el dióxido de carbono en el balón con hidróxido de Hyamine y tolueno, que estaba externamente refrigerado con nitrógeno líquido, manteniéndolo a esa temperatura durante 1 hora, para que la transferencia fuera total. Finalmente, el balón aislado del resto del equipo (llave C cerrada) se dejó llegar a temperatura ambiente, y luego de 30 minutos se transfirió la solución resultante a un recipiente de vidrio especial para medir radiactividad por centelleo líquido, lavando con 2 porciones de 5 ml de solución centelleadora de tolueno.

- Método 2 (117):

Carbonato de bario (5-10 mg) se suspendió en 1 ml de agua y 14 ml de solución centelleadora de dioxano, en un recipiente especial de vidrio para medición de radiactividad. Para facilitar la dispersión del sólido, se sumergió el recipiente en un baño ultrasónico durante 15 minutos y para evitar la decantación del carbonato de bario se agregaron 200 mg de gelificante (Cab-O-Sil), y se midió la radiactividad por centelleo líquido. Por este segundo método se obtienen valores que corresponden al 80% de los determinados por el método 1.

Los resultados globales de la experiencia se presentan en la Tabla 5 y en la Figura 15, en páginas 46 y 45 , respectivamente.

EXPERIENCIA CON HORDENINA- $\beta$ - $^{14}$ C (103)

A) Inoculación del trazador y búsqueda de los productos de degradación:

A<sub>1</sub>) Inoculación del trazador:

Plántulas de cebada de 8 días de desarrollo (400) fueron inoculadas con 157 mg de hordenina- $\beta$ - $^{14}$ C. Para ello se disolvieron en 20 ml de solución salina nutriente los 157 mg, y se agregó 0,1 ml de esa solución a cada uno de los 200 recipientes de vidrio en que crecían las 400 plantas. Posteriormente, se lavó el matraz que contenía la solución salina radiactiva con otros 100 ml de solución nutriente, distribuyendo 0,5 ml más en cada recipiente. Dosis: 0,39 mg hordenina/planta; actividad específica: 0,19 mCi/mmol ó  $4,30 \times 10^8$  dpm/mmol; actividad total entregada: 0,18 mCi ó  $4,08 \times 10^8$  dpm.

A<sub>2</sub>) Análisis de la hordenina sin absorber:

Luego de 24 horas, se retiraron las plantas de los recipientes, recogiendo la solución salina remanente y lavando las plantas y los recipientes con agua destilada. Del volumen total recogido (1,2 l), se tomó 1 ml para medir la radiactividad no absorbida, y para ello esta alícuota se mezcló con 14 ml de solución centelleadora de dioxano y se realizó la determinación, encontrándose que esta solución tenía una actividad de

$8,75 \times 10^4$  dpm/ml, lo que corresponde a  $1,05 \times 10^8$  dpm (o sea, 25,7% sin absorber y 74,3% absorbido en 24 horas).

Esta solución se llevó a pH 1 mediante el agregado de ácido clorhídrico 1 N y se liofilizó. El residuo se tomó con solución de hidróxido de amonio (c) (25 ml) y se evaporó a sequedad a presión reducida y el residuo obtenido se sublimó a  $100-105^\circ\text{C}$  y  $5 \times 10^{-4}$  Torr, obteniéndose 35 mg de un sólido blanco, identificado como hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  por CCD (sistema 13) y por espectrometría de masa. Actividad específica: 0,19 mCi/mmol ó  $4,30 \times 10^8$  dpm/mmol. El residuo remanente luego de la sublimación no mostró actividad.

### A<sub>3</sub>) Extracción del material vegetal:

El material vegetal, sin secar, fue separado en raíces y parte aérea, y ambas fracciones (disgregadas en mortero con ayuda de arena lavada) fueron extraídas en Soxhlet con metanol, durante 48 horas. A las 24 horas de extracción se renovó el solvente, y se controló la finalización de la extracción por medición de la radiactividad extraída.

Al evaporar el solvente de cada uno de los extractos, se obtuvieron los siguientes residuos:

Raíces: 2,28 g

Actividad total:  $1,77 \times 10^8$  dpm

Actividad específica:  $7,76 \times 10^4$  dpm/mg

Parte aérea: 0,93 g

Actividad total:  $1,21 \times 10^7$  dpm

Actividad específica:  $1,30 \times 10^4$  dpm/mg

A<sub>4</sub>) Determinación de la radiactividad de los residuos insolubles:

A continuación se midió la radiactividad de los residuos insolubles, previo tratamiento de ese material con Protosol, como ya se ha descrito (ver pág. 138). Se encontró que el material vegetal aéreo (1,62 g) tenía una actividad específica de 748 dpm/mg (actividad total:  $1,21 \times 10^6$  dpm), por lo que no se continuó su análisis.

En cambio, el material vegetal de las raíces (2,60 g), tratado de la misma manera con Protosol, mostró que tenía una actividad específica de  $3,79 \times 10^4$  dpm/mg (actividad total:  $9,90 \times 10^7$  dpm), por lo que fue sometido a una extracción en Soxhlet con agua durante 42 horas. A las 18 horas de extracción se renovó el solvente, y se controló la finalización de la extracción por medición de la radiactividad de los extractos.

