

Tesis de Posgrado

Estudio químico de Bauhinia candicans Benth.(Familia: Leguminosae)

Iribarren, Adolfo Marcelo

1984

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:

Iribarren, Adolfo Marcelo. (1984). Estudio químico de Bauhinia candicans Benth.(Familia: Leguminosae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1861_Iribarren.pdf

Cita tipo Chicago:

Iribarren, Adolfo Marcelo. "Estudio químico de Bauhinia candicans Benth.(Familia: Leguminosae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1861_Iribarren.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTUDIO QUIMICO DE *BAUHINIA CANDICANS* BENTH.
(FAMILIA: *LEGUMINOSAE*)

Autor

Adolfo Marcelo Iribarren

Directora de Tesis

Dra. Alicia B. Pomilio

Lugar de trabajo

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas
1984

1861

21

a Elena y Adolfo Jukonen, mis padres
a Claudia Pitiler, mi esposa
a Paulita, mi hija.

Agradezco a la Dra. Alicia B. Pomilio por su guía e interés en mi evolución profesional. Por la comprensión, libertad y, sobre todo, amistad que siempre me brindó. Por todo lo que de ella aprendí.

Agradezco también:

a la Ing. R. Fortunato (INTA, Castelar), por haberme facilitado la obtención del material vegetal para el estudio de las especies *Bauhinia variegata* y *B. forficata*.

al Prof. Emilio Ulibarri (Instituto de Botánica, Darwinion, Buenos Aires) por la identificación de *B. candicans*.

a la Curadora Dra. M. C. Vianna (Herbario "Alberto Castellanos", FEEMA, Río de Janeiro, Brasil) por el envío e identificación de *B. forficata*.

al Dr. A. Viale (Cátedra de Microbiología e Inmunología, Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA) por los estudios sobre actividad antimicrobiana.

al Dr. E. del Castillo (IBYME, Buenos Aires) por pancreatectomía y perfusión necesarias para los estudios sobre actividad hipoglucémica e hipocolesterolémica.

al Dr. E. Rúveda y al Dr. M. González Sierra (IQUIOS, Rosario) por los espectros de ^{13}C -RMN.

al Lic. G. Aldomá por la realización de espectros de ^1H -RMN.

al Dr. E. Monesiglio (INTA) por los aminogramas realizados.

a UMYMFOR (CONICET-FCEN) por la ayuda y equipo técnico suministrado.

a las Licenciadas M. Rivero y M. M. de Moglia por la realización de los cromatogramas gas-líquido.

al Sr. J. A. Aznárez por la realización de los espectros de masas y cromatografías gas-líquido acopladas a espectrómetro de masas.

al Sr. G. Arabehty, al Dr. G. Burton y a la Srta. A. Arenaza por los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

a los Doctores M. D. González, C. A. Buschi, C. D. Schteingart, a los Licenciados R. Rofi, R. Iñigo y E. Jares por su compañía y ayuda, por compartir con alegría todos y cada uno de los tantos momentos de convivencia en nuestro laboratorio.

al Dr. J. F. Groisman por su lírica amistad.

a todos mis compañeros, profesores y personal no docente del Departamento de Química Orgánica por su cariño y cordialidad.

a Claudia C. Rittler, mi esposa, por su comprensión y paciencia, por brindarme, junto a nuestra hija, la felicidad que fue el soporte que sustentó este trabajo y este tramo de mi vida.

a Elena Benedetto y Adolfo Iribarren, mis padres, por haberme dado con tanto cariño, todo lo necesario para formar los cimientos de lo que soy.

INDICE

Capítulo I: FAMILIA *LEGUMINOSAE*

Familia <i>Leguminosae</i>	1
Subfamilia <i>Caesalpinioideae</i>	
Alcaloides	4
Terpenoides	9
Género <i>Bauhinia</i>	14

Capítulo II: 3-CETOESTEROIDES Y GLICOSIDOS DE ESTEROLES

Cetoesteroides insaturados - Introducción	20
Análisis de los espectros de masas de 3-cetoesteroides monoinsaturados	21
Análisis de los espectros de masas de 3-cetoesteroides diinsaturados	24
Glicósidos de esteroides - Introducción	31
Espectrometría de masas	36
Espectroscopía de ^1H -RMN	43
Espectroscopía de ^{13}C -RMN	55

Capítulo III: ACCION HIPOGLUCEMIANTE

Introducción	62
Medicamentos utilizados contra la diabetes	62
Compuestos hipoglucemiantes de origen natural	65

Capítulo IV: DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Tratamiento del material vegetal	69
- Análisis del precipitado de éter de petróleo :	
Análisis estructural de triacontanol <u>I</u>	69
Alcoholes lineales	71
Esteroides:	72
Análisis estructural de estigmasta-1,3,5-trieno <u>II</u>	74

Análisis estructural de estigmasta-3,5-dieno <u>III</u>	76
Análisis estructural de campesterol <u>IV</u> , estigmasterol <u>V</u> y sitosterol <u>VI</u>	78
Análisis estructural de estigmast-4-en-3-ona <u>VII</u>	82
Análisis estructural de estigmasta-4,6-dien-3-ona <u>VIII</u>	88
Análisis estructural de estigmasta-3,5-dien-7-ona <u>IX</u>	97
-Análisis del extracto de éter de petróleo:	
Hidrocarburos	99
Glicósidos de esteroides:	100
Análisis estructural de sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido	101
Análisis estructural de sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranosido <u>XI</u>	111
-Análisis del extracto etanólico	
Análisis estructural de sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido <u>XII</u>	128
Glicósidos de flavonoides:	
Análisis estructural de canferol-3-O- β -rutinosido <u>XIII</u>	13
Análisis estructural de canferol-3-O- β -rutinosido-7-O- α -L-ramnopiranosido <u>XIV</u>	147
Protoalcaloides:	
Colina <u>XV</u>	153
Trigonelina <u>XVI</u>	155
Aminoácidos	157
-Análisis del extracto etanólico de flores de <i>B. candidans</i>	
Análisis estructural de D-inositol-3-metiléter <u>XXXI</u>	159
Glicósidos de flavonoles <u>XIII</u> y <u>XIV</u>	160
-Estudio comparativo de los componentes de <i>B. variegata</i> y <i>B. forficata</i> .	
Hidrocarburos	162
Esteroides	163
Glicósidos de esteroides	167
Protoalcaloides y aminoácidos	167
Componentes de <i>B. variegata</i> identificados en trabajos previos	168
Tabla comparativa de los componentes de <i>B. candidans</i> , <i>B. variegata</i> y <i>B. forficata</i> .	170

-Actividad antimicrobiana de <i>B. candidans</i>	170
-Actividad hipoglucémica e hipocolesterolémica de <i>B. candidans</i>	171
Capítulo V: PARTE EXPERIMENTAL	
Métodos empleados	175
Estudio químico de <i>B. candidans</i>	180
Estudio químico de <i>B. variegata</i>	187
Estudio químico de <i>B. fcrficata</i>	190
Compuestos identificados en el precipitado de éter de pe- tróleo de <i>B. candidans</i>	194
Compuestos identificados en extracto de éter de petróleo de <i>B. candidans</i> .	197
Compuestos identificados en el extracto etanólico de <i>B. candidans</i>	202
Compuestos identificados en extracto etanólico de flores de <i>B. candidans</i>	208
Actividad antimicrobiana de <i>B. candidans</i>	209
Actividad hipoglucémica e hipocolesterolémica de <i>B. candidans</i>	211
Resumen	214
Bibliografía	218

CAPITULO I
FAMILIA *LEGUMINOSAE*

FAMILIA LEGUMINOSAE

La familia de las Leguminosas es una de las más importantes del Reino Vegetal, junto a las Compuestas y Orquídeas, debido al gran número de especies que comprende. Está dividida en tres subfamilias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* y *Papilionoideae*.

