

Tesis de Posgrado

Estudios acerca de la biosíntesis de bufadienólidos en la planta *Scilla marítima*

Galagovsky Kurman, Lydia Raquel

1983

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

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

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

Cita tipo APA:

Galagovsky Kurman, Lydia Raquel. (1983). Estudios acerca de la biosíntesis de bufadienólidos en la planta *Scilla marítima*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1803_GalagovskyKurman.pdf

Cita tipo Chicago:

Galagovsky Kurman, Lydia Raquel. "Estudios acerca de la biosíntesis de bufadienólidos en la planta *Scilla marítima*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1803_GalagovskyKurman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**ESTUDIOS ACERCA DE LA BIOSINTESIS
DE BUFADIENOLIDOS EN LA PLANTA**

Scilla marítima

LYDIA RAQUEL GALAGOVSKY

1983

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS ACERCA DE LA BIOSINTESIS
DE BUFADIENOLIDOS EN LA PLANTA
SCILLA MARITIMA

LYDIA RAQUEL GALAGOVSKY

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1 9 8 3 -

1803
Ej. 2

A mis hijos:

Gabriel y Daiana

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Eduardo G. Gros, quien sugiriera el tema de Tesis, por su apoyo y guía permanentes y por las enseñanzas de él recibidas que me permitieron la concreción del presente trabajo.

Agradezco también al Dr. Gerardo Burton por su eficaz colaboración y las fructíferas discusiones mantenidas.

Deseo agradecer además:

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

Sr. J.A. Aznárez por los espectros de masa.

Lic. María Rivero de Aznárez y María M. de Moglia por las cromatografías gas-líquido.

Dr. Gerardo Burton y Sr. C.G. Arabehty por los espectros de RMN- ^{13}C y RMN- ^1H en 100 MHz.

Dra. Alicia Seldes y Srta. Alicia Arenaza por los espectros de RMN- ^1H en 60 MHz.

Dra. Blanca Deferrari y Lic. Marta Marcote por las pesadas de alta precisión.

Al Ing. Agr. Juan J. Valla por cedernos los primeros ejemplares de *Scilla marítima* utilizados.

Al Dr. Juan Hunziker por permitirnos el uso de un sector del vivero.

A Laboratorios Sandoz Argentina y Knoll Argentina, por las muestras de scillirósido y proscillaridina respectivamente.

A la Dra. Ana M. Porto por la dirección de esta Tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Lic. Adriana Veleiro, Lic. Alberto Ghini y Lic. Mario González por su apoyo, amistad, entusiasmo y alegría constantes.

A todos mis colegas y personal docente y no docente del Departamento de Química Orgánica por su permanente cordialidad.

INDICE

pág.

Capítulo I : Introducción.

Generalidades.....	1
Antecedentes históricos de la acción Farmacológica.....	6
Características concernientes a la <i>Scilla marítima</i>	9
Determinación de estructuras y reactividad de Scillaren A.....	13
Scillirósido.....	18
Biosíntesis de geninas esteroidales:	
Cardenólidos.....	23
Bufadienólidos animales.....	30
Bufadienólidos vegetales.....	34

Capítulo II : Descripción de la labor realizada.

Objetivos	38
Síntesis de trazadores.....	40
Inoculación de precursores.....	43
Aislamiento de scillirósido.....	46
Reacciones de degradación del scillirósido:	
a) Con permanganato de potasio.....	50
b) Para la obtención de los C-22, 23 y 24.....	52
c) Para la obtención del C-24.....	55
d) Para la obtención de D-glucosa y el C-24.....	62

e) Para la obtención de los C-componentes del grupo acetato de C-6.....	72
f) Para obtener los C-10, 13, 18 y 19.....	74
g) Para obtener los C-23 y 24.....	76
h) Para obtener los C-21, 22, 23 y 24.....	77
Reacciones de degradación de proscillaridina.....	81

Capítulo III : Presentación y discusión de los resultados.

Incorporaciones absolutas.....	88
Incorporaciones relativas en subestructuras del scillirósido.....	93

Capítulo IV : Parte Experimental.

Generalidades.....	109
Síntesis de trazadores.....	112
Inoculación de precursores.....	118
Aislamiento de scillirósido.....	120
Reacciones de degradación sobre scillirósido:	
a) Con permanganato de potasio.....	124
b) Para la obtención de los C-22, 23 y 24.....	126
c) Para la obtención del C-24.....	128
d) Para la obtención de D-glucosa y el C-24.....	133
e) Para la obtención de los Carbonos del grupo acetato de C-6.....	140
f) Para la obtención de los C-10, 13, 18 y 19.....	144
g) Para la obtención de los C-23 y 24.....	147

h) Para la obtención de los C-21, 22, 23 y 24.....	149
Reacciones de degradación sobre proscillaridina.....	156
Resumen.....	163
Bibliografía.....	166
Indice de Figuras.....	173
Indice de Esquemas y Tablas.....	174

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N

Generalidades

Los esteroides que tienen la propiedad de ejercer una acción específica y poderosa sobre el músculo cardíaco, por inoculación en humanos y animales, se agrupan bajo la designación general de principios cardiotónicos o cardioactivos.

Esta acción radica en un incremento de la contractibilidad del músculo cardíaco y una disminución en la frecuencia lográndose, entonces, una mayor eficiencia cardíaca.

Los esteroides cardiotónicos se encuentran distribuidos tanto en el reino animal como vegetal y se presentan en forma glicosídica o bien como agliconas, llamadas también geninas.

Se localizan glicósidos cardíacos, en pequeñas cantidades, en semillas, hojas, troncos, raíces y cortezas de plantas con amplia distribución geográfica.

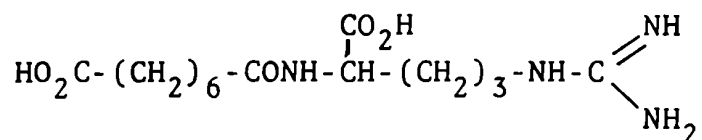
Muchas especies crecen en regiones tropicales y han sido utilizadas por nativos de Africa y Sudamérica en la preparación de veneno para las puntas de sus flechas y lanzas, empleadas en acciones de caza o lucha.

Las geninas se encuentran en los venenos de sapos. Estos principios cardioactivos animales no están glicosidados, pero su estructura esteroideal está relacionada con las agliconas de los principios vegetales.

Ya los antiguos chinos usaban un preparado de las secreciones cutáneas de estos batracios, que aplicaban con fines medicinales tales como estimulantes cardíacos, diuréticos y expectorantes¹.

Se supone que la actividad cardíaca de los glicósidos reside en la aglicona y que los hidratos de carbono le confieren una solubilidad favorable, siendo por esta razón los glicósidos más efectivos que las agliconas correspondientes.

Esto no ocurre con los venenos de sapos, donde las geninas esteroidales libres son más potentes que cuando se los encuentra como ésteres de la suberilarginina:



Estructuralmente, los principios cardiotónicos esteroidales son de dos tipos llamados cardenólidos y bufadienólidos (Figura 1). Los Cardenólidos son esteroides de veintitres átomos de carbono, con un anillo lactónico de cinco miembros α , β no saturado (grupo butenólido), y poseen un hidroxilo en el carbono 14 con configuración β .

Los bufadienólidos poseen veinticuatro átomos de carbono, un anillo lactónico de seis miembros doblemente no saturado (α -pirona), y un hidroxilo en posición 14 o un epóxido en 14-15, teniendo en todos los casos configuración β .

La estereoquímica de estos compuestos corresponde al de un estero \bar{l} o un ácido biliar en los carbonos 8, 9, 10, 13 y 17 pero la configuración en el carbono 14 es β , o sea que los anillos C y D se encuentran fusionados en *cis*. La configuración en el carbono 5 es β en los bufadienólidos (anillos A y B *cis*),

mientras que en los cardenólidos puede ser α o β (Figura 2) o poseer un doble enlace en la posición 5 (6). Los bufadienólidos vegetales suelen presentar un doble enlace en la posición 4 (5).

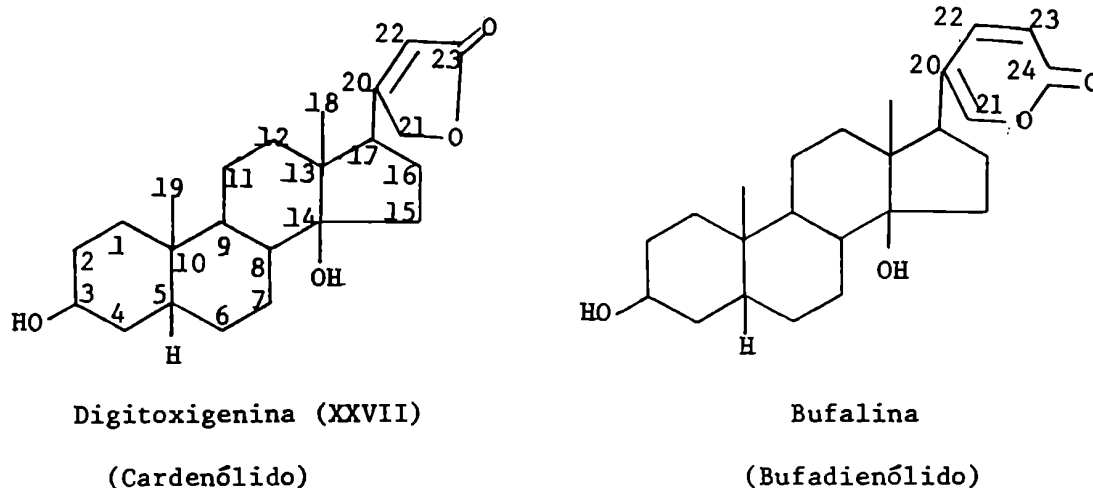


Figura 1: Ejemplo de los distintos tipos de principios cardiotóxicos.

Las variaciones estructurales en ambas series consisten en diferentes configuraciones en los carbonos 3 y 5 y en la presencia de funciones oxigenadas en distintas posiciones del sistema polinuclear.

Todos los cardenólidos existen como glicósidos vegetales, pero los bufadienólidos son productos que se encuentran tanto en vegetales como en animales.

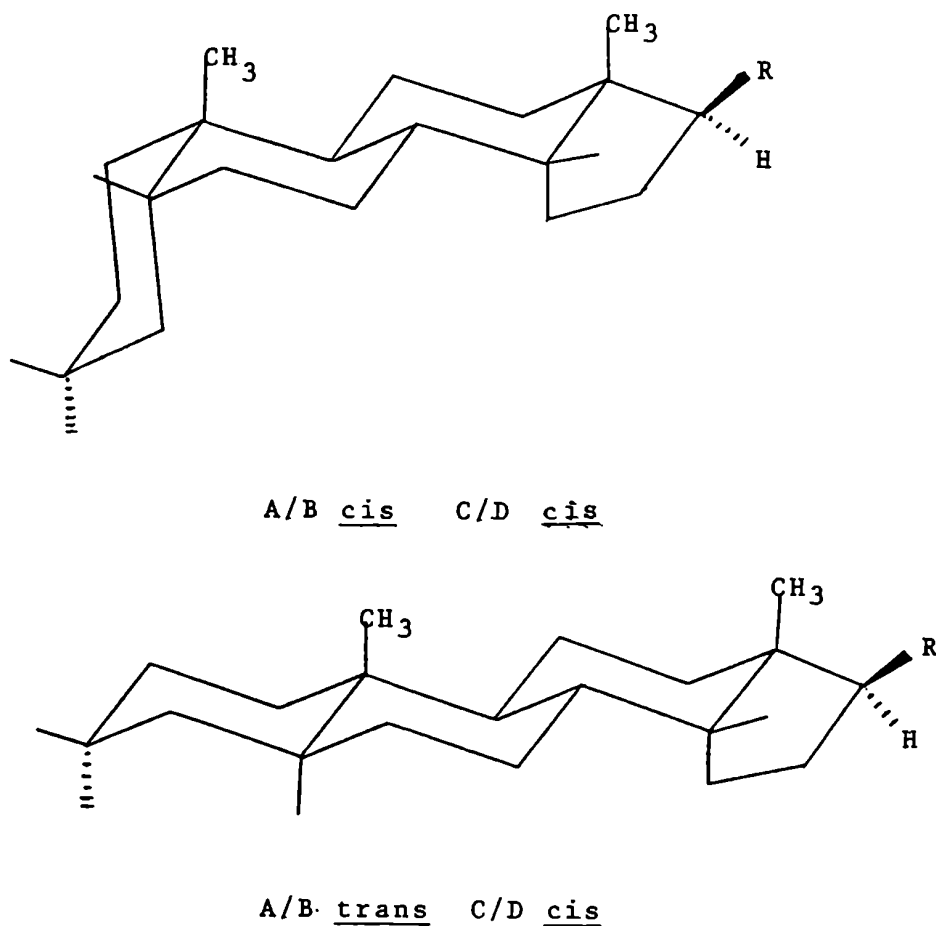


Figura 2: Estereoquímica de los cardenólidos y bufadienólidos

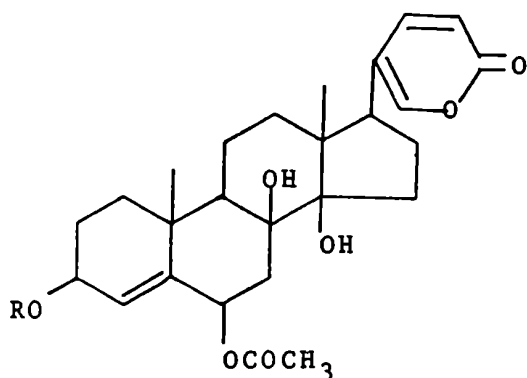
Numerosos investigadores se han dedicado al estudio de la biogénesis tanto de cardenólidos como de bufadienólidos, y de estos últimos, tanto los provenientes del reino animal como del vegetal.

Durante este trabajo se intentó dilucidar el proceso biosintético del anillo lactónico de bufadienólidos vegetales.

Para este propósito se utilizaron bulbos de *Scilla marítima*, inoculando precursores marcados con carbono 14 y degradando pos

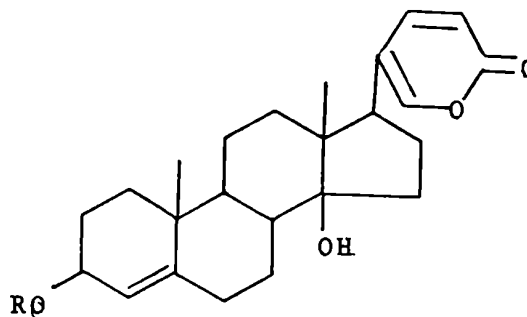
teriormente al bufadienólido aislado con el objeto de localizar la marca incorporada.

Los bufadienólidos mayoritarios presentes en esta planta



I : R= D-Glucosa
Scillirósido

Ia : R= H
Scillirosidina



II : R= L-Ramnososa
Proscillaridina

IIa: R= 4-O-D-Glucopiranosil-
L-ramnososa
Scillaren A

IIb: R= H Scillarenina

son el scillirósido (I), para la variedad roja, y la scillaren A (IIa), para la variedad blanca.

Si bien se utilizaron para el presente estudio biosintético ejemplares de la variedad roja de la *Scilla*, para poder generalizar una posible aplicación del método en otras variedades, el estudio degradativo se realizó tanto sobre la estructura de scillirósido (I) como sobre la de proscillaridina (II).

Antecedentes históricos de la acción farmacológica

La *Scilla* (= *Urginea*) *marítima* (Baker L.) ya era conocida por los antiguos egipcios, griegos y romanos como remedio para varias enfermedades y venerada como medio de defensa contra calamidades.

El papel que desempeñaba el polvo de *Scilla* desecada en la vida de los antiguos está descripto en la literatura de cada época. Se la utilizó como tónico y diurético, y en la lucha contra las ratas.

Los árabes difundieron su conocimiento y utilización en la Europa de la Edad Media².

Los apuntes más antiguos conocidos en los que se menciona la *Scilla marítima* como medio de exterminación de roedores provienen del investigador árabe Muhammed Elgâfaki, quien describió, a comienzos del siglo XIII, una "Introducción a la Ciencia de los Medicamentos"³.

En tiempos más recientes se observaron diferencias entre dos variedades de *Scilla marítima*: la blanca, de actividad netamente cardiotónica, y la variedad roja, con una gran actividad rodenticida, además de su gran acción cardiotónica.

Morfológicamente ambas variedades son tan similares que los botánicos no hacen diferencia sistemática alguna entre ellas. Las partes más carnosas de la planta se parecen por completo, con una leve tonalidad más rojiza para la variedad roja. Las diferencias características radican en las distintas sustancias activas que contienen.

Este hecho implicó, durante la Edad Media, una fuerte oposición al empleo de estas drogas en Medicina ya que pesaba por un lado, la peligrosidad de la droga natural, con sus fuertes variaciones de actividad, y por otro lado, los preparados galénicos frecuentemente inactivos. Estos preparados tenían un origen netamente empírico y consistían en asar los bulbos, o cocinarlos en agua o vinagre con lo cual se destruían sus principios activos termolábiles⁴.

Así, las propiedades curativas de la *Scilla* quedaron completamente olvidadas hasta que en el siglo XVIII fue nuevamente utilizada como medicamento contra la hidropesía, y volvió a experimentarse con bulbos.

G.L.B. van Swieten cambió el procedimiento de los médicos antiguos que, temiendo a la actividad de los bulbos frescos trataban de amortiguarla en preparados, y utilizó la *Scilla marítima* recién cosechada, con toda su actividad, la que fue regulada con una mejor dosificación. Esto fue, sin duda, un gran adelanto sobre la vieja terapia, aunque no resultaba muy práctico.

F. Mendel intentó utilizar polvo de *Scilla* seca logrando resultados negativos.

Por más de cien años siguieron estudios confusos e infructuosos tendientes a purificar los principios activos.

En 1864, Schroff pudo establecer experimentalmente la gran actividad diurética conocida de la *Scilla* y en 1866, Fagge y Stevenson tuvieron éxito en la investigación sobre la actividad cardíaca en ranas.

En 1878, C. Moller realizó trabajos sobre actividad fisio-

lógica con preparados obtenidos por E. Merck. Estos preparados resinosos, que se vendían en el comercio, contenían las llamadas "scillipikrina" y "scillitoxina" con acción específica sobre el corazón, mientras que la "scillina", cristalina, poseía propiedades tóxicas.

Aún a principios del siglo XX continuaban infructuosamente los intentos de lograr preparados puros y cristalinos, pero las propiedades químicas indicadas en la literatura muestran que dichos preparados deben considerarse como extractos enriquecidos acompañados con productos de descomposición.

Finalmente, por iniciativa del farmacólogo W. Straub, los Laboratorios Sandoz, de Suiza, se hicieron cargo de los trabajos sobre *Scilla marítima*, a partir de 1933. Allí se llevó a cabo un minucioso estudio de aislamiento y caracterización de los principios activos de la planta.

Si bien estos laboratorios han dejado de utilizar ya como drogas terapéuticas los compuestos de la *Scilla*, que lograron aislar y caracterizar, actualmente los Laboratorios Knoll continúan empleando dichos compuestos o sus derivados, como por ejemplo, los mono, di y tri acetatos de proscillaridina⁵.

Características concernientes a la *Scilla marítima*

Las variedades blanca y roja de *Scilla marítima* se encuentran extendidas en vastas zonas, pero rigurosamente separadas.

España, Portugal, Malta, Chipre y Asia Menor, producen la especie blanca, mientras que Francia, Italia, Argelia y Marruecos tienen los bulbos de la variedad roja.

La *Scilla marítima* desarrolla, en los meses de otoño e invierno, es decir durante el período de lluvias, hojas carnosas acintadas de, aproximadamente, 50 a 70 cm. de longitud. Este follaje comienza a secarse en primavera, y, al llegar el estío el bulbo se encuentra en período de calma o latencia.

Hacia mediados del verano surge una vara de hasta 1,5 m de altura, con un gran racimo de flores blancas o débilmente rojizas. Las hojas aparecen nuevamente un tiempo después del florecimiento (aproximadamente 1 mes), y proveen al bulbo durante el período verde del material de reserva.

Sólo en el tiempo en que se marchitan las hojas aumenta significativamente su contenido en materia activa, la cual alcanza su máximo durante el período de calma, es decir, inmediatamente antes del florecimiento.

Este contenido disminuye durante la floración y permanece bajo durante el período de hojas.

A. Stoll y J. Renz³ de los Laboratorios Sandoz, publicaron los primeros trabajos sobre el estudio químico de la planta.

De sus observaciones se concluyó que el contenido de glucósidos cardiotónicos en los bulbos de *Scilla marítima* fluctúa

marcadamente según la latitud y la época del año.

El contenido promedio en scillirósido para ejemplares de la variedad roja naturales de Argelia es, en los meses de verano, de 350 mg por Kg de bulbo fresco. El mismo contenido aislado de ejemplares adaptados a nuestro vivero resultó, en promedio, de 35 mg por Kg de bulbo fresco.

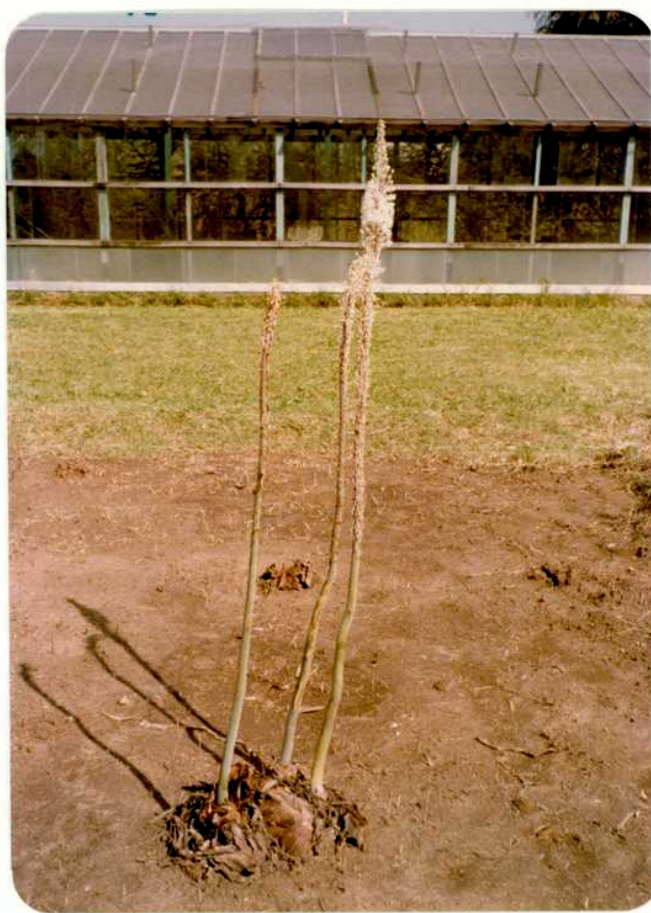
Hasta 1951 no se tuvo éxito en encontrar procesos de separación sistemáticos de los glucósidos cardiotónicos ya fuera con fines analíticos o preparativos.

En ese año⁶ aplicando técnicas cromatográficas con Silica-gel en columnas, ya sea basadas en adsorción o partición, se lograron estandarizar las condiciones y obtener separaciones reproducibles, aunque para los glucósidos que están presentes en menor proporción, sólo se obtuvieron mezclas parcialmente enriquecidas.

Recién con el advenimiento de la cromatografía de alta resolución (HPLC) fue posible la determinación cuali-cuantitativa de preparados de *Scilla*⁷. Las detecciones se realizaron con luz U.V. a 280 ó 300 nm. Como fase estacionaria se utilizó fase invertida C-18 y como eluyente metanol, o mezclas isocráticas de acetonitrilo-agua. Como estándar interno se usaron ésteres de p-hidroxibenzoico y como glicósido de referencia la proscillaridina (II).



Fotografía 1: Aspecto que presentan ejemplares de
Scilla maritima en época de lluvias.
Las hojas tienen 50-70 cm de longitud.



Fotografía 2: Aspecto que presentan los bulbos de *Scilla marítima* durante el período de florecimiento. Se puede observar la subdivisión de un bulbo original en tres bulbos hijos que comparten la misma raíz.

Determinación de estructuras y reactividad de los principales glicósidos cardiotónicos de la *Scilla marítima*.

1) Scillaren A (IIa)

Este es el nombre del glicósido principal presente en la variedad blanca de *Scilla marítima*.

Después de diez años investigando la química de este glicósido, Stoll y colaboradores publicaron una serie de trabajos científicos a partir de 1933³, 8-10, pero, la dilucidación completa de su estructura la presentaron casi veinte años más tarde^{6b}.

Scillaren A (IIa), como el resto de bufadienólidos de plantas, dio negativo los tests característicos para cardenólidos, es decir, los tests de Legal¹¹, y Raymond¹², y debieron ser caracterizados por el test de Liebermann³ que consiste en la aparición de color por tratamiento de los glicósidos o sus agliconas con ácido sulfúrico 50 % en anhídrido acético.

La estructura básica de scillaren A se pudo determinar, luego de estudios de hidrólisis, como una aglicona unida a glucosa y ramnosa. El disacárido aislado se llamó scillabiosa y su estructura resultó ser: 4-O-D-glucopiranosil-L-ramnosa¹³.

La hidrólisis cuantitativa de scillaren A a scillaridin A (III) se realiza con ácido sulfúrico 1 % en metanol 50 % a 100°C, y esta ruptura ocasiona la pérdida adicional de una molécula de agua^{8,9}.

Por acción de la enzima scillarenasa o de la strofantobia-

sa, se logró la separación del resto de glucosa, y la consecuente obtención de otro de los glicósidos presentes en la *Scilla*, la proscillaridina (II). Por hidrólisis suave de (II) se obtuvo scillaridin A (III), hecho que condujo al resultado erróneo de suponer en la aglicona original un doble enlace 5 (6) que se conjuga con el 3 (4) formado durante la hidrólisis.

La verdadera posición del doble enlace, entre los C-4 y C-5, se confirmó recién en 1951^{6b}, cuando por acción de enzimas aisladas de hongos (*Penicillium*, *Paecilomyces*, *Claviceps*, etc.) se logró aislar la aglicona intacta llamada scillarenina (IIb).

Las hidrólisis aludidas y otras reacciones que se realizaron sobre scillaren A (IIa) se muestran esquematizadas en la Figura 3.

La hidrogenación catalítica^{9d} de (IIa) condujo a la saturación de los dobles enlaces en el núcleo y cadena lateral, y se observó también hidrogenólisis parcial del anillo lactónico con formación de una cadena lateral del tipo de ácido biliar, dando el ácido hexahidroscillaren A (IV).

La saturación del doble enlace en 4(5)¹⁴ elimina la labilidad del glicósido alílico, y así se pudo eliminar el disacárido por reflujo con clorhídrico 1N en metanol. Durante esta hidrólisis se produjo también la deshidratación del hidroxilo del carbono 14, y por posterior hidrogenación se obtuvieron dos productos, uno de los cuales resultó ser idéntico al ácido 3 β -hidroxi-5 α -colánico.

Las identidades se basaron en mediciones de punto de fusión mezcla, poder rotatorio, solubilidades y formas cristalinas.

Por tratamiento de (III) en medio ácido, se obtuvo anhidro-

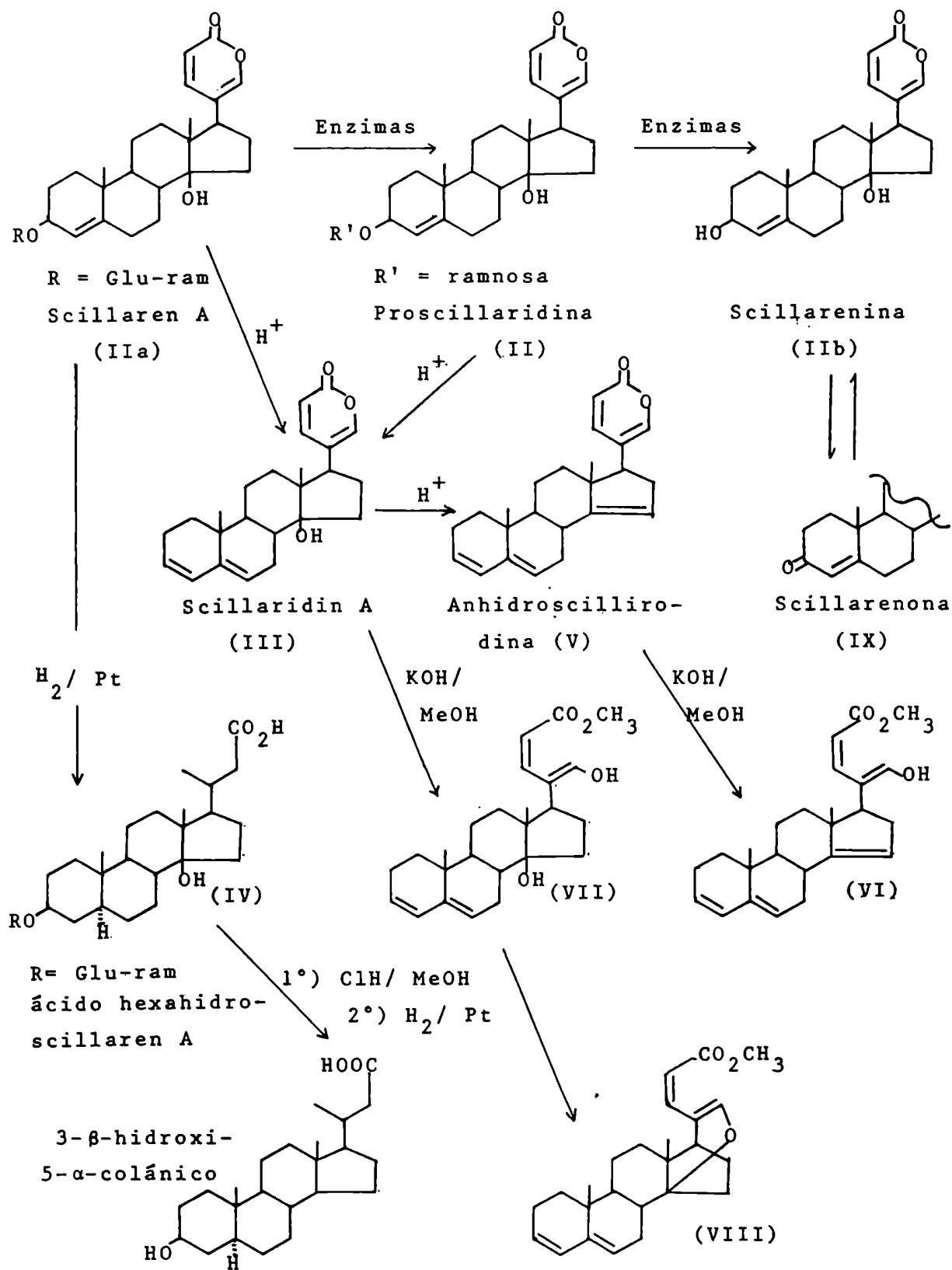


Figura 3 : Reacciones sobre scillaren A (IIa).

proscillaridina (V), la que por acción de hidróxido de potasio metanólico produjo la ruptura del anillo lactónico^{9c}, obteniéndose el éster metílico (VI) con el carbono 21 en forma totalmente enólica, ya que se pudo acilar y metilar, pero no se logró formar su oxima, semicarbazona ni fenilhidrazona.

La scillaridin A (III) se comportó en forma similar, y recién preparado el éster (VII) se pudo metilar el enol con diazometano, pero (VII) no pudo ser aislado por formarse espontáneamente el derivado de la serie iso (VIII), hecho éste que aportó evidencia sobre la orientación β del hidroxilo del carbono 14.

La posición correcta del doble enlace del anillo A del esteroide se logró localizar una vez aislada la genina intacta scillarenina (IIb)^{6b}. Esta genina al ser sometida a oxidación de Oppenauer condujo¹⁶ a una cetona α - β insaturada: scillarenona (IX). Por reducción de Meerwein-Ponndorf de este compuesto se obtuvieron alcoholes epímeros en C-3, separables por cromatografía, y uno de ellos resultó ser idéntico a (IIb).

Las propiedades espectroscópicas de los glicósidos cardiotónicos de la *Scilla marítima* son comunes en cuanto a las señales características del anillo bufadienólido. En el I.R. se observan bandas en 1720, 1639, 1603 y 1450 cm^{-1} .

El espectro U.V. es muy característico y presenta la clásica absorción a 300m μ , $\log \epsilon = 3,74$.

El espectro de RMN-¹H del anillo bufadienólido presenta las siguientes señales características:

$\delta = 6,27$ (d, J = 10 Hz, H-C-23)

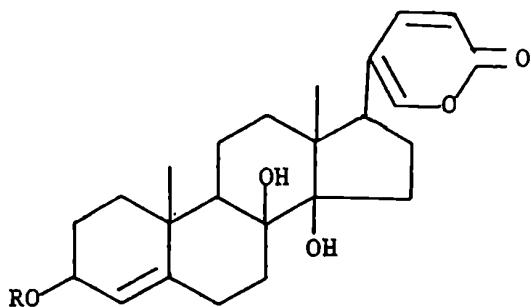
$\delta = 7,46$ (d, $J' = 2$ Hz, H-C-21)

$\delta = 7,87$ (dd, $J = 10$ Hz, $J' = 2$ Hz, H-C-22)

El resto de las señales que aparecen en los espectros de RMN- ^1H no han sido totalmente asignados en la literatura y se discuten más adelante.

En estudios más recientes¹⁷ se dilucidaron las estructuras de dos nuevos glicósidos cardiotónicos de la variedad blanca de *Scilla*: el Scillifósido (X) y el glucoscillifósido (XI).

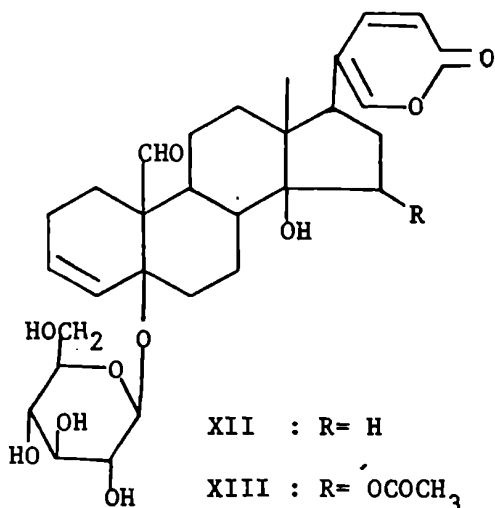
También se caracterizaron otros glicósidos que están presentes en ambas variedades de *Scilla*: el scilliglaucósido (XII)^{18a}, y el scillicianósido (XIII)^{18b}.



X : R= L-Ramnosa

XI : R= 4-O-D-Glucopiranosil-

L-Ramnosa



XII : R= H

XIII : R= 'OCOCH₃

2) Scillirósido (I).

Este es el nombre del glicósido principal presente en la variedad roja de *Scilla marítima*. Es un poderoso veneno para ratas y no actúa sobre otros animales domésticos ya que su primer efecto sobre ellos es provocarles el vómito. La dosis letal media es de 0,4 mg por Kg de rata hembra, y 0,7 mg por Kg. de rata macho.

El scillirósido es un bufadienólido del tipo aglicona-glucosa sumamente resistente a la hidrólisis, y fue por este motivo que Stoll³ y colaboradores comenzaron sus estudios sobre el glucósido intacto, hecho que condujo a la interpretación errónea de algunos resultados obtenidos.

La presencia del anillo lactónico doblemente insaturado quedó determinada por la identidad del espectro U.V. con el de scillaren A (IIa), así como por las reacciones características.

Por titulación se requerían dos equivalentes de base, uno para abrir la lactona, y otro para hidrolizar un grupo acetato que fue aislado como acetato de plata. Por ésta y otras observaciones el grupo de investigadores de los Laboratorios Sandoz sugirió una fórmula tentativa¹⁶ para el scillirósido en la cual el grupo O-acetato estaba localizado en el carbono 23, es decir, unido al anillo bufadienólido.

En 1950 Stoll y Renz^{19a} utilizando enzimas extraídas de *Coronilla glauca* L., *Medicago sativa* (alfalfa)^{19b}, y hongos²⁰, lograron separar el resto D-glucosa y aislar intacta la genina scillirosidina (Ia). Hasta ese momento ninguna reacción aplicaca

da habfa conducido a derivados cristalin^{os}.

El espectro I.R. de (Ia) mostr^o un grupo acetato saturado en lugar de un enolacetato, y esto descart^o la posibilidad de que dicho grupo estuviera ubicado en el anillo α -pirona.

Tambi^{en} se estableci^o en (Ia) la presencia de un alcohol alifl^{ico}, oxidable con MnO_2 a una cetona α , β no saturada (XVII).

La presencia de un grupo hidroxilo en posici^on 14 β fue establecida por conversi^on de scillirosidina (Ia) con KOH metan^olico en su iso^oster (XXI). Un tratamiento similar, pero con metilato de bario sobre el scillir^osido mismo²¹, habfa conducido a un ^oster metflico, aunque por su an^lisis no pudo asignarse como un ^onico derivado. Este ^oster metflico presentaba en C-21 un aldeh^odo enolizable, que no dio derivados cristalin^{os} del grupo carbonilo, ni pudo ser metilado con diazometano.

Los autores concluyeron que estos hechos confirmaban la formaci^on de un ester de la serie iso, por deshidrataci^on entre el enol del carbono 21 y el hidroxilo del carbono 14 β .

La presencia de un hidroxilo en posici^on 8 se asign^o debido a que luego del tratamiento de 3-acetilscillirosidina con tetraacetato de plomo, se obtuvo un compuesto que present^o en el espectro I.R. las bandas caracterfsticas de cetonas en anillos de 5 y 6 miembros. La prueba definitiva de que se trataba de un 8 β , 14 β diol, la dio el hecho de que form^o un ^oster sulfito cfclico (XIV)^{22a}.

Por tratamiento de scillirosidina (Ia) con permanganato de potasio, se dej^o intacto el doble enlace 4 (5) y se obtuvo un derivado del ^ocido eti^onico que fue esterificado al compuesto (XV). Por posterior hidrogenaci^on, deshidrataci^on y nueva hi-

drogenación total, se llegó al etianato de metilo (XVI).

La localización definitiva del acetato se determinó^{22b} por el hecho de que al someter a la scillirosidina (Ia) a hidrogenación catalítica se produjo la eliminación parcial de dicho grupo. Se lo ubicó, por lo tanto en posición alílica, en carbono 6. Además, la fácil epimerización de (XVII) al estereoisómero ecuatorial más estable (XVIII) y más dextrorrotatorio, confirmó una configuración 6β para el grupo acetato del scillirósido.