El extracto acuoso fue llevado a sequedad por liofilización (previa acidificación del mismo con gotas de ácido clorhídrico (c)), y se obtuvo un residuo de 0,68 g, cuya actividad específica era de  $3,12 \times 10^4$  dpm/mg (actividad total:  $2,12 \times 10^7$  dpm).

El material vegetal insoluble en agua (1,81 g) todavía mostraba algo de actividad, como se determinó tratando una pequeña porción del mismo (5 mg) con Protosol y midiendo su ra

diactividad, según un procedimiento ya descrito (ver pág. 138). Este residuo tenía una actividad específica de  $4,27 \times 10^4$  dpm/mg (actividad total:  $7,73 \times 10^7$  dpm).

B) Aislamiento de la lignina de raíz (110):

Una parte del residuo insoluble de la extracción anterior (0,4 g) se trató con 10 ml de hidróxido de sodio 0,5 N a 80°C, con agitación continua durante 12 horas. Al cabo de este tiempo, la mezcla se filtró y el residuo insoluble se lavó con agua. Este tratamiento se repitió 2 veces más sobre el residuo insoluble.

La solución básica proveniente de estos tratamientos se concentró hasta unos 15 ml y luego se acidificó con ácido sulfúrico 5 N. El precipitado de color pardo producido fue separado por centrifugación y posteriormente lavado 3 veces con agua. Este precipitado se disolvió en la mínima cantidad de hidróxido de sodio 1,25 N (aproximadamente 4 ml) y se agregaron 16 ml de etanol y ácido sulfúrico 5 N hasta neutralidad o ligera acidez. La suspensión producida se separó por centrifugación y a la solución límpida, de color pardo, resultante, se le eliminó la mayor parte del etanol por evaporación. En este punto precipitó la lignina, la que fue separada por centrifugación y posteriormente purificada por redisolución en hidróxido de sodio 1,25-N y precipitada por adición de ácido sulfúrico 5 N hasta ligera acidez. Esta suspensión se calentó a ebullición con lo que la lignina coaguló y fue más fácil de sepa-

rar por centrifugación.

Se obtuvieron 133 mg de lignina, cuya radiactividad (medida disolviéndola con Protosol, según una técnica ya descrita, ver pág. 138) resultó ser de  $1,28 \times 10^5$  dpm/mg.

C) Análisis del extracto metanólico de raíz:

Al extracto metanólico seco (2,28 g; ver pág. 145) se le eliminaron los lípidos y sustancias no polares tratándolo con 2 porciones de 50 ml de éter de petróleo (fracción 60-80°C), durante 24 horas a temperatura ambiente. Los extractos de éter de petróleo no mostraron actividad.

El extracto ya tratado con éter de petróleo se sembró en una columna de sílicagel (relación muestra/adsorbente: 1:100; 220 g de sílicagel) y se fue eluyendo con cloruro de metileno y cantidades crecientes de metanol. Se recogieron fracciones de aproximadamente 100 ml cada 4 horas, con ayuda de un colector automático.

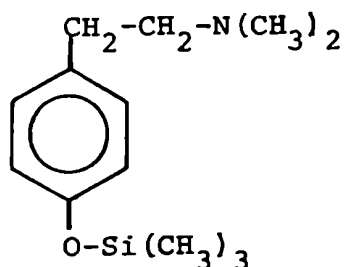
Cada fracción de la columna fue controlada por CCD, desarrollando con el solvente de elución que se estaba empleando en ese momento. También se determinó la radiactividad de cada una de las fracciones, analizando solamente aquellas que mostraban un nivel de radiactividad significativo.

En las fracciones 160-180, eluidas con una mezcla de cloruro de metileno y metanol 9:1, se encontraron 33,1 mg de hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ , que fue purificada por sublimación (110°C y 0,001 Torr), cuya actividad específica era de  $2,48 \times 10^8$  dpm/mmol.



Su identidad fue confirmada por EM y también por CGL-EM de su derivado trimetilsililado. Este último se preparó tomando 3 mg del residuo de las fracciones 160-180 y tratándolos con 100  $\mu$ l de una mezcla de hexametildisilano (HMDS) y trimetilclorosilano (TMC) en relación 99:1, durante 15 minutos a 100°C.

EM (m/z, %): 237 ( $M^+$ , 2), 222 (6), 179 (6), 73 (22), 58 (100); que corresponde a:



Entre las fracciones 186 y 220 se obtuvieron 37,5 mg de tiramina (que se oxida rápidamente al entrar en contacto con el aire), la que fue identificada por EM y por CCD (sistema 13), revelando con solución de ninhidrina (129). La tiramina fue eluída también con la mezcla de cloruro de metileno y metanol en relación 9:1. La actividad específica de este producto era de  $1,97 \times 10^8$  dpm/mmol.

No se obtuvieron fracciones de radiactividad significativa al aumentar la polaridad del solvente de elución, salvo cuando se empleó la mezcla de metanol y ácido clorhídrico (c) en relación 97:3. Entre las fracciones 610 y 615, eluídas con

esta mezcla, se obtuvieron 18 mg de ácido *p*-hidroxibenzoico, identificado por CCD (sistema 12) y por EM.

EM (m/z, %): 138 ( $M^+$ , 73), 121 (100), 93 (34), 45 (41).

La actividad medida de este producto era de  $1,69 \times 10^8$  dpm/mmol. No se encontraron otras fracciones con un nivel de radiactividad significativo. En particular, entre hordenina y tiramina, no pudo detectarse la presencia de N-metiltiramina (por CCD de las fracciones concentradas).