Las Leguminosas están ampliamente distribuidas en el mundo excepto en las regiones árticas y antárticas y algunas islas como Nueva Zelandia, donde son muy escasas.

En términos generales se puede decir que las Mimosoideas y Cesalpinioideas son megatérmicas, y en consecuencia, predominan en las selvas y sabanas ecuatoriales y subtropicales, mientras que las Papilionoideas, mesotérmicas y arbustivas o herbáceas en general, constituyen la representación casi exclusiva de la familia en las zonas templadas y templado-cálidas.

Las primeras estimaciones realizadas en 1825 por De Candolle indicaban que el número de especies de esta familia era superior a 3700. Este número fue aumentando en estudios posteriores, así es que en 1916 Prantl-Pax, Engler-Gilg, Willis, Gans, Irmscher y Rendle informan más de 12000 y recientemente Polhill, Haven y Stirlos elevan esta cifra a 18000 especies comprendidas en 650 géneros ¹.

Según las estimaciones de Burkart², la Flora argentina tiene cerca de 530 Leguminosas indígenas y 30 adventicias. Estas especies indígenas se reparten en 94 géneros, abarcando la subfamilia *Papilionoideae* el 67,4% del total de los mismos, la *Mimosoideae* el 18,3% y la *Caesalpinioideae* el 14,3% restante.

En el siguiente cuadro se detallan las tribus que integran las tres subfamilias y el número de géneros que comprende cada una de ellas, según la clasificación de Polhill, Haven y Stirlos¹.

Subfamilia *Caesalpinioideae*

Tribu	Número de géneros
<i>Caesalpiniae</i>	47
<i>Cassieae</i>	20
<i>Cercideae (o Bauhineae)</i>	5
<i>Detarieae</i>	54
<i>Amhersitieae</i>	25

Subfamilia *Mimosoideae*

Tribu	Número de géneros
<i>Parkieae</i>	2
<i>Mimozygantheae</i>	1
<i>Mimoseae</i>	37
<i>Acacieae</i>	2
<i>Ingaeae</i>	17

Subfamilia *Papilionoideae*

Tribu	Número de géneros
<i>Swartzieae</i>	11
<i>Sephoreae</i>	47
<i>Dipteryseeae</i>	3
<i>Dalbergieae</i>	19
<i>Abreae</i>	1
<i>Tephrosieae</i>	50
<i>Robinieae</i>	21
<i>Indigofereae</i>	4
<i>Desmodieae</i>	27
<i>Phaseoleae</i>	84
<i>Psoraleeae</i>	6
<i>Amorpheae</i>	8
<i>Aeschynomeneae</i>	25
<i>Adesmieae</i>	1
<i>Galegeae</i>	20
<i>Carmichaelieae</i>	5

Continuación del cuadro de pág.2

Tribu	Número de géneros
<i>Hedysareae</i>	7
<i>Loteae</i>	4
<i>Coronilleae</i>	6
<i>Vicieae</i>	5
<i>Cicereae</i>	1
<i>Trifolieae</i>	7
<i>Brongniartieae</i>	2
<i>Mirbelieae</i>	23
<i>Bossiaeeae</i>	10
<i>Podalyrieae</i>	3
<i>Liparieae</i>	5
<i>Crotalarieae</i>	16
<i>Euchresteeae</i>	1
<i>Thermopsidaeae</i>	6
<i>Genisteae</i>	20

BREVE RESEÑA QUIMICA DE LAS LEGUMINOSAS

Cuando se observan los datos químicos existentes, aunque éstos se encuentran en un estado muy incompleto, se pueden dividir a las Leguminosas en dos grandes grupos, uno que agrupa a las subfamilias *Mimosoideae* y *Caesalpinioideae* y el otro integrado por *Papilionoideae*.

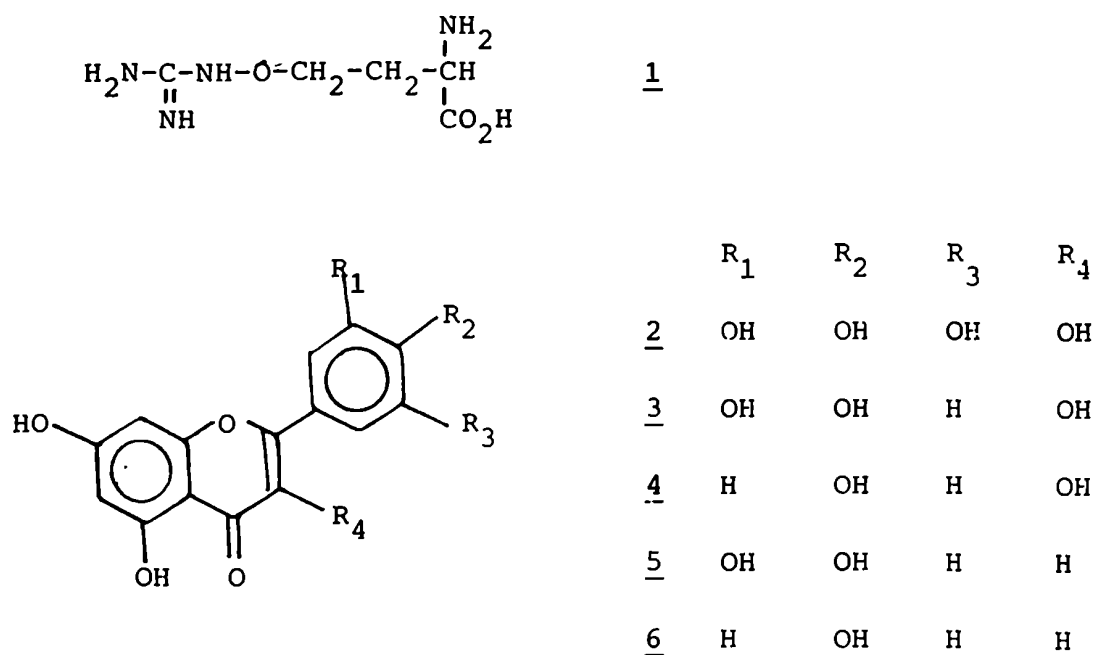
De las quince familias de alcaloides mencionadas por Mear y Mabry¹, sólo cuatro aparecen en el grupo *Mimosoideae-Caesalpinioideae* mientras que en *Papilionoideae* se encuentran catorce.