La hidrogenación catalítica de scillirosidina (Ia), condujo a resultados dispares^{3, 22b}. Por un lado con platino como catalizador y en medio acético se consumieron 5,3 moles de hidrógeno por mol de (Ia), aislándose entre otros, los compuestos derivados de los ácidos biliares (XIX). También se formaron algo de los 3-desoxi-compuestos.

Por otro lado cuando se utilizó paladio como catalizador y etanol como solvente, se consumieron sólo 3 moles de hidrógeno. De la mezcla de productos se pudo aislar un compuesto carente del acetato de C-6, y con el anillo lactónico sin abrir, por lo que se le asignó, tentativamente, la estructura (XX). El doble enlace remanente pudo ser reducido en una hidrogenación posterior con platino y, como por oxidación con dióxido de manganeso o trióxido de cromo, no se obtuvo una cetona α, β insaturada, se asignó la posición 20-22 para el doble enlace resistente a la reducción con paladio. Se trataría, entonces de una adición 1,4 de hidrógeno.

Todas las reacciones descriptas se esquematizan en la Figura 4.

En literatura no figura la asignación completa del espectro

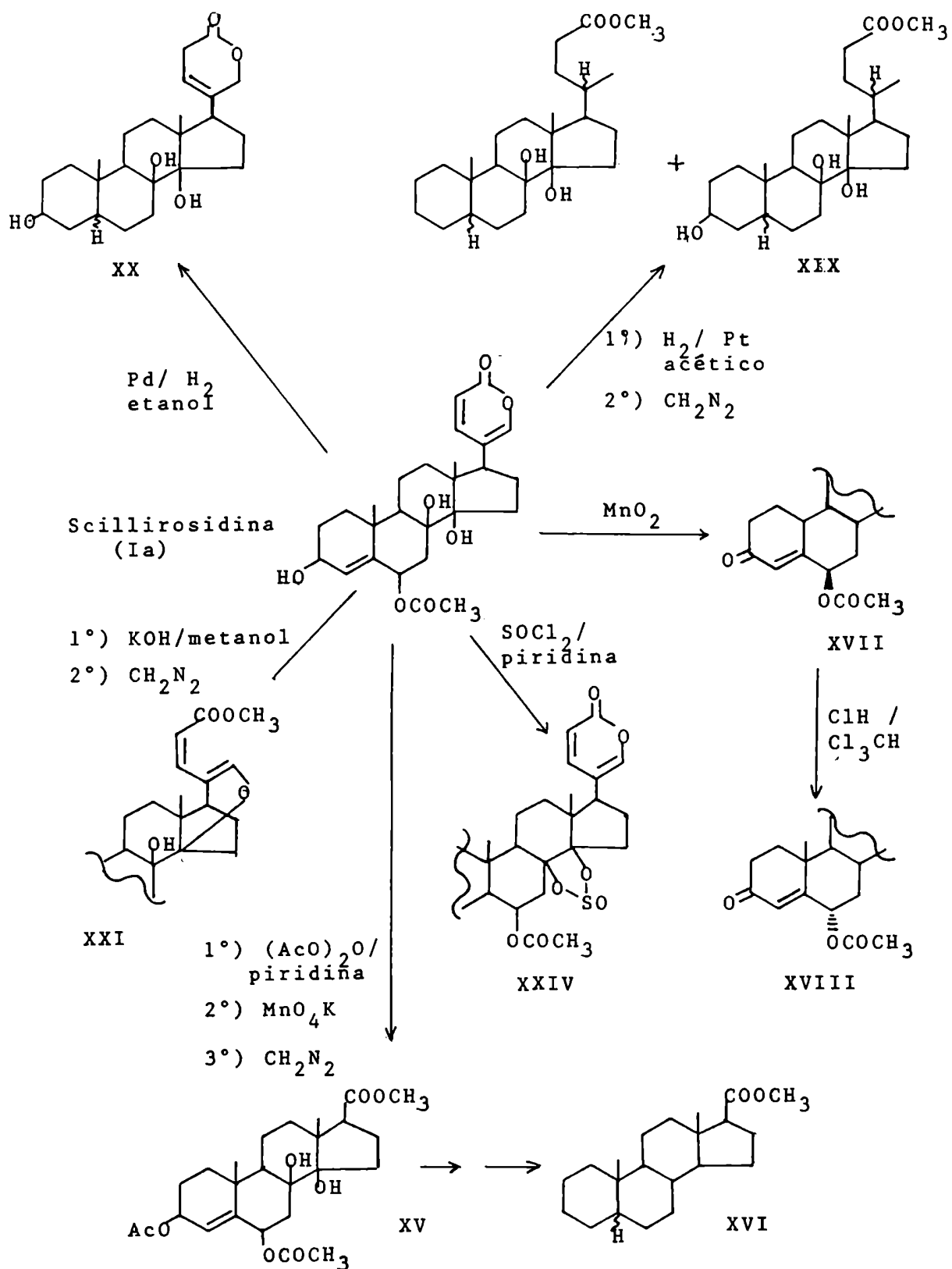


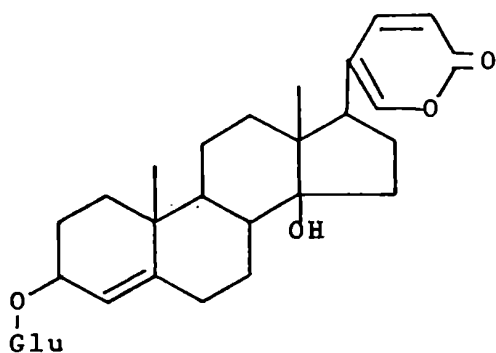
Figura 4 : Reacciones sobre scillirosidina (Ia)

de RMN-¹H del Scillirósido, aunque se han publicado algunas asignaciones parciales.

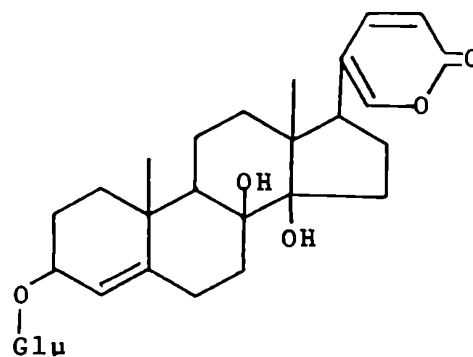
Los espectros de (I) así como los de su tetraacetil derivado se discutirán más adelante.

En estudios más recientes a cargo de A. von Wartburg^{23,24} se lograron aislar nuevos glicósidos de la variedad roja de *Scilla*. Estos nuevos compuestos fueron hidrolizados a sus agliconas por acción de enzimas específicas, y la estructura del núcleo esteroidal fue caracterizada principalmente por el uso de técnicas espectroscópicas de RMN-¹H, directamente sobre la aglicona o derivados de la misma.

Se asignaron así, las estructuras de Scillarenina- β -D-glucósido (XXII) y Scillirubrósido (XXIII).



XXII



XXIII

Biosíntesis de geninas esteroidales.

a) Biosíntesis de cardenólidos.

El grupo de los cardenólidos es el que ha sido más ampliamente estudiado; la biosíntesis de los mismos fue investigada utilizando plantas del género *Digitalis*, en particular *D. lanata* y *D. purpúrea*. Se realizaron, además, algunos estudios complementarios en *Strophantus kombé*.

Dado que la diferencia esencial entre cardenólidos y esteroides radica en que la cadena lateral alifática de éstos últimos ha sido reemplazada por un grupo butenólido, es de esperar que su biogénesis esté íntimamente relacionada.

Teniendo en cuenta que el ácido mevalónico (XXIV) es precursor conocido del colesterol (XXV), el primer paso fue establecer si los cardenólidos también derivaban de dicho compuesto.

Ramstadt y Beal^{25,26} en *Digitalis lanata* y Leete y colaboradores^{27,29} en *D. purpúrea* encontraron que suministrando ácido mevalónico-2-¹⁴C a una planta, aislaban un glicósido radiactivo que por hidrólisis producía digitoxigenina (XXVI) y los hidratos de carbono glucosa y digitoxosa, comprobando que toda la actividad permanecía en la aglicona.

Si la digitoxigenina (XXVI) se formaba a través del colesterol (XXV), o algún triterpeno muy relacionado, por ruptura entre los carbonos 23 y 24, la distribución de la marcación sería la indicada en la Figura 5.

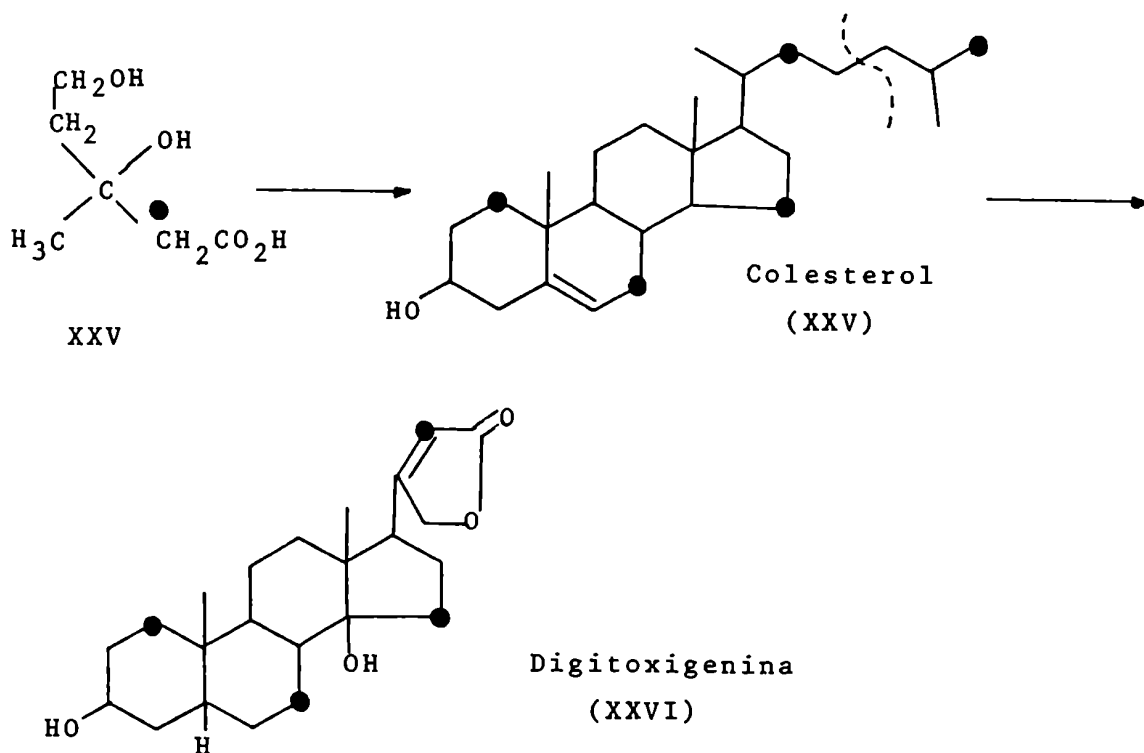


Figura 5: Hipótesis sobre la marcación en Digitoxigenina a partir de ácido mevalónico-2-¹⁴C. La degradación total indicó que toda la radiactividad se encontraba en los carbonos 1, 7 y 15.

Por degradación de la digitoxigenina al ácido etiánico correspondiente y análisis de los productos de degradación, se comprobó que el carbono 22 no estaba marcado. Además la degradación total indicó que toda la radiactividad se encontraba en los carbonos 1, 7 y 15²⁷.

En consecuencia, si bien plantas de *D. Lanata* son capaces de metabolizar colesterol²⁸, el anillo butenólido no provenía

de la cadena lateral del mismo ni directamente a partir del ácido mevalónico (XXIV), ya que ninguno de sus átomos de carbono poseía radiactividad.

Quedaban por lo tanto dos hipótesis posibles:

- a) una ruptura de la cadena lateral del colesterol entre los carbonos 20 y 22, para dar un 20-ceto-derivado del pregnano, el cual reaccionaría con una molécula de acetato (como acetil Coenzima A), dando un β -hidroxiácido que, por deshidratación oxidación del C-21 y lactonización daría lugar al anillo butenólido.
- b) a partir de un ácido etiánico el que reaccionaría con una molécula de acetato dando un β -ceto-ácido, el que por descarboxilación daría lugar a un 20-ceto-derivado del pregnano que reaccionaría como se indicó anteriormente en a. (Figura 6).

Para decidir cuál era la hipótesis correcta, Leete y colaboradores hicieron experimentos suministrando a plantas *D. Purpurea*, acetato de Sodio-1- $^{14}\text{C}^{29,30}$, y ácido mevalónico-3- $^{14}\text{C}^{30}$ y Reichstein y colaboradores³⁰ suministraron ácido mevalónico-3- ^{14}C a *D. Lanata*. Las distribuciones de marcación en escualeno (XXVII), colesterol (XXV) y pregnenolona (XXVIII), pueden observarse en la Figura 7.

La digitoxigenina (XXVI) aislada en todos los casos resultó activa, y por degradación^{27,30}, se determinó que el acetato de sodio-1- ^{14}C había dado lugar a digitoxigenina marcada en el sistema esteroidal y en los carbonos 20 y 23 del anillo butenólido, pero no en los carbonos 21 y 22, lo cual estaría de acuerdo con cualquiera de las dos hipótesis enunciadas anteriormente.

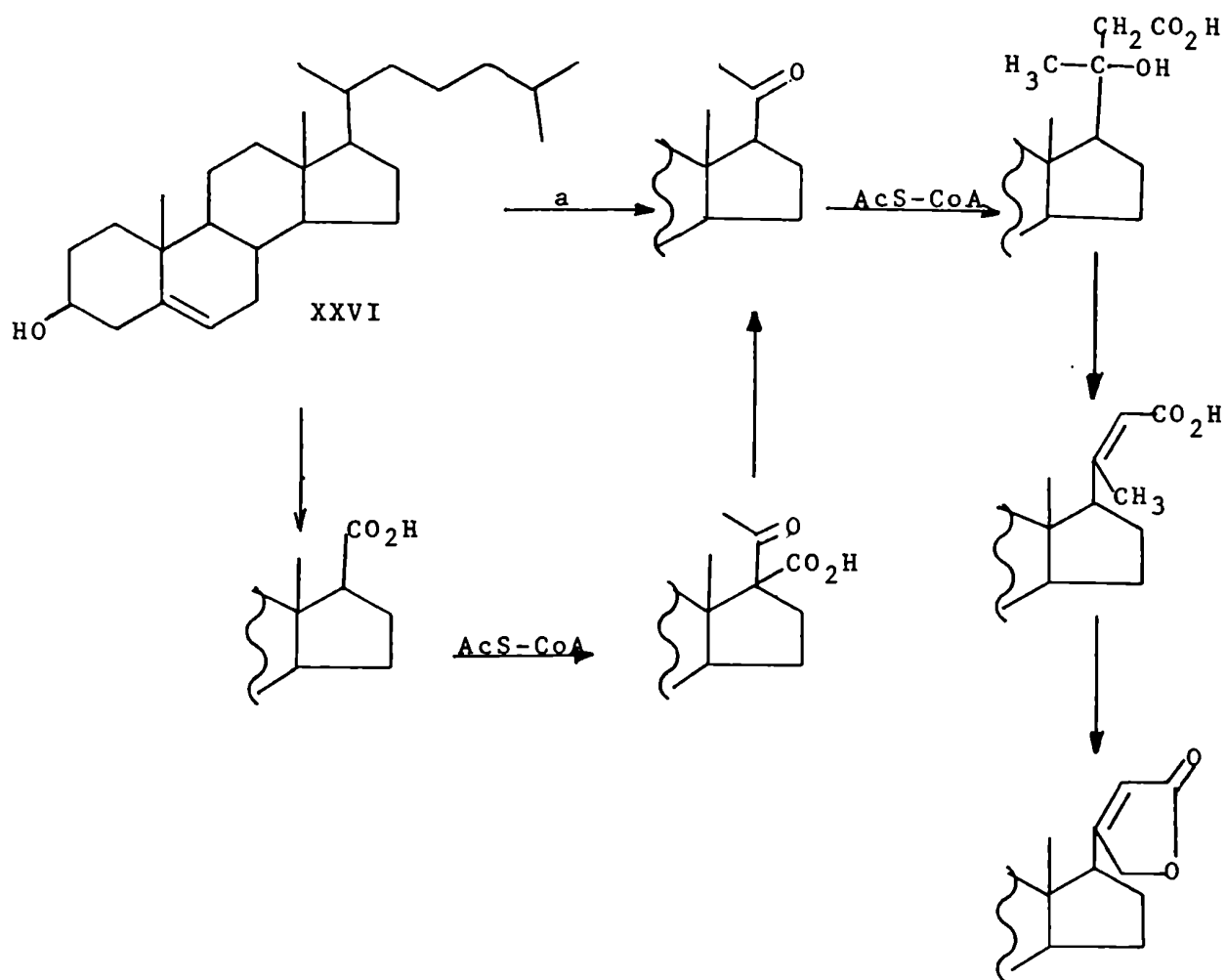


Figura 6: Hipótesis sobre la formación del anillo butenólido de cardenólidos.

El ácido mevalónico-3-¹⁴C había marcado sólo el carbono 20 de la digitoxigenina (además del sistema esteroideal), y finalmente el ác. mevalónico-3'-¹⁴C produjo el cardenólido marcado en los carbonos 18, 19 y 21, estando la tercera parte de la ac

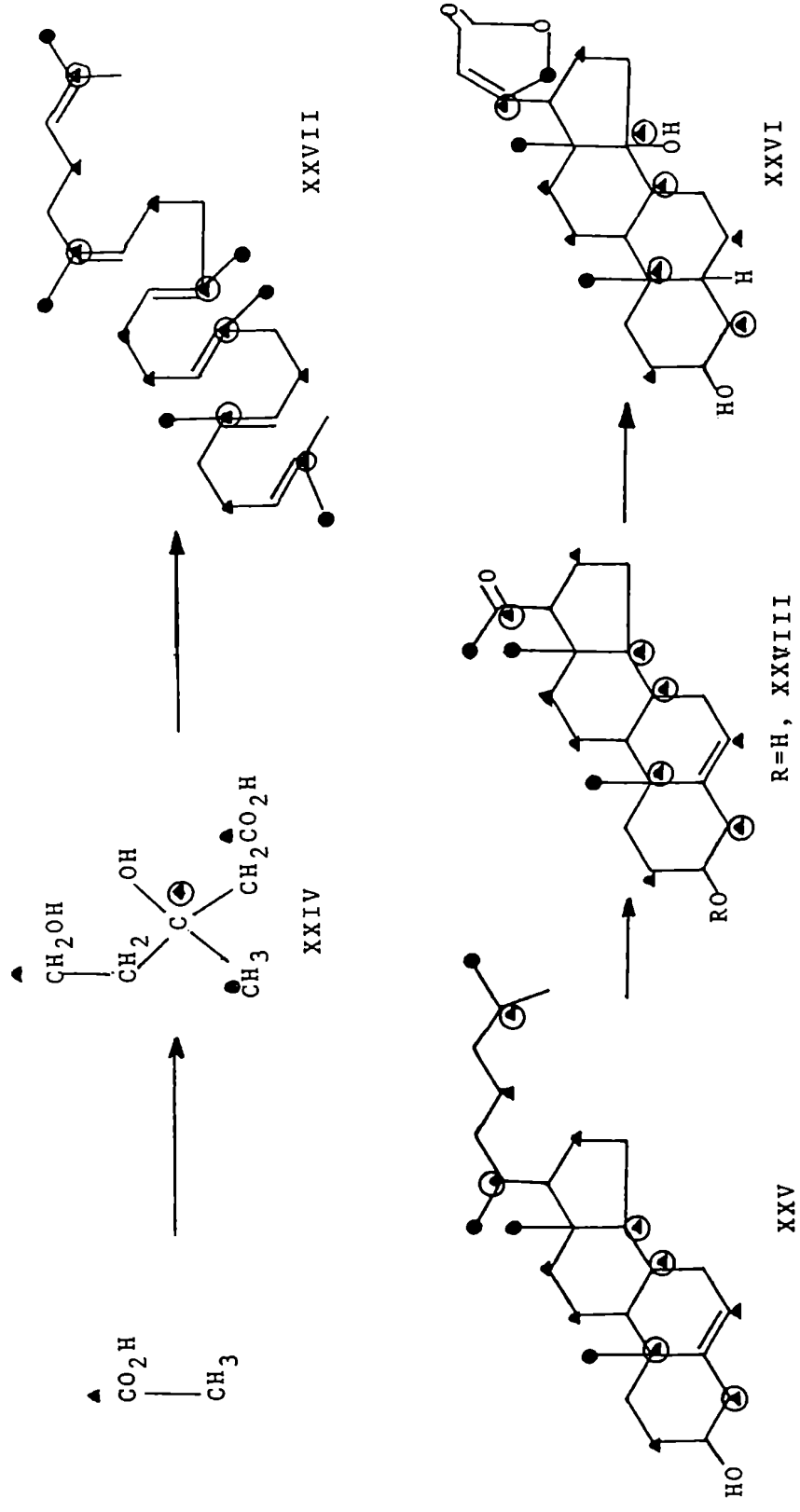


Figura 7 : Distribución de la marcación en escualeno (XXVII) , colesterol (XXV), pregnenolona (XXVIII) y digitoxigenina (XXIX) , a partir de ácido mevalónico (XXIV)-3-¹⁴C (O) , 3'-¹⁴C (●) y acetato de sodio-1-¹⁴C (▲).

tividad total presente en este último.

Este resultado está de acuerdo con un intermediario del tipo pregnano y no con un ácido etiánico, debido a que en ese último caso debería obtenerse digitoxigenina sin marcación en el carbono 21, ya que éste provendría de una molécula de acetato.

Además la hipótesis de un ác. etiánico no estaría de acuerdo con el resultado obtenido con ác, mevalónico-3-¹⁴C, ya que dicha hipótesis supone que el C-20 proviene de una molécula de acetato.

En consecuencia quedó demostrado el camino:

ác. mevalónico----->colesterol----->pregnenolona-----
|_acetato_|----->cardenólidos.

Varios trabajos posteriores intentaron aclarar algunos pasos del esquema biosintético trazado.

Entre ellos Tschesche y Brassat³² encontraron que administrando pregnenolona-21-¹⁴C, con el hidroxilo de la posición 3 β libre, a *D. purpúrea* se obtenía digitoxigenina radiactiva

Establecidos entonces los lineamientos generales del esquema biosintético quedaba por estudiar aún:

- a) el mecanismo de saturación del doble enlace 5 (6), y
- b) la hidroxilación en β del carbono 14.

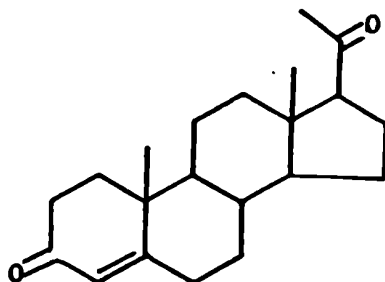
Respecto de a) se pudo comprobar³³⁻³⁸ que la progesterona (XXIX) era el intermediario utilizado por la planta para reducir el doble enlace 5 (6).

Análogamente a lo que ocurre en animales la pregnenolona (XXVIII) se transformaría en progesterona (XXIX) y en ese momento se saturaría el doble enlace.

Respecto de la hidroxilación en el carbono 14 no es posi-

ble con los datos que se tienen hasta el momento 36,37,39-46 aclarar su mecanismo .

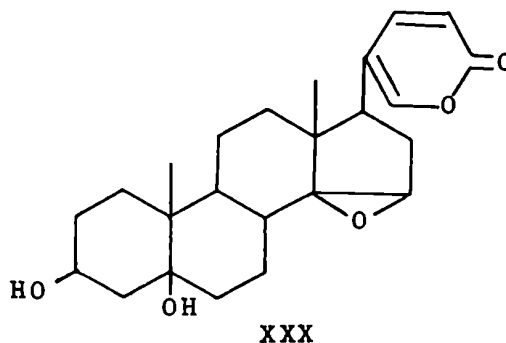
Con respecto a las hidroxilaciones en otras posiciones del sistema esteroidal, los datos registrados hasta el presente son muy limitados.



XXIX

b) Biosíntesis de bufadienólidos animales.

Con el objeto de comprobar si el anillo bufadienólido en animales tenía su origen en una condensación entre un derivado del tipo 20-ceto-pregnano con una molécula de bajo peso molecular, que proporcionaría los tres átomos de carbono que restan para formar el anillo lactónico, se inyectó pregnenolona-4- ^{14}C a sapos *Bufo marinus* y pregnenolona-20- ^{14}C (XXVIIIa) a sapos *Bufo paracnemis*⁴⁷. En ambos casos se encontró que la marinobufagina (XXX) aislada no era radiactiva.



Algunas experiencias previas de inoculaciones con colesterol-4- ^{14}C (XXV)^{47, 50} en *Bufo marinus* habían originado resultados contradictorios respecto de su incorporación a bufadienólidos. Por otra parte el ácido mevalónico (XXIV) era incorporado en los bufadienólidos y en el colesterol (XXV) en sapos *Bufo paracnemis*^{49, 51}.

Finalmente se inyectó colesterol-20- ^{14}C ^{48, 49} a sapos *Bufo paracnemis* y la marinobufagina (XXX) aislada al cabo de 78 y 107

días resultó radiactiva. Por oxidación al ácido etiánico correspondiente, previa acetilación, y degradación de Schmidt de dicho ácido, se determinó que toda la actividad del bufadienólido residía en el carbono 20.

Se postuló, entonces, que en el caso de los sapos el colesterol (XXV) sería inicialmente transformado en un intermediario con estructura de ácido biliar⁵², que luego sería convertido en bufadienólidos.

Con el objeto de sustentar esta hipótesis se sintetizaron colesterol-24-¹⁴C⁵¹ (XXV) y el ácido 3-β-hidroxi-5-colénico-24-¹⁴C^{53,54} (XXXI), y se utilizaron en ensayos biosintéticos con sapos *Bufo paracnemis* intactos. En ambos casos las experiencias indicaron que los productos ensayados no resultaron precursores de los bufadienólidos de origen animal⁵⁵.

Teniendo en cuenta estos resultados negativos se descartaría la hipótesis del precursor con cadena de ácido biliar, al menos cuando el sistema tetracíclico del precursor contenga diferentes funciones tales como las de los bufadienólidos en estudio.

Se reconsideró, entonces, la posibilidad de que en animales el proceso transcurriera a través de un intermediario del tipo 20-ceto-pregnano, pero estructuralmente más cercano del producto final que la pregnenolona.

Se realizó entonces la síntesis de la 3-β-hidroxi-5-β-pregnan-20-ona-20¹⁴C^{65b} (XXVIIb) que fue inoculada en sapos *Bufo paracnemis*. También en este caso se obtuvieron resultados negativos⁵⁵ por lo que, el proceso biosintético no está aún claramente establecido.

Los resultados obtenidos por inoculación de esteroides marcados en las experiencias con sapos mencionadas, se esquemati-zan en la Figura 8.

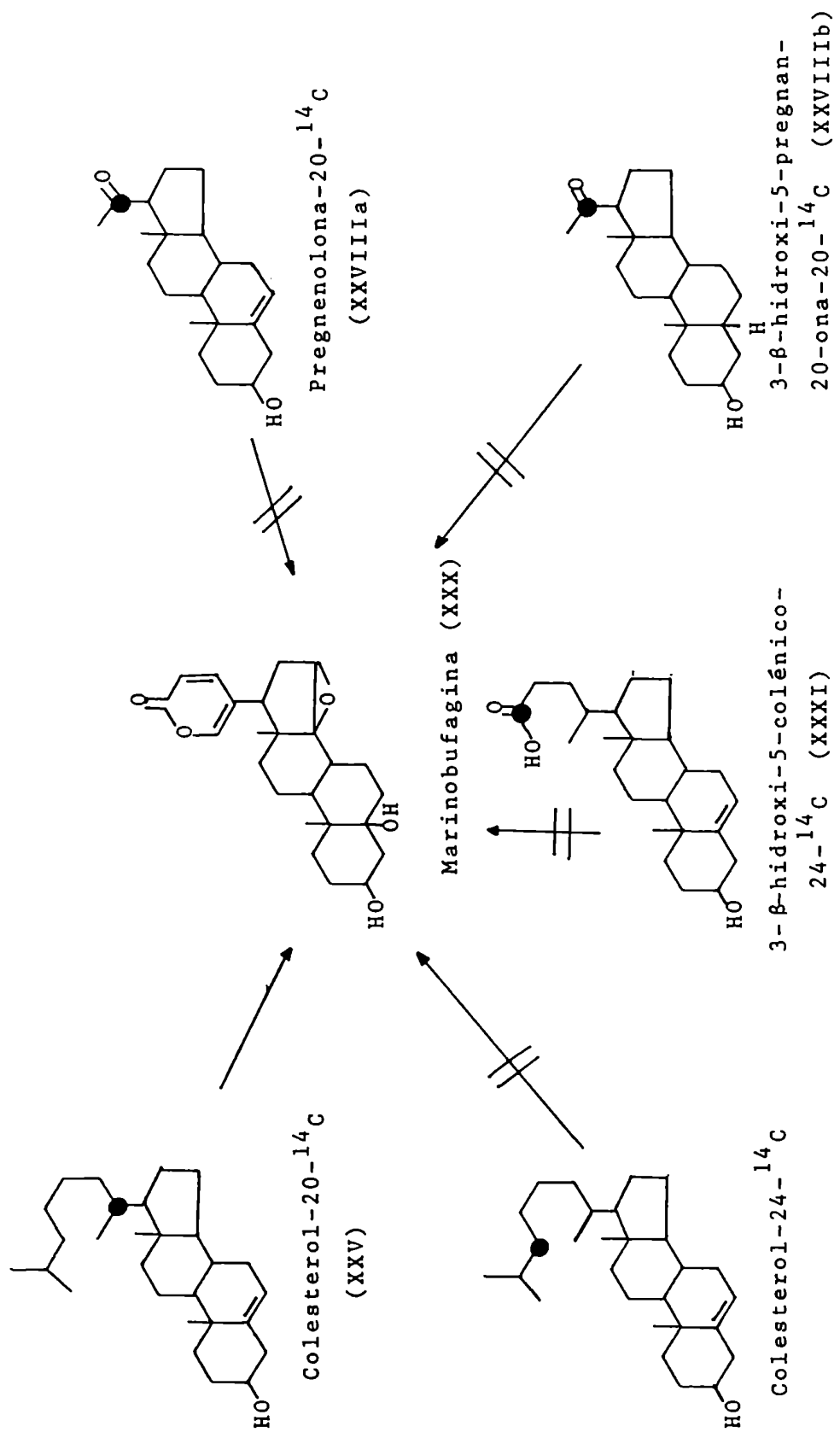


Figura 8 : Biosíntesis de bufadienólidos animales resultados obtenidos por inoculación de esteroides marcados .

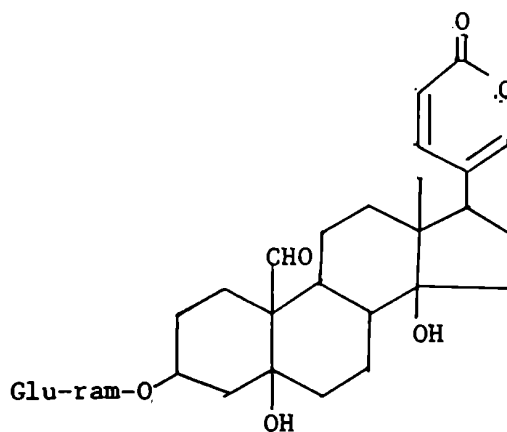
c) Biosíntesis de bufadienólidos vegetales.

Los estudios biosintéticos de bufadienólidos en el reino vegetal han sido realizados en *Helleborus atrorubens* y en la variedad roja de *Scilla marítima*.

Dada la similitud estructural entre cardenólidos y bufadienólidos, se pensó que la biogénesis de ambos estaría muy relacionada. En 1965, Tschesche y Brassat⁵⁷ suministraron el glucósido de pregnenolona-21-¹⁴C a *Helleborus atrorubens*, determinando que la hellebrina (XXXII) aislada al cabo de 16 días era radioactiva. Por ozonólisis de este producto, previa acetilación, se obtuvo una sustancia inactiva, lo cual demostraba que la radioactividad presente en la hellebrina (XXXII) se encontraba en el anillo lactónico y que por lo tanto no había ocurrido una ruptura de la pregnenolona dando acetato radiactivo y posterior síntesis del bufadienólido.

Posteriormente se suministró pregnenolona-4-¹⁴C y pregnenolona-3- α -T⁵⁸ con el fin de estudiar el mecanismo de hidroxilación en la posición 5. La hellebrina aislada contenía tritio aunque la relación T/¹⁴C había disminuído. Por otra parte, la 3- β -hidroxi-5- β -pregnan-20-ona-16,17-T₂ (XXXIIIa) y la 3- β -hidroxi-5- α -pregnan-20-ona-16,17-T₂ (XXXIIIb)⁵⁸, no fueron incorporadas. Esto permitió suponer que la hidroxilación en el carbono 5 no ocurre por sustitución directa del hidrógeno en esa posición sino por adición de agua al doble enlace 5 (6). Además el hecho de que haya una retención parcial del tritio en la posición 3 α , implica que no es necesaria la formación de un ceto-derivado; sin embargo la pérdida de tritio encontra

da puede deberse a que la pregnenolona (o un derivado relacionado) esté en equilibrio con un 3-ceto-derivado que no intervendría directamente en la síntesis de hellebrina (XXXII).



Hellebrina (XXXII)

Paralelamente a estos ensayos en *Helleborus atrorubens*, Gros y colaboradores realizaron experiencias sobre la variedad roja de *Scilla marítima* encontrando que el ácido mevalónico-2- ^{14}C (XXIV)⁵⁹ y la pregnenolona-20- ^{14}C (XXIX)⁴⁹ se incorporaban al scillirósido (I) lo cual confirma los resultados anteriores.

De acuerdo con estos datos se pudo postular el esquema biosintético básico de la Figura 9 para la formación de los bufadienólidos en plantas. No se conocía hasta ese momento la unidad X que reaccionaba con el intermediario de tipo pregnano para formar el anillo lactónico. Tampoco se sabía si el aporte de los 3 átomos de carbono requeridos provendrían de un sólo compuesto o de dos o tres adiciones sucesivas.

Se suponía como un camino posible de formación del anillo

lactónico α -pirona, la condensación del ácido oxalacético (XXXIV) con un derivado de la pregnenolona (XXVIII), con posterior pérdida de dióxido de carbono y lactonización.

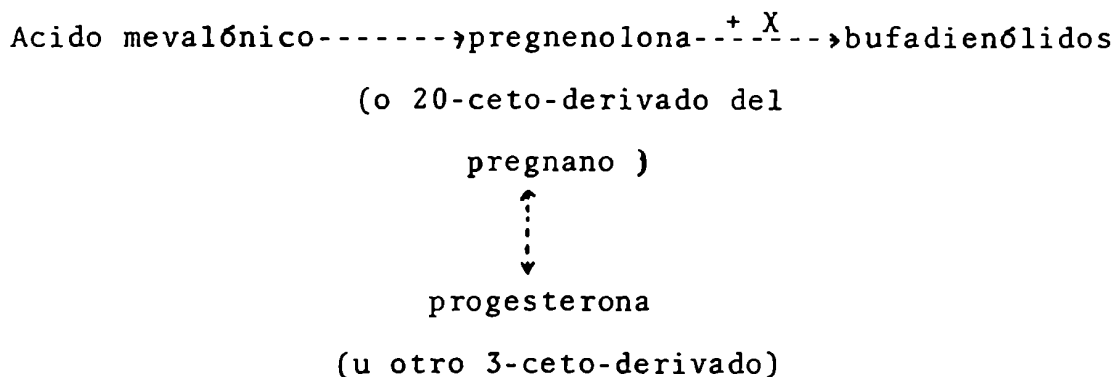


Figura 9: Esquema biosintético de formación de los bufadienólidos en plantas.

La reducción del grupo carbonilo presente en el anillo y la pérdida de dos moléculas de agua produciría el anillo lactónico hexaatómico doblemente insaturado. (Figura 10).

Nuestro trabajo justamente se inicia, en base a estos resultados, con el objeto de dilucidar cuál es la unidad X que se une al derivado del tipo pregnenolona para formar el anillo bufadienólido.

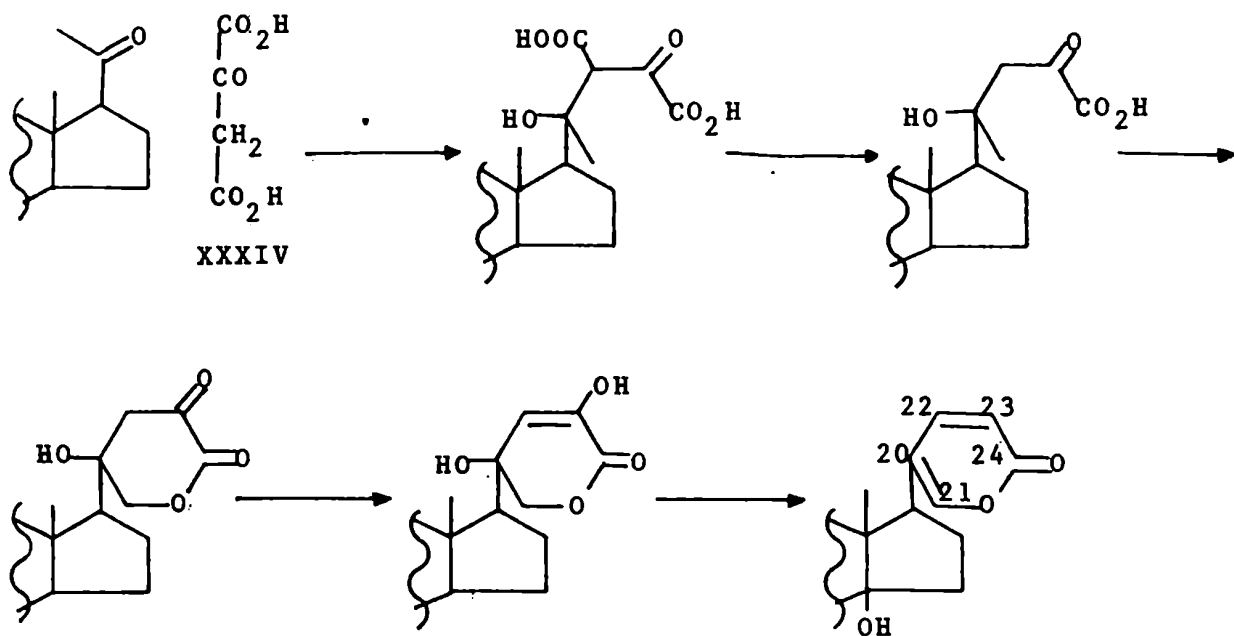


Figura 10: Hipótesis sobre la formación del anillo α -pirona.