D) Análisis del extracto acuoso de raíz:

El residuo sólido obtenido por liofilización del extracto acuoso (0,68 g), se investigó por CCD (sistema 13), en busca de sustancias orgánicas radiactivas. Se encontró que el residuo mostraba 2 sustancias de comportamiento cromatográfico similar a hordenina y tiramina (no se encontró N-metiltiramina). Para determinar la localización de la radiactividad a lo largo de la capa delgada, se dividió ésta en porciones de aproximadamente 1,5 cm de longitud, desde el origen hasta el frente de solvente, teniendo especial cuidado en separar las manchas de hordenina y tiramina. Cada una de estas porciones de la placa se transfirió cuantitativamente a un recipiente especial para medir radiactividad por centelleo líquido. Al realizar las determinaciones se encontró que el 50% de la radiactividad estaba en la zona de hordenina y el otro 50% en la zona de tiramina. No se encontró radiactividad en ninguna otra zona.

El residuo se tomó entonces con 2 ml de hidróxido de

amonio (c) y se eliminó el solvente a presión reducida. Este residuo se sublimó a  $5 \times 10^{-4}$  Torr y 105-110°C, obteniéndose 7,0 mg de hordenina, cuya identidad fue confirmada por EM y por CCD (sistema 13). Su actividad específica era de  $2,50 \times 10^8$  dpm/mmol.

Al aumentar la temperatura hasta 140-150°C sublimó otro producto, sólido, blanco y cristalino, que se oxidaba rápidamente al aire, y que fue identificado como tiramina, también por CCD (sistema 13) y por EM. Su actividad específica era de  $2,02 \times 10^8$  dpm/mmol.

E) Análisis de la lignina de raíz:

E<sub>1</sub>) Hidrólisis alcalina (111):

Se tomaron 150 mg de lignina y se trataron a ebullición, con 15 ml de hidróxido de potasio metanólico 2 N durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se agregaron 15 ml de agua, se acidificó con ácido acético y se extrajo con 3 porciones de 25 ml de éter etílico. El extracto etéreo se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se llevó a sequedad. El residuo obtenido (3,2 mg) se identificó como ácido p-hidroxibenzoico por CCD (sistema 12) y por EM. Como la cantidad aislada de ácido fue muy pequeña, 800 mg del material vegetal insoluble en agua (pág. 146) se hidrolizaron como se indica más arriba, lográndose aislar 6,0 mg del ácido esperado, cuya actividad específica era de  $1,58 \times 10^8$  dpm/mmol (recristalizado una vez de

agua).

E<sub>2</sub>) Oxidación alcalina con nitrobenzeno (112):

Se to

maron 10 mg de lignina y se trataron con 1 ml de hidróxido de sodio 2 N y 0,06 ml de nitrobenzeno, en un recipiente especial de acero inoxidable, hermético, de 2 ml de capacidad. La mezcla se calentó a 160°C durante 2,5 horas. Luego de dejar enfriar, se tomaron 2 alícuotas de la mezcla de reacción (0,2 ml cada una) y se sembraron en sendos papeles cromatográficos. Las zonas de siembra se acidificaron ligeramente, pasando el papel rápidamente por vapores de ácido acético en ebullición. Los papeles se desarrollaron con el solvente mezcla ya descrito (ver pág. 88 ) durante 13 horas. Uno de los papeles fue revelado con solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina en etanol, detectándose la presencia de vainillina y *p*-hidroxibenzaldehído. Este papel se usó posteriormente para medir la distribución de la radiactividad a lo largo del mismo. Se encontró que la zona de vainillina era inactiva, mientras que la zona del *p*-hidroxibenzaldehído mostraba el 19,4% de la actividad total de la mezcla. El 80,6% restante estaba en la zona de siembra.

El segundo papel se cortó en las zonas correspondientes a vainillina y *p*-hidroxibenzaldehído; para ubicar estas zonas, se había sembrado un punto con la misma mezcla de reacción sobre un costado del papel, el cual fue recortado y revelado con solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina en etanol. Las respectivas tiras se sometieron a extracciones en Soxhlet con

etanol (25 ml) durante 2 horas.

A cada uno de los extractos se le agregaron 4 ml de hidróxido de potasio en etanol (0,2%) y se llevaron a volumen (50 ml).

Para determinar la cantidad de cada aldehído presente, se midió la absorbancia de estas soluciones, a 352 nm para vainillina y a 335 nm para *p*-hidroxibenzaldehído. La cantidad de cada aldehído presente se valoró por comparación de la absorbancia de estas soluciones con la absorbancia de soluciones de concentración conocida de estos aldehídos, preparadas de la misma manera. Los valores determinados fueron corregidos teniendo en cuenta la absorbancia de un blanco obtenido de igual forma, utilizando papel cromatográfico limpio.

De esta manera se estimó que, de los 10 mg de lignina tratados, se había producido 1,0 mg de cada aldehído (o sea, un 20% de aldehídos, en relación 1:1).

Cuando se repitió la determinación con 40 mg de material vegetal insoluble en agua (sin aislar la lignina, ver pág. 146) se obtuvieron los mismos resultados, teniendo en cuenta las distintas cantidades de lignina presente en cada caso.