La situación es similar respecto del aminoácido libre canavanina 1, el cual ha sido sólo encontrado en especies de Leguminosas. Este compuesto no ha sido detectado en semillas

de Mimosoideas ni de Cesalpinioideas, pero sí en la mitad de las semillas de Papilionoideas estudiadas.

Los flavonoides no están distribuidos uniformemente en las Leguminosas estudiadas¹. Miricetina 2, quercetina 3 y canferol 4 están confinados casi completamente a las arborescentes Mimosoideas y Cesalpinioideas, encontrándose muy raramente en las Papilionoideas. Solamente unas pocas especies leñosas de esta última subfamilia poseen leucoantocianidinas mientras que estos compuestos siempre están presentes en las otras dos.

Dos flavonas, luteolina 5 y apigenina 6, caracterizan a las Papilionoideas ya que nunca han sido encontradas en las otras dos subfamilias. Finalmente, sólo las especies de Papilionoideas tienen compuestos del grupo de los isoflavonoides.



Subfamilia *Caesalpinioideae*

Alcaloides

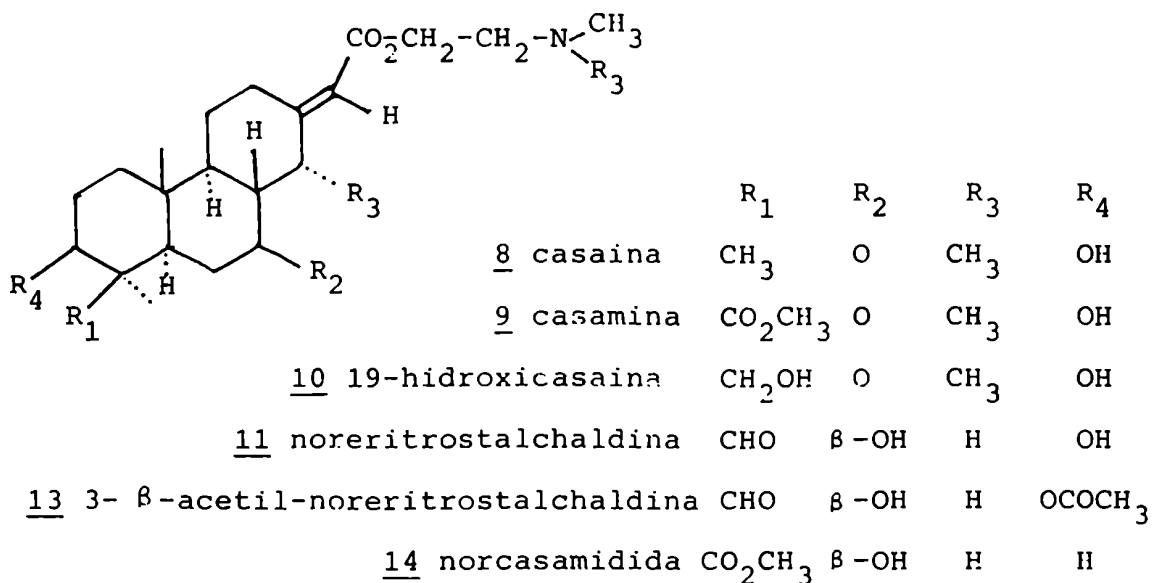
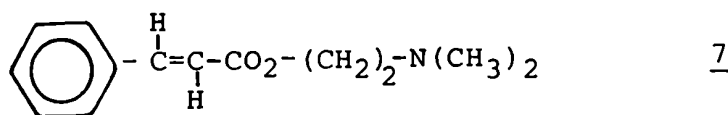
A) Alcaloides de *Erythrophleum*

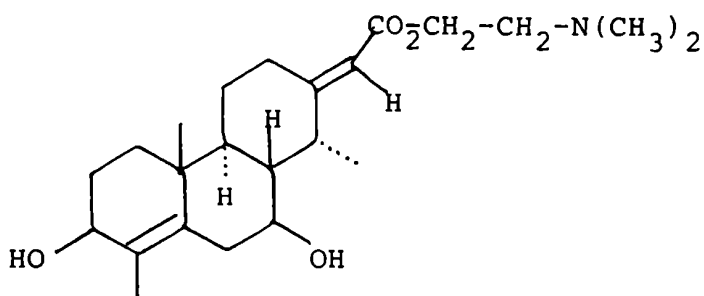
Estos alcaloides que se encuentran en el género del cual deriva su nombre (tribu *Caesalpinieae*), presentan el esqueleto básico N-metil-2-aminoetanol.

Originariamente, todos los alcaloides conocidos de este tipo eran derivados de ácidos diterpénicos pero luego se aisló de *Erythrophleum chlorostachys*¹³ el cinamato de β-dimetilaminoetilo 7.

En la actualidad se conocen alcaloides representativos con una unidad diterpénica que poseen todos los estados de oxidación comúnmente encontrados en C-19 (metilo 8, metoxycarbonilo 9, hidroximetilo 10 y formilo 11)⁴. También se describió⁵ la 19-nor-4-deshidrocasaidina 12 que presenta una insaturación en C-4.

Muchos de estos alcaloides coexisten con los correspondientes 3 β-acetil ésteres como es el caso de la noreritrostalchaldina 11 y 13⁴.





12

Uno de los problemas que presenta el aislamiento de este tipo de alcaloides es que las amidas se transforman fácilmente en ésteres por cromatografía sobre alúmina o en soluciones básicas⁶. Es así como la norcasamidida 14 y otros compuestos aislados de *Erythrophleum suaveans* resultaron ser amidas y no ésteres^{7,8}.

Los alcaloides de *Erythrophleum* no han sido encontrados en ningún otro género de *Caesalpinioideae*.

B) Alcaloides derivados de triptofano

La distribución de triptamina y compuestos relacionados (indolalquilaminas)⁹ está relativamente restringida en *Caesalpinioideae* y *Mimosoideae*, encontrándose arbitrariamente distribuidos⁹.

En el género *Piptadenia* se encontraron compuestos sustituidos en C-5¹⁰. Algunos de ellos (15-20) figuran en la Fig.1.

La N-metiltriptamina 20 fue aislada por primera vez en 1978 de una *Caesalpinioideae* (*Tachigalia paniculata*)¹¹.

C) Alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina

Aunque las Leguminosas poseen gran diversidad de derivados simples de fenilalanina y tirosina, la variación estructural en las *Cesalpinioideae* es menos aparente^{10,12,13}. En la Fig. 2 se detallan algunos de los mismos.