C A P I T U L O I I

DESCRIPCION DE LA LABOR

REALIZADA

Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue dilucidar el origen biosintético del anillo α -pirona que forma parte del esqueleto carbonado de los bufadienólidos vegetales.

Se trabajó con *Scilla marítima* (Baker) variedad roja.

Según el esquema postulado de biosíntesis presentado en la Figura 10 los precursores del anillo bufadienólido serían:

- a) un esteroide del tipo 20-ceto-pregnano y
- b) un metabolito pequeño de 3 ó 4 átomos de carbono de los cuales el ácido oxalacético parecía ser el más indicado.

Se inocularon en dichos bulbos los siguientes precursores marcados con ^{14}C :

- a) Precursores inoculados que fueron adquiridos a firmas comerciales.

Acetato de sodio - ^{14}C

Piruvato de sodio - 1- ^{14}C

Acido succínico - 1,4- $^{14}\text{C}_2$

- b) Precursores inoculados que fueron sintetizados para este propósito:

Acido oxalacético-4- ^{14}C

Acido oxalacético-1,2- $^{14}\text{C}_2$

Con el objeto de verificar diferencias que pudieran ocurrir en los procesos metabólicos relacionados con la biosíntesis, se realizaron inoculaciones en distintas épocas del año, y con distintas técnicas, según la presencia o ausencia de hojas en

las plantas.

Luego se aislaron los bufadienólidos presentes en cada bulbo inoculado y se purificó el scillirósido obtenido en cada caso.

El estudio posterior consistió en una degradación del scillirósido radiactivo obtenido en cada una de las inoculaciones.

Se describirán detalladamente a continuación las siguientes etapas:

- 1) Síntesis de trazadores marcados.
- 2) Inoculación de trazadores.
- 3) Aislamiento de scillirósido.
- 4) Reacciones de degradación.

Síntesis de Trazadores

Con el objeto de comprobar el camino de biosíntesis propuesto en la Figura 10, se llevó a cabo la síntesis del ácido oxalacético (XXXIV) con marcación radiactiva en distintos carbonos:

- a) ácido oxalacético-4-¹⁴C: esta marcación no debería localizarse en la estructura final del bufadienólido.
- b) ácido oxalacético-1,2-¹⁴C₂: esta marcación debería hallarse en la estructura final del bufadienólido, localizada en los carbonos 23 y 24 del mismo.

Métodos para la Síntesis del Acido oxalacético

Método 1

Por condensación de los ésteres etílicos de los ácidos acético y oxálico, con etóxido de sodio, se obtuvo el derivado sodado del oxalacetato de dietilo^{60,61}. Luego de débil acidificación se separó el oxalato de dietilo aceitoso, que se purificó por destilación a 24 Torr. La hidrólisis final para obtener el compuesto (XXXIV) se realizó con ácido clorhídrico 1 N a reflujo⁶².

Este último paso disminuyó notablemente el rendimiento global de la reacción, y por lo tanto, se descartó para la síntesis del compuesto radiactivo.

Método 2

Un camino sintético alternativo consistió en la condensación de los ésteres *ter*-butílicos de los ácidos acético y oxálico, utilizando *ter*-butóxido de potasio^{63,64}. Se obtuvo, entonces, la sal de potasio del oxalacetato de *diter*-butilo (XXXVII) que, luego de acidificación y extracción, se trató en benceno anhidro y *p*-toluen-sulfónico para obtener el compuesto buscado (XXXIV)⁶⁵.

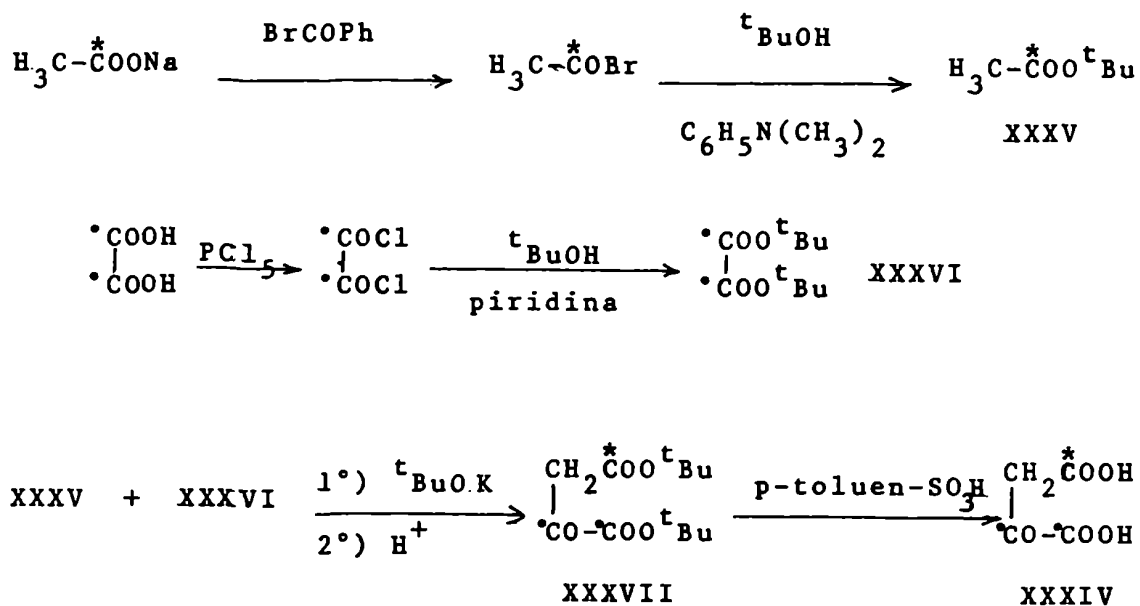
Este último paso de eliminación resultó producirse con alto rendimiento, gracias a la labilidad de los ésteres *ter*-butílicos, y permitió, asimismo, el aislamiento como un sólido del ácido oxalacético en su forma enólica (más estable): *trans*-hidroxifumárico, evitándose reacciones secundarias de descomposición.

Según fuera la marcación radiactiva final deseada para el ácido oxalacético se debió partir alternativamente de acetato de *ter*-butilo-1-¹⁴C (XXXV), o de oxalato de *diter*-butilo-1,2-¹⁴C₂ (XXXVI).

El esquema de síntesis del ácido oxalacético (XXXIV) marcado en distintos carbonos se presenta en el Esquema 1.

Para la obtención del acetato de *ter*-butilo-1-¹⁴C (XXXV) se hicieron reaccionar bromuro de benzofilo y acetato de sodio-1-¹⁴C anhidro⁶⁷, destilándose de la mezcla de reacción el bromuro de acetilo-1-¹⁴C. Debido a la labilidad frente a la humedad que presenta el mencionado halogenuro de ácido no se lo aisló, sino por el contrario, se lo recogió directamente sobre los reactivos de esterificación. Se purificó a XXXV por destilación.

Para la obtención del oxalato de diter-butilo-1,2- $^{14}\text{C}_2$ ⁶⁶ (XXXVI) se hizo reaccionar pentacloruro de fósforo con ácido oxálico-1,2- $^{14}\text{C}_2$ anhidro finamente pulverizados y con buena agitación durante tres días. Luego se destiló del sistema el dicloruro de oxalilo formado, el que se esterificó inmediatamente. El compuesto (XXXVI) se purificó por recristalización.



Esquema 1 : Síntesis del ácido oxalacético-4- ^{14}C (*),
y 1,2- ^{14}C (°).

2) Inoculación de precursores

Como ya se describió anteriormente las plantas de *Scilla* presentan dos períodos anuales bien diferenciados por la presencia o carencia de follaje. Debido a que los estudios acerca del contenido en scillirósido de los bulbos, que figuran en literatura, fueron realizados sobre ejemplares oriundos de la zona del Mar Mediterráneo, se trató de verificar dichos resultados sobre bulbos de la variedad roja provistos por la Facultad de Agronomía local. Sin duda, la especie ha debido adaptarse al clima más fresco y a un suelo distinto en nuestra latitud.

Fue por este motivo que se inocularon precursores marcados en distintas épocas del año. Los resultados obtenidos fueron similares a los que figuran en bibliografía, y se discutirán más adelante (Tabla 3).

En los meses en que no había hojas presentes, la inoculación se efectuó directamente en el bulbo, practicándose orificios con sacabocados. (Método A).

El precursor se inyectó diluido en solución reguladora, de modo tal de llenar dichos orificios. Luego se los cerró con un tapón del mismo tejido del bulbo.

Debido a la poca circulación de metabolitos que supusimos tenía lugar en el bulbo, se practicaron orificios lo más pequeño y profundo posibles. Para esto se construyó un sacabocados especial, lográndose perforaciones de 3 mm de diámetro por 15 cm de longitud. Se practicaron tres orificios por día durante cuatro días consecutivos, inoculando cada vez un do-

INO C U L A C I O N S C I L L I R O S I D O obtenido

É	Precursor Inoculado	Canti- dad (mg)	Act.Esp. dpm/mmol	Act.Tot. dpm	MI	Mes	TI	Cant. mg.	Act.Esp. dpm/mmol	Act.Tot. dpm	Inc.Absol †
1	Acetato-1- ¹⁴ C	2,1	1,3 x 10 ¹¹	3,3 x 10 ⁹	B	Agos	21	80	1,02 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁶	0,04
2	Acetato-1- ¹⁴ C	1,4	1,3 x 10 ¹¹	2,2 x 10 ⁹	B	Mayo	18	81	1,5 x 10 ⁶	2,03x 10 ⁵	0,009
3	Piruvato-1- ¹⁴ C	8,3	1,4 x 10 ¹¹	1,1 x 10 ⁹	B	Ago	22	51	1,6 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁴	0,0012
4	Succina- to-1,4- ¹⁴ C ₂	1,01	2,6 x 10 ¹¹	2,2 x 10 ⁹	A	Dic	9	100	6,1 x 10 ⁴	9,88x 10 ³	0,00045
5	Oxalaceta- to-4- ¹⁴ C	72	2,0 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁸	B	Set	15	40	1,0 x 10 ⁴	0,4 x 10 ³	0,0004
6		68	2,0 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	B	May	20	23	2,3 x 10 ⁴	0,8 x 10 ³	0,00085
7		131	1,7 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁸	B	Set	13	27	1,3 x 10 ⁵	5,6 x 10 ³	0,0033
8	Oxalaceta- to-1,2- ¹⁴ C ₂	141	1,7 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁸	B	Abr	21	18	1,4 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁴	0,021
9		63,2	3,6 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁸	A	Dic	7	715	4,7 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁴	0,032

Tabla 3: E= entrada; MI= método de inoculación, A: en ausencia de hojas, B: en presencia de hojas; TI= Tiempo de inoculación (en días); Inc.Abs.= Se define como la actividad total presente en el scillir6si do aislado dividido por la actividad total inoculada en el bulbo.

ceavo del volumen total a inocular. En los casos de inoculación de oxalacetato se separó la masa total en cuatro fracciones y se disolvieron en el momento mismo de la inoculación para evitar reacciones de descomposición.

En los meses en que la planta presentaba hojas, el método de inoculación se complementó (Método B) con mechas de hilo de algodón cuyos extremos pescaban en un frasquito con la solución del precursor. Así el precursor ingresaba a las hojas por capilaridad.

Existía también la posibilidad de que un bulbo con sus raíces intactas absorbiera el trazador de una solución hidropónica, que contenía, además, sorbato de potasio como antifúngico. (Método C). Pero se comprobó que la planta, carente de hojas, no aumentaba su peso luego de una semana semisumergida en este medio, y que el tejido de sus raíces comenzaba a ablandarse. Por lo tanto se descartó este medio de inoculación.

El tiempo transcurrido entre el primer día de inoculación y el día de cosecha de la planta, varió entre siete y veintidós. Cuando la inoculación se realizó en los últimos días de Diciembre, el tiempo transcurrido hasta la cosecha era menor, debido al riesgo de que, en el interín, comenzara la floración, con la consiguiente biodegradación del scillirósido ya formado.

Se realizaron en total 9 inoculaciones en distintos bulbos según se muestra en la Tabla 3.

3) Aislamiento del scillirósido.^{3,23}

Una vez cosechado cada bulbo, se descartaron sus raíces, se pesó, se cortó en pequeños trozos y se secó. El peso de cada bulbo seco representaba aproximadamente, el 10 % del peso del bulbo fresco.

Luego de pulverizarlo se procedió al aislamiento de los glicósidos de bufadienólidos. Existen dos técnicas en literatura que se basan en una extracción con metanol²³ o etanol³ respectivamente.

Por constatarse que luego de varias extracciones con etanol, aún quedaba en el residuo de scillirósido extraíble con metanol, se utilizó la técnica del metanol para todos los aislamientos.

Una vez concentrado el residuo alcohólico se agregó agua y tetraacetato de plomo, para precipitar antocianinas y colorantes. Esta mezcla de aspecto lechoso, se filtró por Celite, se diluyó con igual cantidad de agua y se eliminó completamente el alcohol por reducción del volumen a baja presión y temperatura.

De esta solución acuosa se extrajeron con cloroformo las sustancias poco polares (como por ejemplo los esteroides), y luego, en una extracción con cloroformo-butanol 7:3, se aisló la fracción que contenía los glicósidos cardiotónicos impuros, y que representaban el 1 % p/p del extracto seco inicial aproximadamente.

En la Figura 24 (pág.92) se detallan las incorporaciones de radiactividad que se localizaron en cada uno de los residuos

y extractos provenientes del proceso de aislamiento del scillirósido obtenido por inoculación de oxalacetato-1,2-¹⁴C (Tabla 3 entrada 9).

La obtención de scillirósido puro a partir de la fracción de glicósidos de bufadienólidos, se logró por cromatografía de adsorción en silicagel. El extracto se sembró en forma de pastilla y la elución se comenzó con cloroformo, aumentándose gradualmente el porcentaje de metanol. El scillirósido se eluyó con una solución de 4% de metanol en cloroformo.

La forma cristalina se logró por recristalización de metanol-agua.

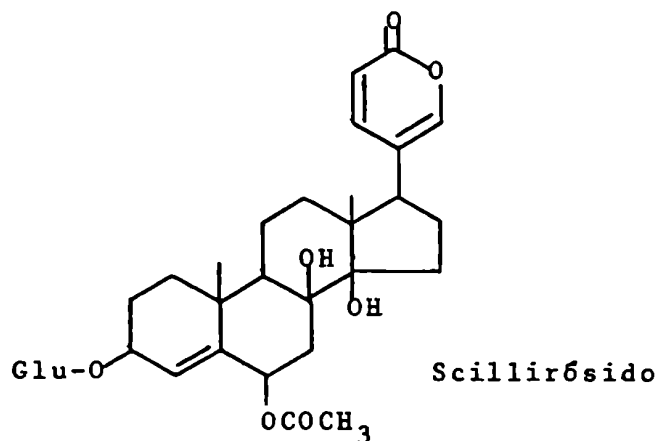
4) Reacciones de degradación del scillirósido.

Con el objeto de establecer en forma inequívoca el origen biosintético de los carbonos constituyentes del anillo α -pirona en los bufadienólidos vegetales, debieron llevarse a cabo secuencias de degradación sobre el scillirósido radiactivo. Se pudieron aislar así, determinados grupos o átomos, y medir la incorporación radiactiva lograda en cada uno de ellos.

Dichas secuencias degradativas se muestran en la Figura 11.

Excepto los caminos indicados como a), b) y g), que no condujeron a resultados satisfactorios, el resto, se aplicó sobre scillirósido obtenido por inoculación con distintos precursores marcados.

Además se extendió la aplicabilidad de estas secuencias, ensayándolas sobre la estructura de proscillaridina (II).



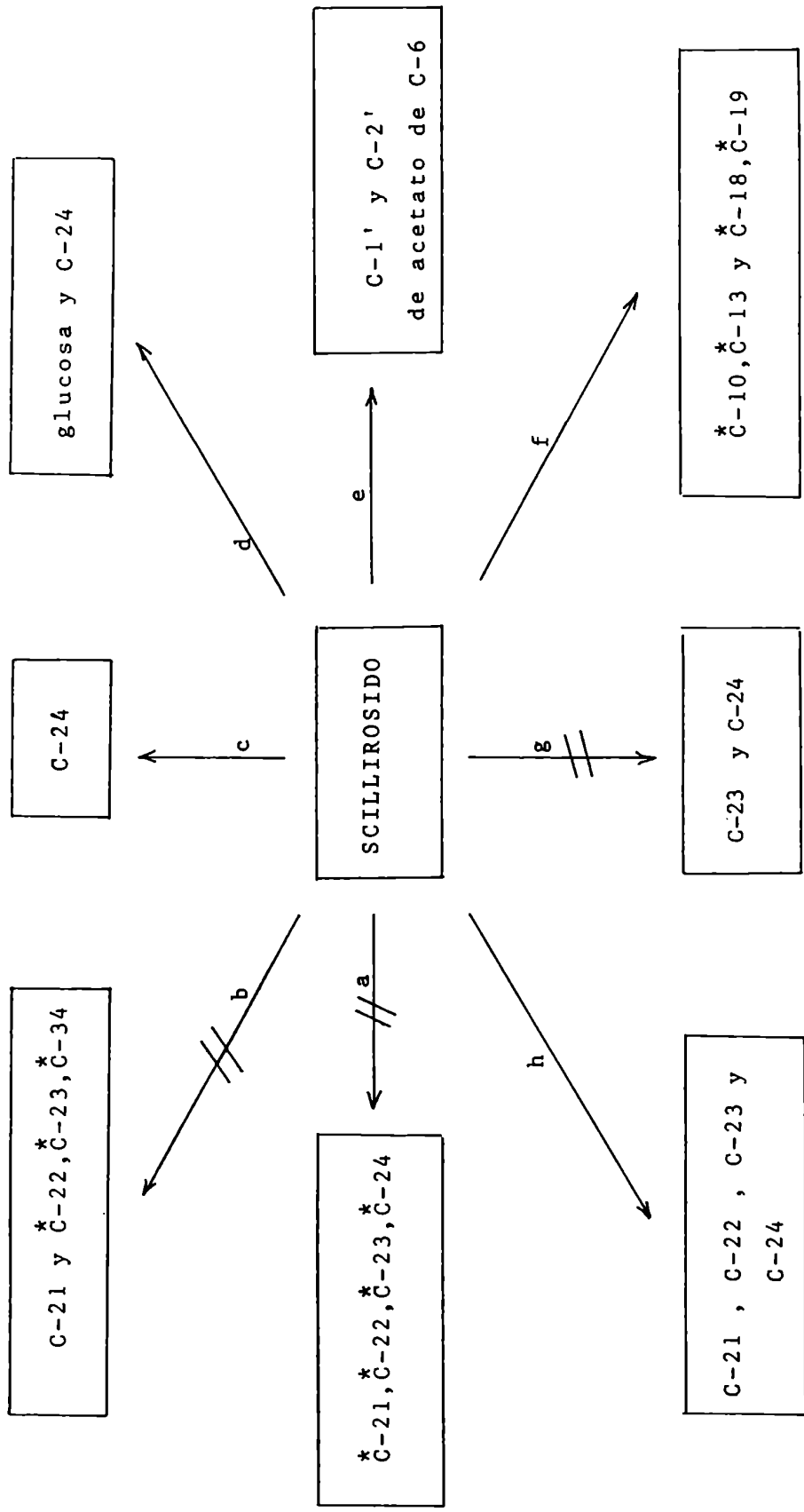


Figura 11 : a,b,c,d,e,f,g y h son secuencias degradativas llevadas a cabo sobre la estructura de scillirósido , con el objeto de aislar los carbonos incluidos en los recuadros .

C : carbonos diferenciados en su aislamiento
 *C : carbonos indiferenciados en su aislamiento .

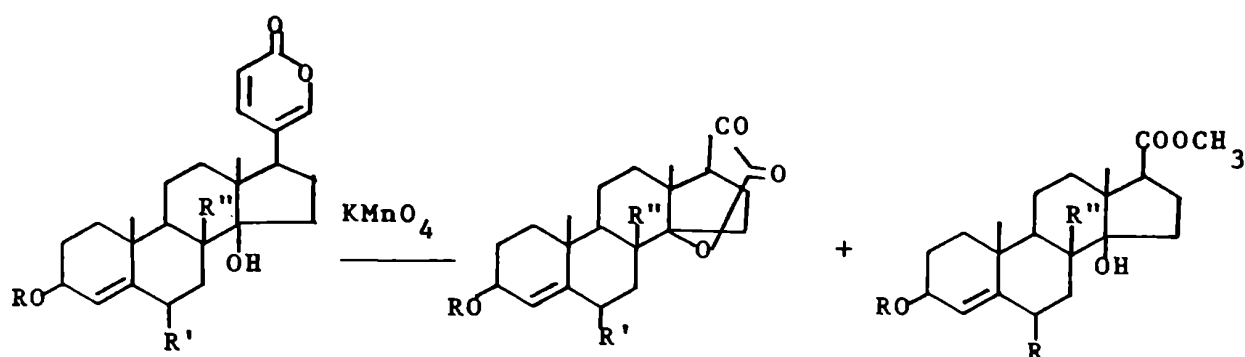
a) Reacción de degradación con permanganato de potasio.

En literatura está descripta la reacción de scillirosidina (Ia)^{22b} y scillaren A (IIa)⁶⁸, acetilados previamente, con permanganato de potasio utilizando acetona como solvente.

Según los autores, el reactivo sólo actúa sobre el anillo bufadienólido, sin afectar el doble enlace en 4(5), ni el resto de las funciones presentes en la molécula.

Una vez finalizada la oxidación ellos describieron la obtención de dos fracciones principales: una ácida que, luego de esterificación con diazometano, produjo un derivado del etianato de metilo (XXXVIII). La otra fracción, neutra, correspondía a una estructura de ceto-lactona (XXXIX).

La reacción propuesta se presenta en el Esquema 2.



Ia' : $\text{R} = \text{Ac}$, $\text{R}' = \text{OAc}$,
 $\text{R}'' = \text{OH}$

IIa' : $\text{R} = \text{scillabiosa}$
 peracetilada, $\text{R}' = \text{R}'' = \text{H}$

XXXIX

XXXVIII

Esquema 2: Degradación con permanganato de potasio.

De haber sido viable esta degradación para la molécula en estudio, se hubiera dispuesto de una forma rápida de eliminación de los carbonos correspondientes al anillo α -pirona, y la detección de radiactividad, tanto la remanente en la estructura esteroideal glucosidada, como la presente en los carbonos aislados (indiferenciados), como carbonato de bario.

Cuando se aplicó, en nuestro laboratorio, esta reacción sobre el tetraacétilscillirósido (XL), y se analizó la mezcla de reacción por ccd, se observó la formación de por lo menos, cinco productos.

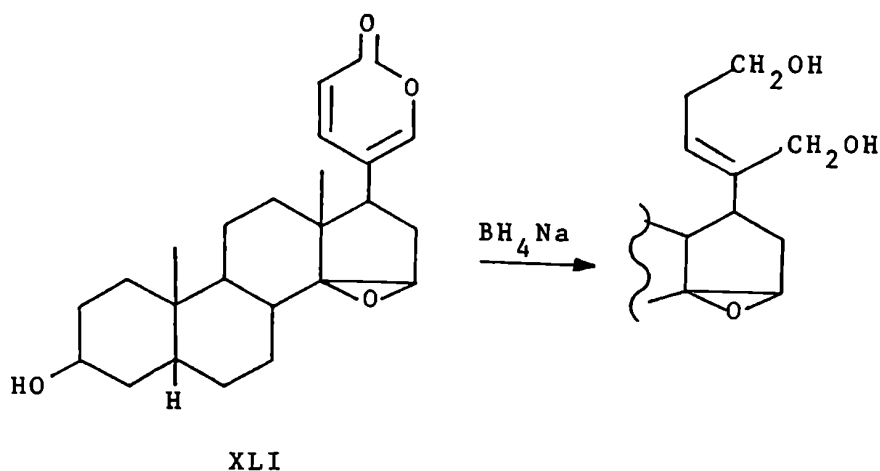
Los componentes de dicha mezcla resultaron ser muy difíciles de separar, y las extracciones con base sólo lograron enriquecimientos parciales en algunos de los productos más polares.

Debido a la escasez de scillirósido de partida, a la poca reproducibilidad de la reacción, y a la imposibilidad de aislar en forma pura los productos de reacción para determinar sus estructuras, se descartó esta secuencia degradativa.

b) Secuencia degradativa para la obtención de los carbonos 22, 23 y 24.

Se intentó aplicar sobre el scillirósido la secuencia de reacciones propuestas por Kamano^{69a,b} sobre resinobufogenina (XLI).

Según esta secuencia la acción del borohidruro de sodio conduciría a una reducción del carboxilo de C-24, con posterior apertura del lactol formado, adición 1,4 de hidrógeno a los dobles enlaces conjugados y una nueva reducción de los resultantes aldehidos de C-24 y 21, resultando así, una cadena lateral con la siguiente forma:



La obtención a partir de scillirósido de una estructura de este tipo, habría permitido, por acetilación y posterior ozonólisis oxidativa, aislar los carbonos 22, 23 y 24 bajo la forma de ácido β -acetilpropiónico y, por otro lado, el resto es-

teroidal acetilado.

Sin embargo la acción de los hidruros metálicos sobre los bufadienólidos no está claramente establecida, más aún, resultan contradictorios los resultados obtenidos por distintos grupos de investigadores^{24,70-72}.

Inicialmente se probó en nuestro laboratorio, la reducción del scillirósido con dioxano-agua (4:1) como solvente, a 0°C. Pero el compuesto resultó insoluble en esas condiciones. Se cambió entonces el solvente por metanol o etanol. En ambos casos a los pocos minutos de comenzar la reacción se observó, por ccd en silicagel, solvente de elución 1, revelador 2, la mancha correspondiente a scillirósido ($R_f=0,55$) y una mancha de aspecto totalmente similar de $R_f=0,4$. Ambas revelaron con fluorescencia verde-amarillenta. Con el tiempo, la proporción de scillirósido disminuía y al mismo tiempo aparecía un precipitado blanco cristalino. A las 24 hs. no se detectó scillirósido por ccd. Se filtró entonces la solución y se aisló el precipitado, cuyo espectro RMN-¹H indicó la desaparición del grupo acetato alílico de C-6, y la permanencia intacta de las señales del anillo α -pirona. Este compuesto se comportó por análisis en ccd como la mancha de $R_f=0,4$.

La formación de este precipitado impidió una reducción subsiguiente a baja temperatura, y sólo con reflujo se logró, a las 24 hs., la desaparición de la mancha de $R_f=0,4$ (debió agregarse esporádicamente más borohidruro). Sin embargo, la reacción perdió utilidad pues se obtuvo una mezcla compleja de varios productos muy polares que revelaron ya sin fluorescencia.

Se intentó, entonces, nuevamente con el solvente dioxano-agua, trabajando esta vez a temperatura ambiente para evitar la insolubilidad del scillirósido.

A las dos horas de reacción se detectó, por ccd, el producto de desacetilación ($R_f = 0,4$). Dos horas más tarde se detectaron dos productos más polares que revelaron con color marrón ($R_f = 0,2$ y $R_f = 0,1$). A las 48 hs. sólo se detectaron por ccd. las dos manchas más polares que resultaron ser difícilmente extrañables del medio de reacción, dada su gran solubilidad en dioxano-agua.

Ambos productos, aislados con un rendimiento máximo del 15%, no pudieron obtenerse puros como tales, ni como sus derivados acetilados, por cromatografía de adsorción en columna.

En el espectro de RMN de ^{13}C de la mezcla acetilada (se detalla en la Parte Experimental) se pudo observar que la doble ligadura en 4(5) permanecía intacta, y suponer una mezcla de compuestos que poseían además dobles enlaces en 20 (22) y 20 (21). El espectro de RMN- ^1H confirmó la presencia de la insaturación en 4(5).

c) Secuencia degradativa tendiente a aislar el C-24

Una posibilidad interesante resultó ser el aislamiento directo del C-24 del scillirósido como el carbono carbonílico de la benzofenona.

Un mecanismo degradativo de este tipo había sido llevado a cabo por E. Leete y colaboradores²⁷ sobre digitoxigenina (XXVI)

El método se basó en la reacción de grupos carbonilo con fenil-litio para dar, luego de una oxidación fuerte, ácido benzoico o benzofenona, según que el carbonilo original proviniera de una cetona o una lactona respectivamente.

Para poder aplicar este tipo de reacción sobre la molécula de scillirósido se debieron superar dos inconvenientes:

- 1) la búsqueda de un solvente apropiado para la reacción con fenil-litio, capaz de solubilizar a aquella molécula tan polar.
- 2) Eliminación de la precipitación de los alcóxidos de litio, debido a la presencia en el scillirósido de grupos hidroxilos libres, antes que se produjera la reacción deseada con el carbonilo de la lactona.

Ambos problemas se superarían bloqueando los grupos hidroxilos secundarios. Una acetilación de los mismos, implicaba la segura reacción del fenil-litio con los restos acetilo introducidos, imposibilitando así, el aislamiento de una benzofenona que proviniese exclusivamente del C-24.

Se procedió, entonces, a metilar los hidroxilos secundarios libres, presentes en el scillirósido.

El primer método que se probó fue, el que utilizaba una so-

lución de diazometano en cloruro de metileno y catálisis de trifluoruro de boro eterato⁷³. Como cosolvente para la disolución del scillirósido, se utilizó 1,2-dimetoxietano anhidro.

Durante el agregado de diazometano se observó la formación de abundante precipitado de polimetileno, hasta que se insolubilizó el bufadienólido. Luego del aislamiento se recuperó el producto de partida sin metilar.

Se intentó luego el método de Kuhn⁷⁴, aunque se sabía de antemano que para lograr una reacción total se debía proceder a remetilar.

Se trabajó con óxido de bario como base heterogénea, N, N-dimetilformamida secada sobre óxido de bario como solvente, e ioduro de metilo como agente metilante.

El producto aislado de tipo vítreo mostró por ccd (silica gel, solvente de desarrollo 2, revelador 1), ser una mezcla de dos productos principales con polaridad mucho menor que el scillirósido de partida, habiendo éste desaparecido.

Los intentos de analizar la mezcla por cgl fueron infructuosos debido a la descomposición de la muestra bajo todas las condiciones probadas.

Dado que el producto de metilación resultó ser soluble en solventes poco polares se decidió probar sobre éste la reacción con fenil-litio, sin haber obtenido un único producto totalmente metilado; ya que, si bien éste se lograba con una remetilación, la pérdida de rendimiento se hacía importante.

La Figura 12 muestra el espectro de RMN-¹H para el producto de metilación del scillirósido.

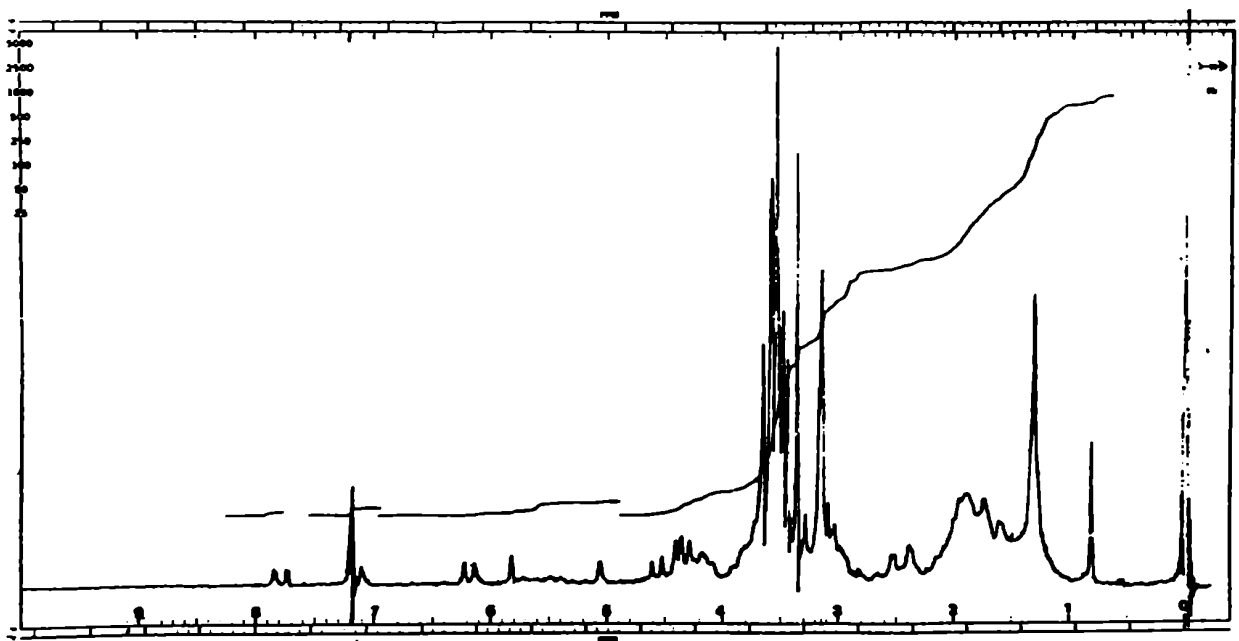


Figura 12: Espectro RMN-¹ del producto de metilación del scillirósido.

Dos datos importantes se pudieron deducir de la observación del espectro y su comparación con el del scillirósido intacto (Figura 13).

En primer lugar se observa la pérdida del grupo acetato alílico del carbono 6. En segundo lugar, se observa la introducción de seis grupos metoxilo, cuatro correspondientes al azúcar, otro, proveniente de la metilación del hidroxilo de C-6, y el último, puede provenir de la metilación del hidroxilo vinílico de C-21.

La apertura de la lactona insaturada se manifiesta en la señal obtenida a $\delta = 3,64$ proveniente del grupo $\text{CH}_3\text{OOC-}$ del C-24.

De esta forma se modifica la estructura de la cadena lateral obteniéndose un esqueleto del tipo *a*. (Figura 14).

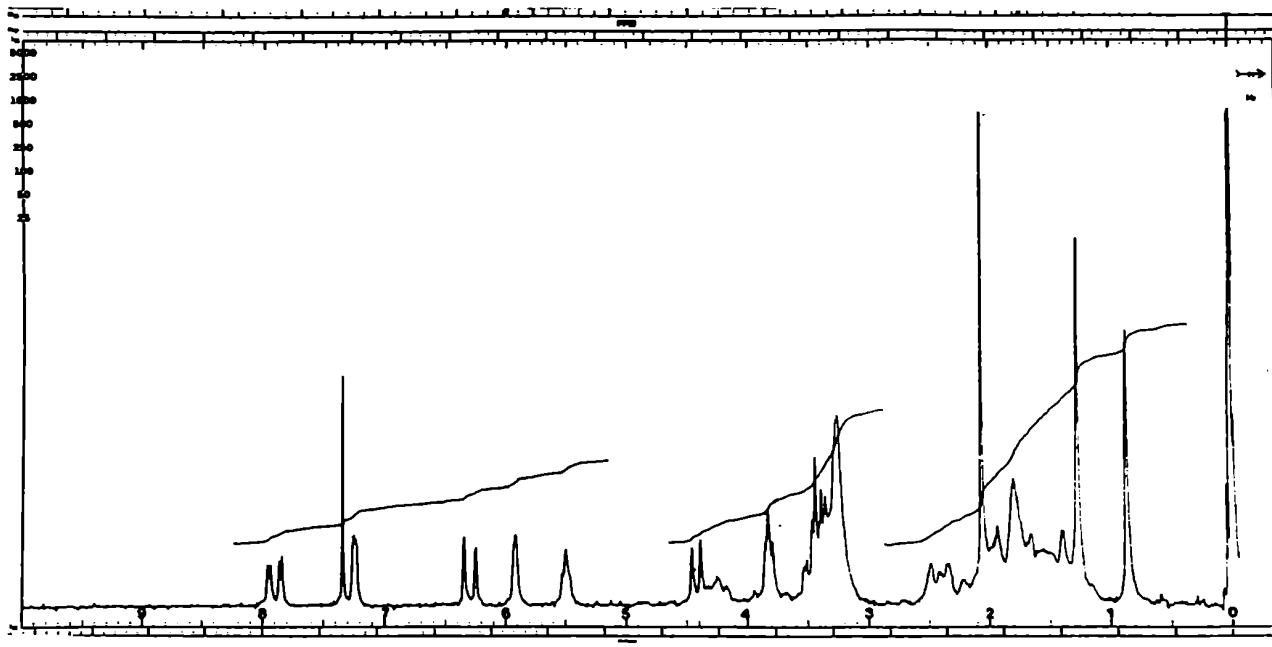


Figura 13: Espectro de RMN-¹H de scillirósido.

Los datos que figuran en literatura^{9,16,22a,77,78} describen una cadena lateral del tipo *b* para los casos en que se trató al bufadienólido de partida con metilatos en metanol anhidro.

Esta diferencia se basa posiblemente en los distintos mecanismos de reacción.

Si bien los productos de metilación presentaron el anillo α -pirona alterado, aún resultaron susceptibles de reaccionar con fenil-litio sobre el C-24 y, al mismo tiempo, se logró eliminar el otro centro reactivo similar: el acetato alílico.

La reacción del éster de C-24 para dar un alcohol terciario

con dos sustituyentes fenilos, puede lograrse también por tratamiento con bromuro de fenilmagnesio, en éter anhidro, pero esta reacción de Grignard sobre ésteres α, β -insaturados, da mayor porcentaje de adiciones conjugadas 1,4, que los correspondientes reactivos organo-litios⁷⁸.