## EXPERIENCIA CON HORDENINA (METILO-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>)

### A) Inoculación del trazador:

Esta inoculación se realizó en las mismas condiciones que la de la hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C (ver pág. 139). Se emplearon 50 plántulas de *Hordeum vulgare* que crecían en un recipiente de vidrio cerrado, con circulación forzada de aire, ya descrito (ver Capítulo II, pág. 43). Cuando las plántulas cumplieron 8 días de desarrollo fueron inoculadas con 18,2 mg de hordenina(metilo-<sup>14</sup>C<sub>2</sub>), disueltos en 25 ml de solución salina nutritiva (actividad específica:  $1,50 \times 10^9$  dpm/mmol ó 0,68 mCi/mmol; actividad total entregada:  $1,65 \times 10^8$  dpm; dosis: 0,36 mg/planta).

### B) Captación del dióxido de carbono expelido:

El dióxido de carbono expelido por las plantas (más el contenido en el aire) se fue recogiendo como carbonato de bario, a distintos tiempos, con una serie de trampas de solución saturada de hidróxido de bario. El carbonato de bario producido se separó por filtración. Este ensayo duró 6 días.

La actividad de cada fracción de carbonato de bario obtenida se determinó por el método 2 (117), descrito en la página 143, controlando la exactitud del método con muestras de carbonato de bario de radiactividad conocida. En estas fracciones se encontró el 94,6% de la actividad entregada.

La solución salina remanente luego de los 6 días,

más el agua empleada en el lavado de las plantas, se llevó a volumen (1 l), y se tomó una alícuota (1 ml) para determinar la radiactividad que había quedado sin absorber, por centelleo líquido, y que resultó ser de  $5,69 \times 10^6$  dpm, lo que corresponde al 3,4% de la actividad total entregada.

C) Extracción del material vegetal:

Por último, se dividieron las 50 plántulas en raíces y parte aérea, y luego de disgregarlas por separado en mortero con ayuda de arena lavada, se sometieron a extracciones en Soxhlet, con 200 ml de metanol cada una, durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se determinó la actividad de los extractos. Se encontró que el extracto metanólico de las raíces tenía  $2,80 \times 10^6$  dpm, lo que corresponde a un 1,7% de lo entregado. La radiactividad del extracto metanólico de la parte aérea era despreciable.

Los resultados generales de la experiencia se presentan en la Tabla 9 y en la Figura 21, de las páginas 83 y 82, respectivamente.

PREPARACION DE HOMOGENATOS DE TEJIDO DE RAIZ DE *Hordeum vulgare*.  
ESTUDIO DE SU CAPACIDAD PARA DEGRADAR HORDENINA

A) Preparación del homogenato:

Se tomaron las raíces de 200 plantas de *Hordeum vulgare* de 15 días de desarrollo y se sumergieron en 200 ml de solución reguladora de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,2), en un baño de hielo. Esta suspensión fue disgregada cuidadosamente en una licuadora a 4-5°C, en intervalos de 30 segundos, se parados por 5 minutos, durante 1 hora.

A continuación, se rompieron las células por ultrasonido, en pulsos de 100 W de 1 segundo de duración, separados por 30 segundos, durante 15 minutos a 4-5°C.

La suspensión se centrifugó a 5000 x g durante 15 minutos, se separó el sobrenadante y se volvió a centrifugar, ahora a 15000 x g, durante 2 horas, en ambos casos a 4°C. Este sobrenadante se separó en 2 partes, una de 35 ml y otra de 200 ml. Esta última fracción se concentró por ultrafiltración por una membrana Amicon de PM 10000 (Diaflo YM-10), hasta 20 ml, a 5°C.

B) Ensayos de actividad del homogenato:

Del homogenato concentrado se tomaron 3 porciones de 2 ml, a las que se agregaron 0,99 mg de hordenina- $\alpha$ -<sup>14</sup>C



( $1,18 \times 10^9$  dpm/mmol ó 0,53 mCi/mmol), y se incubaron a 30°C, con agitación continua, durante 14 horas.

Simultáneamente, se incubaron 2 porciones del homogenato sin concentrar (17 ml), a los cuales se agregó la misma cantidad de hordenina- $\alpha$ - $^{14}$ C.

También se incubó una parte del residuo separado por centrifugación, el cual fue resuspendido en 17 ml de la solución reguladora de pH 7,2, con la misma cantidad (0,99 mg) de hordenina- $\alpha$ - $^{14}$ C (previamente, se había lavado este residuo con 2 porciones de 20 ml de la solución reguladora, suspendiéndolo y separándolo por centrifugación).

Finalmente, también se incubaron 2 fracciones del homogenato regenerado (20 ml cada una) con la misma cantidad de hordenina- $\alpha$ - $^{14}$ C. Este homogenato se preparó mezclando 4 ml del homogenato concentrado con 36 ml de la solución filtrada obtenida en el proceso de ultrafiltración.

Paralelamente, se hizo un ensayo en blanco, con 17 ml de solución reguladora y 0,99 mg de hordenina- $\alpha$ - $^{14}$ C.

Luego de 14 horas de incubación, se detuvieron las reacciones mediante el agregado de 0,5 ml de ácido clorhídrico (c) a cada ensayo. Para determinar el grado de degradación de la hordenina- $\alpha$ - $^{14}$ C entregada, se determinó la radiactividad remanente en cada solución, tomando una alícuota de cada una y midiendo su radiactividad por centelleo líquido.