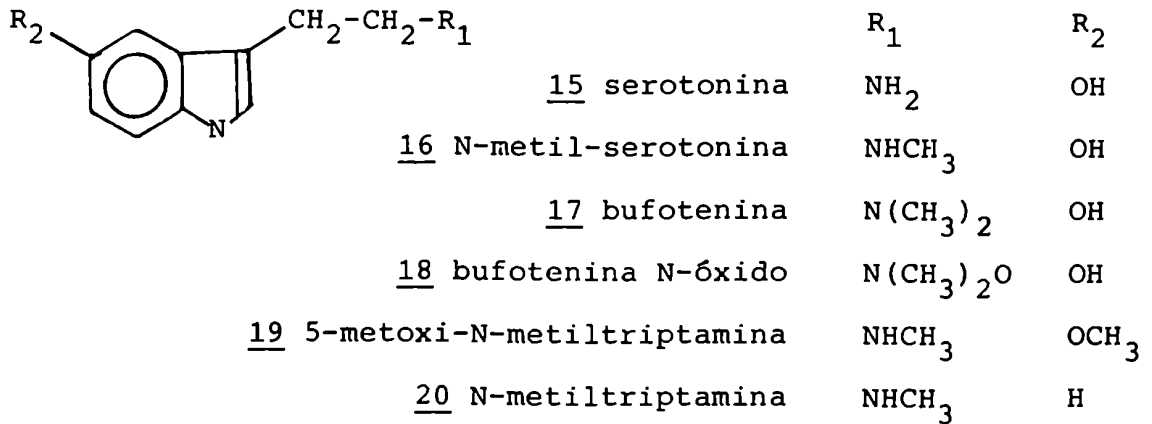


Figura 1

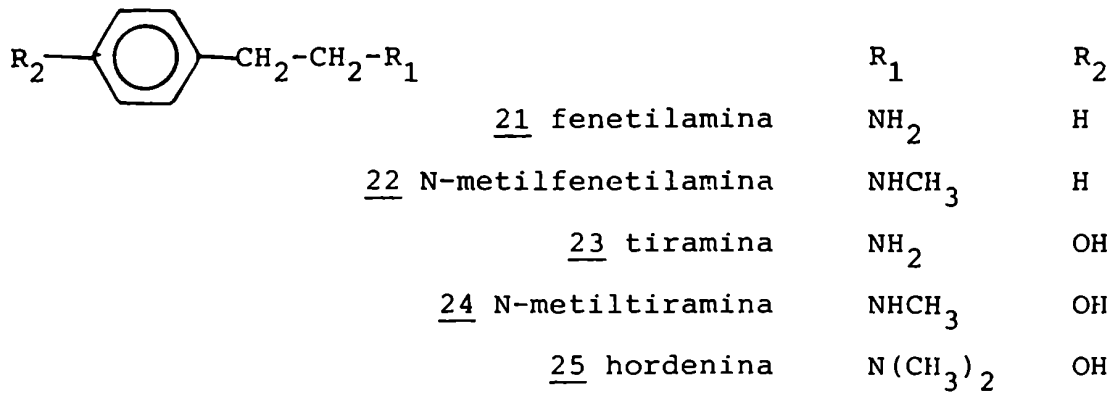
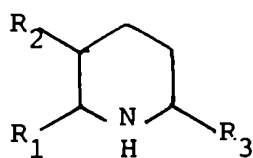


Figura 2

El screening de estos compuestos requiere el uso de reactivos cromogénicos para aminas primarias, secundarias e hidroxiladas¹³ ya que pueden no ser detectados en extractos de plantas si se usan reveladores convencionales de alcaloides en c.c.d..

D) Alcaloides piperidínicos

Del género *Cassia* se aislaron una serie de alcaloides piperidínicos dialquilados y con un grupo funcional en C-3¹, algunos de los cuales figuran a continuación (26-32):



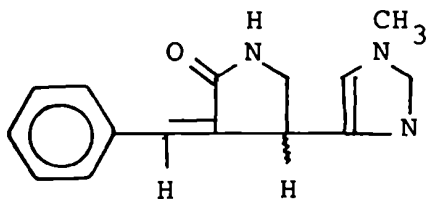
	R ₁	R ₂	R ₃
<u>26</u> casina	β CH ₃	β OH	α (CH ₂) ₁₀ COCH ₃
<u>27</u> carnavalina	α CH ₃	β OH	α (CH ₂) ₁₀ CH(OH)CH ₃
<u>28</u> espectralina	β CH ₃	β OH	β (CH ₂) ₁₂ COCH ₃
<u>30</u> iso 6-carnavalina	α CH ₃	α OH	β (CH ₂) ₁₀ CH(OH)CH ₃
<u>31</u> iso 6-casina	β CH ₃	β OH	β (CH ₂) ₁₀ COCH ₃
<u>29</u> espectralinina	β CH ₃	β OH	β (CH ₂) ₁₂ CH(OH)CH ₃
<u>32</u> casinicina	α CH ₃	α OH	α (CH ₂) ₁₂ COCH ₃

Un ejemplo de una nueva variación de esta clase de compuestos es la casinicina 32 aislada de *Cassia spectabilis*¹⁴.

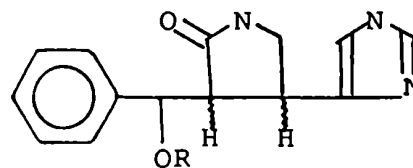
E) Alcaloides misceláneos

Ciertos alcaloides encontrados en Cesalpinioideas no pueden ser agrupados con los compuestos anteriores.

De las hojas de *Cynometra ananta*¹⁵ se obtuvieron los alcaloides imidazólicos anantina 33, cinom trina 34 y cinodina 35.



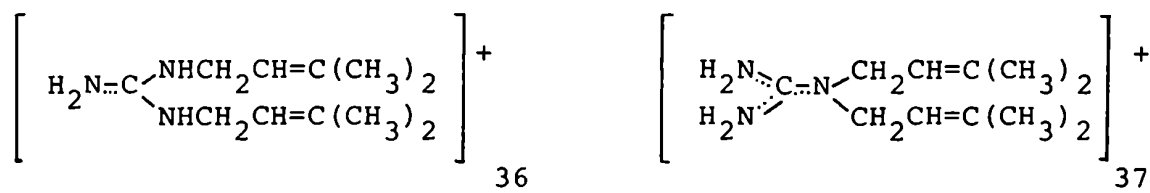
33



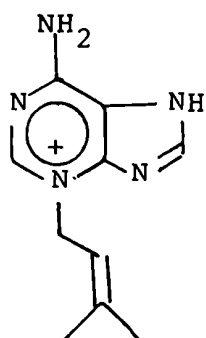
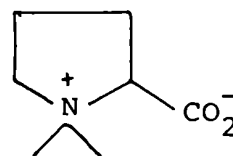
34 R=H

35 R=C₆H₅

De *Pterogyne nitens*¹⁶ se aislaron los alcaloides guanidínicos pteroginidina 36 y pteroginina 37.



Otros dos ejemplos de alcaloides no agrupables en los casos anteriores, aislados de especies de *Cesalpinioides* son triacantina 38 y estequidrina 39.