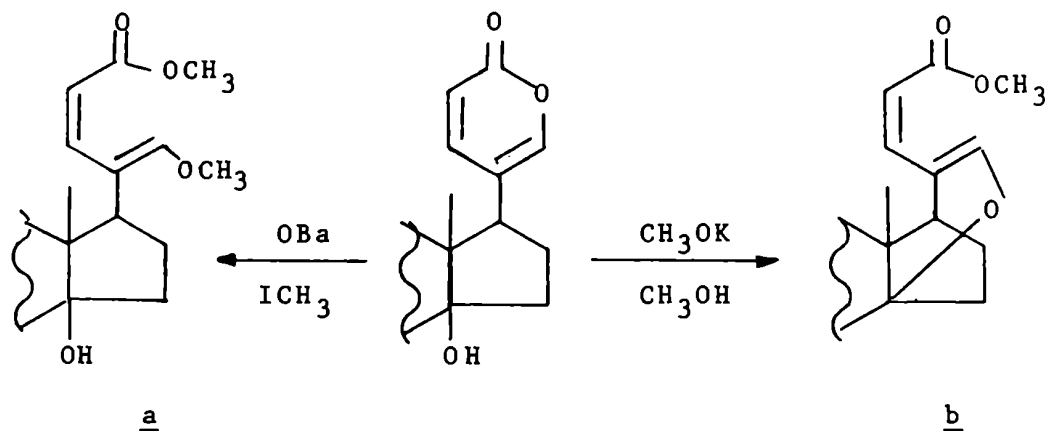


Figura 14

Se preparó el reactivo fenil-litio⁷⁹ y se lo guardó en frío como un sólido blanco. La reacción con la mezcla de productos metilados del scillirósido se llevó a cabo a 0°C, en tetrahydrofurano anhidro y bajo atmósfera de nitrógeno. Instantáneamente se observó la aparición de un color oscuro, lo que indicaba que se había verificado la adición de fenilos al C-24.

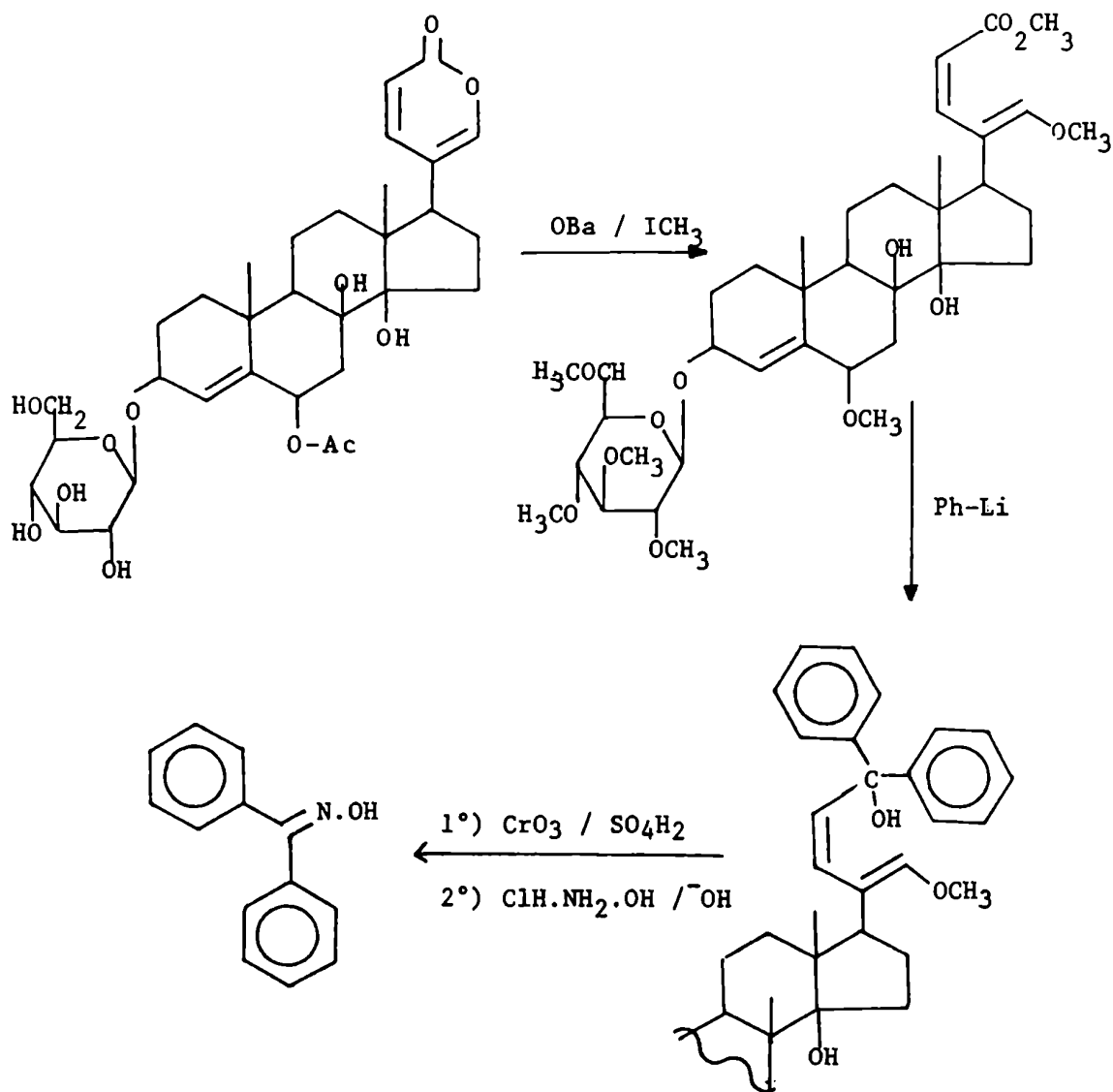
La reacción resultó ser muy sensible a trazas de humedad y se requirió un exceso de 30 a 50 veces de reactivo organo-litio, por estar presentes, además, grupos hidroxilos libres.

Cuando se aisló el producto crudo de reacción se comprobó por espectroscopía IR la ausencia de grupos carbonilo en la mo

lécua, y resultó además, estable frente al análisis por cgl.

La secuencia degradativa descrita se presenta en el Esquema 3.

El producto crudo de fenilación se sometió a oxidación con trióxido de cromo en ácido sulfúrico diluido²⁷, y se destiló por arrastre con vapor. El destilado se extrajo con éter y la benzofenona aislada se derivatizó a su oxima. Se purificó por recristalización de etanol 95 %.



Esquema 3 : Secuencia degradativa tendiente a aislar el C-24 del scillarósido.

d) Secuencia degradativa tendiente a aislar la D-glucosa y el C-24 del scillirósido.

d1) Hidrogenación del scillirósido.

Debido a la imposibilidad de separar al scillirósido en glucosa + aglicona intacta³ se procedió a hidrogenar previamente al bufadienólido. Con la eliminación del doble enlace⁴ (5) se facilitó la hidrólisis, lográndose buen rendimiento en la separación del azúcar y del resto esteroidal, aunque esta última estructura no correspondió exactamente a la de la hexahidroaglicona.

Se probaron distintas técnicas de hidrogenación, que se resumen en la Tabla 1. Todos los métodos de hidrogenación ensayados condujeron a mezclas de productos. El aspecto general de una ccd de la mezcla de hidrogenación presentó tres zonas diferenciadas (A, B, C), aunque en proporciones variables, según la técnica utilizada.

Ninguna de dichas zonas presentó fluorescencia al ser revelada con sulfúrico 50 %, lo que indicó ausencia del anillo bufadienólido.

De las tres zonas observables en ccd se supuso que la "B" correspondía al producto deseado: hexahidroscillirósido, por su R_f de valor similar al del scillirósido en silicagel, solvente de desarrollo 3. (R_f A= 0,75-0,8, R_f B= 0,45-0,5, R_f C= 0,2). Esta presunción se confirmó, como se detalla más adelante, y las mejores condiciones de hidrogenación fueron, enton-

ces, las de la entrada 5, Tabla 1.

Entrada	Catalizador (10 % P/P)	Solvente (100 % P/V)	Presión	zona predomi nante (ccd)
1	Platino	ác. acético	3 atm.	zona A
2	Platino	ác. acético	1 atm.	zona B
3	Platino	dioxano	1 atm.	N.R.
4	Platino	dioxano-acético (9:1)	1 atm.	zona A
5	Platino	metanol	1 atm.	zona B
6	Platino	metanol	3 atm.	zona B
7	Paladio/C	metanol	1 atm.	zona A

Tabla 1: Distintos sistemas de hidrogenación ensayados. El tiempo en cada caso se llevó hasta desaparición del scillirósido de partida.

La imposibilidad de obtener un producto único de reacción se debió a la combinación de las seis transformaciones que pueden ocurrir durante la hidrogenación:

- 1) Formación de la lactona totalmente saturada.
- 2) Formación de los isómeros 20R, 20S.
- 3) Formación de los isómeros 5 α y 5 β

- 4) Apertura reductiva del anillo bufadienólido a hidroxiaácido.
- 5) Hidrogenólisis del grupo acetato alílico.
- 6) Hidrogenólisis del grupo glucosa alílico.

Una vez elegidas las mejores condiciones de hidrogenación, se intentó aislar las fracciones observadas en ccd.

Resultó complicado separar la zona C de la B, debido a la gran polaridad de ambas, pero se utilizaron para lograrlo columnas de silicagel H, y presión de nitrógeno.

Zona A :

Por presentar R_f mayor debía contener los productos de hidrogenólisis del resto glucosa. Su peso representó un 5 a 10 % del total de los productos. El espectro de RMN- 1H indicó la desaparición de dobles enlaces, eliminación de la señal del C-1' (evidencia de la hidrogenólisis de la glucosa), y disminución en la intensidad de la señal correspondiente al acetato de C-6.

Zona B :

Se aisló un compuesto homogéneo por ccd, de aspecto vidrioso, cuyo espectro de RMN- 1H se muestra en la Figura 15.

Del espectro se concluyó la ausencia de dobles enlaces, la presencia del hidrógeno anomérico de la glucosa, y la aparición, disminuída en intensidad, de la señal del acetato de C-6.

Zona C :

Se aisló con gran dificultad un compuesto, homogéneo por ccd, muy polar, y escasamente soluble en metanol.

En su espectro de RMN-¹H se observó ausencia de dobles enlaces, presencia del hidrógeno anomérico, y ausencia de los protones metílicos del acetato de C-6.

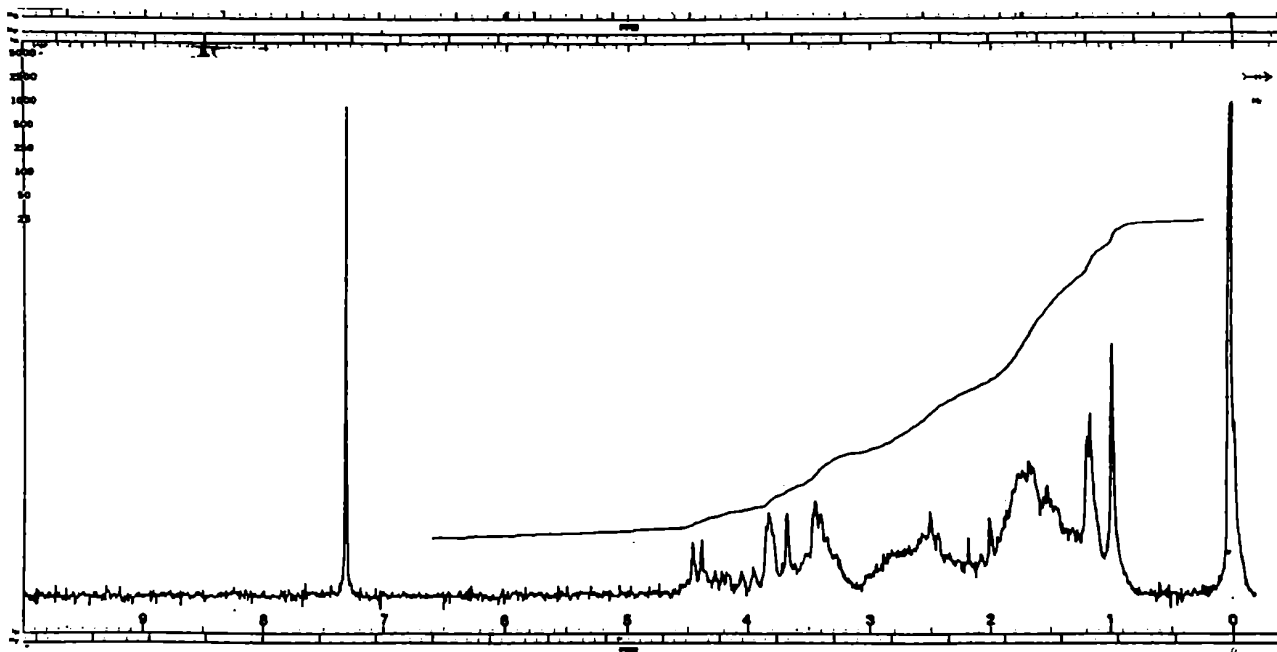


Figura 15: Espectro de RMN-¹H de la zona B de hidrogenación del scillirósido.

Dada su gran insolubilidad en la mayoría de los solventes orgánicos, fue imposible metilarlo en cantidad, para luego determinar fehacientemente su estructura. Sin embargo, se logró metilarlo sobre los puntos de siembra en ccd, tanto en la mezcla original, como en la siembra del producto aislado como zona C. En ambos casos luego del desarrollo del cromatograma, se observó la desaparición de dicha zona C, y simultánea aparición de manchas de mayor R_f. Se postuló, entonces, que se trataría.

de un hidroxí-ácido proveniente de la apertura reductiva del anillo α -pirona⁸⁰.

El espectro de masa de la mezcla de hidrogenación (entrada 5, Tabla 1) resultó concordante con las estructuras propuestas.

Para el logro de los objetivos buscados en la degradación del material radiactivo, fue innecesaria la separación de los productos de hidrogenación. Por lo tanto, se procedió a hidrolizar la mezcla cruda de hidrogenación.

d2) Hidrólisis del scillirósido hidrogenado.

Se probaron distintos métodos de hidrólisis que se presentan en la Tabla 2:

Entrada	ácido	relación ác.-solvente	normalidad final	solvente
1	SO ₄ H ₂ 2N	1 40	0,005	metanol
2	SO ₄ H ₂ 2N	1 : 80	0,0025	metanol
3	SO ₄ H ₂ 0,2N	1 1	0,1	metanol
4	SO ₄ H ₂ 0,1N	1 1	0,05	metanol-H ₂ O (1:1)

Tabla 2: Distintas condiciones de hidrólisis ensayadas sobre scillirósido hidrogenado. Las reacciones se interrumpieron cuando se observó la desaparición del producto de partida.

En todos los casos ensayados se obtuvieron mezclas de productos de hidrólisis, pero las condiciones más reproducibles, que además condujeron a una liberación cuantitativa del azúcar remanente y a un menor número de productos por análisis en ccd, resultaron ser las de la entrada 4, Tabla 2.

La hidrólisis total se logró en dicho sistema, con un reflujo de tres horas y media.

Luego de la extracción de la mezcla con cloroformo, se aisló glucosa de la fase acuosa.

Por acetilación de la misma se obtuvo el derivado cristalino β -acetil-(2,3,4,6-tetra-O-acetil)-glucopiranosido, impurificado en pequeñísima proporción con el isómero α .

Al analizar la fase orgánica remanente por ccd, se observaron nuevamente tres zonas O, P, y Q, cuyos valores de R_f resultaron ser: 0,8-0,85; 0,7 y 0,4-0,5 respectivamente.

Sorprendentemente cuando la mezcla de hidrólisis se guardó por un tiempo, un nuevo análisis por ccd reveló ausencia de la zona Q, en favor de un incremento de las zonas de mayor R_f .

El espectro de RMN- ^1H de la mezcla de agliconas obtenida, se muestra en la Figura 16.

En el espectro de la Figura 16 se observa la ausencia total de las señales del azúcar y del grupo acetato de C-6, así como la aparición de una señal a $\delta = 3,64$ proveniente de un éster metílico. La mezcla de agliconas fue acetilada y un espectro de RMN- ^1H de la misma se observa en la Figura 17.

Aparecen en el espectro de la Figura 17 la señal a $\delta = 5,25$ correspondiente al H-C-6 que se reacetiló, como en el scillirósido original, y un incremento de la señal a $\delta = 1,26$ que invo

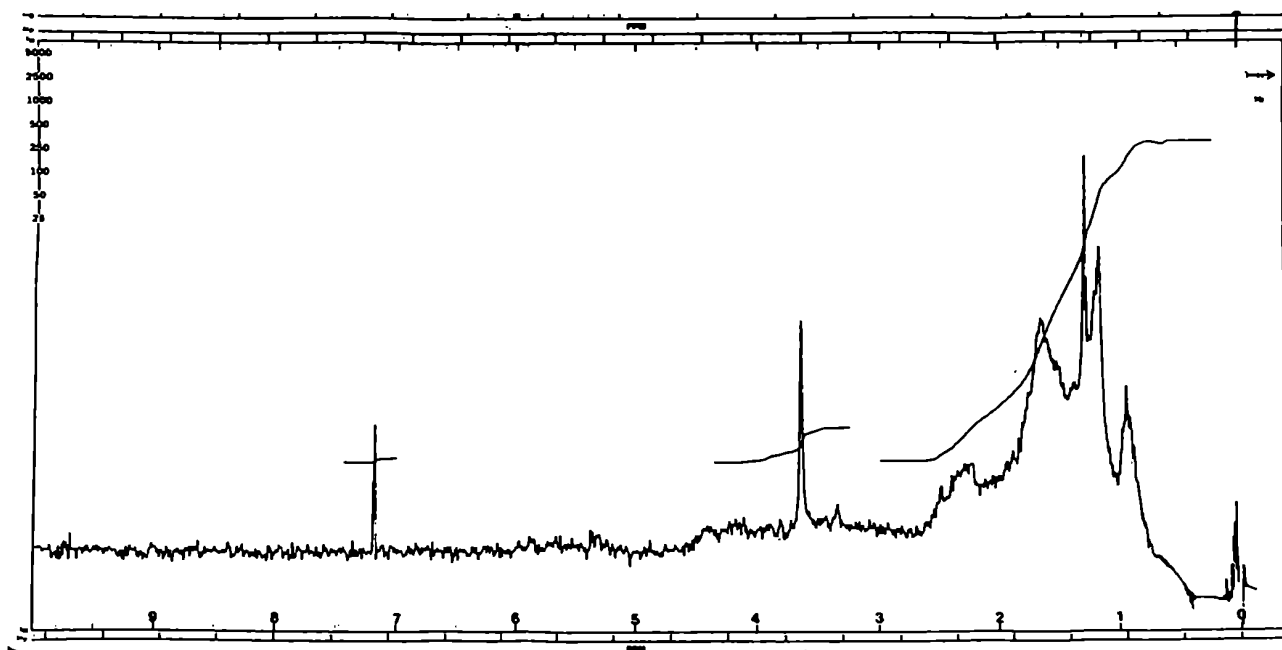


Figura 16: Espectro RMN-¹H de la mezcla de agliconas del scillirósido hidrogenado.

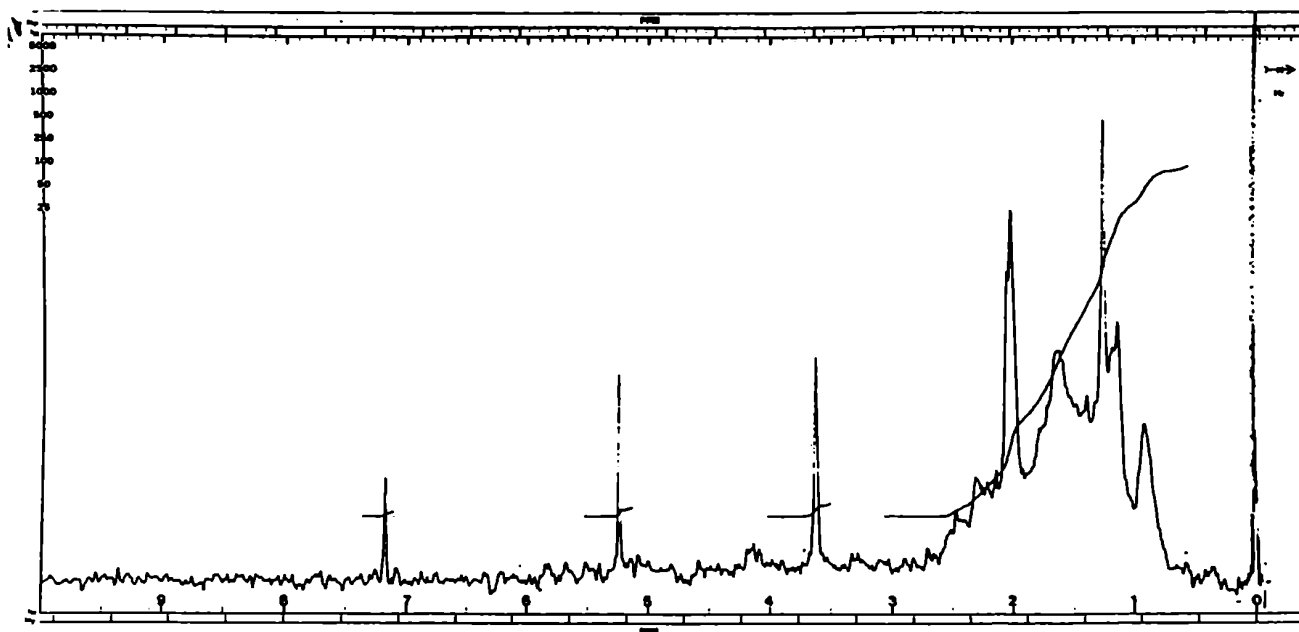


Figura 17: Espectro RMN-¹H de la mezcla de agliconas acetilada.

lucra al metilo-19 desplazado por la reaparición del grupo acetato de C-6, orientación β^{81}

El espectro de masa de la mezcla cruda de agliconas, resultó de aspecto singularmente simple, permitiendo una asignación tentativa a los fragmentos principales, que se muestran en la Figura 18.

Del estudio de los espectros de RMN y de masa pueden asignarse, entonces, la estructura de hidroxí-ácido a la zona Q del análisis por ccd por la mayor polaridad de esta fracción, que perdería una molécula de agua previo a la fragmentación para dar las estructuras XLI y XLII.

A la zona P se le atribuyó tentativamente la estructura $3\beta, 6\beta, 8\beta, 14\beta, 21$ -pentahidroxí-colanato de metilo, que perdería una molécula de metanol, previamente a su fragmentación, contribuyendo también a las estructuras XLI y XLII. También se incluiría en esta zona el correspondiente producto de hidrogenólisis del grupo acetato alílico : $3\beta, 8\beta, 14\beta, 21$ -tetrahidroxí-colanato de metilo.

Finalmente, la zona O correspondería a la estructura XLI.

Esta asignación estructural para los productos de hidrólisis luego de la reducción catalítica, además de corresponder por sus polaridades a la separación obtenida en ccd, explicaría el hecho comentado sobre la desaparición con el tiempo de la "zona Q", con el concomitante incremento de las restantes zonas.

A esta mezcla cruda de agliconas se la hizo reaccionar con fenil-litio en exceso, en forma análoga a lo indicado en la se

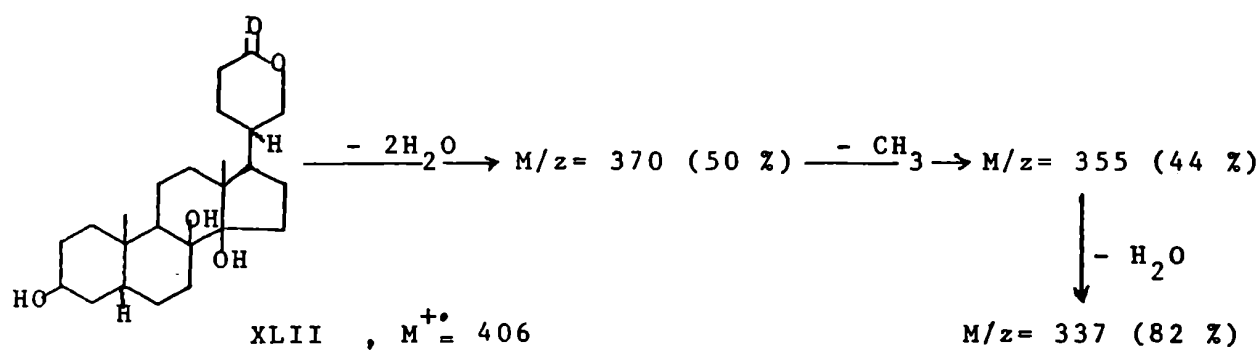
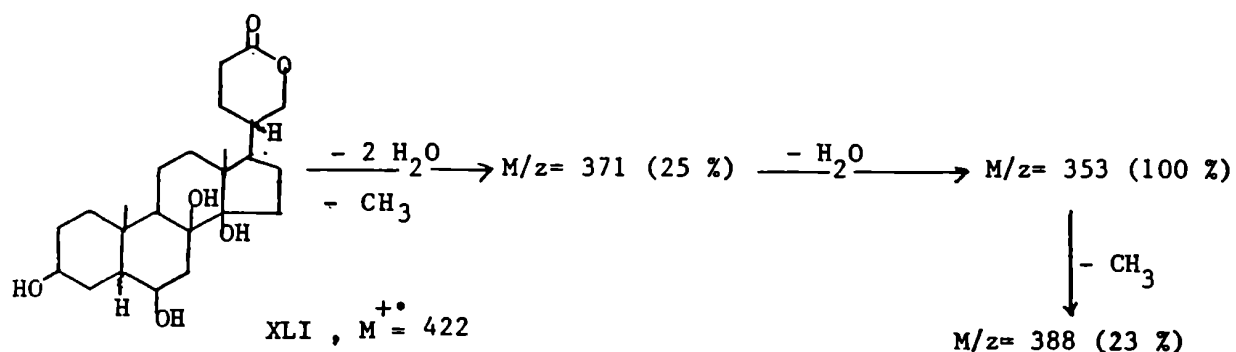
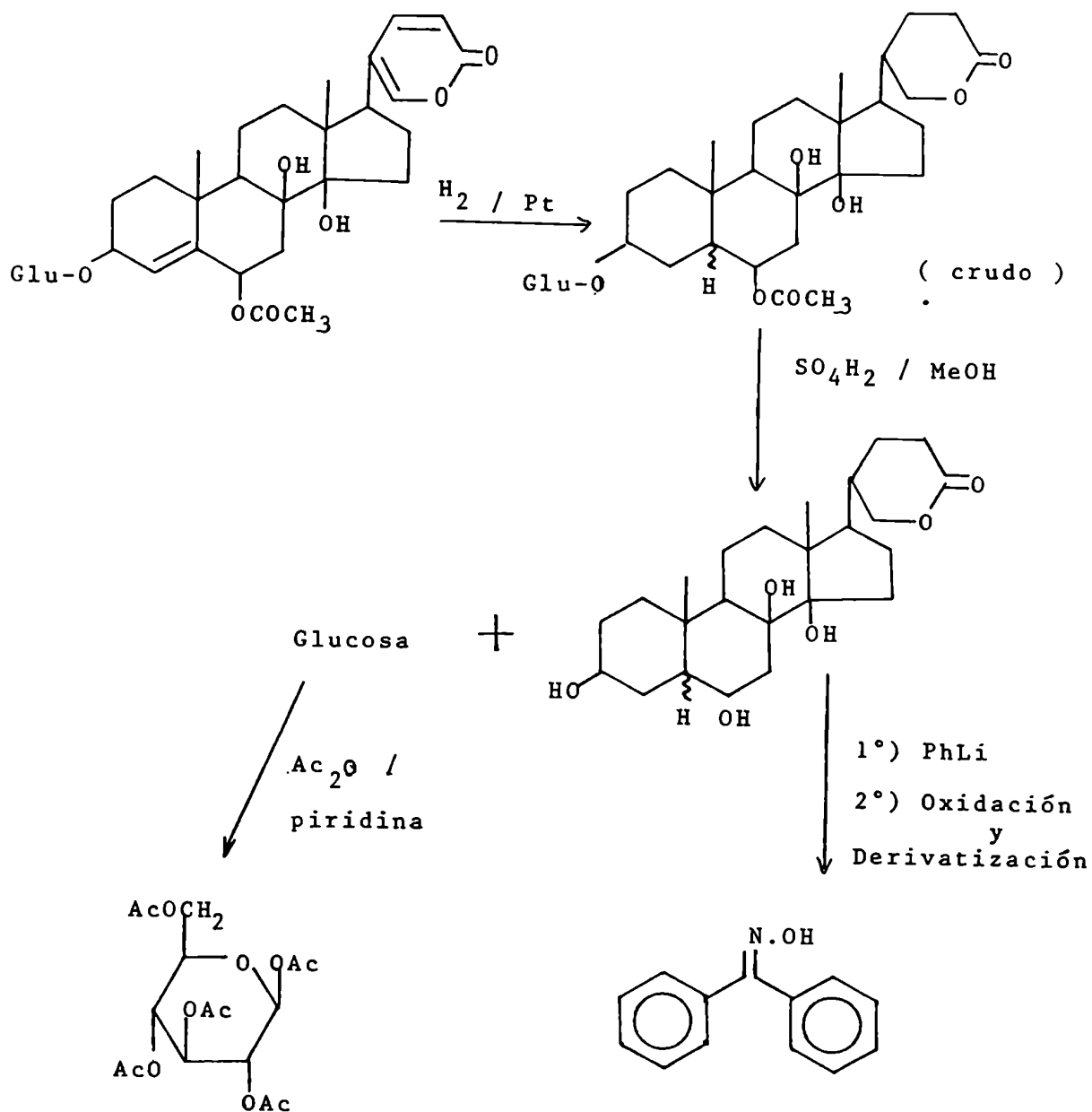


Figura 18: Principales fragmentos en el espectro de masa de la mezcla de agliconas del scillirósido hidrogenado. La estructura XLII proviene de la hidrogenólisis del grupo acetato alílico de C-6, ocurrida durante la hidrogenación catalítica.

cuencia degradativa c). Siguió luego la oxidación con trióxido de cromo, aislamiento de la benzofenona de C-24 y derivatización a su oxima.

La secuencia degradativa descrita se resume en el Esquema 4.



Esquema 4: Secuencia degradativa tendiente a aislar la glucosa y el C-24.

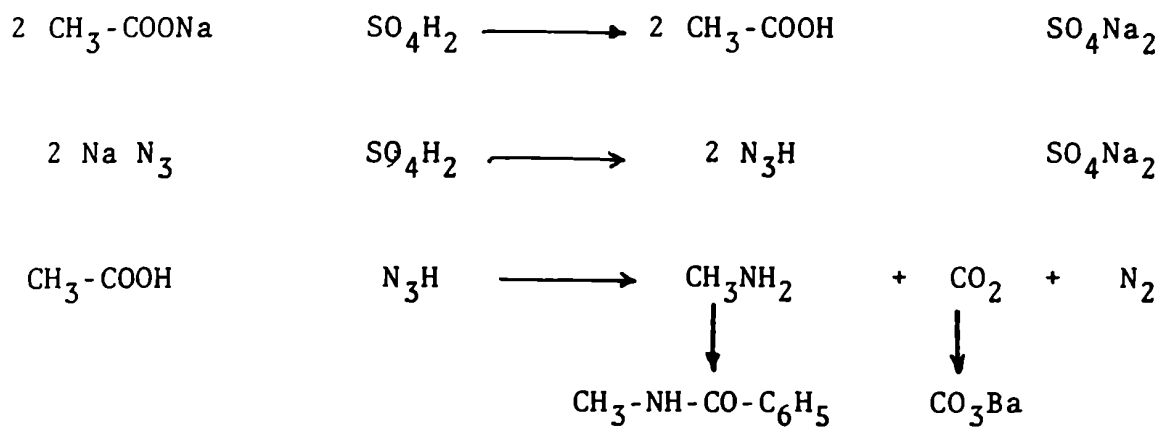
e) Secuencia degradativa tendiente a aislar independientemente los carbonos componentes del grupo acetato de C-6.

Los métodos descritos en literatura para aislar el grupo acetato de C-6 del scillirósido, se basan en hidrólisis alcalinas, que afectan la estructura restante del scillirósido^{3,16}.

Dada la escasa cantidad y la baja actividad específica del material radiactivo de partida, se pensó en emplear un método que permitiera aislar al grupo acetato, sin alterar imprevisiblemente al resto de la molécula. El camino elegido fue la metilación con óxido de bario e ioduro de metilo, descrito en la secuencia degradativa c). De esta forma se logró aislar como acetato de sodio al grupo buscado, a partir de las aguas madres de metilación.

El acetato de sodio se sometió luego a la degradación de Schmidt, para determinar la actividad específica de cada carbono. Este proceso consistió en hacer reaccionar al acetato de sodio aislado con azida sódica en medio ácido sulfúrico concentrado. Al cabo de unos minutos se recogió como carbonato de bario, el dióxido de carbono generado. Una vez completada la reacción se destiló la metilamina remanente, previa basificación del medio, y se la derivatizó a N-metilbenzamida.

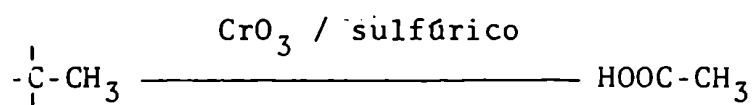
La secuencia descrita se presenta en el Esquema 5:



Esquema 5: Degradación de Schmidt sobre acetato de sodio (aislado del C-6 del scillirósido).

f) Secuencia degradativa tendiente a aislar los pares de carbonos 10 - 13 y 18 - 19.

La oxidación de Kuhn-Roth⁸² aplicada sobre una estructura esteroidal conduce a la obtención de dos equivalentes de acetato de sodio, cuyos metilos provienen de los carbonos 18 y 19, según la ecuación:



La aplicación de esta reacción sobre la estructura intacta del scillirósido tiene el inconveniente de la presencia de un grupo acetato ya existente en dicha molécula, y que no podría distinguirse de los obtenidos por oxidación.

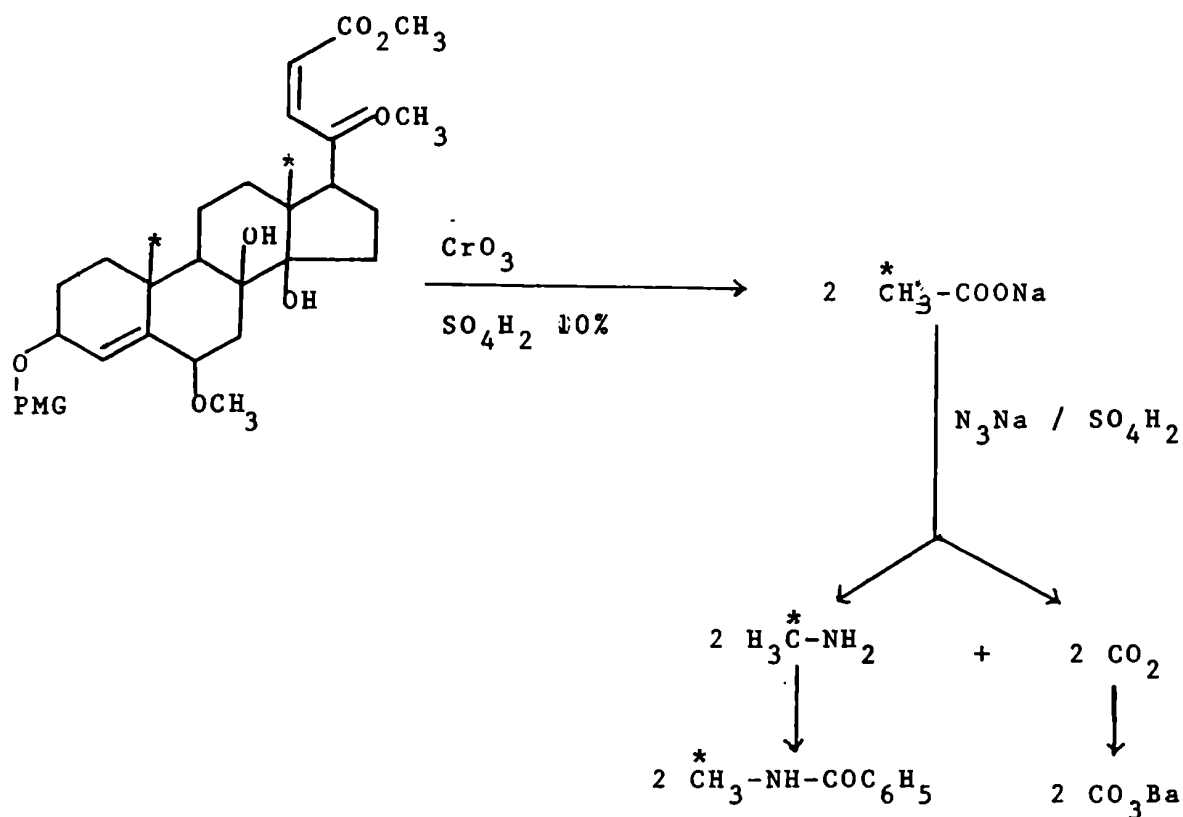
Se pensó entonces en metilar al scillirósido, ya que en las condiciones descritas de metilación se elimina a dicho grupo acetato, sin destruir al resto de la estructura esteroidal.

Por lo tanto la aplicación de la oxidación de Kuhn-Roth sobre el scillirósido metilado condujo, limpiamente, a la obtención de los carbonos 10 , 13 , 18 y 19 .

Una posterior degradación de Schmidt sobre el acetato de sodio obtenido condujo al aislamiento de los pares de carbonos 10 y 13 como carbonato de bario; y 18 y 19 como N-metilbenzamida.

La obtención de acetato de sodio y no de sales de ácidos de mayor número de carbonos, se comprobó por ccd de celulosa,

por comparación con patrones auténticos .
 La secuencia degradativa descrita se presenta en el Esquema 6 .



Esquema 6: Secuencia de oxidación de Kuhn-Roth y posterior degradación de Schmidt sobre el scillirosido metilado .
 PMG = Permetilglucosa .

g) Secuencia degradativa tendiente a aislar los carbonos 23 y 24 de scillirósido.

Con el objeto de aislar los carbonos 23 y 24 del scillirósido se estudió la posibilidad de introducir un doble enlace conjugado con el carbonilo de C-24, sobre una estructura previamente saturada.