Los homogenatos concentrados y los originales fueron liofilizados y los residuos de cada uno de ellos se tomaron con 0,5 ml de metanol y se analizaron por CCD (sistema 13),

para observar su comportamiento cromatográfico y comparar los resultados. Se encontró que el homogenato sin concentrar mostraba una serie de productos radiactivos, entre los que se encontraba la hordenina sin metabolizar. Esto se determinó midiendo la radiactividad a lo largo de toda la capa delgada, como ya se explicó anteriormente (ver pág. 150).

En cambio, el homogenato concentrado mostraba un producto mayoritario, que retenía el 70% de la radiactividad remanente en el homogenato, y que no se trataba de hordenina ni de tiramina.

Se tomó entonces el resto de la solución metanólica de ese homogenato y se la concentró en un crisol de oro de aproximadamente 2 mm de diámetro y 5 mm de altura, especial para usar en el sistema de introducción directa de muestras en el espectrómetro de masa. Al observar el espectro de masa de este residuo, se detectó en el osciloscopio la presencia del ion de  $m/z = 151$  (correspondiente al ion molecular de N-metil-tiramina), y no se detectaron los iones de  $m/z = 137$  y  $m/z = 165$ , que corresponden a los iones moleculares de tiramina y hordenina, respectivamente.

Los resultados globales de esta experiencia se encuentran resumidos en la Tabla 8, de página 73.

EXPERIENCIA CON HORDENINA (METILO- $^{13}\text{C}_2$ )Ensayo de observación directa por RMN- $^{13}\text{C}$ :

El homogenato concentrado que se iba a emplear en la inoculación con hordenina (metilo- $^{13}\text{C}_2$ ) se preparó de la misma manera que el anterior, partiendo de 200 raíces de *Hordeum vulgare* de 15 días de desarrollo. La única diferencia introducida fue el grado de concentración, ya que en este último caso el volumen final de la ultrafiltración fue de 10 ml.

Se tomaron 4 ml de este homogenato y se colocaron en un tubo de RMN de 12 mm de diámetro. Este homogenato fue inoculado con 200  $\mu\text{l}$  de una solución de hordenina (metilo- $^{13}\text{C}_2$ ) (19,3 mg) en agua deuterada (1 ml), que corresponden a 3,9 mg de hordenina. La síntesis de este trazador ha sido discutida anteriormente (ver Capítulo II, pág. 26 y Capítulo III, pág. 130).

El proceso de degradación se siguió por RMN- $^{13}\text{C}$ , acumulando espectros en intervalos de 2,3 horas durante 48 horas, a aproximadamente 28°C. Cada espectro fue el resultado de 10000 pulsos de 90°, con una amplitud espectral de 5120 Hz y una velocidad de repetición de 0,8 segundos. Como se indicó previamente (Capítulo II, pág. 75), el estudio permitió detectar la degradación de hordenina a N-metiltiramina. Luego de las 48 horas, y en vista de que aún se observaba la señal correspondiente al grupo metilo de N-metiltiramina (metilo- $^{13}\text{C}$ ), se intentó su aislamiento, que fue infructuoso.

## RESUMEN

En las semillas de *Hordeum vulgare* (cebada) no existen alcaloides, pero éstos aparecen durante los primeros días de germinación, para finalmente desaparecer aproximadamente a los treinta días de desarrollo de la planta.

El presente trabajo tuvo por objeto el estudio del catabolismo de uno de estos alcaloides, la hordenina, en plantas de *Hordeum vulgare*.

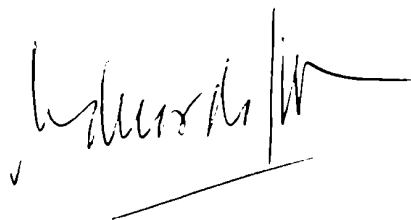
En el mismo se describen:

- a. Los antecedentes que dieron origen al presente estudio; entre ellos los alcaloides presentes en la cebada, su concentración y los estudios sobre biosíntesis de  $\beta$ -feniletilaminas.
- b. Las síntesis de los distintos trazadores, radiactivos o no, empleados en la elucidación del camino metabólico. Ellos fueron:
  - 1) hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$
  - 2) hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$
  - 3) hordenina(metilo- $^{14}\text{C}_2$ )
  - 4) hordenina(metilo- $^{13}\text{C}_2$ )
- c. La búsqueda de un buen sistema para el desarrollo de las plantas y de un buen método de inoculación del alcaloide.
- d. Las inoculaciones de los tres primeros trazadores (radiactivos) en plantas enteras de *Hordeum vulgare*, del mismo grado de desarrollo, y en condiciones controladas y reproducibles. Con la inoculación de hordenina- $\alpha$ - $^{14}\text{C}$  se demostró

que el C- $\alpha$  de hordenina se eliminó como dióxido de carbono. Al entregar hordenina- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ , se marcó el camino de la otra porción de la molécula de hordenina, encontrándose que la unidad C $_6$ -C $_1$  formada al desmetilarse y posteriormente perder el C- $\alpha$ , ejemplificada por el aislamiento de ácido p-hidroxibenzoico libre, se incorpora en la lignina de raíz. Finalmente, la inoculación de hordenina(metilo- $^{14}\text{C}_2$ ) mostró que los metilos son eliminados también como dióxido de carbono.