3839

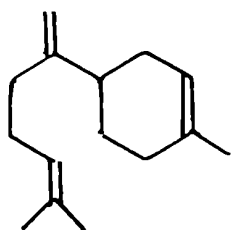
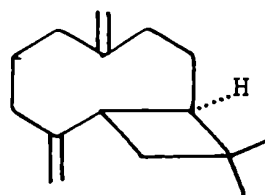
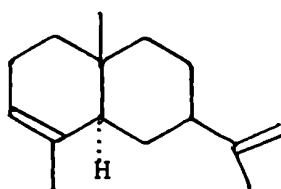
Terpenoides

A) Sesquiterpenos

Los géneros en que más se estudiaron este tipo de compuestos son *Hymenaea*, *Guibourtia* y *Copaifera*^{17,18}. Estos tres géneros pertenecen a las *Cesalpinioides* tropicales y son árboles productores de resina.

Sólo han sido identificados en estos géneros hidrocarburos sesquiterpénicos y todas las especies contienen esencialmente los mismos compuestos. Algunos de ellos como el β -bisaboleno

40, cariofileno 41 y α -selineno 42 se representan a continuación:

404142

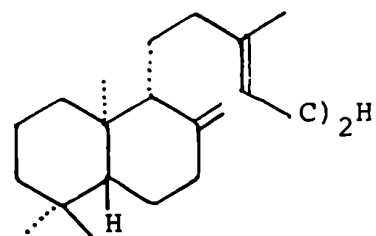
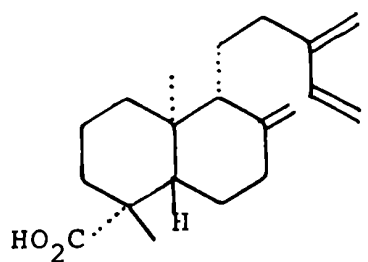
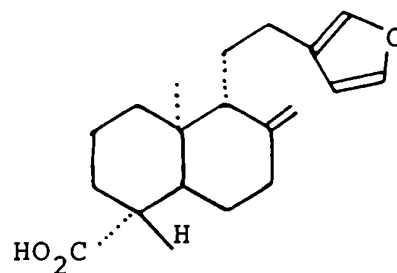
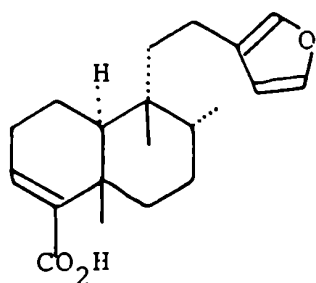
Estos compuestos se encuentran tanto en hojas como en tallos y la variación entre especies es más bien cuantitativa que cualitativa. Además se verificó cuidadosamente que la variación en la composición cuantitativa refleja diferencias genotípicas y no depende de factores físicos ambientales durante el crecimiento de las plantas¹⁹

B) Diterpenos

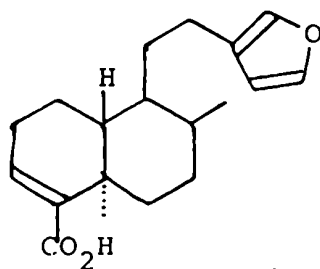
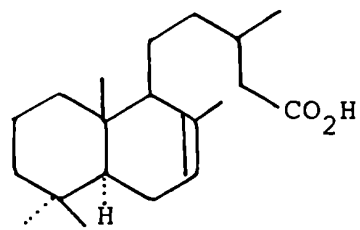
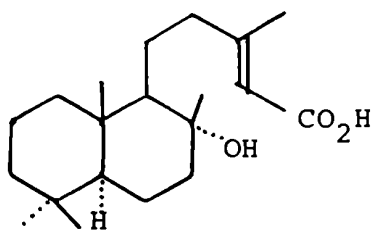
La mayoría de los diterpenos de Leguminosas informados en literatura provienen de especies de esta subfamilia. En particular, los provenientes de resinas fueron encontrados casi exclusivamente en la tribu *Detarieae*²¹⁻²⁵.

La mayoría de los compuestos aislados, como por ejemplo, ácido (-)-harduíquico 43, ác. daniélico 44, ác. enantio-8(17), 13(16), 14-labdatrien-18-oico 45²² y ác. copálico 46, son diterpenos bicíclicos que poseen como característica común el esqueleto

labdano.

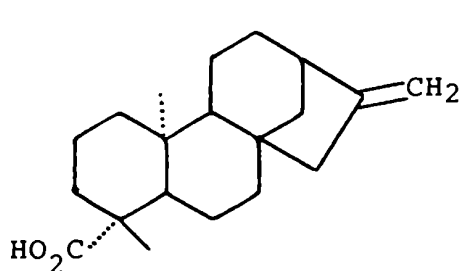
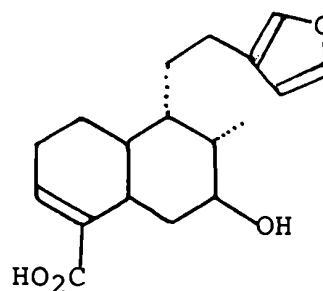


Además, se encontraron diterpenos bicíclicos con configuración epurano, como por ejemplo, ácido labd-13-en-18-ol-15-oi
co 47²⁰, ácido (+)-catívico 48 y ácido harduíquico 49.

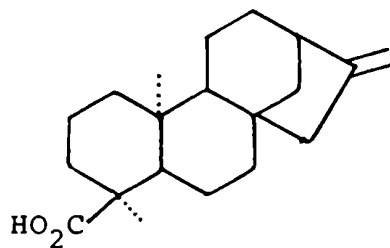
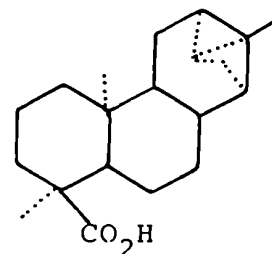


Compuestos de ambas series estereoquímicas se encontraron en las mismas especies como en el caso de *Oxystigma oxyphyllum*²⁵ y *Hymenaea courbanil*²⁰.

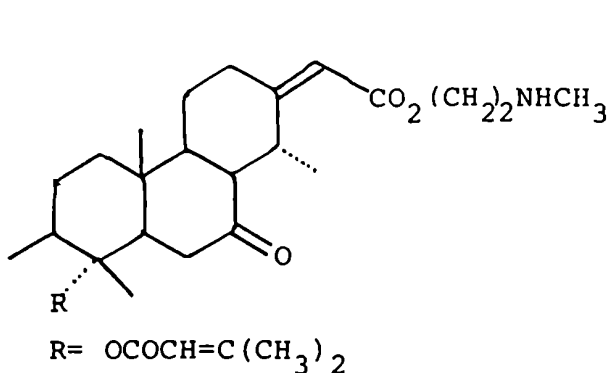
En algunas especies de *Copaifera* los ácidos diterpénicos aislados de sus maderas pueden ser tanto bicíclicos como tetracíclicos, como por ejemplo ácidos ent-kaur-16-en-19-oico 50 y 7-hidroxiharduíquico 51.