Para lograr ese objetivo se postuló el siguiente esquema de reacciones:

- 1) Hidrogenación del bufadienólido.
- 2) Metilación del producto de hidrogenación.
- 3) Tratamiento del producto aislado en 2) con difenildiselenuro o cloruro de fenilselenio, para la formación del fenilselénido en el carbono α al carbonilo del éster de C-24^{83,84}.
- 4) Oxidación del fenilselénido con agua oxigenada para lograr la obtención del doble enlace 22 (23).^{85,86}

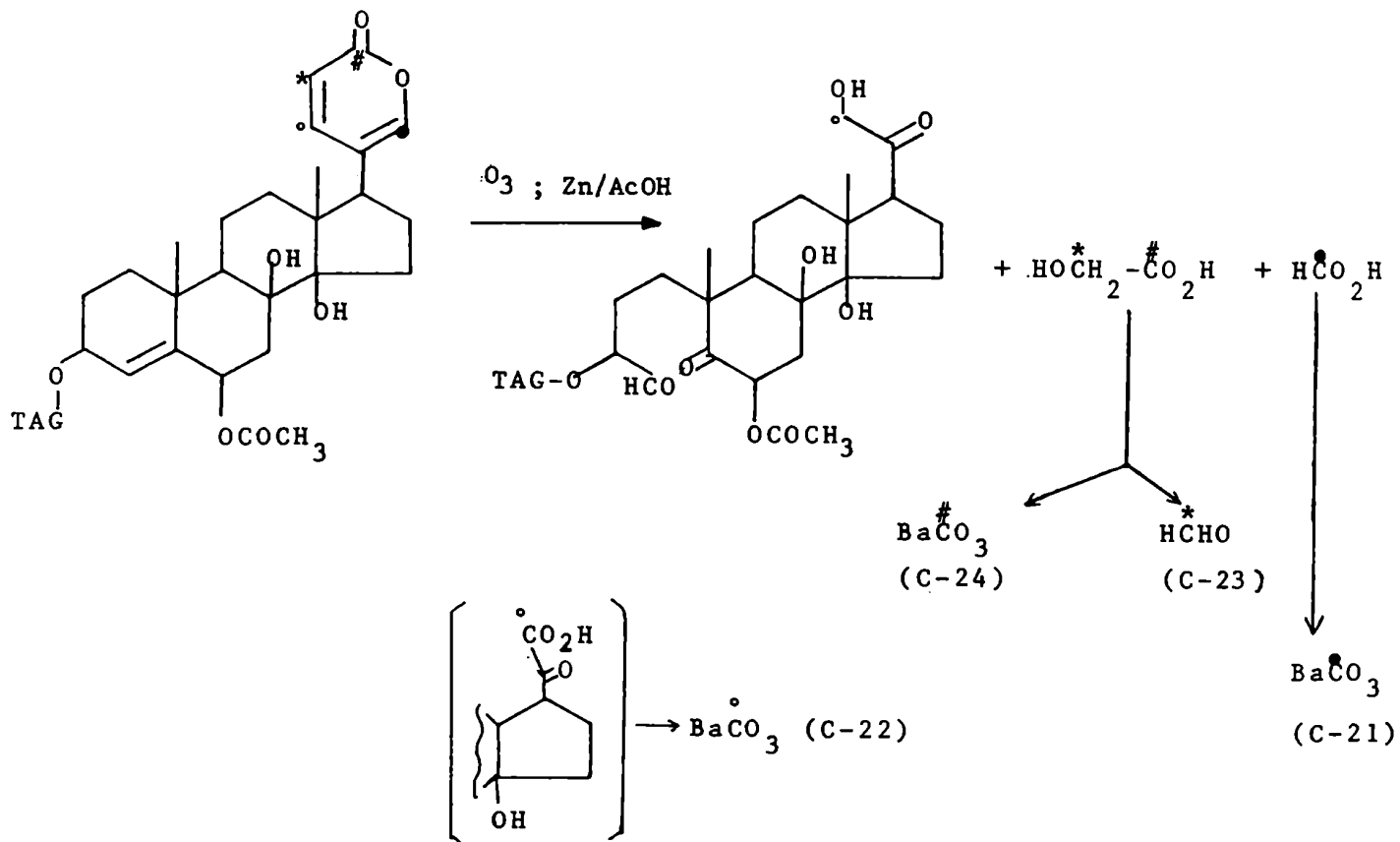
Finalmente el compuesto derivado del Δ^{22} -colanato de metilo se sometería a ozonólisis²⁷, aislándose ácido glicólico proveniente de sus carbonos 23 y 24.

Si bien los pasos de reacción (1) y (2) procedieron sin inconvenientes, no se pudo formar el fenilselénido (3).

Este inconveniente obligó a dejar de lado esta secuencia degradativa y se debió aplicar entonces la ozonólisis directa sobre el bufadienólido intacto, es decir con tres dobles enlaces afectables por ozonización.

h) Secuencia degradativa tendiente a aislar los carbonos 21, 22, 23 y 24 del scillirósido.

El aislamiento de los carbonos 21, 22, 23 y 24 se logró a través de una ozonólisis reductiva que permitió separar los carbonos 23 y 24 del scillirósido como ácido glicólico, el que por tratamiento posterior condujo al aislamiento de cada uno de sus carbonos. También se lograron captar los carbonos 21 y 22, según la secuencia degradativa que se muestra en el Esquema 7.



Esquema 7: Secuencia degradativa tendiente a aislar los carbonos 21, 22, 23 y 24 del scillirósido (aplicado a scillirósido radiactivo). (TAG= Tetraacetilglucosa).

En literatura figuran reacciones de ozonólisis sobre cardenólidos²⁷, bufadienólidos animales⁸⁷ y vegetales⁵⁸, pero en ningún caso los compuestos de partida presentaban doble enlace 4 (5).

En nuestro caso la ozonólisis se llevó a cabo sobre el tetraacetilscillirósido (XL), utilizando cloroformo como solvente y pasando la corriente de ozono hasta la desaparición del compuesto de partida demostrada por análisis en ccd.

La ruptura del ozónido se logró con polvo de cinc y acético 50 %²⁷. De la fase acuosa se separó el ácido fórmico (C-21) por arrastre con vapor, y luego fue oxidado y captado como carbonato de bario.

Del residuo de la destilación por arrastre se extrajo el ácido glicólico, el cual se sometió a una oxidación posterior con metaperiodato de sodio, aislándose el C-24 como carbonato de bario y el C-23 como derivado cristalino formaldehído-dimedona.

El residuo clorofórmico de la ozonólisis reductiva mostró en su RMN-¹³C la desaparición de las señales de los carbonos 4, 5, 20, 21, 22, 23 y 24, lo que evidenció una perfecta eficiencia en la ozonólisis de los dobles enlaces del tetraacetilscillirósido original.

Se observó simultáneamente la aparición de tres señales nuevas de grupos carbonilo de cetona o aldehído, aunque de baja intensidad. Se asignó a estas señales una correspondencia tentativa con los carbonilos resultantes en los carbonos 4, 5 y 20 ($\delta = 200, 217$ y 208 ppm respectivamente).

La presencia de una agrupación 21-hidroxi-20-ceto en el producto residual se determinó por la señal característica en RMN-¹H

a $\delta = 4,2$, que se desplaza a $\delta = 4,7$ ($J = 4$ Hz) por acetilación a 21-acetoxi-20-ceto derivado.

El H-aldehídico de C-4 se observó en RMN- ^1H a $\delta = 9,5$ y también en menor proporción, se observó una señal a $\delta = 8,1$ asignada tentativamente al grupo aldehído de la agrupación 21-aldehído-20-ceto esteroide que podría haberse formado en la reacción.

El espectro de RMN- ^1H del extracto clorofórmico crudo de ozonólisis se muestra en la Figura 19.

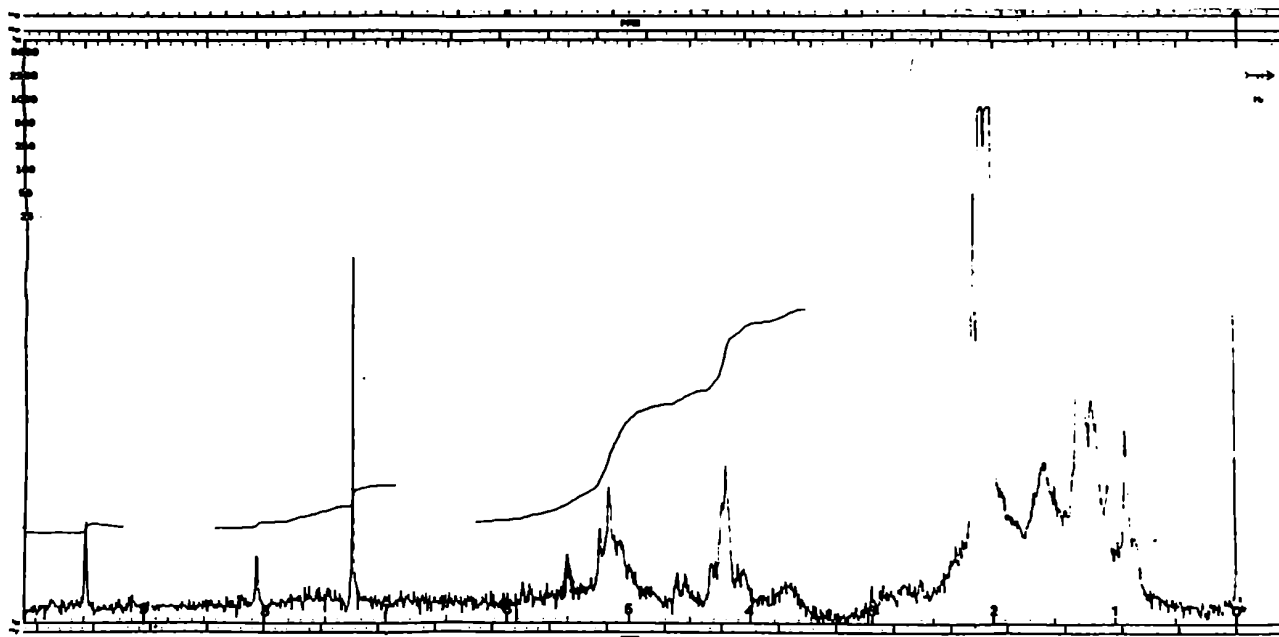


Figura 19: Espectro de RMN- ^1H del residuo crudo del extracto clorofórmico de la ozonólisis del tetraacetilscilirósido.

Las señales observadas evidenciaban una reducción del ozónido, obteniéndose la mezcla de compuestos con funciones 21-aldehído-20-ceto y 21-hidroxi-20-ceto, con gran proporción de

de este último .

Este producto crudo de ozonólisis se trató con ácido orto-periódico en metanol-agua, y se captó el C-22 como derivado cristalino del formaldehído con dimedona. El resto esteroidal presentó en RMN-¹H la señal del éster metílico en C-20, y de metil acetales de los carbonilos remanentes.

Debido a que en las experiencias con productos radiactivos las cantidades a degradar eran pequeñas, se realizó este último paso (captura del C-22) tratando al extracto clorofórmico de la ozonólisis con agua oxigenada en dioxano, y luego con ácido ortoperiódico, aislándose así el C-22 como carbonato de bario (proveniente del 21-aldehído o el 21-hidroxi indistintamente).

Secuencia degradativa tendiente a aislar el C-24 de proscillaridina.

Proscillaridina (II) cuyo espectro de RMN-¹H se muestra en la Figura 20, fue sometida a reacciones análogas a las descritas para el scillirósido.

Los resultados obtenidos fueron absolutamente similares.

En todos los casos se mantuvo la relación estequiométrica utilizada para scillirósido, excepto para la reacción con fenil-litio, donde se lograron resultados similares utilizando sólo un exceso de 30 veces molar del organolitio. Esto se logró, probablemente, por la ausencia del hidroxilo terciario del C-8 y del hidroxilo secundario de C-6' en la ramnosa con respecto a la glucosa.

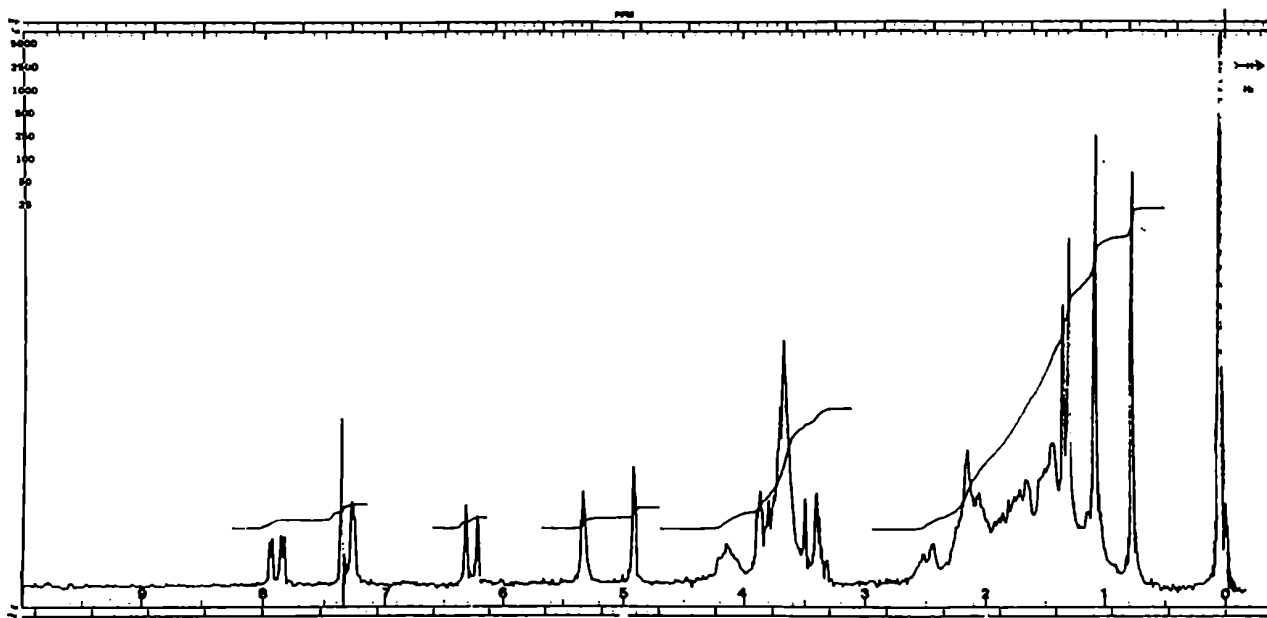


Figura 20: Espectro de RMN-¹H de proscillaridina .

Secuencia degradativa tendiente a aislar la L-ramnosa y el carbono 24 de proscillaridina.

a) Hidrogenación de proscillaridina.

Al igual que lo encontrado para el caso del scillirósido, la presencia de un doble enlace en 4 (5) dificultó la hidrólisis ácida directa sobre proscillaridina para obtener, con buen rendimiento, el azúcar y la aglicona.

Este inconveniente se solucionó por hidrogenación catalítica previa. Las técnicas probadas anteriormente para el scillirósido (Tabla 1) se aplicaron sobre proscillaridina, obteniéndose resultados totalmente coincidentes.

Nuevamente se observaron tres zonas diferenciadas por un

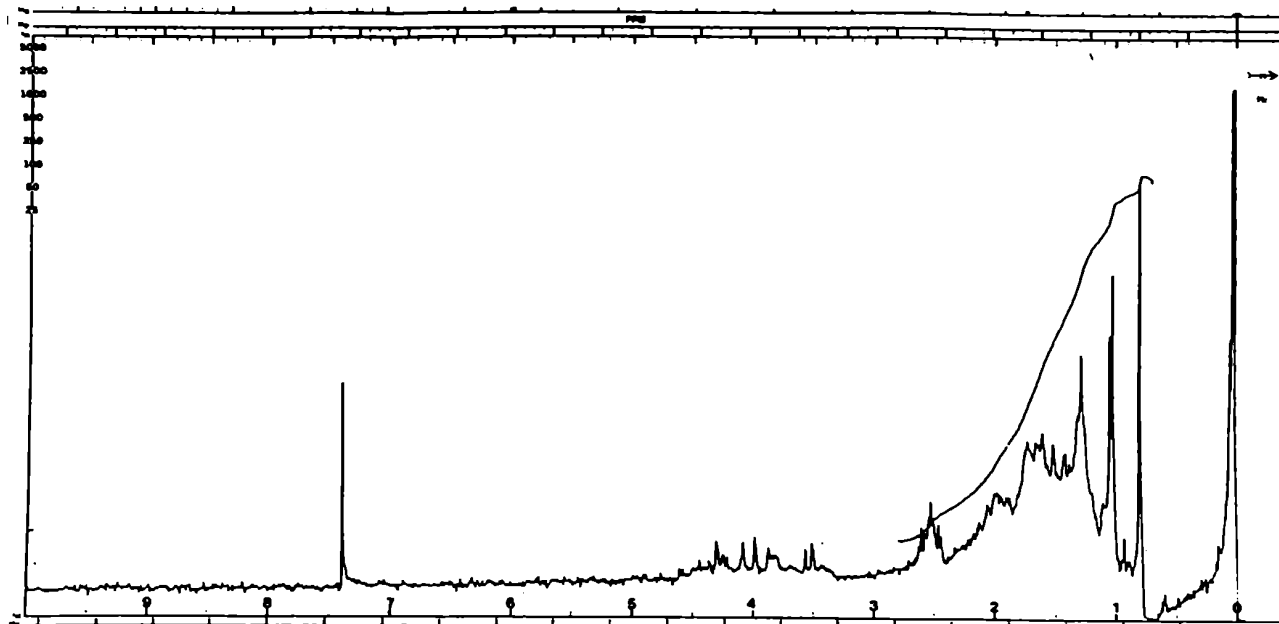


Figura 21: Espectro de RMN-¹H de la zona A' de hidrogenación catalítica de proscillaridina.

análisis en ccd (A', B' y C'), y sus estructuras se asignaron en forma análoga a lo indicado para el caso del scillirósido.

Los procesos que ocurren durante la hidrogenación del scillirósido se vuelven a manifestar en este caso, excepto la hidrogenólisis del grupo acetato de C-6, inexistente en la estructura de proscillaridina.

En la Figura 21 se presenta el espectro RMN-¹H de la zona A de hidrogenación, aislada por cromatografía de adsorción en columna. Se puede observar que la diferencia fundamental con el espectro de la Figura 22 es la presencia en este último de la señal del carbono anomérico de la ramosa (zona B' de hidrogenación).

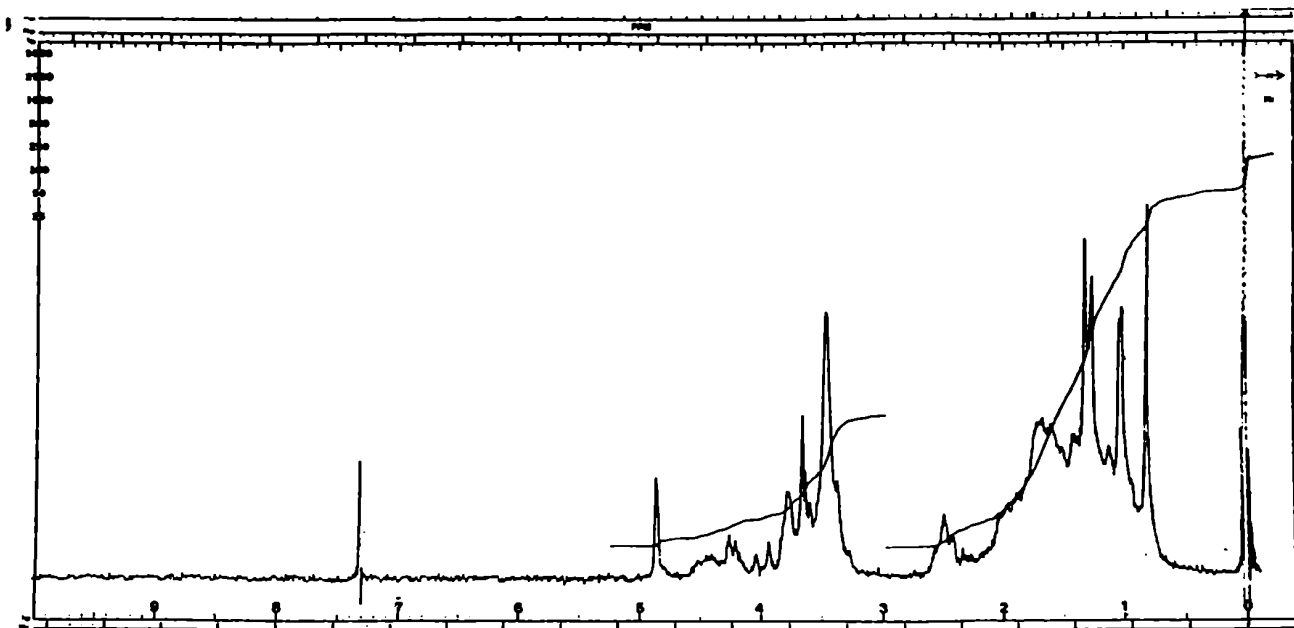


Figura 22: Espectro de RMN-¹H de la zona B' de hidrogenación catalítica de proscillaridina.

El espectro de masa, que se detalla en la Parte Experimental, resultó no difícil de interpretar, aún tratándose de una mezcla, y los picos más importantes pudieron asignarse a fragmentos provenientes de las estructuras propuestas para los productos formados en la hidrogenación de la proscillaridina. Dichas estructuras se muestran en la Figura 23.

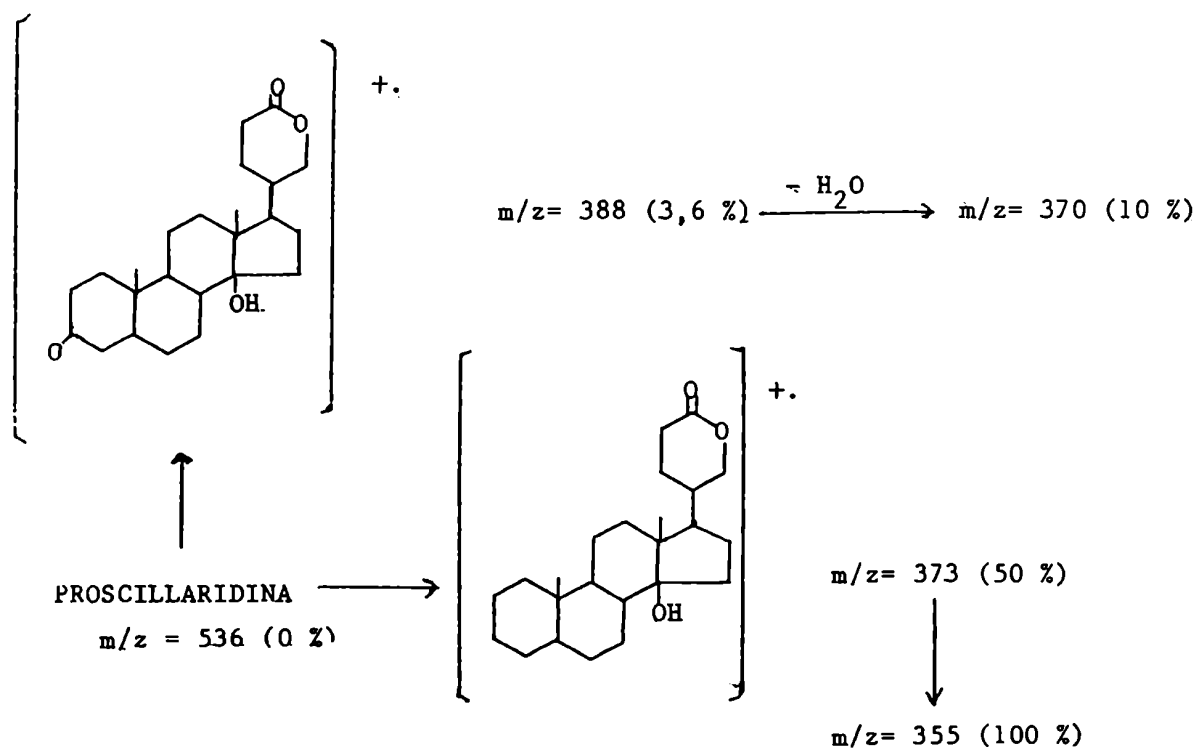


Figura 23: Principales fragmentos identificados en el espectro de masa de la proscillaridina hidrogenada.

b) Hidrólisis de proscillaridina hidrogenada.

Al igual que en la experiencia con scillirósido, las mejores condiciones de hidrólisis resultaron ser las de la entrada 4, Tabla 2.

En este caso también se observó en el espectro RMN-¹H de la mezcla de agliconas la presencia del éter metílico en C-24, como un singulete a $\delta = 3,64$.

En el espectro de masa resultó el pico base de $m/e = 390$, correspondiente a la estructura de hexahidroproscillaridin A.

Secuencia degradativa tendiente a aislar los carbonos 10, 13, 18 y 19 de la proscillaridina.

Se realizó la oxidación de Kuhn-Roth sobre la proscillaridina.

Se aisló acetato de sodio proveniente de los metilos 18 y 19 del esteroide y los correspondientes carbonos cuaternarios unidos a ellos, quizás también aportara acetato de sodio la oxidación de los carbonos 5' y 6' (de la ramnosa).

El acetato de sodio aislado se sometió posteriormente a una degradación de Schmidt, tal como se relató para el scillirósido.

Secuencia degradativa tendiente a aislar los carbonos 21, 22, 23 y 24 de proscillaridina.

La ozonólisis de proscillaridina triacetilada (XLIII) se efectuó en forma similar a la realizada sobre tetraacetilscillirósido (XL), pero utilizando mayores cantidades de muestra.

Luego de la reducción del ozónido con Zn/AcOH se obtuvieron dos fracciones:

a) Fracción acuosa.

b) Fracción clorofórmica.

Tal como se describió para scillirósido de la fracción acuosa se obtuvieron ácido fórmico (proveniente del C-21, captado como carbonato de bario), y ácido glicólico. Este último se utilizó en parte para obtener el derivado cristalino glicolato de p-bromofenacilo y también para aislar los carbonos 23 y 24 de la proscillaridina por oxidación con *metaperiodato* de sodio.

Un espectro de RMN-¹H de la fracción clorofórmico cruda mostró desaparición de señales de H-vinílicos y aparición de nuevas señales a $\delta = 9,6$ y $\delta = 8,15$ asignadas tentativamente a los hidrógenos de los aldehidos de C-4 y C-21 respectivamente.

La señal del grupo 21-hidroxi esperada a $\delta = 4,2$ fue de menor intensidad que la obtenida para scillirósido. Posiblemente debido a que la reducción con Zn/AcOH no es tan efectiva cuando se trabaja con cantidades superiores a los 200 mg. Este hecho se vio confirmado por los datos de RMN-¹³C, que presentó, además de la desaparición de las señales de los carbonos 20, 21, 22, 23, 24, 4 y 5, la aparición de cinco señales nuevas de grupos carbonilo.

Las señales a $\delta = 200$ y 217 ppm son comunes a las observadas en el RMN-¹³C del extracto clorofórmico de ozonólisis del tetraacetilscillirósido y, por lo tanto, se asignaron tentativamente a los C-4 y C-5 respectivamente. Las señales a $\delta = 213$ y $\delta = 219$ pertenecerían a los carbonos del grupo 21-aldehido-20-ceto y la señal a $\delta = 209$ correspondería al carbonilo del grupo 21-hidroxi-20-ceto.

Esta fracción clorofórmica b), que contenía la mezcla 21 - hidroxi-20-ceto y 21-aldehido-20-ceto derivados, se trató en forma análoga a lo indicado para el tetraacetilscillirósido (oxida-

ción con ácido *ortoperiódico*). Por pasaje de nitrógeno a través de la solución se arrastró formaldehído (C-22 del bufadienólido original), proveniente de la agrupación 21-hidroxi-20-ceto, y se captó como derivado cristalino dimedona-formaldehído.

Sobre la solución remanente, conteniendo el ácido fórmico proveniente de la oxidación con ácido *ortoperiódico*, de la agrupación 21-aldehído-20-ceto, se agregó agua oxigenada de 150 volúmenes, y se recogió, como carbonato de bario, el dióxido de carbono resultante.

C A P I T U L O I I I

P R E S E N T A C I O N Y D I S C U S I O N

D E L O S

R E S U L T A D O S

Inoculación de trazadores.

a) Incorporaciones absolutas obtenidas.

El primer paso en el intento de dilucidar el origen biosintético de los carbonos 22, 23 y 24 del anillo α -pirona en bufadienólidos vegetales consistió en la inoculación de probables precursores marcados con ^{14}C , y el posterior aislamiento y medición de la radiactividad del scillirósido obtenido.

Los datos correspondientes se presentan en la Tabla 3.

Las incorporaciones absolutas de precursores radiactivos en vegetales, suelen ser pequeñas (menores que un 5%).

Este problema se ve agravado al utilizar ciertos metabolitos primarios, fundamentalmente debido a:

- 1) La dilución que sufren algunos trazadores con el contenido endógeno del mismo metabolito no marcado, presente en el organismo vegetal intacto. Tal es el caso del acetato, piruvato y succinato.
- 2) La gran reactividad, desde el punto de vista biológico, del trazador inoculado, que implica una rápida metabolización del mismo. Este es el caso del oxalacetato⁸⁹ cuya concentración no supera las 20 a 40 moléculas por mitocondria⁹⁰.
- 3) Por tratarse de metabolitos primarios todos ellos son comunes a numerosos caminos metabólicos, e, incluso pueden interconvertirse a través de procesos cíclicos.

Sin embargo, si durante la inoculación del trazador, el proceso de biosíntesis de bufadienólidos fuera mucho más rápido

que el proceso de degradación del metabolito inoculado, se subsanarían algunos de los inconvenientes mencionados.

Sabiendo por literatura que el contenido máximo de scillirósido se observa en los bulbos de *Scilla* inmediatamente antes del florecimiento³, y se consume durante el mismo, se procedió a inocular los trazadores en distintas épocas del año y sobre ejemplares florecidos, y no. Esto nos permitió, como se verá más adelante, hacer un estudio comparativo sobre la efectividad de las distintas inoculaciones realizadas y, sobre las distintas vías de utilización recorridas por el trazador.

Por los valores de incorporación absoluta obtenidos quedó establecida la imposibilidad de trabajar con precursores enriquecidos en el isótopo estable ^{13}C (aún con 90% de enriquecimiento), ya que para observar incremento de alguna señal en el espectro de RMN- ^{13}C , se requiere una incorporación suficiente como para producir 0,5-1% del contenido del producto final endógeno con igual enriquecimiento que el trazador.

Este hecho implicó la necesidad de trabajar únicamente, utilizando los resultados logrados con trazadores radiactivos.

Si bien en algunas experiencias (entradas 8 y 9 de la Tabla 3) se lograron buenas incorporaciones relativas del oxalacetato respecto del piruvato (entrada 3) y succinato (entrada 4), no se pudo afirmar, con estos datos que aquél fuera el precursor directamente responsable de la formación del anillo bufadienólido. Para llegar a esta confirmación fue necesaria una degradación de la estructura carbonada y un análisis de las incorporaciones de radiactividad distribuidas en dicha estructura.

El destino de la radiactividad que recorrió caminos distin

INOCULACION

SCILLIROSIDO obtenido

È	Precursor Inoculado	Canti- dad (mg)	Act.Esp. dpm/mmol	Act.Tot. dpm	MI	Mes	TI	Cant. mg.	Act.Esp. dpm/mmol	Act.Tot. dpm	Inc.Absol
1	Acetato-1- ¹⁴ C	2,1	1,3 x 10 ¹¹	3,3 x 10 ⁹	B	Agos	21	80	1,02 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁶	0,04
2	Acetato-1- ¹⁴ C	1,4	1,3 x 10 ¹¹	2,2 x 10 ⁹	B	Mayo	18	81	1,5 x 10 ⁶	2,03x 10 ⁵	0,009
3	Piruvato-1- ¹⁴ C	8,3	1,4 x 10 ¹¹	1,1' x 10 ⁹	B	Ago	22	51	1,6 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁴	0,0012
4	Succina- to-1,4- ¹⁴ C ₂	1,01	2,6 x 10 ¹¹	2,2 x 10 ⁹	A	Dic	9	100	6,1 x 10 ⁴	9,88x 10 ³	0,00045
5	Oxalaceta- to-4- ¹⁴ C	72	2,0 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁸	B	Set	15	40	1,0 x 10 ⁴	0,4 x 10 ³	0,0004
6		68	2,0 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	B	May	20	23	2,3 x 10 ⁴	0,8 x 10 ³	0,00085
7		131	1,7 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁸	B	Set	13	27	1,3 x 10 ⁵	5,6 x 10 ³	0,0033
8	Oxalaceta- to-1,2- ¹⁴ C ₂	141	1,7 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁸	B	Abr	21	18	1,4 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁴	0,021
9		63,2	3,6 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁸	A	Dic	7	715	4,7 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁴	0,032

Tabla 3: E= entrada; MI= método de inoculación, A: en ausencia de hojas, B: en presencia de hojas; TI= Tiempo de inoculación (en días); Inc.Abs.= Se define como la actividad total presente en el scillirósido aislado dividido por la actividad total inoculada en el bulbo.

tos al de la biosíntesis de bufadienólidos se analizó para el caso de incorporación de oxalacetato-1,2- $^{14}\text{C}_2$ (entrada 9, Tabla 3) y se resume en la Figura 24.

Se observó que el 90,6% de la radiactividad se perdió, probablemente, como dióxido de carbono ya que no se la localizó ni en el extracto metanólico, ni en el residuo sólido de extracción. Este hecho estaría de acuerdo con un rápido catabolismo del trazador inoculado, e implicó la posibilidad cierta de que dicho precursor hubiera marcado subestructuras de distinto origen biosintético dentro de la molécula de scillirósido.

Sin embargo, si el compartimiento biológico en el cual se metaboliza el oxalacetato estuviera próximo a aquél en el cual se forma el anillo α -pirona del scillirósido y, por lo tanto, no se requiriera mayor transporte del metabolito inoculado, existiría una buena probabilidad de encontrar una incorporación de la unidad de oxalacetato como tal. Esto se confirmaría con valores de incorporación específica similar para los carbonos 23 y 24 del anillo bufadienólido, como se mostró en la Figura 10.

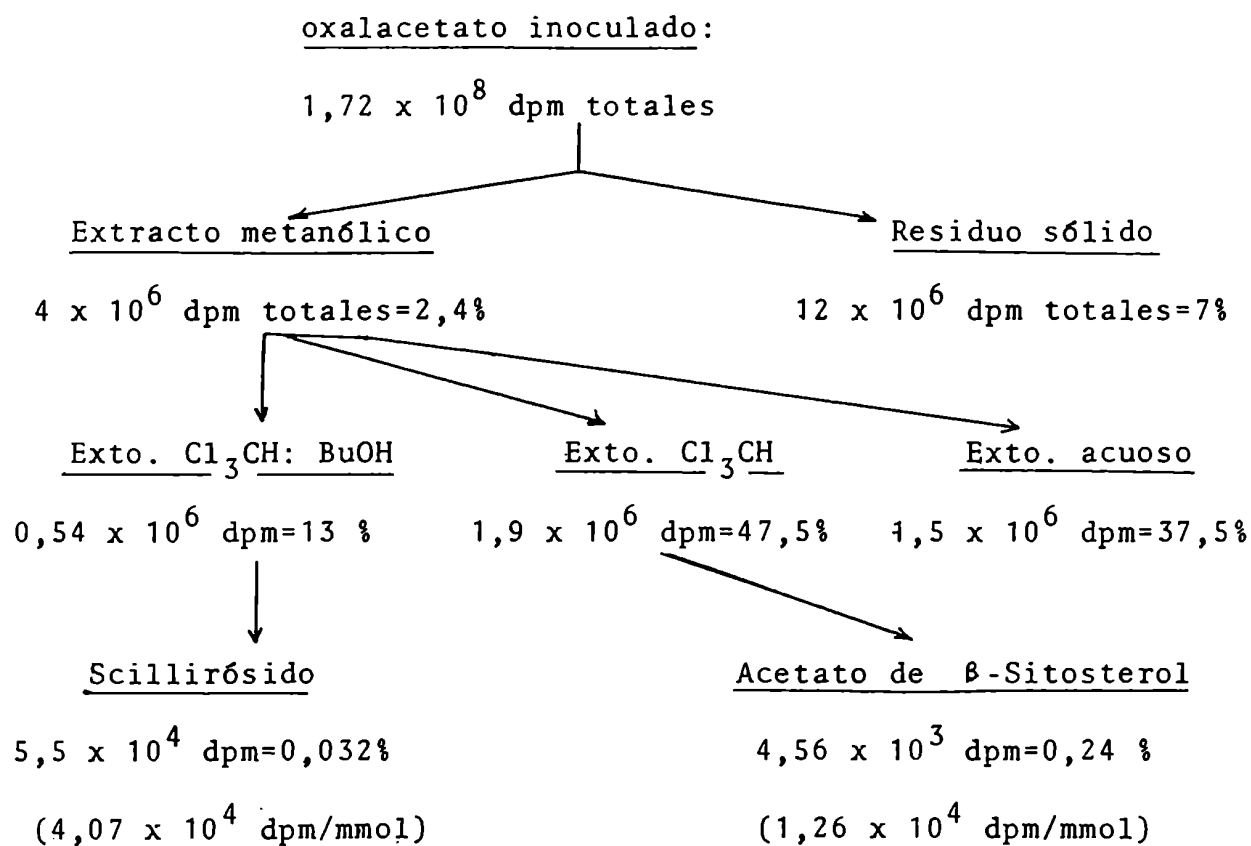


Figura 24: Destinos sufridos por la radioactividad inoculada en el caso de la entrada 9, Tabla 3.

b) Incorporaciones relativas obtenidas en subestructuras del scillirósido.

Con el objeto de aislar el carbono 24 del scillirósido se efectuó la secuencia degradativa que se describió en el Esquema 3.

Los resultados de esta degradación aplicada al scillirósido radiactivo proveniente de la inoculación de un bulbo con oxalacetato-1,2- $^{14}\text{C}_2$ (Tabla 3, entrada 9), se presenta en la Tabla 4.

Scillirósido	Scillirósido metilado	Carbono 24
$4,07 \times 10^4$ dpm/mmol	$3,09 \times 10^4$ dpm/mmol	$0,15 \times 10^4$ dpm/mmol
100 %	76 %	3,7 %

Tabla 4: Actividades específicas obtenidas tras la aplicación de la secuencia degradativa correspondiente al Esquema 3 .

De estos resultados puede concluirse que:

- 1) La incorporación de radiactividad en el carbono 24 fue baja.
- 2) Un 24 % de la radiactividad se perdió durante el proceso de metilación.

Como se ha descrito anteriormente, durante la metilación del scillirósido con OBa / ICH_3 se produce la hidrólisis del grupo acetato alílico, ubicado en posición 6β , y, por lo tan-

to, debería ser este grupo el responsable de la pérdida de radiactividad en el scillirósido metilado aislado.

Esto implicaría una actividad específica de $0,94 \times 10^4$ dpm/mmol para el acetato de carbono 6.