- e. La preparación de homogenatos de tejido de raíz y el estudio de su capacidad para degradar hordenina.
- f. La inoculación de hordenina(metilo- $^{13}\text{C}_2$ ) en homogenatos de tejido de raíz y la observación directa de los primeros pasos del proceso degradativo por RMN- $^{13}\text{C}$ . Esta experiencia permitió confirmar que la desmetilación de hordenina ocurría en dos etapas, siendo el intermediario la N-metiltiramina.

Con los resultados de las distintas experiencias, se propuso y discutió un posible camino degradativo para el alcaloide hordenina en plantas de cebada.



BIBLIOGRAFIA:

1. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería, dirigida por L.R. Parodi - ACME (1959).
2. Evolution of crop plants, editado por N.W. Simmonds - Longman (1976, reimpreso 1979).
3. A.L. Montes - Bromatología - EUDEBA (1966).
4. Y. Raoul - Ann. Fermentations 3: 129 (1937) y referencias allí citadas.
5. E. Léger - Bull. Soc. Chim. France 35: 235, 706, 868 (1906).
6. E. Léger - Compt. Rend. 143: 234, 912 (1906).
7. E. Léger - Compt. Rend. 144: 208, 488 (1907).
8. E. Léger - J. Pharm. Chim. 25: 5, 273 (1907).
9. E. Léger - Bull. Soc. Chim. France 1: 148 (1907).
10. G.O. Gaebel - Arch. Pharm. 244: 441 (1906).
11. E. Spaeth - Monats. 40: 129 (1919).
12. The alkaloids, Vol. III, editado por R.H.F. Manske y H.L. Holmes - Academic Press (1953) y referencias allí citadas.
13. T.A. Smith - Phytochemistry 16: 9 (1977).
14. H. Kawauchi y T. Sasaki - Nippon Suisan Gakkaishi 14: 135 (1978); Chem. Abstr. 88: 148956d (1978).
15. K.C. Güven, A. Bora y G. Sunam - Phytochemistry 9: 1893 (1970).
16. C.J. Barwell y G. Blunden - Lloydia 44: 500 (1981).
17. T.M. Lee, L.G. West, J.L. McLaughlin, L.R. Brady, J.L. Lowe y A.H. Smith - Lloydia 38: 450 (1975).

18. L.G. West, I.T. Johnson y J.L. McLaughlin - Lloydia 37: 633 (1974).
19. F. Sandberg y K.H. Michel - Lloydia 26: 78 (1963).
20. E. Israilov, X.A. Abduazimov y S.U. Yusunov - Dok. Akad. Nauk. Uz. SSR 22: 18 (1965); Chem. Abstr. 63: 7346e (1965).
21. A.D. Volodina, E.K. Dobronravova y T.T. Shakirov - Khim. Prir. Soed. 6: 450 (1970); Chem. Abstr. 74: 897a (1971).
22. T.A. Wheaton e I. Stewart - Lloydia 33: 244 (1970).
23. J.G. Bruhn y C. Bruhn - Econ. Botany 27: 241 (1973).
24. D.G. Norquist y J.L. McLaughlin - J. Pharm. Sci. 59: 1840 (1970).
25. J.M. Neal, P.T. Sato, C.L. Johnson y J.L. McLaughlin - J. Pharm. Sci. 60: 477 (1971).
26. J.M. Neal y J.L. McLaughlin - Lloydia 33: 395 (1970).
27. J.G. Bruhn - Phytochemistry 14: 2509 (1975).
28. W.W. Speir, V. Mihanian y J.L. McLaughlin - Lloydia 33: 15 (1970).
29. S.O. Ruiz, G. Neme, M. Nieto y A.T. D'Arcángelo - An. Asoc. Quím. Argent. 61: 41 (1973).
30. S. Agurell - Lloydia 32: 206 (1969).
31. J.X. de Vries, P. Moyna, V. Díaz, S. Agurell y J.G. Bruhn - Rev. Latinoamericana Quím. 2: 21 (1971).
32. J.G. Bruhn, S. Agurell y J.E. Lindgren - Acta Pharm. Suec. 12: 199 (1975).
33. K.M.K. Hornemann, J.M. Neal y J.L. McLaughlin - J. Pharm. Sci. 61: 41 (1972).

34. W.J. Keller, J.L. McLaughlin y L.R. Brady - J. Pharm. Sci. 62: 408, 411 (1973).
35. J.J. Dingerdissen y J.L. McLaughlin - Lloydia 36: 419 (1973).
36. I.J. McFarlane y M. Slaytor - Phytochemistry 11: 235 (1972).
37. S. Agurell, J.G. Bruhn, J. Lundström y U. Svensson - Lloydia 34: 183 (1971).
38. L.G. West, R.L. Vanderveen y J.L. McLaughlin - Phytochemistry 13: 665 (1974).
39. J.L. McLaughlin y A.G. Paul - Lloydia 29: 315 (1966).
40. L.G. West y J.L. McLaughlin - Lloydia 36: 346 (1973).
41. R.L. Vanderveen, L.G. West y J.L. McLaughlin - Phytochemistry 13: 866 (1974).
42. L. Reti - Compt. Rend. Soc. Biol. 114: 811 (1933).
43. F.S. El-Feraly y C.E. Turner - Phytochemistry 14: 2304 (1975).
44. G.O. Iketubosin y D.W. Mathieson - J. Pharm. Pharmacol. 15: 810 (1963).
45. Y. Raoul - C. R. Acad. Sci. Paris 204: 74 (1937).
46. Y. Hashitani - J. Tokyo Chem. Soc. 41: 545 (1920); Chem. Abstr. 14: 3096 (1920).
47. L.R. Brady y V.E. Tyler - Plant Physiol. 33: 334 (1958).
48. R.C.S. Audette, J. Bolan, H.M. Vijayanagar, R. Bilous y K. Clark - J. Chromatog. 43: 295 (1969).
49. J.S. Fitzgerald - Australian J. Chem. 17: 160 (1964).
50. S. Ghosal, R.S. Srivastava, S.K. Bhattacharya y P.K. Debnath - Planta Med. 23: 321 (1972).