5051

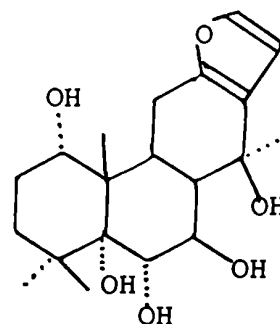
Aunque los ácidos diterpénicos de resinas de especies americanas del género *Hymenaea* son bicíclicos, los de *H. verrucosa*, una especie africana, son tetra- y pentacíclicos^{26,27} como por ejemplo ent-kar-16-en-18-oico 52 y ácido traquilobánico 53.

5253

Los diterpenos aislados de maderas de otras tribus de la subfamilia son distintos a los de *Detarieae*, así por ejemplo los de *Erythrophloeum* (tribu *Caesalpiniae*) son diterpenos alcaloidales como ivorina 54 y los del género *Caesalpinia* son del tipo de cesalpina 55.



54



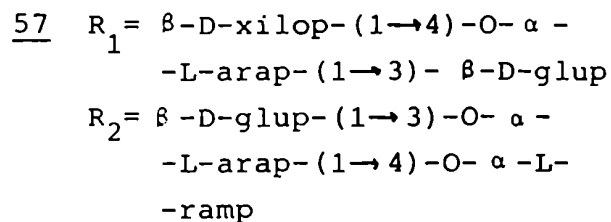
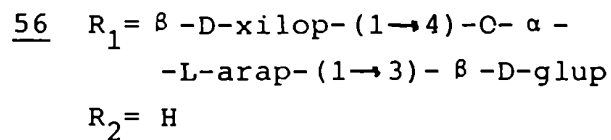
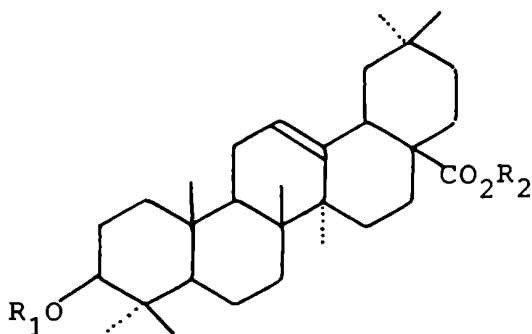
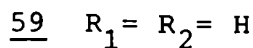
55

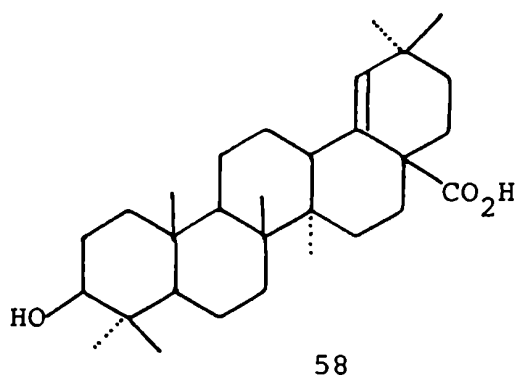
La mayoría de estos diterpenos está demostrado que son patógenos o repelentes de predadores.

C) Triterpenos

Pocos compuestos del tipo de esteroides, triterpenos pentacíclicos, saponinas y glicósidos cardiotónicos fueron aislados de especies de *Caesalpinioideae* mientras que las otras dos subfamilias los poseen en forma numerosa.

Algunos ejemplos de especies de *Caesalpinioideae* estudiadas son *Gleditsia triacanthos* de la que se aislaron los triacantósidos A₁ 56 y G 57²⁶; *Mora excelsa* de la que se extrajo el ácido morfólico 58¹⁵ y *Mora gonggrijpii* de la que obtuvo ácido oleanólico 59.





GENERO BAUHINIA

En 1981, Wunderlin et al.¹ rehabilitaron la olvidada tribu *Cercideae* de la clasificación de Bronn (1822). En esta tribu además de *Bauhinia* incluyeron los géneros *Cercis*, del hemisferio norte, *Adenolobus* y *Griffonia* del continente africano y *Brenieria* con una especie endémica de Madagascar.

Estos autores, basándose en caracteres seminales dividieron a la tribu *Cercideae* en dos subtribus: *Cercidineae* (*Cercis*, *Adenolobus* y *Griffonia*) y *Bauhininae* (*Bauhinia* y *Brenieria*)

El género *Bauhinia* fue bautizado así por Plumier y luego por Linné, en honor de Juan y Gaspar Bauhin, famosos botánicos y médicos de principio de siglo XVII ya que las formas de sus hojas hacen recordar su gloria gemela¹.

El género *Bauhinia*, entonces, está incluido en la subtribu *Bauhininae* y es el género que más especies comprende dentro de la tribu *Cercideae*, ya que el número de las mismas asciende a 250.

En el país se encuentran seis especies *B. microstachya* (Raddi) Macbr. o *B. langsdorffiana* Bong (Misiones); *B. microphylla* Vog. o *B. bauhinioides* Mart (Formosa); *B. notophila* Gris. (Salta); *B. argentinensis* Burkart (Chaco); *B. uruguayensis* Benth. (Corrientes) y *B. candicans* Benth. (nordeste argentino y cultivada).

Las especies estudiadas químicamente hasta el momento son:

B. purpurea : de sus flores se aislaron isoquercitrina 60, astragalina 61 y quercetina 3²⁸, pelargonidina-3-O-glucósido y pelargonidina-3-triglucósido²⁹; de sus hojas se obtuvo 3',4'-dihidroxichalcona-4'-O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -L-arabinopiranosido 62³⁰; de sus semillas se identificó buteina-4'-O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -L-arabinopiranosido 63³¹ y además se estudiaron las variaciones de aminoácidos y cetoácidos durante la germinación ³²⁻³⁴ y la composición en aminoácidos de sus semillas³⁵.

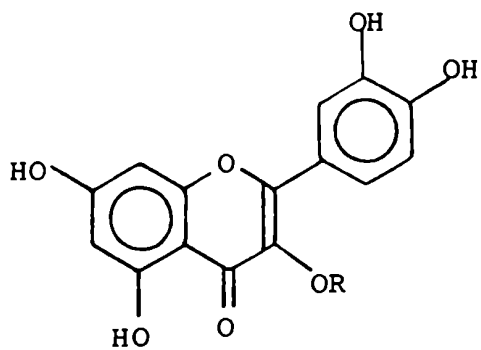
B. retusa: en su corteza se determinó la presencia de quercetina-3-O- β -D-glucopiranosido 64 y rutina 65³⁶; se realizó otro estudio sobre sus flavonoides³⁷ y se analizó la composición en aminoácidos de las proteínas de sus semillas³⁸.