Una marcación de esta magnitud sugirió la posibilidad de que la glucosa unida a la genina debería estar también marcada, requiriéndose entonces, un esquema de degradación que permitiera aislar y medir la radiactividad presente en el monosacárido.

Como ya se sabía por los datos encontrados en literatura, la hidrólisis directa de estos glicósidos cardiotónicos es dificultosa y no cuantitativa (debido a la presencia del doble enlace 4(5)³. Por lo tanto, como paso previo a la hidrólisis se llevó a cabo una hidrogenación. Una vez reducido el doble enlace 4(5) el scillirósido resultó ser perfectamente hidrolizable.

Para completar la degradación se repitió el aislamiento del carbono 24 como oxima de benzofenona, esta vez, por acción del fenil-litio sobre la aglicona.

La secuencia de reacciones se mostró en el Esquema 4 (pág.71)

Los resultados obtenidos a través de este esquema degradativo, aplicado sobre scillirósido radiactivo obtenido por inoculación de oxalacetato-1,2-¹⁴C₂ (Tabla 3, entrada 9), se presentan en la Tabla 5.

De los resultados mencionados en la Tabla 5 se deduce que, en esta oportunidad, durante la hidrogenación catalítica se produjo la hidrogenólisis de la glucosa (que está en posición alílica) en un 15 %. Esto se confirmó ya que luego de la hidrólisis ácida y de la acetilación se recuperó el 85 % de la glucosa

inicial.

Scillirósido	scillirósido hidrogenado	aglicona	glucosa peracetilada	C-24
$4,07 \times 10^4$	$3,13 \times 10^4$	$2,66 \times 10^4$	$0,45 \times 10^4$	$0,15 \times 10^4$
dpm/mmol	dpm/mmol	dpm/mmol	dpm/mmol	dpm/mmol
100 %	76,9 %	65,4 %	11,1 %	3,7 %

Tabla 5: Actividades específicas obtenidas tras la aplicación de la secuencia degradativa correspondiente al Esquema 4.

Tal como se había supuesto, la glucosa unida a la genina presentó incorporación de radiactividad. Aunque el metabolismo de hidratos de carbono es uno de los más activos en plantas, resultando muy grande la dilución con glucosa endógena que debió sufrir la glucosa radiactiva hasta llegar al scillirósido, su valor de incorporación de 11,1 % indica la existencia de un camino directo para la transformación de oxalacetato en azúcares. Dicho camino, muy activo en citoplasma y glioxisomas de plantas⁹³⁻⁹⁵ es el que se ilustra en la Figura 25.

El 15 % de hidrogenólisis de glucosa ($4,5 \times 10^3$ dpm/mmol) mencionado, es responsable de una pérdida del orden del 1,7 % en la actividad total del scillirósido hidrogenado. El resto de la pérdida (21,4 %) se debió, entonces, a la hidrogenólisis del grupo acetato alílico de C-6. ($0,94 \times 10^4$ dpm/mmol aproximadamente).

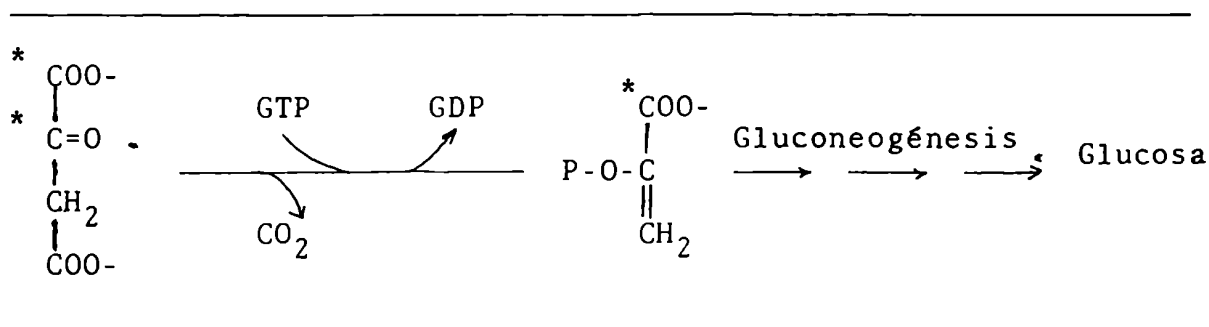


Figura 25: Transformación de oxalacetato en glucosa en vegetales.

Se produjo, por lo tanto, la hidrogenólisis parcial del grupo acetato de C-6 en un valor aproximado al 90 %.

Si consideramos que, como máximo, cuatro de los seis carbonos de la glucosa resultaron marcados, presentarían una actividad específica de $0,7 \times 10^4$ dpm/mmol de carbono radiactivo a - aproximadamente, magnitud que resulta comparable con la del dato del acetato de C-6 ($0,94 \times 10^4$ dpm/mmol).

Estos hechos confirman los problemas planteados como 2) y 3) en la página 88

Haciendo un balance del porcentaje de radiactividad remanente en la estructura del scillirósido analizado, y el número de carbonos aún no medidos, surge un valor del 2,7 % de radiactividad, en promedio, para cada uno de estos átomos.

Esta cifra es del orden de la encontrada para el carbono 24 (3,7 %) indicado en la Tabla 4 (pág. 93). En principio estos datos podrían conducir a suponer una distribución aleatoria de la marca hecho que luego fue descartado por degradaciones individuales de los carbonos que formaban el anillo.

Esta posibilidad de marcación aleatoria y homogénea, hubie-

ra resultado de una degradación del precursor inoculado, pre -
via a su incorporación como tal al esteroide⁵⁶ y una reconver-
sión de la marca en distintas biomoléculas trazadoras.

Este fenómeno podría haber ocurrido a través de los siguien-
tes pasos:

- 1) Decarboxilación del oxalacetato-1,2-¹⁴C₂, en citoplasma,
con formación de piruvato-1,2-¹⁴C₂ (vía malato⁹¹, o espon-
táneamente⁹²), o su fosfoenol éster⁹³⁻⁹⁵ (vía oxalacetato
decarboxilasa).
- 2) El piruvato-1,2-¹⁴C₂ pudo penetrar al medio mitocondrial y
regenerar al oxalacetato-1,2-¹⁴C₂⁹³⁻⁹⁵, o degradarse a
Acetil-Co-A-1-¹⁴C mitocondrial.
- 3) Los metabolitos mencionados en 2), activan el Ciclo de Krebs
(mitocondrial) con el siguiente resultado:
 - a) El oxalacetato-1,2-¹⁴C₂ pierde el 50 % de su marcación du-
rante la primera vuelta del Ciclo⁹⁶, en forma de ¹⁴CO₂, el
que puede reconvertirse en nuevas moléculas.

El resto de la marcación tiende a homogeneizarse, de tal
forma que, luego de la segunda vuelta del Ciclo se logra re-
generar un oxalacetato con el 12,5 % de la marca original
en cada uno de sus carbonos.

- b) El acetato-1-¹⁴C rinde luego de la primera vuelta del Ciclo
oxalacetato-1,4-¹⁴C₂, y durante la segunda vuelta se pierde
el 50 % de ésta marcación.

Un resultado claramente indicativo para la confirmación acer-
ca de la importancia de los procesos relatados y su intervención

en la biosíntesis del scillirósido, sería el hallazgo de una marcación homogéneamente distribuída en el grupo acetato del carbono 6. Esta subestructura pudo haberse formado a partir de citrato homogéneamente marcado, el que, transportado a citoplasma, resultara allí degradado por la enzima citratoliasa⁹⁷ y, utilizado luego en la biosíntesis.

Se llevó a cabo, entonces, una reacción de Schmidt sobre el acetato del C-6, aislado de las aguas madres de metilación.

La secuencia de reacciones corresponde a la presentada en el Esquema 5. (pág. 73).

La degradación se realizó con el acetato aislado del scillirósido radiactivo de la entrada 9 de la Tabla 3 y los resultados se presentan en la Tabla 6.

Scillirósido	Scillirósido metilado desacetilado	Acetato de C-6	CO ₃ Ba	N-metil benzamida
4,07 x 10 ⁴	3,08 x 10 ⁴	9,5 x 10 ³	7,9 x 10 ³	1,5 x 10 ³
dpm/mmol	dpm/mol	dpm/mmol	dpm/mmol	dpm/mmol
100%	75,7%	23,3%	19,4%	3,8%

Tabla 6: Actividades específicas encontradas en la secuencia degradativa correspondiente al Esquema 5.

Los datos obtenidos por esta secuencia degradativa indicaron, claramente, que existe una marcación mucho más importante en el

carbono 1 del grupo acetilo, que en el carbono 2 del mismo.

De esta observación surgió la evidencia de que el oxalacetato-1,2- $^{14}\text{C}_2$ inoculado, que resultó transformado en acetato, previo a su incorporación, no presentó su marcación distribuida en forma homogénea, sino, preferentemente localizada en el carboxilo.

Con esta evidencia se descartó la intervención del Ciclo de Krebs, mitocondrial, en el proceso biosintético objeto de nuestro estudio. Es decir, la incorporación del oxalacetato en derivados esteroidales es un proceso localizado globalmente en el citoplasma celular.

El camino por el cual el oxalacetato del medio celular soluble puede ser convertido en Acetil-S-CoA ha sido estudiado en animales y bacterias (hígado⁹⁸⁻⁹⁹, E. Coli¹⁰⁰⁻¹⁰¹, Clostridia¹⁰², etc.). En todos los casos las enzimas involucradas en dicha transformación (cetoácidos-deshidrogenasas) se hallan ligadas⁸⁹ a las enzimas citoplasmáticas sintetisas de ácidos grasos, formando un complejo enzimático de alto Peso Molecular.

En base a estos antecedentes puede postularse un fenómeno similar de compartimentalización entre el proceso degradativo que transforma oxalacetato en Acetil-S-Co-A y el proceso biosintético de Acetil-S-Co-A a esteroides.

Un hecho llamativo que surge del análisis de la Tabla 6 es el valor alcanzado por la incorporación de radiactividad en el grupo acetato del carbono 6 del scillirósido.

El 23 % de incorporación en dicho acetato indica que el acetato-1- ^{14}C (formado por acción de las deshidrogenasas a partir de oxalacetato-1,2- $^{14}\text{C}_2$ inoculado) tuvo una gran probabilidad

dad de incorporarse a la estructura del scillirósido en formación, antes de diluirse en citoplasma. Esta sería, entonces, una evidencia más de la proximidad entre las deshidrogenasas y las enzimas que biosintetizan éstos esteroides.

Además, el hecho de haberse encontrado scillirubrósido²⁴ en bulbos de *Scilla*, de esqueleto carbonado similar al del scillirósido, pero carente del grupo acetato de C-6, implicaría que la acetilación alílica sería uno de los últimos pasos biosintéticos en la formación del scillirósido.

Puede postularse, entonces, que la inclusión de este acetato-1-¹⁴C podría detectarse tanto en la estructura esteroidea como en el grupo acetato alílico, dependiendo del proceso biosintético prevaleciente en el momento de la inoculación.

Para generalizar este aspecto de la biosíntesis se estudiaron las incorporaciones logradas para el grupo acetato alílico, en experiencias de inoculación de oxalacetato-1,2-¹⁴C₂ realizadas fuera del período óptimo de biosíntesis de bufadienólidos.

Los datos encontrados se presentan en la Tabla 7.

Los resultados obtenidos confirmaron efectivamente lo postulado, según se desprende del siguiente análisis.

1) Tabla 7, entrada 1:

El scillirósido degradado había sido aislado de un ejemplar de *Scilla* que, sin haber florecido en su período anterior de latencia, fue inoculado en Setiembre. Esto implicó que el esqueleto carbonado del scillirósido ya había sido biosintetizado, sólo restando la incorporación de la mayor parte del grupo acetato alílico de C-6.

En- tra- da	Precursor	scillirósido metilado desacetilado	acetato	.CO ₃ Ba	N-metil benzamida
1	Oxalacetato 1,2- ¹⁴ C ₂	Activ. específ. $4,6 \times 10^4$ ^o dpm/mmol	$4,42 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$0,17 \times 10^3$
	(Tabla 3, entrada 7)	% de incorp. 100 específ. 6	96,1	95,6	0,37
2	Oxalacetato 1,2- ¹⁴ C ₂	Activ. específ. $3,1 \times 10^5$ ^o dpm/mmol	$9,3 \times 10^3$	$8,9 \times 10^3$	$0,27 \times 10^3$
	(Tabla 3, entrada 8)	% de incorp. 100 específ. 94	3	2,86	0,09
3	Acetato 1- ¹⁴ C	Activ. específ. $2,4 \times 10^6$ ^o dpm/mmol	$4,45 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$1,65 \times 10^3$
	(Tabla 3, entrada 1)	% de incorp. 100 específ. 96,4	1,85	1,8	0,07

Tabla 7: Datos obtenidos por degradación de Schmidt sobre el grupo acetato del C-6 del scillirósido.

Datos post-dilución con scillirósido no marcado para lograr mejor operabilidad.

2) Tabla 7, entrada 2:

El scillirósido degradado en este caso, había sido aislado de un ejemplar que, habiendo florecido luego de su período anterior de latencia, fue inoculado en Abril. Es decir, durante los primeros estadios de la biosíntesis de bufadienólidos (formación del esqueleto esteroidal). Resultó, entonces, un pequeño porcentaje de marcación localizado en el grupo acetato de C-6.

3) Tabla 7, entrada 3:

La concordancia de los datos obtenidos en esta experiencia (en la que se había inoculado acetato-1-¹⁴C) con respecto a la anterior, indicó claramente que, cuando el proceso de biosíntesis de bufadienólidos es mucho más lento que el pasaje de oxalacetato a acetato en citoplasma, este último metabolito se diluye antes de su incorporación, resultando modelos de distribución de marca totalmente similares.

Adicionalmente, resultó interesante comprobar si en el resto del esteroide se había logrado, también, una marcación a través del metabolito acetato-1-¹⁴C proveniente de la degradación del oxalacetato-1,2-¹⁴C₂.

Para ello se pensó en una degradación tendiente a aislar los carbonos de metilos angulares y sus carbonos cuaternarios adyacentes.

Se aplicó al scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 9 de la Tabla 3, la degradación de Kuhn-Roth (previa metilación para eliminar el acetato alílico). Posteriormente se aplicó la degradación de Schmidt sobre los acetatos obteni-

dos en el primer paso de oxidación. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

La secuencia de reacciones se muestra en el Esquema 6 (pág. 75).

Como se sabe, la biosíntesis del colesterol a partir de acetato de sodio-1- ^{14}C muestra la distribución de marca que indica la Figura 7 (pág. 27). Por lo tanto, sólo el carbono 10, de los aislados según la degradación del Esquema 6, debería presentar radiactividad apreciable. El resto de los carbonos aislados 13, 18 y 19 provienen del metilo del acetato-1- ^{14}C .

Scillirósido	Scillirósido metilado desacetilado	Acetato aislado para Kuhn-Roth	CO_3Ba (C-10 y C-13)	N-metilbenzamida (C-18 y C-19)
$4,07 \times 10^4$	$3,08 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$0,38 \times 10^3$
dpm/mmol	dpm/mmol		dpm/mmol	dpm/mmol
100%	75,7%	6,9%	5,9%	0,9%

Tabla 8: Actividades específicas encontradas en la secuencia de degradativa correspondiente al Esquema 6.

Del dato obtenido para la N-metilbenzamida, se dedujo que el porcentaje de incorporación específica en los carbonos 18 y 19 es el orden del 0,45 %. Por lo tanto, corresponde un valor de 4,45% para la incorporación en el carbono 10 y 0,45 % para C-13 del scillirósido.

Con estos valores se confirmó una distribución de marca ordenada en la estructura esteroideal del scillirósido, y a través de una estructura radiactiva repetitiva, correspondiente a acetato-1-¹⁴C.

Si consideramos que la unidad de acetato se incorpora 10 veces en la estructura esteroideal hasta el C-20, surge el siguiente balance:

% de incorporación en glucosa.....	11,1
% de incorporación en acetato de C-6.....	23,2
% de incorporación en 10 unidades de acetato-1- ¹⁴ C....	59,0
% de incorporación en 1 unidad de metilo para el carbono 21 (valor calculado).....	<u>0,45</u>
	93,75

Es decir, que resta sólo el 6,4 %, aproximadamente, de la marcación original para distribuir entre los carbonos 22, 23 y 24 del scillirósido.

Teniendo en cuenta el valor de 3,7 % de incorporación obtenido para el C-24 (Tabla 4), caben dos posibilidades:

- a) Una distribución al azar de la marcación en los carbonos 22 y 23.
- b) Una distribución con marcación semejante para los carbonos 23 y 24, y mucho más baja para el C-22.

Se descartó una distribución de marca como proveniente de la cadena lateral intacta del colesterol, ya que, por incorporación de la unidad repetitiva de acetato-1-¹⁴C debería encontrarse una incorporación aproximadamente 5 veces mayor (según los datos anteriores obtenidos) para el C-23 que para el C-24 y este valor

excedería mucho del valor de incorporación posible.

Resultó entonces imprescindible la degradación del anillo α -pirona, y la consiguiente medición de radiactividad incorporada a sus carbonos.

Para ese propósito se realizó una ozonólisis reductiva del tetraacetilscillirósido (proveniente del scillirósido de Tabla 3, entrada 9), y posteriormente, una ruptura con *metaperiodato* de sodio sobre el ácido glicólico obtenido.

La secuencia de reacciones aplicadas se presenta en el Esquema 7 (pág. 77).

Los datos obtenidos en la degradación se presentan en la Tabla 9.

Scillirósido	scillirósido tetraacetilado	CO ₃ Ba (C-21)	CO ₃ Ba (C-24)	C-23 CH ₂ O-Dimedona
4,07 x 10 ⁴	4,02 x 10 ⁴	0,92 x 10 ²	1,6 x 10 ³	1,7 x 10 ³
dpm/mmol	dpm/mmol	dpm/mmol	dpm/mmol	dpm/mmol
100%	98,8%	0,23%	3,9%	4,1%

Tabla 9: Incorporaciones específicas obtenidas al aplicar la secuencia degradativa del Esquema 7.

Del análisis de los resultados surge, evidentemente, una incorporación similar en valor para los carbonos 23 y 24 del anillo bufadienólido.

Este hecho responde inequívocamente a la entrada de un grupo oxalacetato-1,2- $^{14}\text{C}_2$ intacto, según lo propuesto en la Figura 10 (pág.37)

Según esta conclusión, la unidad X que se adiciona al esteroide de tipo 20-ceto pregnano es el oxalacetato, estructura de 4 carbonos que aporta (luego de la descarboxilación de su C-4), la unidad de tres átomos de carbono necesaria para la formación del anillo bufadienólido.

Al llegar a este punto resultó interesante comparar el patrón de incorporación logrado en el scillirósido radiactivo obtenido por inoculación de oxalacetato-1,2- $^{14}\text{C}_2$ con aquellos scillirósidos obtenidos por inoculación con otros trazadores.

Se aplicaron las secuencias degradativas presentadas en los Esquemas 3 a 7, sobre scillirósido aislado luego de inocular bulbos con:

- a) acetato-1- ^{14}C (Tabla 3, entrada 1).
- b) succinato-1,4- $^{14}\text{C}_2$ (Tabla 3, entrada 4).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

Del análisis de dichos datos se observó que, para el caso a), el patrón de marcación obtenido en el esqueleto esteroidal, fue totalmente similar al que se encontró para el caso de inoculación con oxalacetato-1,2- $^{14}\text{C}_2$, ya descripto.

La distribución de marca en los carbonos del anillo bufadienólido, para el caso a), corroboró que hubo ruptura de la cadena lateral del colesterol a la altura del C-20, ya que, en caso contrario, el carbono 23 debería ser el más marcado del anillo. Más aún, dado que la unidad X que se incorpora a la pregnenolo-

na es el oxalacetato, la forma más eficiente de llegar a dicho metabolito a partir de acetato-1- ^{14}C es, en la planta, a través del Ciclo de Krebs. De esta forma, en la primera vuelta del Ciclo se regenera un oxalacetato-1,4- $^{14}\text{C}_2$, que de incorporarse al esteroide produciría una marcación mayor en el C-24, como efectivamente se verificó.

Si se analiza, en cambio, el destino sufrido por la marcación para el caso de la inoculación con succinato-1,4- $^{14}\text{C}_2$ se observa una muy baja incorporación, aún siendo este metabolito absolutamente convertible en oxalacetato en el medio celular.

El hecho es que el succinato-1,4- $^{14}\text{C}_2$ se transforma por diversas vías biológicas en oxalacetato-1,4- $^{14}\text{C}_2$. El carbono 4 de éste se pierde inmediatamente como $^{14}\text{CO}_2$. El carbono 1, también se pierde rápidamente como $^{14}\text{CO}_2$ (Primera vuelta de Krebs o procesos como el de la Figura 25).

Se puede suponer, entonces, que la incorporación lograda por inoculación de succinato-1,4- $^{14}\text{C}_2$ aunque 100 veces menor que para el caso de acetato u oxalacetato, se debió, en su mayor parte, a la reconversión del $^{14}\text{CO}_2$ producido en nuevas moléculas orgánicas.

Este proceso daría origen a una incorporación en forma no ordenada, al azar.

Además, como el principal método de fijación de CO_2 en plantas verdes y bacterias fotosintéticas es el Ciclo de Calvin, es lógico esperar una importante marcación en el azúcar, como efectivamente se obtuvo.

Estructuras y subestructuras estudiadas	P r e c u r s o r e s				
	Acetato 1- ¹⁴ C (Tabla 3, ent.1)		Succinato 1,4- ¹⁴ C (Tabla 3, ent. 4)		
	dpm/mmol	AER.	dpm/mmol	AER.	
Scillirósido obtenido	1,02 x 10 ⁷		6,13 x 10 ⁴		
Scillirósido diluído	2,08 x 10 ⁶	100	2,82 x 10 ⁴	100	
Aglicona	1,25 x 10 ⁶	60	1,18 x 10 ⁴	41,7	
Glucosa peracetilada	7,9 x 10 ⁵	37,9	1,4 x 10 ⁴	50	
Scillirósido metilado desacetilado	2,3 x 10 ⁶	96,4	2,8 x 10 ⁴	98,5	
Acetato de carbono 6	CO ₃ Ba	4,4 x 10 ⁴	1,7	8,07 x 10 ²	2,9
	N-metil benzamida	1,65 x 10 ³	0,07	1,03 x 10 ³	3,6
CO ₃ Ba (Carbonos 10 y 13) N-metil benzamida (Carbonos 18 y 19)		1,18 x 10 ⁵	5,7	0,79 x 10 ³	2,8
		8 x 10 ³	0,39	2,4 x 10 ³	3,6
Tetraacetilscillirósido	2,08 x 10 ⁶	100	2,7 x 10 ⁴	96,5	
CO ₃ Ba (Carbono 21)	2,2 x 10 ³	0,13	8,7 x 10 ²	3,2	
CO ₃ Ba (Carbono 24)	5,4 x 10 ⁴	2,6	5,9 x 10 ²	2,1	
CO ₃ Ba (Carbono 22)	2,1 x 10 ³	0,1	8,0 x 10 ²	3	
CH ₂ -Dimedona (Carbono 23)	1,5 x 10 ⁴	0,72	4,4 x 10 ²	1,6	

Tabla 10: Incorporaciones localizadas en distintos Carbonos de la estructura del scillirósido obtenido por inoculación con distintos precursores. ° corresponde a scillirósido diluído a 2,4 x 10⁶ dpm/mmol. AER: actividad específica relativa.

C A P I T U L O I V

P A R T E

E X P E R I M E N T A L

Generalidades.

Los puntos de fusión han sido determinados con un aparato Fisher-Johnes y no han sido corregidos.

Los espectros de absorción en el infrarrojo (I.R.) se realizaron en dispersión en Nujol con un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 421, o con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 137, Infracord.

Los espectros de resonancia magnética protónica (RMN- ^1H) se efectuaron a 60MHz con un espectrofotómetro Varian-A-60, o a 100MHz con un espectrofotómetro Varian X-L-100-15. El solvente utilizado fue cloroformo con 5 % de metanol deuterados salvo que se indique otro. Los espectros de resonancia magnética de ^{13}C (RMN- ^{13}C) se realizaron a 25.2MHz con el aparato antes indicado, trabajando con transformada de Fourier con una computadora 620/L-100 y una unidad de discos magnéticos Sykes 7000. Se utilizó cloroformo deuterado con 5 % de metanol deuterado como solvente, excepto en los casos en que se indique lo contrario. En todas las determinaciones se utilizó tetrametilsilano (TMS) como señal de referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en δ (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz); las señales se indican en cada caso como s (singulete), d (doblete), dd (doble doblete), t (triplete), c (cuarteto), m (multiplete), ba (banda ancha), sa (singulete ancho).

Los espectros de masa (EM) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masa Varian-Mat CH-7 A, 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 se introdujeron las muestras directamente a 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 Marck III. Las muestras se disolvieron en una mezcla de 1 ml de agua y 14 ml de solución centelleadora de dioxano que contenía naftaleno (50 g), 2,5-difeniloxazol (3,5 g) y 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno por cada 500 ml.

Las muestras de carbonato de bario radiactivas se suspendieron en idéntica solución, se las sometió a 15 minutos de ultrasonido y se agregaron 500 mg de gelificante Cab-O-Sil para evitar la precipitación del sólido¹⁰⁴. El error en las determinaciones de radiactividad específica es del orden del 0,5 % debido, fundamentalmente, a la sensibilidad de las balanzas utilizadas.

Las hidrogenaciones a presión se realizaron en un hidrogenador Parr.

Las cromatografías en placa delgada (ccd) analíticas se realizaron utilizando como fase fija Silicagel G según Stahl (Merck), y como reveladores 1) vapores de yodo y 2) ácido sulfúrico 50 %.

Las ccd preparativas se realizaron con Silicagel GF/254 (Merck), sobre placas de vidrio, observándolas luego de desarrolladas a la luz ultravioleta (254 o 366 nm). También se utilizó Si gel G (Alugram Sil G / U.V. 254, Macherey Nagel, y

óxido de aluminio (Merck).

En ambos casos de ccd los solventes de desarrollo fueron: 1) cloroformo, 2) cloroformo con 5 % de metanol, 3) cloroformo con 10 % de metanol.

Las placas de celulosa fueron D.C. fertigplatten cellulose F (Merck) y el solvente de desarrollo fue butanol, etanol, agua (10 : 4 : 4).

Las cromatografías en columna se realizaron utilizando como adsorbente Silicagel G Merck (malla 100-200) o, Silicagel H Merck (malla 10-40 micrones), utilizando presión de aire o de nitrógeno.

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, de fase SE-30, 3 %, sobre chromosorb -W-AW- DMCS, malla 60-80.

Las drogas marcadas con ^{14}C fueron adquiridas a New England Nuclear Corp.

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

Síntesis de trazadores radiactivos

Acidos oxalacético-4-¹⁴C y oxalacético-1,2-¹⁴C₂

a) Síntesis de acetato de *ter*-butilo¹⁰⁵ (XXXV):

A una solución de 7,35 ml de *ter*-butanol seco y 10,6 ml de N,N-dimetilanilina recién destilada, se agregaron bajo atmósfera de nitrógeno, y gota a gota, 5,65 ml de cloruro de acetilo comercial. Una vez agregados los 2/3 del volumen original se separó una fase más densa de clorhidrato de N,N-dimetilanilina, al tiempo que comenzaba un reflujo fuerte, debiéndose refrigerar el sistema. Luego se diluyó con agua y éter, la fase orgánica se lavó con ácido sulfúrico 0,5 N frío hasta que no se observó turbidez por agregado de base diluida. Finalmente se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio y con agua. Se secó sobre sulfato de magnesio anhidro.

Por destilación cuidadosa se separó primero el éter y luego se destiló el producto recogiendo la fracción de P. Ebullición: 96-98°C. P. Eb. literatura¹⁰⁵ 97-98°C. Se obtuvieron 5,5 g (65,7 % de rendimiento).

I.R. (cm⁻¹) 1730 (tens. C=O), 1400 (tens C-O).

RMN-¹H (60 MHz) δ : 1,95 (s, 3H), 1,45 (s , 9 H)

b) Síntesis de acetato de *ter*-butilo-1-¹⁴C ⁶³:

41 mg de acetato de sodio-1-¹⁴C comercial (0,079 mCi) se

diluyeron con 459 mg de acetato de sodio anhidro, y la mezcla se trató con 3,5 ml de bromuro de benzofilo comercial, en un balón de 10 ml conectado a un microdestilador.

La reacción requirió agitación vigorosa y un buen calentamiento. Se obvió el agregado de ácido benzoico exógeno, reco - mendado en literatura, ya que ese añadido ocasionaba disminu - ción del rendimiento.

Cuando la temperatura del baño de aceite alcanzó 175°C comenzó a destilar el bromuro de acetilo y se recogió la fracción entre 60 y 72°C. El halogenuro de ácido se recogió directamen - te sobre una solución de 0,75 ml de *ter*-butanol , 1,1 ml de N,N - dimetilanilina recién destilada y 2 ml de éter, con agitación continua. Una vez finalizado el agregado se reflujo durante 2 hs.

Se diluyó con agua y se lavó sucesivamente con ácido sul - fúrico 0,2 N, hidróxido de sodio 0,2 N y agua. Se evaporó el éter por destilación cuidadosa y finalmente se recogió la fracción entre 96 y 98°C, obteniéndose 0,2 ml (25 % de rendimiento) de acetato de *ter*-butilo radiactivo (actividad 0,1987 mCi/mmol.)

c) Síntesis de oxalato de diter-butilo (XXXVI):

Se fundieron 3,2 g de ácido oxálico dihidratado y luego, finamente pulverizados, se mezclaron íntimamente con 10 g de pentacloruro de fósforo ⁶⁶. Se dejó el sistema durante 3 días a temperatura ambiente y con buena agitación.

Se destiló de la mezcla el dicloruro de oxalilo, usando columna de fraccionamiento y recogiendo el destilado entre 60 y

99°C.

1,7 ml del halogenuro de ácido obtenido se agregaron a un balón que contenía una solución de 9,5 ml de *ter*-butanol, 4,8 ml de piridina y 9 ml de éter. La esterificación se completó con 3 hs. de reflujo. Se enfrió y se filtró la mezcla por lecho de Celite, lavándose con éter. La fase orgánica se acidificó y se extrajo 3 veces con éter. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con ácido sulfúrico 2N, agua, solución de bicarbonato de sodio y nuevamente con agua. Se secó sobre sulfato de magnesio y carbonato de potasio anhidro. Finalmente se evaporó el éter obteniéndose 2,45 g de un residuo blanco cristalino de P.F. 70-71°C (P.F. lit.⁶⁶ 70,5-71°C), luego de recristalizarlo de éter de petróleo. El rendimiento fue de 34 %.
 I.R. (cm⁻¹) 1730 (tens. CO), 800 (tens. gem -CH₃)
 RMN-¹H (60 MHz) δ : 1,45 (s)

d) Síntesis de oxalato de *ter*butilo-¹⁴C₂:

d.1) Siguiendo la técnica descripta para la síntesis no marcada, se diluyeron 35 mg de ácido oxálico-¹⁴C₂ (0,85 mCi) con 930 mg de ácido oxálico anhidro, finamente pulverizado y se trataron con 5,7 g de pentacloruro de fósforo. Se obtuvieron 0,8 ml de dicloruro de oxalilo que se trataron con 6,7 ml de *ter*-butanol; 3,4 ml de piridina y 4 ml. de éter. Luego del aislamiento se obtuvieron 802,4 mg de (XXXVI) con 37 % de rendimiento. Se recristalizó hasta actividad específica constante de 0,079 mCi/mmol.

d.2) Siguiendo la técnica descripta para la síntesis no marcada, se diluyeron 140 mg de ácido oxálico- $^{14}\text{C}_2$ (3 mCi) con 875 mg de ácido oxálico anhidro y se trataron con 6 g de pentacloruro de fósforo. Se obtuvo 1 ml de dicloruro de oxalilo que se esterificó con 6,7 ml de *ter*-butanol en 3,5 ml de piridina y 4 ml de éter. Luego del aislamiento se obtuvieron 340 mg del diés-ter radiactivo (15 % de rendimiento). Se recristalizó hasta actividad constante de 0,266 mCi/mmol.

e) Síntesis de oxalacetato de d*ter*-butilo 64 (XXXVII):

Bajo condiciones anhidras se hicieron reaccionar 0,24 g de potasio metálico sobre 7,5 ml de *ter*-butanol. Una vez formado el *ter*-butóxido de potasio se agregaron 1,28 g de oxalato de d*ter*butilo (XXXVI) y 0,8 ml de acetato de *ter*-butilo (XXXV).

Luego de 3 hs. de reflujo la mezcla de reacción se solidificó gradualmente formándose un precipitado blanco lechoso. Una vez frío se disolvió rápidamente en agua (el procedimiento indicado en literatura de usar NaOH 2 % no es aconsejable, ya que con agua se hidroliza el *ter*-butóxido de potasio en exceso y un medio demasiado básico ocasiona la rápida hidrólisis del diéster (XXXVII). Se separaron las fases y la fase acuosa se lavó con éter y posteriormente se acidificó con ácido sulfúrico 2 % y se extrajo 3 veces con éter.

Las fases etéreas reunidas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y al evaporar el solvente se obtuvieron 0,95 g de cristales de (XXXVII), rendimiento 65 %. P.f. 90-91°C.

P.F. Lit⁶⁴ 90-91°C.

I.R. (cm⁻¹) 1730 (tens. CO), 850 (tens. gem-CH₃).

RMN-¹H (60 MHz) δ : 1,55 (s, 18H), 6,1 (s.a., 2H).

f) Síntesis del ácido oxalacético (XXXIV)⁶⁴:

1,0 g del diéster cristalino (XXXVII) se disolvió en 5 ml de benceno anhidro y 20 mg de ácido p-toluensulfónico, y se reflujo durante 1 hora. En el curso de la reacción se eliminó isobuteno y precipitó el ácido *trans*-hidroxifumárico en forma de hojuelas amarillas. Se obtuvieron 487 mg (90 % de rendimiento) de P.F. 182-183°C. (P.F. lit. 183-184°C).

El compuesto aislado se recrystalizó de éter-etílico-éter de petróleo, y se obtuvo el isómero *cis*, el ácido *cis*-hidroximaleico de P.F. 151-153°C. (P.F. lit.⁶⁴ 152°C)

E.M. m/z (asignación, %) 132 (M⁺⁺, 8); 113 (M⁺⁺-18, 18); 87 (M⁺-COOH, 100); 69 (M⁺-COOH-18, 60); 45 (COO⁺, 87); 44 (CO₂, 48).

RMN-¹H (60 MHz) en CD₃OD, a una concentración de 0,5 M⁹²

δ: 2,89 (b.a. forma hemiacetálica)

3,79 (b.a. forma ceto)

5,90 (b.a. forma enólica)

g) Síntesis de ácido oxalacético-4-¹⁴C:

110 mg de potasio se hicieron reaccionar con 3,2 ml de *ter*-butanol en condiciones anhidras y se agregaron 0,510 mg de oxa -

lato de *diter*-butilo (XXXVI) y 0,2 ml de acetato de *ter*-butilo- $1-^{14}\text{C}$ de actividad específica $4,37 \times 10^8$ dpm/mmol (0,1987 dpm/mmol).

Luego del tratamiento descrito en g), se obtuvo XXXVII, el que por la reacción descrita en f) produjo 228,3 mg de ácido *trans*-hidroxifumárico $4-^{14}\text{C}$ crudo, de actividad $1,5 \times 10^8$ dpm/mmol (0,068 mCi/mmol). Luego de recristalizar hasta actividad constante quedaron 147 mg de ácido oxalacético- $4-^{14}\text{C}$ de actividad $1,95 \times 10^8$ dpm/mmol (0,0886 mCi/mmol).

h) Síntesis de ácido oxalacético- $1,2-^{14}\text{C}_2$:

h.1) 150 mg de potasio se hicieron reaccionar en 5 ml de *ter*-butanol en condiciones anhidras y se agregaron 800 mg de oxalato de *diter*-butilo- $^{14}\text{C}_2$ (0,079 mCi/mmol) y 0,5 ml de acetato de *ter*-butilo. Luego de los tratamientos descritos en g) y en f) se obtuvieron 280 mg de ácido *trans*-hidroxifumárico crudo de actividad específica $1,4 \times 10^8$ dpm/mmol (0,064 mCi/mmol).

Luego de recristalizar hasta actividad constante quedaron 271 mg de ácido oxalacético de actividad $1,7 \times 10^8$ dpm/mmol (0,077 mCi/mmol).

h.2) 80 mg de potasio se hicieron reaccionar con 2,5 ml de *ter*-butanol en condiciones anhidras y se agregaron 340 mg de oxalato de *diter*-butilo- $^{14}\text{C}_2$ (0,266 mCi/mmol) y 0,25 ml de acetato de *ter*-butilo. Luego de los tratamientos descritos en g) y en f) y de recristalizar hasta actividad constante, se obtuvieron 140 mg de ácido oxalacético con actividad de $3,6 \times 10^8$ dpm/mmol (0,164 mCi/mmol).

Inoculación de trazadores radiactivos

Método A

En el bulbo que crecía en terreno abierto se practicaron 3 orificios de 3 mm de diámetro por 15 cm de profundidad y se llenaron con 1/12 del volumen total a inocular, es decir, de la solución del trazador disuelto en solución reguladora de fosfato 0,1 M, pH = 7,4.

En las inoculaciones realizadas con ácido oxalacético, éste se disolvió en dicha solución reguladora, hasta una concentración no mayor de 0,09 M, en el instante previo a la inoculación.

Cada orificio se selló con un tapón del mismo tejido del bulbo. La operación se repitió durante 4 días consecutivos, a distintas alturas y con distintas inclinaciones sobre la su -
perficie descubierta del bulbo.

Durante los días que siguieron a la inoculación y hasta la cosecha, los orificios se llenaron con agua destilada cada 2 o 3 días.

Método B

Sobre la superficie descubierta del bulbo se procedió según lo señalado en el Método A, reservándose una parte del vo -
lumen a inocular para hacerlo en una forma diferente:

Con hebras de hilo de zurcir no mercerizado, se atravesaron varias hojas de la planta, cerca de su base.

Se sumergieron ambos extremos de la mecha en un frasquito que contenía la solución del trazador remanente.

Durante los días que siguieron a la inoculación y hasta la cosecha, los orificios y el frasquito se llenaron con agua destilada cada 2 o 3 días. En caso de lluvia se cubrió la planta con un plástico.