51. S. Ghosal y R. Mehta - Phytochemistry 13: 1628 (1974).
52. S.T. Akramov y C.U. Yusunov - Dok. Akad. Nauk. Uz. SSR 2: 34 (1961); Chem. Abstr. 61: 960d (1964).
53. W.J. Keller - Lloydia 44: 366 (1981).
54. M.D. González, A.B. Pomilio y E.G. Gros - An. Asoc. Quím. Argent. 69: 297 (1981).
55. L. Camus - Compt. Rend. 142: 110, 237, 350 (1906).
56. M. Raymond-Hamet - Compt. Rend. Soc. Biol. 113: 386, 875, (1933).
57. M. Raymond-Hamet - Compt. Rend. 209: 67 (1939).
58. J.A. McCleary, P.S. Sypherd y D.L. Walkington - Econ. Botany 14: 247 (1960).
59. G. Subba Rao - J. Pharm. Pharmac. 22: 544 (1970).
60. W.A. Kendall, R.R. Hill (Jr.) y J.S. Shenk - Agron. J. 71: 613 (1979); Chem. Abstr. 91: 120398m (1979).
61. M.F.B. Goelz, H. Rothenbachler, J.P. Wiggins, W.A. Kendall y T.V. Hershberger - Toxicology 18: 125 (1980); Chem. Abstr. 94: 115651w (1981).
62. K.L.S. Harley y A.J. Thorsteinson - Can. J. Zoo. 45: 305 (1967).
63. K. Sogawa - Appl. Entomol. Zool. 6: 215 (1971); Chem. Abstr. 77: 15523m (1972).
64. S. Kurata y K. Sogawa - Appl. Entomol. Zool. 11: 89 (1976); Chem. Abstr. 86: 84686q (1977).
65. N.B. Mandava, G.J. Kapadia y J.F. Worley - Lloydia 44: 94 (1981).

66. M.Y. Zhang, Z.S. Lan, J. Chou, T.R. Yang y X.Y. Pu - Yu-nan Chim. Wu Yen Chiu 2: 62 (1980); Chem. Abstr. 93: 164310x (1980).
67. G. Rabitzsch - Planta Med. 6: 103 (1958).
68. G. Rabitzsch - Planta Med. 7: 268 (1959).
69. R.F. Raffauf - A handbook of alkaloids and alkaloid-containing plants - Wiley-Interscience (1970).
70. S.H. Mudd - Nature 189: 489 (1961).
71. Y. Raoul - Ann. Fermentations 3: 193, 385 (1937).
72. V. Erspamer y G. Falconieri - Naturwiss. 39: 431 (1952).
73. E. Meyer y W. Barz - Planta Med., Supl. 140 (1975).
74. S. Kirkwood y L. Marion - J. Am. Chem. Soc. 72: 2522 (1950).
75. E. Leete, S. Kirkwood y L. Marion - Can. J. Chem. 30: 749 (1952).
76. J. Massicot y L. Marion - Can. J. Chem. 35: 1 (1957).
77. E. Leete y L. Marion - Can. J. Chem. 31: 126 (1953).
78. J.D. Mann y S.H. Mudd - J. Biol. Chem. 238: 381 (1963).
79. J.D. Mann, C.E. Steinhart y S.H. Mudd - J. Biol. Chem. 238: 676 (1963).
80. C.E. Steinhart, J.D. Mann y S.H. Mudd - Plant Physiol. 39: 1030 (1964).
81. A.W. Frank y L. Marion - Can. J. Chem. 34: 1641 (1956).
82. E. Meyer y W. Barz - Planta Med. 33: 336 (1978).
83. G.A. Digenis, J.W. Burkett y V. Mihranian - J. Label. Compounds 8: 231 (1972).
84. E. Léger - Bull. Soc. Chim. 7: 172 (1910).
85. K.W. Rosemund - Ber. 43: 306 (1910).