B. variegata: se estudiaron de sus flores las antocianinas³⁹; los flavonoides, detectándose canferol-3-O-ramnoglucósido, canferol-3-O- β -D-galactopiranosido 66⁴⁰ y sus aminoácidos y cetoácidos⁴¹. De sus tallos se identificaron sitosterol, lupeol 67, 5,7-dimetoxiflavanona-4'-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosido 68⁴², 5,7-dihydroxiflavanona-4'-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosido⁴³ 69 y glicósidos de quercetina³⁷. En sus semillas fueron estudiados los aminoácidos constitutivos de sus proteínas³⁸ y glicósidos de miricetina³⁷.

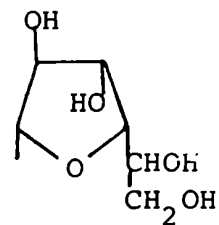
B. tomentosa : en sus flores se encontró quercetina 3, isoquercitrina 60⁴⁴ y rutina⁴⁵ 65.

De *B. glauca* existe un estudio sobre sus catecoles⁴⁶ y de *B. kwangtungensis* sobre sus taninos⁴⁷. En *B. malabarica* y *B. valhi* se detectaron flavonoides³⁷, encontrándose glicósidos de quercetina en todos sus tejidos y glicósidos de canferol sólo en las flores de la segunda especie.

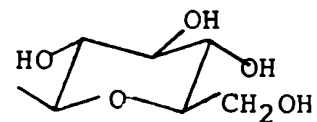
B. championii: se conoce sólo un estudio químico de esta especie en el cual se describen flavonas nuevas⁴⁸.

60

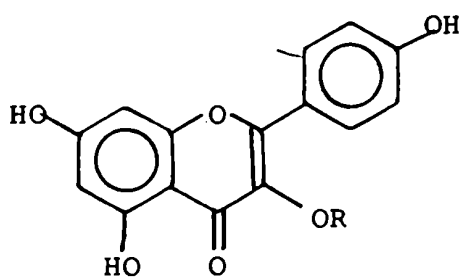
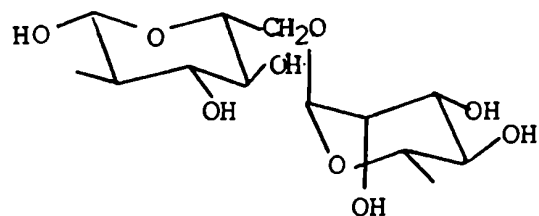
R=

64

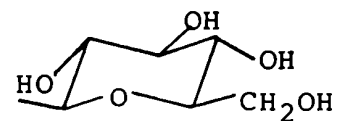
R=

65

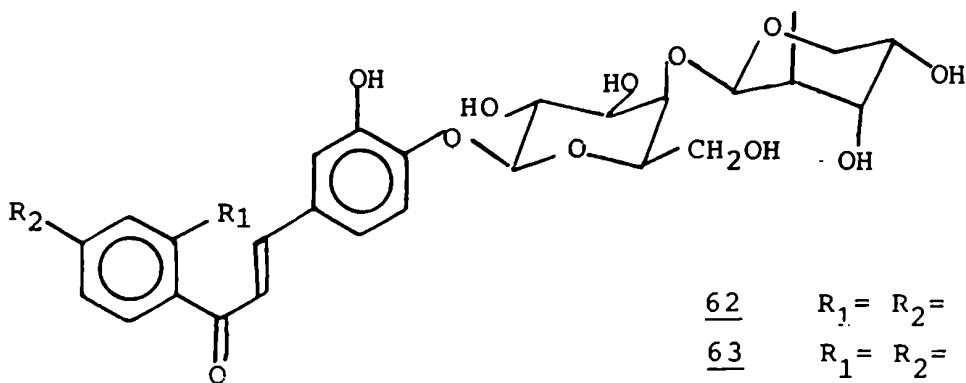
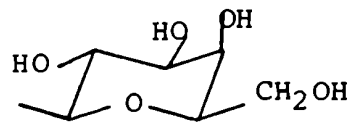
R=

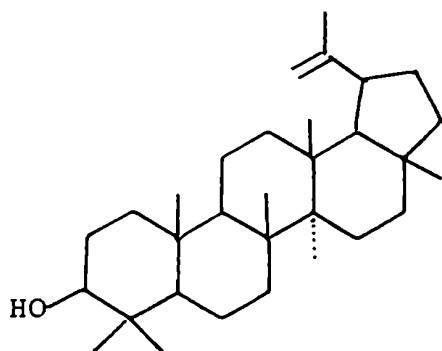
61

R=

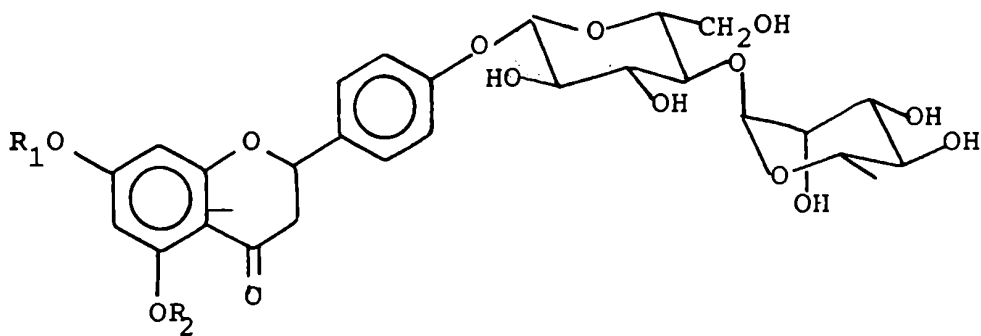
66

R=

62 $R_1 = R_2 = H$ 63 $R_1 = R_2 = OH$



67



68

R₁ = R₂ = H

69

R₁ = R₂ = CH₃

Bauhinia candicans

La especie *Bauhinia candicans*, objeto de estudio químico de esta tesis, es una planta leñosa conocida más comúnmente como "falsa caoba", "pezuña de vaca" o "pata de buey".

Es de interés no sólo por su extraña morfología y valor decorativo sino también porque sus hojas son utilizadas en medicina popular y homeopática por sus propiedades hipoglucémicas e hipocolesterolémicas^{28,49}.

Se han realizado estudios farmacológicos para investigar estas propiedades tanto en esta especie como en otras relacionadas⁵⁰⁻⁵³. Esos resultados son en algunos casos contradictorios por lo que se considera necesario una revisión de los mismos.

Estos estudios eran los únicos hechos con esta especie ya que se carecía de todo dato químico.