Método C

Se desenterró un bulbo en período de latencia evitándose la acción perjudicial de la luz sobre las raíces.

Se lavó y pesó. Se colocó en un recipiente, protegido de la luz de tal forma que las raíces quedaron sumergidas en un litro de solución hidropónica diluída 1 20 y 350 mg de sorbato ácido de potasio (*trans, trans-2,4-hexadienoico*).

La solución se mantuvo aireada con un burbujeador durante 7 días.

Luego de una semana se volvió a pesar no observándose variación alguna.

Medio hidropónico¹⁰⁶: componentes para un litro de solución:

BO_3H_3	15 mg	ClK	800 mg
$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$	32 mg	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ anhidro	165 mg
SO_4Mg anhidro	3600 mg	SO_4Cu	40 mg
SO_4Na anhidro	2000 mg	$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27 mg
IK	7,5 mg	$\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	93 mg
$(\text{NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2900 mg	MoO_3	0,005 mg

Aislamiento de scillirósido

Se cortó en pequeños trozos un bulbo recién cosechado, del que se descartaron raíces y hojas (en caso de tenerlas). Se se_ucó en estufa con corriente de aire a una temperatura menor de 50°C, durante 10 días. Una vez secas, las escamas se molieron. El polvo se extrajo con solvente, según dos técnicas:

a) Obtención del extracto de glicósidos de bufadienólidos

Técnica 1: ³

El polvo de *Scilla* se extrajo 3 veces con 1,5 l de etanol cada vez, la última extracción se realizó a 50°C aproximadamente. El extracto etanólico se llevó a seco al vacío.

Se tomó el residuo seco con 1,5 l de agua y se trató con hidróxido de plomo II recientemente preparado de la siguiente forma: 38 g de acetato de plomo se disolvieron en 250 ml de agua y se añadió una solución de 8 g de NaOH en 100 ml de agua. El precipitado formado se lavó por decantación varias veces hasta neutralidad de las aguas de lavado.

La solución tratada con el hidróxido de plomo se dejó reposar durante la noche y se filtró. El filtrado fue concentrado a 1/3 de su volumen por liofilización.

El liofilizado se extrajo con cloroformo, y finalmente con cloroformo-n-butanol (7 3).

Técnica 2: ²³

El bulbo seco finamente molido se extrajo 3 veces con 1,5 l

de metanol, la última extracción se realizó a 50°C aproximadamente.

El extracto metanólico se concentró a presión reducida hasta 500 ml, diluyéndose entonces con igual volumen de agua.

Se agregaron luego 32 g de acetato de plomo trihidrato en 90 ml de agua y amoníaco 2N en cantidad suficiente como para llevar el pH a 6,3. La solución se tornó verde y se formó un precipitado lechoso en suspensión que; luego de 2 horas, se filtró con dificultad por lecho de Celite.

Luego se eliminó el metanol del filtrado por concentración al vacío, hasta un volumen de 400 ml.

Este extracto acuoso se extrajo primero con cloroformo y luego 3 veces con cloroformo - *n*-butanol 7/3 (300 ml cada vez).

b) Purificación del extracto por cromatografía en columna.

El extracto cloroformo-butanólico, que contenía los glicósidos cardiotónicos, se llevó a seco a presión reducida y se purificó por cromatografía de adsorción, para aislar al scillirósido del resto de los bufadienólidos.

Se utilizó Silicagel G Merck, y se sembró con pastilla (2 g de silicagel para la pastilla y 25 g para la columna, por gramo de extracto).

La elución comenzó utilizando cloroformo como solvente (1 l aproximadamente), luego siguió con 3 % de metanol en cloroformo. Con este solvente se eluyó el glicósido proscillaridina (II) (usualmente unos pocos miligramos). Con metanol 4 % en clorofor

mo se aisló el scillirósido. Las últimas fracciones de scillirósido se obtuvieron impurificadas con glicósidos más polares, que no pudieron diferenciarse por este método cromatográfico.

c) Aislamiento de acetato de β -sitosterol:

El extracto clorofórmico obtenido en a), se sometió a acetilación con anhídrido acético (2 ml) y piridina (2 ml), con agitación durante 24 hs. a temperatura ambiente. Luego la mezcla de reacción se volcó en agua. El precipitado formado se filtró y secó.

Este extracto acetilado se separó en sus componentes por cromatografía preparativa de adsorción (alúmina de actividad 1 en placa de vidrio). Se desarrolló con cloroformo y se eluyó posteriormente la banda correspondiente cuyo R_f coincidía con el acetato de β -sitosterol patrón.

Aislamiento de acetato de β -sitosterol radiactivo:

Por el procedimiento descripto aplicado sobre el extracto clorofórmico del bulbo inoculado con oxalacetato -1,2- $^{14}C_2$ (Tabla 3, entrada 9), se obtuvieron 15 mg de acetato de β -sitosterol, que recristalizados de metanol hasta actividad constante rindieron 2,8 mg de actividad específica 304 dpm/mg ($12,6 \times 10^4$ dpm/mol).

Por el mismo procedimiento se evaluaron las radiactividades específicas del acetato de β -sitosterol aislado en ocasión de haber inoculado bulbos con acetato-1- ^{14}C ; succinato-1- $^{14}C_2$ y

oxalacetato-4-¹⁴C (Tabla 3, entradas 2, 4 y 6 respectivamente),
obteniéndose los siguientes valores:

entrada 2: 2200 dpm/mg (91×10^4 dpm/mmol)

entrada 4: 222 dpm/mg ($9,2 \times 10^4$ dpm/mmol)

entrada 6: 66 dpm/mg (1×10^4 dpm/mmol)

Reacciones de degradación sobre scillirósido

a) Reacción de degradación con permanganato de potasio

62 mg de scillirósido se acetilaron con anhídrido acético (0,1 ml) y piridina (0,1 ml), durante 24 hs. a temperatura ambiente. Se volcó luego la reacción sobre hielo-agua y se filtró el precipitado obtenido de tetraacetilscillirósido (XL).

Tetraacetilscillirósido (XL):

P.F. 199-200°C

RMN-¹H (100 MHz) δ: 0,82 (s, 3H, Me-18); 1,22 (s, 3H, Me-19)
 1,92 (s, 3H, MeCO); 1,97 (s, 3H, MeCO) ;
 2,0 (s, 3H, MeCO); 2,30 (s, 6H, MeCO) ;
 4,2 (m, 3H, H-3 y CH₂-O-); 4,54 (d, J=8 Hz,
 1H, H-C-O); 4,7-5,3 (m, 4H, protones del
 azúcar); 5,9 (s.a., 1H, H-4); 6,16 (d, J=
 8 Hz, 1H, H-23); 7,10 (d, J' = 2 Hz, 1H,
 H-21); 7,76 (dd, J=8 y J'=2 Hz, 1H, H-22)

RMN-¹³C (ppm) 18,21 (C-19); 19,07 (C-18); 20,69; 20,83;
 21,40; 21,60 y 22,22 (CH₃CO); 37,20 (C-10);
 49,40 (C-13); 62,05 (C-6'); 84,59 (C-14);
 99,30 (C-1'); 115,43 (C-23); 122,83 (C-20);
 130,22 (C-4); 141,81 (C-5); 146,75 (C-22);
 148,44 (C-21); 162,40 (C-24); 168,2; 169,48;
 169,60; 170,45 y 170,79 (CH₃-CO).

E.M. m/Z (asignación, %) 457 ($C_{26}H_{33}O_7$ = aglicona- O^+ , 100)
331 ($C_{14}H_{19}O_9$ = tetra-O-acetilglucosil, 60).

78,8 mg de (XL) se disolvieron en 5 ml de acetona, a 0°C. Se agregaron entonces 60 mg de permanganato de potasio finamente pulverizados y se dejó, con muy buena agitación, elevar la temperatura hasta la ambiente. Al cabo de una hora se agregaron 30 mg más de permanganato de potasio. Esta operación se repitió cada 2 hs hasta que no se detectó más tetraacetilscillirósido por ccd (solvente de desarrollo 1).

Para finalizar la reacción se filtró, se llevó a seco, y el residuo se trató con agua, se acidificó con ácido sulfúrico 2N hasta pH = 3,5 y se extrajo con cloroformo. La fase orgánica se lavó con agua, se secó y se evaporó al vacío. El producto de oxidación crudo se disolvió en 7,5 ml de cloroformo-éter 2 1 y, para extraer las partes ácidas, se agitó varias veces con solución fría de hidróxido de sodio 2 N.

De la fase etérea llevada a neutralidad y evaporada se obtuvo una fracción neutra.

Los extractos básicos se acidificaron y extrajeron con cloroformo, obteniéndose la fracción ácida.

Entre los dos extractos reunidos el rendimiento obtenido fue siempre menor al 50 %.

Una esterificación con diazometano en cloroformo, de la fracción ácida, produjo cambios hacia R_f mayores para más de uno de los componentes de dicho extracto. No se logró aislar ningún producto puro.

b) Secuencia degradativa para la obtención de los carbonos 22, 23 y 24

A 150 mg de scillirósido en 10 ml de solvente (alcohol ó dioxano-agua 4 : 1), se agregaron 160 mg de borohidruro de sodio a temperatura ambiente. Periódicamente se agregaban 10 ó 20 mg de borohidruro de sodio, al observarse la cesación de evolución de burbujas. Luego de llegar al punto final de la reacción, determinado por ccd como desaparición del scillirósido de partida, se neutralizó con clorhídrico diluido para destruir el exceso de borohidruro.

La mezcla se volcó luego en agua y se extrajo con cloro - formo-*n*-butanol 7 : 3, hasta que no se observó permanencia de sustancia orgánica en la fase acuosa por ccd (solvente de desarrollo 3).

Scillirósido (I):

P.f. 170-171°C

P.f. lit³ 168-170°C, 200°C d.

U.V. $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{MeOH}}$: 300 m μ (log ϵ = 3,74)

I.R. (cm⁻¹) 3000-3350 (tens. O-H), 1735, 1720, 1640 y 1550 (tens. del anillo α -pirona), 1250 (tens. C-O-C de grupo acetoxilo-).

RMN-¹H (100 MHz) δ : 0,86 (s, 3H, Me-18); 1,26 (s, 3H, Me-19); 2,06 (s, 3H, Me-COO-C-6); 3,82 (t, 2H, J= 2 Hz, CH₂-C-6'); 4,24-4,4 (ma, 1H, H-C-3); 4,4 (d, 1H, J = 8 Hz, H-C-1')¹⁰⁷; 5,5 (s.a.,

1H, H-C-6)¹⁰⁷; 5,9 (sa, 1H, H-C-4)¹⁸; 6,3 (d, 1H, J=8 Hz, H-C-23); 7,24 (d, 1H, J'=2 Hz, H-C-21); 7,88 (dd, 1H, J=8 Hz, J'=2 Hz, H-C-22).

La mezcla resultante de la reducción con borohidruro de sodio sobre el scillirósido se acetiló con anhídrido acético (0,1 ml) y piridina (0,1 ml), durante 24 hs, a temperatura ambiente. Sobre esta mezcla se realizaron los siguientes espectros:

RMN-¹H (60 MHz) δ = 0,86-0,92 (sa, 3H, Me-18); 1,22 (s, 3H, Me-19); 3,95-4,3 (ma., 3H, H-C-3 y H-C-6'); 5,4-5,6 (sa, 1H, H-C-6); 5,45 (dd, integración menor que 1, tentativamente asignado al H-C-22 de doble enlace 20 (22)); 5,84 (sa, 1H, H-C-4); 7,22 (sa, integración menor que 1, tentativamente asignado a H-C-21 en doble enlace 20 (21)).

RMN-¹³C cambios ocurridos en la zona de carbonos sp² con respecto al espectro de tetraacetilscillirósido (XL)
Desaparición de las señales a ppm:
168,3 (C-24); 115,4 (C-23)
Permanencia de las siguientes señales:
123 (C-20)*; 130,2 (C-4); 141,8 (C-5); 146,8 (C-22)*;
148,5 (C-21)*.

* Señales múltiples sin resolución.

c) Secuencia degradativa para aislar el C-24.

a) Metilación del scillirósido.

Se disolvieron 124 mg de scillirósido en 1 ml de N,N-dimetilformamida, secada sobre óxido de bario. Se agregaron 190 mg de óxido de bario finamente pulverizado y se dejó, con buena agitación, durante 1 hora a temperatura ambiente, en balón cerrado para evitar la carbonatación del óxido de bario. La mezcla se enfrió luego en baño de agua y hielo y se agregaron 0,2 ml de yoduro de metilo, registrándose un aumento en la temperatura de la reacción. Al cabo de 3 horas se agregaron 0,3 ml más de yoduro de metilo, y se dejó al abrigo de la luz, y a temperatura ambiente durante 24 hs.

La mezcla amarillenta semisólida obtenida se volcó en 70 ml de cloroformo y se dejó 2 hs. con agitación, expuesto a la atmósfera para procurar la carbonatación del hidróxido de bario remanente. Se filtró luego por Celite y se extrajo 3 veces con agua (y con solución de tiosulfato de sodio en el caso de persistencia del color del yodo).

La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad obteniéndose un producto de aspecto vidrioso.

Al analizar el producto por ccd de silicagel, con solvente de desarrollo 3, revelador 2, se observó la desaparición del scillirósido de partida ($R_f = 0,55$), y la aparición de dos manchas marrones principales de $R_f = 0,82$ y $R_f = 0,86$. El rendimiento en estas metilaciones osciló entre un 66 y un 89 %, observándose mejores rendimientos cuando menor fuera la masa de partida (con

cantidades mayores se veía dificultada la agitación, por ser la mezcla de reactivos de consistencia viscosa y heterogénea). Tal como se indicó anteriormente (pág.58) el producto crudo se procesó directamente sin purificación previa.

Producto crudo de metilación del scillirósido:

I.R. (cm^{-1}): 1600 (tens. C=O), 1050 (tens. C-O-C)

RMN- ^1H (100 MHz) en comparación con el espectro de scillirósido (I) pág. 125, se aprecia (Fig.13) la desaparición de la señal a $\delta = 2,06$ y la aparición de las siguientes: 3,16 (s, asignado al grupo $\text{CH}_3\text{-O-CH-21}$), 3,38, 3,44; 3,47; 3,52; 3,56 (5 s, azúcar, C-O- CH_3)¹⁰⁸.
3,64 (s, $\text{CH}_3\text{-O-CO-24}$)

b) Reacción del producto crudo de metilación del scillirósido con fenil-litio.

Se obtuvo el reactivo fenil-litio⁷⁹ en estado sólido, por reacción de *n*-butil-litio e iodobenceno. Se conservó en heladera y oscuridad.

0,2 mmoles del producto crudo de metilación se llevaron a sequedad en un balón pequeño cerrado con un tapón de látex reversible, y se hizo vacío. Se agregaron 2 ml de tetrahidrofurano recientemente destilado sobre sodio y se enfrió a 0°C.

Se agregaron por medio de una jeringa 10 mmoles de fenil-litio, disueltos en 4 ml de tetrahidrofurano , enfriados a 0°C.

Se observó inmediatamente aumento de la temperatura y oscurecimiento del medio de reacción.

Se dejó el sistema a temperatura ambiente durante 3 hs, y se volcó sobre hielo (reacción exotérmica). Se llevó luego a leve acidez con ácido clorhídrico 2N y se extrajo 3 veces con éter de petróleo-cloroformo 8 2. Las fases orgánicas se lavaron con agua, se secaron sobre SO_4Na_2 , y se llevaron a se-
quedad, obteniéndose un producto crudo de aspecto vidrioso.

Un análisis por ccd, solvente 2, revelador 2, mostró que habían desaparecido los reactivos metilados iniciales y había una nueva mancha amarilla de $R_f = 0,7$. Cuando se reveló con iodo aparecieron algunas manchas de R_f menor (productos secundarios aromáticos, debido al exceso de reactivo fenil-litio).

El análisis por cgl indicó dos productos principales, cuando se utilizó una columna S-E-30 y la temperatura del horno se varió entre 110 y 250°C a razón de 10° por minuto (tiempos de retención registrados: 10,62 y 26,15 minutos).

c) Oxidación y aislamiento del C-24 como oxima de benzofenona.

El producto crudo de fenilación se suspendió en 10 ml de ácido sulfúrico 10 % y se le agregaron 3 g de trióxido de cromo. La mezcla se destiló inmediatamente bajo corriente de nitrógeno y se recogió en un balón enfriado conteniendo 5 ml de hidróxido de sodio 10 %. Se agregó agua al balón de reacción para que su volumen se mantuviera entre 7 y 10 ml, hasta recoger unos 60 ml

de destilado. Este destilado alcalino se extrajo con éter y se llevó a seco, obteniéndose un 100 % de rendimiento en benzofenona (como gotas aceitosas).

La benzofenona cruda aislada se disolvió en 7 ml de etanol-agua 4 3 y se agregaron 30 mg de clorhidrato de hidroxilamina y 180 mg de hidróxido de potasio. La solución se calentó a baño maría durante 10 minutos. Luego se enfrió el sistema y se agregó ácido clorhídrico diluido. Al tiempo precipitaron cristales incoloros de la oxima (aproximadamente el rendimiento osciló entre un 60 y 80 % respecto del scillirósido de partida). El p.f. de la oxima fue de 144°C (P.F. lit ¹⁰⁵ 144°C) y no descendió por P.F. mezcla.

En caso necesario se recristalizó de etanol 95 %.

Aplicación de la secuencia degradativa descripta al scillirósido radiactivo.

Se partió de 58,8 mg de scillirósido de actividad específica 65,7 dpm/mg (Tabla 3, entrada 9), que se trataron con 130 mg de óxido de bario y 0,2 ml de yoduro de metilo en 1 ml de N, N-dimetilformamida. Se aislaron 64,6 mg de scillirósido metilado, mezcla que presentó una actividad de 45 dpm/mg, es decir, se recuperó un 76 % de la radiactividad de partida. El resto de la marcación se localizó en las aguas madres de metilación.

El producto crudo de metilación se trató con 5 mmoles de fenil-litio en tetrahidrofurano a 0°C, obteniéndose el producto crudo de fenilación. Posteriormente se sometió al nuevo producto a oxidación, destilación y derivatización, según la técnica ya

descripta.

Se obtuvieron 6,8 mg de oxima de benzofenona que se recristalizaron hasta actividad específica constante de 8 dpm/mg (1500 dpm/mmol), que correspondió a un 3,9 % de la actividad específica del scilirósido de partida.

d) Secuencia degradativa tendiente a aislar la D-glucosa

y el carbono 24 del scillirósido.

1) a) Hidrogenación del scillirósido:

Las mejores condiciones de hidrogenación resultaron ser las de la entrada 5 de la Tabla 1 (pág. 63).

50 mg de scillirósido se disolvieron en 50 ml de metanol, y se hidrogenaron a temperatura ambiente y presión atmosférica con un 10 % pp de dióxido de platino como catalizador, durante 5,5 hs. Una vez desaparecido el scillirósido de partida, se filtró la solución por lecho de Celite y se llevó a sequedad, obteniéndose un producto vidrioso con buen rendimiento : 92-97 %.

b) Separación de los productos de hidrogenación:

El análisis por ccd se llevó a cabo con solventes de desarrollo 3, revelador 2, observándose las zonas A : $R_{fA} = 0,75-0,8$; B : $R_{fB} = 0,45-0,5$; y C : $R_{fC} = 0,2$. La cromatografía preparativa se llevó a cabo en columna con silicagel H y presión de nitrógeno, en una relación de muestra a relleno de

1 : 100, y una altura máxima de 20-25 cm. Como solvente de armado y primera elución se empleó cloroformo con 6 % de metanol (la siembra se efectuó en pastilla), separándose así la zona A, amorfa (discutida en la pág 64).

Con cloroformo y 8 % de metanol se aisló la zona B, a la que se asignó la estructura genérica de hexahidroscillirósido.

Al llevar a sequedad quedó un sólido de P.F. 150-151°C.

Zona B : hexahidroscillirósido

RMN-¹H (100 MHz) : δ : 0,98 (sa, asignado tentativamente a los hidrógenos siguientes ⁸¹:

Me-19 de serie 5 α , 14 β y Me-18 de serie 5 β , 14 β con contribuciones de grupos 3 β OH y 6 β H).

1,14 y 1,18 (2 s, Me-19 de serie 5 α 14 β + 3 β OH + 6 β acetato, Me-19 de serie 5 β , 14 β + 3 β OH + 6 β H, Me-18 de serie 5 α 14 β + 3 β OH + 6 β H, Me-18 de serie 5 β , 14 β + 3 β OH + 6 β acetato), 2,0 ($\text{CH}_3\text{-COO-C-6}$, en proporción 20-25 %), 4,4 (d, 1H, J= 8 Hz, H-C-1').

E.M. m/Z (asignación,%): 626 (M^{++} , 0); 403 (M^+ -glucosa-($\text{CH}_3\text{-CO}$), 3) 388 (403-15 y 406-18, 41); 373 (388-15 y 391-18, 13); 370 (388-18, 22); 355 (370-15, 13); 337 (355-18, 15); 319 (337-18, 40); 271 (370-cadena lateral, 7); 255 (355-cadena lateral-1); 406 ($\text{M}^+\text{-C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5$ -42-15, 20).

Con solvente cloroformo con 10-12 % de metanol se eluyó la zona C. Al llevarla a sequedad se obtuvo un producto sólido, de P.F. 209-210°C, cuyas características se discutieron en la página 64.

2) Hidrólisis del producto crudo de hidrogenación del scillirósido y obtención de penta-O-acetil-D-glucopiranosa.

Las mejores condiciones de hidrólisis resultaron ser las de la entrada 4 de la Tabla 2 (pág. 66).

El producto crudo resultante de la hidrogenación de 50 mg de scillirósido se disolvió en 2 ml de metanol, y se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 N. La solución se reflujo 4 hs., al término de las cuales el sistema estaba turbio. Se diluyó, entonces, con 3 veces su volumen de agua y se extrajo 4 veces con cloroformo (10 ml cada vez). El extracto orgánico se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad, obteniéndose así la mezcla cruda de agliconas.

La solución acuosa remanente se neutralizó con carbonato de bario, se filtró por lecho de Celite y se liofilizó dicho filtrado. (Un análisis por ccd de partición indicó presencia de glucosa libre, por comparación con patrón auténtico, solv. de desarrollo: *n*-butanol, piridina, agua 10:4:4). El residuo sólido se trató con anhídrido acético-piridina (1:1; 2 ml) y se lo dejó una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se volcó sobre hielo-agua y el precipitado obtenido se filtró y se secó.

Se recrystalizó de etanol la penta-O-acetil-D-glucopiranosa, obtenida con un rendimiento del 86 %, aproximadamente, con res-

pecto al scillirósido. Sus propiedades y constantes físicas resultaron idénticas a las del patrón auténtico.

Mezcla cruda de agliconas.

RMN-¹H (100 MHz) δ : 0,9 (sa*, Me-19 serie 5 α , 14 β); 1,11-1,14 (sa*, Me-18 de serie 5 α , 14 β y 5 β , 14 β); 1,26 (sa*, Me-19 de serie 5 β , 14 β); 3,64 (s, CH₃-OCO-24).

* Los sa se deben al efecto de los distintos sustituyentes.

La acetilación de esta mezcla mostró en su RMN-¹H (Figura 17), la presencia de dos señales adicionales:

δ : 2.0 (s, CH₃-COO-) y 5,24 (s, H-C-6 con 6 β acetoxi).

E.M. m/z (asignación, %) 386 (M⁺: 2 H₂O, 15); 371 (386-15, 25)
353 (371-18, 100); 338 (371-15, 23);
271 (371-cadena lateral-1, 25); 253
(353-cadena lateral-1, 30); 370 (M⁺:
-2 H₂O, 50); 355 (370-15, 44); 337
355-18, 82); 255 (355-cadena lateral-1,
15); 237 (337-cadena lateral-1, 15).

M⁺ = 412 (compuesto (XLI))
M⁺ = 406 (compuesto (XLII)) } Figura 18.

3) Reacción de la mezcla cruda de agliconas con fenil-litio.

Se procedió en la forma ya descripta para scillirósido metilado (Pág. 59).

4) Oxidación y aislamiento del C-24 como oxima de benzofenona:

Se siguió un procedimiento totalmente análogo al descrito en la página 130 para lograr el aislamiento del C-24 como oxima de benzofenona.

Aplicación de la secuencia degradativa descrita al scillirósido radiactivo.

a) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 9, de la Tabla 3:

50 mg de scillirósido de actividad específica 65,7 dpm/mg (40750 dpm/mmol), se hidrogenaron según la técnica descrita en 1), obteniéndose 47,6 mg de producto hidrogenado, de actividad 53 dpm/mg.

46,4 mg del producto de hidrogenación se sometieron a hidrólisis bajo las condiciones descritas para el compuesto no radiactivo, rindiendo 32,4 mg de mezcla de agliconas, de actividad específica 61 dpm/mg.

De la solución acuosa remanente se aisló glucosa, y luego de su acetilación se obtuvieron 26,7 mg de penta -O-acetil-D-glucosa, actividad específica 11,6 dpm/mg (4524 dpm/mmol). (Tabla 5).

31,4 mg de la mezcla de agliconas se sometieron a reacción con fenil-litio y posterior oxidación y derivatización de la benzofenona producida. Se obtuvieron 4 mg de oxima, de actividad específica 5 dpm/mg (1546 dpm/mmol).

b) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 1, Tabla 3.

35 mg de scillirósido de actividad $1,02 \times 10^7$ dpm/mmol, se diluyeron con scillirósido no activo y se llevó a actividad específica constante de $2,08 \times 10^6$ dpm/mmol.

Se tomaron 21,22 mg de dicho scillirósido diluido ($3,36 \times 10^3$ dpm/mg) y se hidrogenaron según la técnica 1), obteniéndose 17,6 mg crudos de actividad 3102 dpm/mg.

16,4 mg de dicho producto crudo de hidrogenación se sometieron a hidrólisis ya descrita. Luego de la extracción con cloroformo se obtuvieron 11,70 mg de actividad 2862 dpm/mg.

De la solución acuosa remanente se aisló glucosa, que, luego de acetilada dio 12,9 mg de penta-O-acetil-D-glucosa de actividad específica $7,9 \times 10^5$ dpm/mmol. (Tabla 10, pág. 108).

c) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 4, Tabla 3.

Los 100 mg de scillirósido obtenido de actividad específica $6,1 \times 10^4$ dpm/mmol, se diluyeron con scillirósido frío y se recristalizó hasta actividad específica constante de $28,2 \times 10^3$ dpm/mmol. Se tomaron 29,25 mg de este scillirósido (45,5 dpm/mg) y se hidrogenaron según lo indicado anteriormente, obteniéndose 33,3 mg de producto crudo de actividad 30,8 dpm/mg.

Luego de hidrólisis de este producto crudo se aislaron 13,6 mg de mezcla de agliconas de actividad 27 dpm/mg.

De la solución acuosa remanente y luego de acetilación, se

podieron aislar 11,95 mg de glucosa peracetilada de actividad específica 36 dpm/mg (14×10^3 dpm/mmol). (Tabla 10).

e) Secuencia degradativa tendiente a aislar independientemente los carbonos componentes del grupo acetato de C-6.

1) Metilación del scillirósido.

Se procedió según la técnica descrita en la página 128

Las aguas madres de lavado de la metilación se alcalinizaron con hidróxido de sodio hasta pH=9, y se llevaron a sequedad en baño de aceite a 120-140°C. De esta forma se obtuvo acetato de sodio anhidro proveniente del grupo acetilo de C-6 del scillirósido, impurificado con sales inorgánicas que no afectaron el curso posterior de la reacción.

2) Degradación de Schmidt sobre acetato de sodio.

A 20 mg de acetato de sodio contenidos en un balón de 10 ml de dos bocas, se le agregaron 0,5-1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se entibió el balón en baño de agua hasta que se disolvió su contenido. Luego se enfrió el sistema a 0°C y se purgó con nitrógeno el aparato. A los 10 minutos se agregaron 50 mg de azida sódica, e inmediatamente se reconectó la circulación de nitrógeno. Se mantuvo la reacción a 60°C durante 2 hs recogiendo el CO₂ en una trampa de solución de hidróxido de bario. Previo a esta trampa se había colocado otra con permanganato de potasio 5 % en ácido sulfúrico 2N, para eliminar el ácido hidra

zoico que pudiera volatilizarse.

El precipitado de carbonato de bario se filtró rápidamente al vacío y evitando todo contacto con la atmósfera para impedir carbonatación exógena contaminante, y la concomitante dilución del producto radiactivo. La actividad específica del sólido se determinó aplicando el método descrito en la página 110

El sulfato de dimetilamonio remanente en el balón de reacción se volcó sobre 100 ml de agua-hielo. Esta solución se llevó a pH básico con hidróxido de sodio 10 % y se destiló a un balón conteniendo 10 ml de ácido clorhídrico 2 N.

El destilado se liofilizó obteniéndose un residuo cristalino. A este producto crudo se le agregó 0,1 ml de cloruro de benzofilo y 4 ml de hidróxido de sodio 1 N, se tapó y agitó fuertemente. Se dejó toda la noche y finalmente se extrajo con éter etílico, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. El residuo de N-metilbenzamida, P.F. 78-79°C, se recristalizó de éter de petróleo y resultó idéntico en propiedades y constantes físicas al patrón auténtico.

Aplicación de la secuencia degradativa descrita al scillirósido radiactivo.

a) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 9, Tabla 3

79,42 mg de scillirósido de actividad específica 65,7 dpm/mg se metilaron con óxido de bario e ioduro de metilo, obteniéndose 89 mg de producto crudo de metilación (44 dpm/mg).

De las aguas madres se aisló el acetato de sodio que se some

tió a la degradación de Schmidt.

Se aislaron 12,6 mg de carbonato de bario de actividad específica 40 dpm/mg ($7,9 \times 10^3$ dpm/mmol); y 22,6 mg de N-metilbenzamida de actividad 8,8 dpm/mg ($1,5 \times 10^3$ dpm/mmol).

b) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 7, Tabla 3

Los 26,5 mg de scillirósido obtenido, de actividad específica $1,3 \times 10^5$ dpm/mmol, se diluyeron con scillirósido frío y se llevaron a actividad constante de $4,6 \times 10^4$ dpm/mmol.

Se metilaron 73,44 mg del scillirósido diluido (74,6 dpm/mg) obteniéndose 73,2 mg de producto con actividad 4 dpm/mg.

Del acetato de sodio-aislado de aguas madres y sometido a reacción de Schmidt, se aislaron 22 mg de carbonato de bario (224 dpm/mg; $4,4 \times 10^4$ dpm/mmol); y 15,1 mg de N-metilbenzamida (1,3 dpm/mg; 171 dpm/mmol).

c) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 1, Tabla 3

Los 23 mg de scillirósido obtenidos ($1,02 \times 10^7$ dpm/mmol) se diluyeron y recrystalizaron hasta actividad específica constante de $2,4 \times 10^6$ dpm/mmol.

98,01 mg del scillirósido diluido (4×10^3 dpm/mg) se metilaron obteniéndose 140 mg de producto ($2,6 \times 10^3$ dpm/mg).

Por reacción de Schmidt sobre el acetato de sodio aislado, se recogieron 16 mg de carbonato de bario de actividad específica 205 dpm/mg ($4,4 \times 10^4$ dpm/mmol); y 12,9 mg de N-metilbenzamida de actividad específica 12,2 dpm/mg ($1,65 \times 10^3$ dpm/mmol).

d) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 4 de la Tabla 3.

Los 100 mg de scillirósido obtenido (98,8 dpm/mg; $6,1 \times 10^4$ dpm/mmol), se diluyeron y llevaron a actividad constante de $28,2 \times 10^3$ dpm/mmol).

79,8 mg de este scillirósido (45,5 dpm/mg) se metilaron obteniéndose 85 mg de producto (40 dpm/mg; $2,8 \times 10^3$ dpm/mmol).

Por reacción de Schmidt sobre el acetato de sodio aislado se obtuvieron 14,2 mg de carbonato de bario de actividad específica 4,1 dpm/mg ($0,8 \times 10^3$ dpm/mmol) y 9,69 mg de N-metilbenzamida de actividad específica de 7,6 dpm/mg ($1,03 \times 10^3$ dpm/mmol).

Los resultados aquí descriptos corresponden a los datos presentados en las Tablas 4, 6 y 8 de la sección Discusión de los Resultados (págs. 93, 98 y 103 respectivamente).

f) Secuencia degradativa tendiente a aislar los pares de carbonos 10-13, y 18-19 del scillirósido.

1) Metilación del scillirósido:

Se procedió según la técnica descrita en la página 56.

2) Oxidación de Kuhn-Roth:

0,5 a 1 mmol de scillirósido metilado se colocaron en un balón al que se agregaron 5 g de trióxido de cromo y 10 ml de ácido sulfúrico 2 N. Se comenzó, entonces una destilación por arrastre con vapor, debiéndose agregar agua desde una ampolla para mantener el volumen del balón entre 10 y 15 ml. El destilado, incoloro, se recogió en un balón enfriado con hielo y se continuó la destilación hasta que las gotas recogidas no fueran ácidas (aproximadamente 60 ml). El destilado se llevó a débil basicidad con hidróxido de sodio 0,1 N y fenolftaleína como indicador, y luego se llevó a sequedad a 100°C de temperatura.

La presencia de acetato de sodio puro se detectó por ccd de celulosa. El solvente de desarrollo utilizado fue : 1 ml de hidróxido de sodio 10 % en 10 ml de etanol 95 %. La sal se detectó rociando el cromatograma con una solución de verde de bromocresol (50 mg) y ácido cítrico (200 mg) en 100 ml de agua, revelando como una mancha azul sobre fondo amarillo y se la compa

r6 con los siguientes patrones carbonato de sodio ($R_f = 0,15$); acetato de sodio ($R_f = 0,34$); propionato de sodio ($R_f = 0,44$) y butirato de sodio ($R_f = 0,53$).

3) Degradación de Schmidt.

El acetato de sodio obtenido por oxidación de Kuhn-Roth se sometió a una degradación de Schmidt según la técnica descrita en la página 74.

Aplicación de la secuencia descrita al scillirósido radiactivo.

a) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 9 de la

Tabla 3.

88 mg de scillirósido metilado crudo (44 dpm/mg, cuya obtención se detalló en la página 130) se sometieron a la oxidación de Kuhn-Roth.

Al acetato de sodio resultante se le aplicó la degradación de Schmidt, aislándose 19,3 mg de carbonato de bario (6 dpm/mg; $2,4 \times 10^3$ dpm/mmol) y 19 mg de N-metilbenzamida (1,4 dpm/mg ; $0,38 \times 10^3$ dpm/mmol). Estos resultados se discuten en la Tabla 8. (pág. 103).

b) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 1 de la

Tabla 3.

35 mg de scillirósido de actividad específica $1,02 \times 10^7$ dpm/mmol se diluyeron con scillirósido no activo y se recristalizaron hasta actividad constante de $2,08 \times 10^6$ dpm/mmol ($3,4 \times 10^3$ dpm/mg).

68,7 mg de dicho scillirósido diluido se metilaron obteniéndose 83 mg de producto crudo ($2,7 \times 10^3$ dpm/mg).

Este producto de metilación se sometió a la oxidación de Kuhn-Roth y una posterior degradación de Schmidt sobre el acetato de sodio obtenido. Se aislaron 12,9 mg de carbonato de bario (300 dpm/mg; $1,18 \times 10^5$ dpm/mmol) y 12,5 mg de N-metilbenzamida (30 dpm/mg; 8×10^3 dpm/mmol). Estos resultados se discuten en la Tabla 10 (pág.108).

c) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 4 de la

Tabla 3.

84 mg del producto de metilación (40 dpm/mg; cuya obtención se detalló en la página 142), se sometieron a una oxidación de Kuhn-Roth y posterior degradación de Schmidt sobre el acetato de sodio aislado. Se obtuvieron en esa oportunidad 17,45 mg de carbonato de bario (2 dpm/mg; $0,79 \times 10^3$ dpm/mmol) y 8,15 mg de N-metilbenzamida (9 dpm/mg; $2,4 \times 10^3$ dpm/mmol). Estos resultados se discuten en la Tabla 10 (pág. 108).

g) Secuencia degradativa tendiente a aislar los carbonos
23 y 24 del scillirósido.

1) Hidrogenación del scillirósido.

Se realizó según el procedimiento descrito en la página 62.

2) Metilación del producto crudo de hidrogenación.

Procedimiento empleado totalmente análogo al descrito para la metilación del scillirósido (página 56).

3) Formación del fenil-selénido.

Una solución de 0,34 mmoles del producto metilado, en 2 ml de tetrahidrofurano anhidro conteniendo 91 mg de HMPA (hexametil₆enfosforamida), se agregó, lentamente, a una solución de diisopropilamido de litio, enfriada a -78°C (preparada bajo nitrógeno, con 1 mmol de diisopropilamina y 640 μl de solución 1,54 M de *n*-butil-litio en hexano).

Luego de 20 minutos de espera, durante los cuales debió formarse el anión en el carbono α al éster de C-24, se agregó 1 ml de tetrahidrofurano a -78°C conteniendo 356 mg de difenildiseleno (Ph_2Se_2) ó 195 mg de cloruro de fenilselenio (ClSePh). Al finalizar dicho agregado se dejó alcanzar lentamente la temperatura ambiente.

La reacción se terminó por agregado de cloruro de amonio a -

cuoso y el producto se aisló por extracción con cloroformo.

Los extractos orgánicos se secaron y evaporaron. Luego se purificaron por cromatografía de adsorción en silicagel H con presión de nitrógeno. Con cloroformo como eluyente se eliminaron productos secundarios no polares, y con 3 % de metanol en cloroformo se aislaron los compuestos esteroidales. Estos resultaron ser idénticos a los reactivos de partida por comparación de sus espectros de RMN-¹H. Por lo tanto no se logró la formación de fenilselénidos.

Probablemente el paso fallido fue la formación del enolato del ester metílico de C-24.

Se repitió el proceso variando proporciones de base, temperaturas y tiempos de formación del enolato, no lográndose en ningún caso la obtención del compuesto esperado.

h) Secuencia degradativa tendiente a aislar los carbonos 21, 22, 23 y 24 del scillirósido.

1) Ozonólisis de tetraacetilscillirósido (XL).

120 mg de tetraacetilscillirósido (obtenidos según el procedimiento indicado en la página 123) se disolvieron en 40-50 ml de cloroformo. El sistema se enfrió a -60°C y se pasó corriente de ozono. A los 10 minutos la solución estaba azul, y a los 60 minutos se comprobó por ccd de silicagel, solvente de desarrollo 1, la desaparición del producto de partida.