86. H. Voswinchel - Ber. 45: 1004 (1912).
87. F. Ehrlich y P. Pistschimuka - Ber. 45: 2428 (1912).
88. E. Spaeth y Ph. Sobel - Monats. 41: 77 (1920).
89. B. Loev y C.R. Dawson - J. Am. Chem. Soc. 78: 6095 (1956).
90. E. Haslam, R.D. Haworth, S.D. Mills, H.J. Rogers, R. Armitage y T. Searle - J. Chem. Soc. 1836 (1961).
91. R.S. Shelton, N.G. van Camphen Jr., D.F. Meiner, S.M. Pomerter, E.R. Andrews, R.E. Allen y K.K. Wyckoff - J. Am. Chem. Soc. 75: 5491 (1953).
92. Organic Synthesis, Vol. Col. IV, editado por N. Rabjohn - John Wiley & Sons (1963).
93. L. Freidman y H. Shechter - J. Org. Chem. 25: 877 (1960).
94. F. Benington y R.D. Morin - J. Org. Chem. 32: 1050 (1967).
95. W. Hauting - J. Am. Chem. Soc. 50: 3370 (1928).
96. Organic Synthesis, Vol. Col. III, editado por E.C. Horning - John Wiley & Sons (1955).
97. K.W. Rosenmund y E. Pfankuch - Ber. 56: 2258 (1923).
98. R.L. Burwell Jr. - Chem. Rev. 54: 615 (1954).
99. J. March - Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure - McGraw-Hill Book Company (1968).
100. R.E. Bowman y H.H. Stroud - J. Chem. Soc. 1342 (1950).
101. C.A. Russo y E.G. Gros - J. Label. Comp. & Radiopharm. 18: 1185 (1981).
102. D.L. Manson y O.C. Musgrave - J. Chem. Soc. 1011 (1963).
103. C.A. Russo y E.G. Gros - Phytochemistry 21: 609 (1982).
104. J.F. Walker - Formaldehyde - Reinhold Publishing Corp. (1944).

105. P.R. White - The cultivation of animal and plant cells,  
2a. edición - Ronald Press (1963).
106. J.E. Dale, G.M. Felipe y G.M. Fletcher - Ann. Bot. 36:  
385 (1972).
107. C.A. Russo y E.G. Gros - Phytochemistry 20: 1763 (1981).
108. The chemistry of wood, editado por B.L. Browning -  
Interscience Publishers (1963).
109. D.E. Metzler - Biochemistry. The chemical reactions of  
living cells - Academic Press (1977).
110. A. Bondi y H. Meyer - Biochem. J. 43: 248 (1948).
111. D.C.C. Smith - J. Chem. Soc. 2347 (1955).
112. J.E. Stone y M.J. Blundell - Anal. Chem. 23: 771 (1951).
113. S.A. Brown y A.C. Neish - Can. J. Bioch. and Physiol.  
33: 948 (1955).
114. Información correspondiente a la nueva cebada cervecera  
MAGNIF 102 - INTA. Dirección General de Producción y Fo-  
mento Agrícola. Ministerio de Agricultura y Ganadería de  
la Nación (1968).
115. J.E. Dale y G.M. Felipe - Ann. Bot. 36: 397, 411  
(1972).
116. C. Marriott y J.E. Dale - Z. Pflanzenphysiol. 81: 377  
(1977).
117. A.A. Ghini, G. Burton y E.G. Gros - Phytochemistry 21:  
605 (1982).
118. Handbook of chemistry, recopilado por N.A. Lange, 5a.  
edición - Handbook Publishers Inc. (1944).

119. Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie - Vierte Auflage - Julius Springer (1932).
120. N. Kornblum y A.P. Lurie - J. Am. Chem. Soc. 81: 2705 (1959).
121. N. Kornblum, P.J. Berrigan y W.J. Le Noble - J. Am. Chem. Soc. 85: 1141 (1963).
122. M. Tomita, K. Nakaguchi y S. Tagaki - J. Pharm. Soc. Japan 71: 1035 (1951); Chem. Abstr. 46: 5062a (1952).
123. G. Means y R.E. Feeney - Biochemistry 7: 2192 (1968).
124. J.M. Passman, N.S. Radin y J.A.D. Cooper - Anal. Chem. 28: 484 (1956).
125. P.R. Srinivasan y R.L. Lichter - Org. Magn. Reson. 8: 198 (1976); Chem. Abstr. 85: 108831r (1976).
126. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as a solvent for cyanide reactions - Crown Zellerbach Corporation, Product Information Bulletin (1968).
127. G. Burton, R.L. Baxter, M. Gunn, P.J. Sidebottom, P.E. Fagerness, K. Shishido, J.Y. Lee y A.I. Scott - Can. J. Chem. 58: 1839 (1980).
128. T.C. Farrar y E.D. Becker - Pulse and Fourier Transform NMR - Academic Press (1971).
129. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel - E. Merck, Darmstadt Alemania (1972).
130. J. Armstrong y R.B. Barlow - Br. J. Pharmac. 57: 501 (1976).
131. F.A. Bovey - Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - Academic Press (1969).

132. Progress in Mass Spectrometry, Vol. 3, editado por M. Hesse y H.O. Bernhard - Verlag Chemie (1975).
133. G.C. Levy y G.L. Nelson - Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 para Químicos Orgánicos - Ediciones Bellaterra (1976).
134. Sadtler Standard Spectra - Sadtler Research Laboratories (1976).
135. W. Steck y F. Constabel - Lloydia 37: 185 (1974).
136. Biosynthesis, Vol. 3 - The Chemical Society (1975).
137. Plant tissue culture and its biotechnological applications, editado por W. Barz, E. Reinhard y M.H. Zenk - Springer Verlag (1977).
138. Methods in Enzymology, Vol. XVII (B), editado por H. Tabor y C.W. Tabor - Academic Press (1971).
139. M. Krajl - Biochem. Pharmacol. 14: 1683 (1965).
140. P. Partington, J. Feeney y A.S.V. Burgen - Mol. Pharmacol. 8: 269 (1972).