Se dejó al sistema alcanzar la temperatura ambiente y se agregaron 400 mg de cinc en polvo y 3 ml de ácido acético 50 %. Se mantuvo así por 18 hs. con buena agitación. Luego se filtró por lecho de Celite y se extrajo con agua (10 ml, 3 veces) y finalmente una vez con 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N.

Se obtuvieron, entonces, dos extractos:

a) Extracto clorofórmico

b) Extracto acuoso

El extracto clorofórmico a) se llevó a sequedad (89 mg) y se observaron en su RMN- ^1H las siguientes señales características:

RMN-¹H (100 MHz) δ 0,92 (s, 3H, Me-18); 1,28 (s, 3H, Me-19); 2,02, 2,04; 2,08; 2,10; 2,18 (5 s, 15 H, Me-CO); 4,20 (m, H-3, H-6' y HO-CH₂-CO). 4,56 (d, 1H, J= 8 Hz, H-C-1'); 5,40 (t, 2 H, J= 1 Hz, H-C-6); 8,1 (s, menos que 1 H, H-CO-C-20) ; 9,50 (s, 1 H, OHC-4).

RMN-¹³C (ppm) en comparación con el espectro del tetraacetilscillirósido (XL) de la página 123, se observó la ausencia de las siguientes señales:

115,4 (C-23); 122,9 (C-20); 130,2 (C-4); 141,8 (C-5); 146,8 (C-22); 148,5 (C-21); 168,3 (C-24).

Y la aparición de tres nuevas señales en la zona de carbonos carbonílicos:

217,15 (C=O de C-5); 208,21 (CO-CH₂OH); 200,21 (CHO de C-5).

2) Obtención del C-22 como formaldehído.

El extracto clorofórmico seco, se disolvió en 5 ml de metanol y 0,6 ml de agua conteniendo 250 mg de ácido peryódico.

Se dejó reaccionar al sistema durante 48 hs. a temperatura

ambiente y luego por pasaje de nitrógeno, se recogió el formaldehído formado, proveniente del C-22, como derivado cristalino, por captura en una trampa conteniendo solución de dimedona (0,4 %).

El contenido remanente en el balón, extraído con cloroformo, indicó por RMN-¹H la presencia de un grupo metilo de éster a 3,64 ppm y grupos metilo de acetales a 3,3 ppm.

3) Obtención del C-22 como dióxido de Carbono:

En las experiencias con scillirósido radiactivo el extracto clorofórmico se disolvió en 5 ml de dioxano, se agregaron 2 ml de agua oxigenada 150 volúmenes y 0,1 ml de HCl 6 N, se dejó 2 hs con burbujeo de N₂. Luego se agregaron 250 ml de ácido periódico y se dejó 24 hs. Se captó entonces el CO₂ proveniente del C-22 como carbonato de bario, al hacer circular nuevamente nitrógeno.

4) Aislamiento de los carbonos 21, 23 y 24.

El extracto acuoso proveniente de la ozonólisis reductiva se llevó a pH= 9 con hidróxido de sodio 1 N y se dejó reposar hasta completar la precipitación del hidróxido de cinc. Luego se filtró por Celite y el filtrado se acidificó con ácido clorhídrico 6 N. De esta solución ácida se separaron por arrastre con vapor el ácido acético (agregado antes como medio de reduc

ción del ozónido) y el ácido fórmico, proveniente del C-21 del bufadienólido. El destilado se recogió sobre 5 ml de hidróxido de sodio 0,1 N. Durante la destilación se cuidó de que el residuo del balón no disminuyera más allá de 30 ml en volúmen (para evitar autoesterificación del ácido glicólico presente). La destilación se continuó hasta reacción neutra del líquido recogido.

Se tuvieron a esta altura dos soluciones:

- b₁) Extracto débilmente alcalino , destilado (contiene el C-21)
- b₂) Extracto ácido residual en el balón (contiene los carbonos 23 y 24 como ácido glicólico).

5) Obtención del C-21 como dióxido de carbono.

El extracto b₁ se liofilizó y luego, contenido en un balón cerrado con tapón de látex reversible, se le agregaron 8 ml de agua oxigenada 150 volúmenes y se lo dejó 2 hs en la heladera.

Al cabo de este tiempo se purgó el balón con nitrógeno y luego de conectarlo a un sistema de trampas con hidróxido de bario se acidificó con ácido clorhídrico 6 N, utilizando una jeringa.

Inmediatamente se captó el dióxido de carbono producido, como carbonato de bario. Este se filtró sin entrar en contacto con la atmósfera y se midió su actividad.

6) Obtención de los carbonos 23 y 24:

El extracto ácido b₂, conteniendo ácido glicólico se lio-

filizó. Luego el residuo sólido se extrajo con éter etílico (3 veces, 8 ml cada vez), y se evaporó el éter en un balón pequeño. El residuo 7-8 mg, se disolvió en 2 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M pH=5,8 y se le agregaron 120 mg de metaperiodato de sodio disueltos en 2 ml de agua. Se guardó el sistema en la oscuridad, previo purgado con nitrógeno, durante 24 hs a temperatura ambiente (25-30°C). Al cabo de este tiempo se conectó al sistema con una serie de trampas conteniendo sucesivamente: solución de dimedona 0,4 % y solución de hidróxido de bario 2 N;

Se hizo pasar por el sistema, entonces, una suave corriente de nitrógeno. Se recogió así, como carbonato de bario el CO₂ de carbono proveniente del carboxilo del ácido glicólico (es decir, el carbono 24 del scillirósido), y como derivado cristalino dimedona-formaldehído el C-2 del ácido glicólico (correspondiente al C-23 del scillirósido).

El formaldehído que permanecía aún en el balón se aisló de la siguiente forma: la solución de oxidación remanente en el balón se enfrió y se le agregó 1 ml de ácido sulfúrico 6 N; 1 ml de ioduro de potasio al 20 % y suficiente solución de arsenito de sodio (20 %) como para decolorar al iodo formado. Luego se agregaron 15 ml de solución de dimedona al 0,4 % y se formó el derivado cristalino.

Aplicación de la secuencia degradativa
descripta al scillirósido radiactivo.

a) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 9 de la Tabla 3.

102,85 mg de scillirósido de actividad específica 65,7 dpm/mg, se acetilaron obteniéndose 131 mg de tetraacetilscillirósido (XL) de actividad 51 dpm/mg ($4,02 \times 10^4$ dpm/mmol).

129 mg de dicho compuesto se ozonolizaron reductivamente, según la técnica descrita, con la consiguiente obtención de los carbonos 21, 22, 23 y 24. Los resultados se presentan en la Tabla 11:

<u>C-N°</u>	<u>mg de derivado</u>	<u>dpm/mg</u>	<u>dpm/mmol</u>
21	24,6	0,5	$0,91 \times 10^2$
22	20	0,5	$0,98 \times 10^2$
23	12,91	6	$1,67 \times 10^3$
24	33	8	$1,6 \times 10^3$

Tabla 11

b) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 1 de la Tabla 3.

73,38 mg de scillirósido ($3,4 \times 10^3$ dpm/mg; $2,08 \times 10^6$ dpm/mmol) se acetilaron obteniéndose 93,4 mg de compuesto (XL) ($2,7 \times 10^3$ dpm/mg; $2,08 \times 10^6$ dpm/mmol).

92 mg de dicho compuesto se ozonolizaron reductivamente y, luego de aplicar la totalidad de la secuencia degradativa, se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 12.

<u>C-N°</u>	<u>mg de derivado</u>	<u>dpm/mg</u>	<u>dpm/mmol</u>
21	21,3	14,0	$2,2 \times 10^3$
22	18	12,2	$2,1 \times 10^3$
23	13,31	54	$1,5 \times 10^4$
24	13,56	275	$5,4 \times 10^4$

Tabla 12.

c) Scillirósido radiactivo correspondiente a la entrada 4 de la
Tabla 3.

71,77 mg de scillirósido (45,5 dpm/mg; $2,8 \times 10^4$ dpm/mmol) se acetilaron, obteniéndose 93 mg de (XL) (34 dpm/mg; 2,68 dpm/mmol).

91 mg de dicho compuesto se ozonolizaron reductivamente y luego de aplicar la totalidad de la secuencia degradativa descripta se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 13:

<u>C-N°</u>	<u>mg de derivado</u>	<u>dpm/mg</u>	<u>dpm/mmol</u>
21	10	4,4	$0,87 \times 10^3$
22	8	4,0	$0,8 \times 10^3$
23	8,28	1,6	$0,44 \times 10^3$
24	8,6	3	$0,59 \times 10^3$

Tabla 13

Reacciones de Degradación sobre Proscillaridina

Secuencia degradativa tendiente a aislar el

C-24 de proscillaridina (II)

Se sometió a la proscillaridina a las reacciones de metilación, fenilación, oxidación y obtención de benzofenona, con posterior derivatización a su oxima, en forma totalmente análoga a la descrita para el scillirósido (página 127).

Proscillaridina:

RMN-¹H (100 MHz) δ : 0,80 (s, 3H, Me-18); 1,10 (s, 3H, Me-19);
 1,33 (d, 3H, J= 4 Hz, CH₃-ramnosa); 4,0-
 4,22 (ma, 1H, H-C-3); 4,93 (s, 1H, H-C-1'¹⁰⁹);
 5,33 (sa, 1H, H-C-4); 6,28 (d, 1H, J= 8 Hz,
 H-C-23); 7,29 (sa, 1H, J= 2 Hz, H-C-21); 7,9
 (dd, 1H, J= 8 Hz, J' = 2 Hz, H-C-22).

Producto crudo de metilación de proscillaridina:

RMN-¹H (100 Hz) aparecieron en el espectro, con respecto al de proscillaridina, las siguientes señales:
 δ : 3,3 (s, 3H, CH₃-C-21); 3,54, 3,58 (2s, de 3 CH₃-O-del azúcar); 3,64 (s, CH₃-O.OC-24).
 La integración de las señales desde 3,54 hasta 3,64 evidencian un 80 % de metilación, aproximadamente.

Secuencia degradativa tendiente a aislar L-ramnosa y el C-24
de proscillaridina.

1) Hidrogenación catalítica de proscillaridina:

Se utilizaron exactamente las condiciones óptimas de hidrogenación del scillirósido (página 63).

Un análisis por ccd (silicagel, solvente de desarrollo 3, revelador 2) mostró tres zonas bien diferenciadas que se designaron como A', B' y C', por analogía con lo encontrado para scillirósido (sus relaciones frontales mantuvieron valores semejantes a los indicados para I, página 62).

Luego de una purificación por columna de silicagel H con presión de nitrógeno, y con eluyente cloroformo y proporciones crecientes de metanol, se aislaron las tres zonas mencionadas, que se encontraron en una relación de masas del 3, 75 y 20 % respectivamente.

Las distintas zonas presentaron características espectrales diferentes, que se presentan a continuación:

Zona A'

RMN-¹H (100 MHz) δ : 0,76 (s, Me-19 de la serie 5 α , 14 β);
1,1 (s, Me-18 y 19 de la serie 5 β , 14 β);
1,2 (Me-18 de la serie 5 α , 14 β); 1,3
(Me- de C-6 de ramnosa).

Zona B'

Asignada tentativamente a la estructura de hexahidroproscillaridina.

RMN-¹H (100 MHz) δ : 0,78 (s, Me-19 de la serie 5 α , 14 β); 1,1 (s, Me-18 y Me-19 de la serie 5 β , 14 β); 1,2 (Me-18 de la serie 5 α , 14 β); 1,3 (d, 3H, CH₃-C-6 de ramnosa); 4,94 (s, 1H, H-C-1').

E.M. m/z (asignación, %): 419 (M⁺ - C₅H₉O₃, 2); 401 (419-18, 17); 388 (M⁺ - C₆H₁₂O₄, 3,6); 370 (188-18, 10); 373 (M⁺ - ramnosa + 1, 50); 355 (373-18, 100); 273 (373-cadena lateral-1,12); 255 (355-cadena lateral-1, 10).

Zona C'

Sólo se pudo separar de la columna cromatográfica con solvente cloroformo-15 a 20 % de metanol. Por acción del diazometano sobre su siembra en ccd, se observó, luego del desarrollo, la desaparición de la zona C', y la aparición de señales de mayor R_f, por lo cual se asignó la presencia de una cadena lateral abierta en hidroxiaácido, análogamente a lo supuesto para scillirósido.

2) Hidrólisis de proscillaridina hidrogenada.

Se utilizaron exactamente las condiciones óptimas de hidrólisis de scillirósido (página 66).

La mezcla de agliconas presentó las siguientes propiedades espectroscópicas:

RMN-¹H (100 MHz) δ : 0,8 y 1,2 (2 s, Me-18 y 19 de las series 5 α y 5 β); 3,64 (s, Me -O.OC-24).

E.M. m/z (asignación, %): 390 (M⁺, 100); 375 (390-15, 20); 372 (390-18, 35); 360 (375-15, 68); 357 (375-18, 20); 342 (357-15 y 360-18, 15); 273 (372-cadena lateral, 65).

3) Aislamiento de L-ramnosa.

La solución de hidrólisis remanente de la extracción de las agliconas, se neutralizó, filtró y acetiló como es en caso descrito para scillirósido (página 134). Se obtuvo entonces, tetra-O-acetil-L-ramnopiranosido, cuyas constantes físicas coincidieron totalmente con las del patrón auténtico.

4 y 5) Fenilación, oxidación y obtención de la benzofenona como su oxima.

Se procedió en forma similar a la empleada para scillirósido (página 127).

Secuencia degradativa tendiente a aislar los carbonos 21, 22, 23 y 24 de proscillaridina.

1) Acetilación de proscillaridina

1 g de proscillaridina se acetiló con anhídrido acético (2 ml) y piridina (1,5 ml) durante 24 hs con agitación y a temperatura ambiente. Luego la mezcla se volcó sobre agua-hielo y se

filtró el precipitado obtenido de triacetilproscillaridina (XLIII): 1,2 g.

Triacetilproscillaridina (XLIII):

P.F. = 124-125°C.

RMN-¹H (100 MHz) δ : 0,70 (s, 3H, Me-18); 1,0 (s, 3H, Me-19); 1,18 (d, 3H, J= 5 Hz, CH₃ de C-6'); 1,88, 2,0 y 2,14 (3 s, 9H, CH₃-CO); 4 (m, 1H, H-C-3); 4,82 (s, 1H, H-C-1'); 5,2 (m, 1H, H-C-4); 6,16 (d, 1H, J= 8 Hz, H-C-23); 7,14 (d, 1H, J'= 2 Hz, H-C-21); 7,75 (dd, 1H, J= 8 Hz, J'= 2 Hz, H-C-22).

RMN-¹³C ppm: 16,53 (C-18); 17,32 (C-19); 18,87 (C-6'); 20,74 y 20,87 (CH₃-CO); 48,21 (C-13); 50,95 (C-9); 84,68 (C-14); 96,55 (C-1'); 114,96 (C-23); 120,05 (C-4); 122,71 (C-20); 146,87 (C-22); 147,15 (C-5); 148,32 (C-21); 162,24 (C-24); 162,76 y 169,98 (CH₃-CO).

2) Ozonólisis de triacetilproscillaridina (XLIII).

1,2 g de triacetilproscillaridina se disolvieron en 60 ml de cloruro de metileno y se burbujeó corriente de ozono a -60°C hasta desaparición del reactivo de partida determinada por análisis en ccd (solvente de desarrollo 1). La reducción del ozónido se efectuó con 2 g de cinc en polvo y 20 ml de acético 50%, durante 24 hs a temperatura ambiente y con buena agitación.

Luego de filtrar y extraer con agua (3 x 30 ml) y finalmen-

te con hidróxido de sodio 0,1 N (1 x 20 ml), se obtuvieron dos fracciones:

- a) Fracción acuosa
- b) Fracción clorofórmica

3) Obtención de los carbonos 21, 23 y 24.

La fracción acuosa se trató similarmente a lo descrito para el scillirósido (pág. 151). Se logró aislar, así, el carbono 21 como carbonato de bario.

El residuo acuoso conteniendo el ácido glicólico se separó en dos alícuotas. Con una de ellas se trabajó similarmente a lo indicado para scillirósido (pág. 151), aislándose luego de la oxidación el C-23 como derivado cristalino dimedona-formaldehído, y el C-24 como carbonato de bario.

La segunda alícuota se liofilizó, se disolvió en 3 ml de agua, se neutralizó con hidróxido de sodio 0,1 N y se agregó a una solución de bromuro de p-bromofenacilo (75 mg) en etanol (23 ml). Se reflujo durante 2 hs, luego se enfrió y se agregó agua hasta turbidez. Se dejó la solución en frío hasta que, con el tiempo, aparecieron cristales de glicolato de p-bromofenacilo, de P.F. 137-139, luego de recristalizar de etanol. El derivado resultó idéntico en propiedades físico-químicas que el obtenido con ácido glicólico patrón.

4) Obtención del C-22 como derivado formaldehído-dimedona y como carbonato de bario.

La fracción clorofórmica de ozonólisis reductiva presentó

las siguientes características espectrales:

RMN-¹H (100 MHz) δ : 0,90 (s, 3H, Me-18); 1,20 (s, 3H, Me-19);
 1,18 (d, 3H, J= 5 Hz, H₃C-6'); 1,88; 2,0
 y 2,14 (3 s, 9H, CH₃-CO); 4,0 (m, 1H, H-C-
 3); 4,2 (m, H-3₁ HOCH₂-CO); 4,82 (s, 1H,
 H-C-1'); 8,15 (s, 0,5H, CHO-C-20); 9,6 (s,
 1H, CHO-C-4).

RMN-¹³C: En comparación con el espectro de (XLIII) se observó:
 la desaparición de las señales de los carbonos 4, 5,
 20, 21, 22, 23 y 24; y la aparición de cinco nuevas se
 ñales:

ppm: 200 (OHC-4); 209 (CH₂OH-CO en C-20); 213 y 219
 (CHO-CO en C-20); 217 (OHC-5).

Este extracto clorofórmico se trató primero con ácido *orto*pe
 ryódico y, por pasaje de nitrógeno se captó, como formaldehido-
 dimedona el C-22 del bufadienólido original proveniente de la a-
 agrupación 21-OH-20-ceto y luego, con agua oxigenada 150 volúme-
 nes, calor y nuevo pasaje de nitrógeno recogiendo de ese modo co
 mo carbonato de bario el dióxido de carbono producido por oxida-
 ción del ácido fórmico (resultante este último, de la acción del
 ácido *orto*periódico sobre el grupo 21-aldehído-20-ceto). Se pudo
 comprobar entonces, químicamente, la presencia de ambos grupos co
 mo resultado de la organización reductiva.

Resumen

El objetivo del presente trabajo de Tesis consistió en dilucidar el origen biosintético de los carbonos numerados como 22, 23 y 24 del anillo α -pirona de los bufadienólidos vegetales.

El estudio se realizó con ejemplares de la variedad roja de *Scilla marítima* (Baker), en los que el scillirósido es el principal glucósido cardiotónico.

Sabiendo que los 21 carbonos restantes del esqueleto esterooidal básico provienen de una unidad del tipo 20-ceto-pregnano, se pensó inocular metabolitos de tres o cuatro átomos de carbono, tales que por su funcionalidad pudieran ser precursores efectivos del anillo bufadienólido. Según el esquema biosintético propuesto el metabolito más apropiado resultaba ser el ácido oxalacético.

Se sintetizó, entonces a dicho ácido oxalacético con marcación radiactiva en diferentes carbonos, y se practicaron inoculaciones de éste y otros precursores probables como los ácidos succinico y pirúvico en los bulbos de *Scilla*.

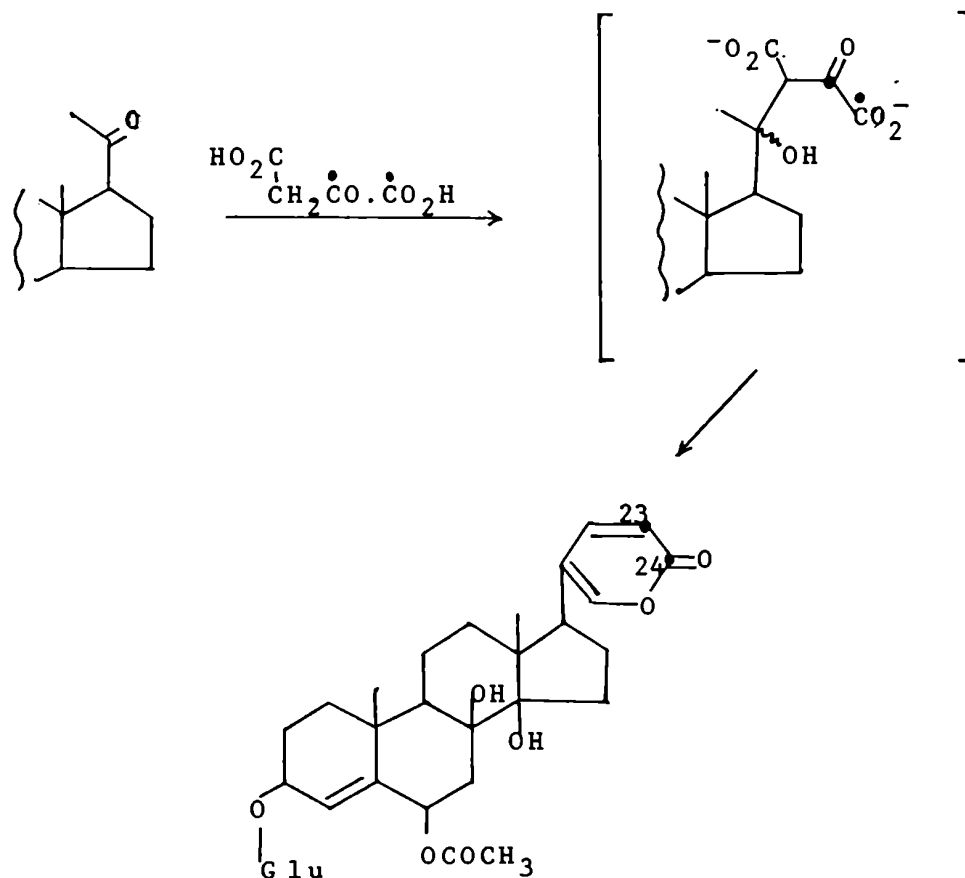
Las inoculaciones se repitieron en distintas épocas del año para analizar, además, posibles variaciones de las incorporaciones logradas con los trazadores en el scillirósido, según el estado biosintético en que aquellos encontraran a dicho bufadienólido.

Una vez aislado y purificado el scillirósido de cada bulbo inoculado, se comprobó que los resultados de incorporación absoluta obtenidos no pudieron ser concluyentes respecto de cuál es el verdadero precursor del anillo α -pirona.

Se procedió, entonces, a analizar las incorporaciones de radiactividad relativa obtenidas en ciertos carbonos individuales del scillirósido.

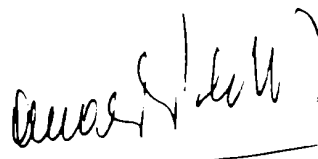
Se estudiaron, para tal efecto, reacciones de degradación de dicha molécula polifuncional, de tal forma de aislar limpiamente subestructuras claves. Las secuencias degradativas se aplicaron al scillirósido radiactivo aislado de las distintas inoculaciones.

El análisis de las incorporaciones relativas obtenidas permitió afirmar que el ácido oxalacético es el metabolito donante de los tres carbonos requeridos para completar el anillo α -pirona en bufadienólidos vegetales por lo que el proceso biosintético de formación de estos compuestos sería el siguiente



Los temas principales relatados en el presente trabajo son:

- 1) Antecedentes sobre estudios biosintéticos de glicósidos cardiotónicos de origen animal y vegetal.
- 2) Síntesis de probables precursores radiactivos.
- 3) Análisis de incorporaciones absolutas logradas.
- 4) Secuencias degradativas realizadas sobre scillirósido y extendidas a proscillaridina.
- 5) Análisis y discusión de los valores de incorporación radiactiva relativa, obtenidos en subestructuras de la molécula de scillirósido proveniente de inoculaciones con distintos precursores, y su comparación según la época del año.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. S. G.', with a horizontal line underneath.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'C. G. S.', with a horizontal line underneath.

Bibliografía:

- 1) L. Fieser y M. Fieser. "Steroids". Reinhold Publishing Corporation New York 1959.
- 2.) G. Sharp - *Pharmac and Pharmacist*, 84, 136, 170 (1910).
- 3) A. Stoll y J. Renz - *Helv. Chim. Acta*, 25, 43, 377 (1942).
- 4) A. Stoll, E. Suter, W. Kreis, B. Bussenmaker y A. Hofmann-
Helv. Chim. Acta, 16, 703 (1933) y referencias allí citadas.
- 5) B. Goerlich, H. Kubiniji, W. Steidle (Knoll a. - G. chemische Fabriken) Patente (1970). *Chem. Abs*, 73, 131 275 y
- 6) A. Stoll, E. Angliker, F. Barfuss, W. Kressmaul y J. Renz -
Helv. Chim. Acta, 34, a) 1420, b) 2301, (1951).
- 7) G. Tittel y H. Wagner - *Planta Medica*, 39, 125 (1980).
- 8) A. Stoll, A. Hofmann y A. Helfenstein - *Helv. Chim. Acta*,
17, 641 (1934).
- 9) A. Stoll, A. Hofmann y A. Helfenstein - *Helv. Chim. Acta*, 18 ,
a) 82, b) 401, c) 644, d) 1247 (1935).
- 10) A. Stoll, A. Hofmann y A. Helfenstein - *Z. Physiol*, 222, 24
(1933).
- 11) E. Legal - *Jahresber Fortschr. Chem.*, 1684 (1883). *Chem.*
Zentr. 54, 652 (1883).
- 12) W.D. Raymond - *Analyst*, 63, 478 (1938), 64, 113 (1939). O.
Schlindler y T. Reichstein - *Helv. Chim. Acta*, 34, 108 (1951).
- 13) E.H. Rodd - "Rodd's Chemistry of Carbohydrates Compounds"
Vol. 1, Elsevier Publishing Company, 1967.
- 14) A. Stoll y J. Renz - *Helv. Chim. Acta*, 24, 1380 (1941).
- 15) A. Stoll, J. Renz y A. Brack - *Helv. Chim. Acta*, 35, 1934
(1952).

- 16) A. Stoll, J. Renz y A. Helfenstein - *Helv. Chim. Acta*, 26, 648 (1943).
- 17) A. von Wartburg, M. Kuhor y K. Huber - *Helv. Chim. Acta*, 51, 1317 (1968).
- 18) H. Lichti, P. Nicklaus y A. von Wartburg - *Helv. Chim. Acta*, 56, a) 2083, b) 2088, (1973).
- 19) A. Stoll y J. Renz - *Helv. Chim. Acta*, 33, 286 (1950) y 32, 293 (1949).
- 20) A. Stoll, J. Renz y A. Brack - *Helv. Chim. Acta*, 34, 397 (1950).
- 21) A. Stoll y J. Renz - *Helv. Chim. Acta*, 26, 377 (1943).
- 22) A. von Wartburg y J. Renz - *Helv. Chim. Acta*, 42, a) 1620, b) 1643, (1959).
- 23) A. von Wartburg y J. Renz - *Helv. Chim. Acta*, 47, 1228 (1964)
- 24) A. von Wartburg - *Helv. Chim. Acta*, 49, 31 (1966).
- 25) E. Ramstadt y J.L. Beal - *Chem. and Ind.*, 177 (1960).
- 26) E. Ramstadt y J.L. Beal - *J. Pharm. Pharmacol.*, 12, 552 (1960).
- 27) E.G. Gros y E. Leete - *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 3475 y 3479 (1965).
- 28) E. Caspi, D.O. Lewis, D.M. Piatak, K.V. Thimann y A. Winter-
Experientia, 22, 506 (1966).
- 29) H. Gregory, E. Leete - *Chem. and Ind.*, 1242 (1960).
- 30) J. von Euw y T. Reichstein - *Helv. Chim. Acta*, 47, 711 (1964).
- 31) R. Tschesche y G. Lilienweiss - *Z. Naturforschg.*, 19b, 265 (1964).
- 32) R. Tschesche y B. Brassat - *Z. Naturforschg.*, 21b, 894 (1966).
- 33) H.H. Sauer, R.D. Bennet y E. Heftmann - *Naturwissenschaften*, 54, 226 (1967).

- 34) H.H. Sauer, R.D. Bennet y E. Heftmann - *Phytochemistry*, 6, 1521 (1967).
- 35) R.D. Bennet, H.H. Sauer y E. Heftmann - *Phytochemistry*, 7, 41 (1968).
- 36) E. Caspi, G.N. Hornby - *Phytochemistry*, 7, 423 (1968).
- 37) R. Tschesche, R. Hombach, H. Scholten y M. Peters - *Phytochem.*, 9, 1505 (1970).
- 38) E. Caspi, D.O. Lewis - *Science*, 156, 519 (1967).
- 39) K. Heusler, J. Kalvoda, G. Anner, A. Wettstein - *Helv. Chim. Acta*, 46, 352 (1963).
- 40) R. Tschesche, H. Hulpke y H. Scholten - *Z. Naturforsch.*, 22b, 677 (1967).
- 41) L. Canónica, F. Ronchetti y G. Russo - *Chem. Comm.*, 1675 (1970).
- 42) L. Canónica, A. Fiecchi, M. Galli Kienle - *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 3597 y 6532 (1968).
- 43) G.F. Gibbons, L. J. Goads - *Chem. Comm.*, 1458 (1968).
- 44) E. Caspi y P.J. Ramm - *J. Am. Chem.Soc.*, 91, 4012 (1969).
- 45) D.H. Aberhardt, E. Caspi - *Phytochemistry*, 12, 1065 (1973).
- 46) R. Tschesche, U. Kleff - *Phytochemistry*, 12, 2375 (1973).
- 47) C. Chen y M.V. Osuch - *Biochem. Pharmacol.*, 18, 1797 (1969).
- 48) A.M. Porto y E.G. Gros - *Experientia*, 26, 11 (1970).
- 49) A.M. Porto, F.E. Baralle y E.G. Gros - *J. Steroid Biochem.*, 3, 11 (1972).
- 50) M.D. Siperstein, A.W. Murray y E. Titus - *Arch. Biochem. Biophys.*, 67, 154 (1957).
- 51) E.G. Gros y A.M. Porto, *Anales Asoc. Quím. Argentina*, 55, 177 (1967).

- 52) G.A.D. Haslwood - *Biol. Rev.*, 39, 537 (1964).
- 53) G. Burton y E.G. Gros - *J. Steroid Biochem.*, 8, 69 (1977).
- 54) G. Burton y E.G. Gros - *J. Lab. Cpds. Radiopharm.*, 13, 627 (1977).
- 55) H.M. Garraffo, G. Burton, A.M. Porto y E.G. Gros - *Anales Asoc. Quím. Arg.*, 70, 743 (1982).
- 56) L.R. Galagovsky, A.M. Porto, G. Burton, M.S. Maier, A.M. Seldes y E.G. Gros - *Anales Asoc. Quím. Arg.* - 70, 327-335 (1982).
- 57) R. Tschesche y B. Brassat - *Z. Naturforschg.*, 20b, 707 (1965).
- 58) R. Tschesche, H. Scholten y M. Peters - *Z. Naturforschg.*, 24b, 1492 (1969).
- 59) E.G. Gros, A.M. Porto - *Anales Asoc. Quím. Arg.*, 55, 177 (1967).
- 60) W. Wislicenus - *Ann. der Chemie*, 246, 306 (1888).
- 61) C. Neuberg y E. Schwenk - *Biochem. Z.*, 71, 112 (1915).
- 62) C. Heilderberger - *Biochem. Preparations* Editor, E.E. Snell. 3, 59, John Wiley and sons, Inc., New York (1953).
- 63) C. Heilderberger, R.B. Hurlbert - *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 4704 (1950).
- 64) A. Murray y D.L. Williams - "*Organic Synthesis with Isotopes*", Interscience Publishers Inc., New York (1958).
- 65) L.R. Galagovsky, A.M. Porto y E.G. Gros - *J. Lab. Cpds Radiopharm.*, a) 18, 1235 (1981). b) H. Garraffo y E.G. Gros - *Ibid* - 19, 149 (1982).
- 66) W. Backer y J. Hofmann - *Rec. Trav. Chem.*, 58, 1048 (1939).
- 67) G. Gould - *J. Biolog. Chem.*, 177, 727 (1949).
- 68) A. von Wartburg y J. Renz - *Helv. Chim. Acta*, 43, 686 (1960).

- 69) Y. Kamano, H. Yamamoto y M. Komatsu - *Chem. Pharmacol. Bull.*, 17, a) 1246, b) 1251, (1969).
- 70) A. Hunger y T. Reichstein - a) *Chem. Ber.*, 85, 635 (1953),
b) *Helv. Chim. Acta*, 36, 385 (1953).
- 71) Ch. Tamm - *Helv. Chim. Acta*, 43, 338 (1960).
- 72) A.J. van Wyk, P.R. Enslin - *J. of the South African Chem. Inst.*, 21, 33 (1968).
- 73) I. Thiel, E.G. Gros y J. Deferrari - "*Methods in Carbohydrates Chemistry*". Academic Press, Vol 6, (1972).
- 74) R. Kuhn, H. Baer y A. Seeliger - *Ann. der Chemie.*, 611, 236 (1958).
- 75) A. Stoll y J. Renz - *Helv. Chim. Acta*, 25, 377 (1942).
- 76) A. Stoll, A. von Wartburg y J. Renz - *Helv. Chim. Acta*, 36, 1531 (1953).
- 77) T.R. Kasturi, G.R. Pettit y K.A. Jaeggi - *Chem. Comm.*, 644 (1967).
- 78) B.J. Wakefield - "*The Chemistry of Organolithium Compounds*", Pergamon Press, Oxford (1974).
- 79) A. Vitale - "*Reacciones de Aril-litio con Monóxido de Carbono*" Tesis, Dto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (1981).
- 80) O.J. Varela - "*Eliminación Beta en 1,5 y 1,4-rannonolactonas Síntesis de didesoxi y tridesoxi azúcares de importancia biológica*". Tesis, Dto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Bs. As. (1979).
- 81) N. Bhacca y D. Williams - "*Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry*". Holden Day, San Francisco (1966).
- 82) E. Leete - *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 2509 (1964).

- 83) D.J. Clive - *Tetrahedron*, 34, 1049 (1978).
- 84) H.J. Reich - *Accounts of Chem. Res.*, 12, 22 (1979).
- 85) P. Grieco y M. Nishizawa - *J. Org. Chem.*, 42, 1717 (1977).
- 86) H.J. Reich - *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 5434 (1975).
- 87) K. Meyer - *Helv. Chim. Acta*, 32, 1239 (1949).
- 88) M. Zingg y K. Meyer - *Helv. Chim. Acta*, 43, 145 (1960).
- 89) D. Metzler-"*Biochemistry*", Academic Press, New York (1977).
- 90) F.S. Rolleston - *Curr Top Cell. Reg.*, 5, 47 (1972).
- 91) W. Vishniac, B.A. Horecker y S. Ochoa.-"*Advances in Enzymol*",
19, 1. F.F. Nord, Interscience Pub. Inc., New York (1957).
- 92) F. Kokesh - *J. Org. Chem.*, 41, 3593 (1976).
- 93) J. Mc Quate, M. Utter - *J. Biol. Chem.*, 234, 2151 (1959).
- 94) P.S. Noce y M. Utter - *J. Biol. Chem.*, 250, 9099 (1975).
- 95) D.J. Creighton, I. Rose - *J. Biol. Chem.*, 251, 69 (1976).
- 96) P. Saltman, V. Lynch, G. Kunitake, C. Stitts y H. Spolter -
Plant Physiol., 32, 197 (1957).
- 97) M. Singh y P.A. Srere - *J. Biol. Chem.*, 250, 5818 (1975).
- 98) U. Schmidt, P. Grafin y H.W. Goedde-"*Advances in Enzymol*",
32, 423, F.F. Nord. Interscience Pub. Inc., New York (1969).
- 99) M. Koike y K. Koike-"*Metabolic Pathways*", 7, 87 (1975),
Academic Press, New York.
- 100) L. J. Reed - *Acc. Chem. Res.*, 7, 40 (1974).
- 101) N. Tanaka, J. Koike y M. Koike - *J. Biol. Chem.*, 249, 191
(1974).
- 102) K. Uyeda, J.C. Rabinowicz - *J. Biol. Chem.*, 246, 3120 (1971).
- 103) L.R. Galagovsky, A.M. Porto, G. Burton y E. G. Gros, en
prensa.

- 104) C.A. Russo y E.G. Gros - *Phytochemistry*, 20, 1763 (1981).
- 105) A. Vogel - "*Practical Organic Chemistry*", Longman, 3 ra. ed., London (1972).
- 106) P.R. White - "*The cultivation of animal and Plant cells*", Ronald Press (1963).
- 107) K. Yamaguchi - "*Spectral Data of Natural Products*" Vol 1, Elsevier Publishing Company, New York (1970).
- 108) J. Barker - *J. Chem. Soc.*, 1538 (1963).
- 109) T.J. Mabry, B. Thomas.- "*The Systematic Identification of Flavonoids*", Springer-Verlag, Berlin (1970).

<u>Indice de Figuras.</u>	pág.
Figura 1.....	3
Figura 2.....	4
Figura 3.....	15
Figura 4.....	21
Figura 5.....	24
Figura 6.....	26
Figura 7.....	27
Figura 8.....	33
Figura 9.....	36
Figura 10.....	37
Figura 11.....	49
Figura 12.....	57
Figura 13.....	58
Figura 14.....	59
Figura 15.....	65
Figura 16.....	68
Figura 17.....	68
Figura 18.....	70
Figura 19.....	79
Figura 20.....	81
Figura 21.....	82
Figura 22.....	83
Figura 23.....	84
Figura 24.....	92
Figura 25.....	96
Fotografía 1.....	11
Fotografía 2.....	12

Indice de Esquemas.

	pág.
Esquema 1.....	42
Esquema 2.....	49
Esquema 3.....	61
Esquema 4.....	71
Esquema 5.....	73
Esquema 6.....	75
Esquema 7.....	77

Indice de Tablas.

Tabla 1.....	63
Tabla 2.....	66
Tabla 3.....	44 y 90
Tabla 4.....	93
Tabla 5.....	95
Tabla 6.....	98
Tabla 7.....	101
Tabla 8.....	103
Tabla 9.....	105
Tabla 10.....	108