CAPITULO II
3-CETOESTEROIDES Y
GLICOSIDOS DE ESTEROLES

CETOESTEROIDES INSATURADOS

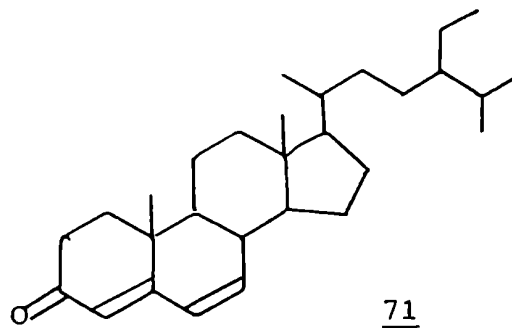
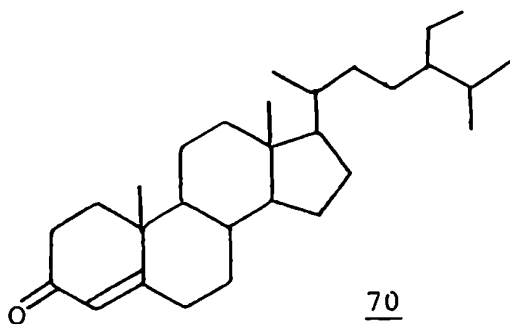
Los esteroides y en particular las cetonas α, β -insaturadas, son un grupo muy importante de productos naturales debido a sus variadas actividades biológicas.

Algunos Δ^4 -3-cetoesteroides son hormonas sexuales o corticosteroides. Estos compuestos se encuentran también en vegetales como por ejemplo Δ^4 -estigmastadien-3-ona 70=VII que fue identificada en numerosas especies^{54-62,67}. Más recientemente fueron aislados esteroides con esta funcionalidad de fuentes marinas⁶³⁻⁶⁶.

Los $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides son corticosteroides medicinalmente importantes. Además, han sido aislados de orina humana⁷⁸ y de organismos marinos^{68,69}.

Finalmente, otros 3-cetoesteroides insaturados que resultaron ser activos biológicamente son los $\Delta^{4,6}$, ya que son progestógenos terapéuticamente útiles. Compuestos de este tipo fueron aislados de organismos marinos⁷⁰ e insectos^{71,72}; en plantas superiores el representante más importante de este grupo es $\Delta^{4,6}$ -estigmastadien-3-ona 71=VIII^{72,73}.

Debido a que estos compuestos se encuentran en pequeñas cantidades y constituyendo mezclas complejas, resultó de gran interés poder determinar sus estructuras mediante una técnica analítica como CGL-EM.



Análisis de los espectros de masas de 3-cetoesteroides monoin- saturados

En contraste con las cetonas saturadas, las α,β -insaturadas exhiben un patrón de fragmentación característico, que se mantiene aún en presencia de algunos otros sustituyentes.

Las primeras publicaciones^{74,75} indicaban los espectros típicos de estos compuestos aunque se carecía de los derivados convenientemente marcados como para discutir las rupturas principales, sobre todo aquellas que implican migraciones de hidrógeno.

Es así como el espectro de Δ^1 -5 α -androst-3-ona⁷⁴ 72 muestra tres fragmentos importantes de m/e 230, 188 y 122, mientras que el correspondiente isómero Δ^4 (Δ^4 -androst-3-ona 73)⁷⁶ presenta sus principales picos a m/e 230, 187, 149 y 124. Como se ve, estas señales resultan de gran importancia para el diagnóstico de la posición del doble enlace en los 3-cetoesteroides α,β -insaturados (Fig. 3).

Los picos en la zona de masas menores a 120, parecen ser productos de rupturas indiscriminadas del núcleo esteroide⁷⁷ y por consiguiente sin valor diagnóstico.

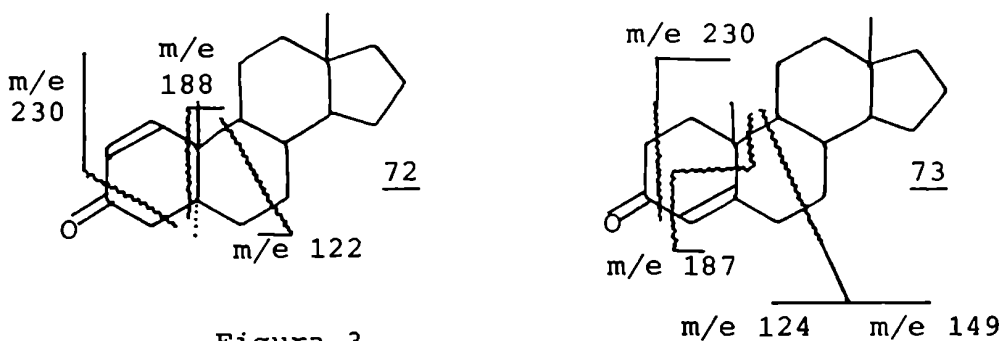


Figura 3

Del análisis del espectro de masas de 72 se observa que el ión de m/e 230 corresponde a la pérdida de 42 u.m.a. a partir del ión molecular.

Al examinarse el espectro de 2,4,4- d_3 - Δ^1 -5 α -andros-ten-3-ona^{74,77}, se observó que el correspondiente ión aparecía a

m/e 231 ($C_{17}H_{25}D^+$). Como se pierden 44 u.m.a. (C_2D_2O) a partir del ión molecular del derivado deuterado (m/e 275) existen dos posibilidades: que los dos deuterios se pierdan junto con el C-4 o que se produzca un reordenamiento complejo mediante el cual se transfiere un átomo de deuterio de C-4 a C-2 con un clivaje concomitante o subsecuente de las uniones 1-2 y 3-4.

El proceso más probable es el primero ya que se asemeja más a una reacción química ordinaria. Este puede ser visualizado (Fig. 4) a través de la formación de un ión molecular a, que genera por ciclación la olefina ionizada b.

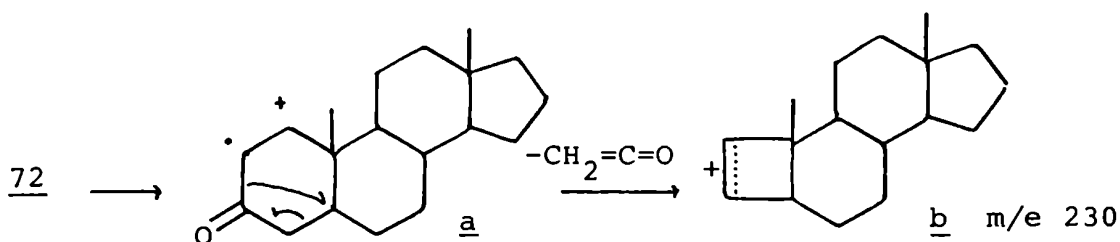


Figura 4

El ión de m/e 188 corresponde a M-84 y está constituido por $C_{14}H_{20}^+$. Se demostró mediante marcaciones⁷⁷ que los C-1,-2,-3,-4 y 19 no formaban parte de dicho ión, pero que sí se retenían en el fragmento cargado los carbonos 5, 6, 7 y 17. Se determinó además, que el H-8 β se transfiere cuantitativamente al fragmento neutro.

Esta ruptura se representa formalmente en la figura 3 pero no se pudo presentar un mecanismo plausible, especialmente debido a la ausencia de iones metaestables.

El pico base en el espectro del compuesto 72 se observa a m/e 122. Se demostró mediante marcaciones con deuterio que se producían migraciones de hidrógenos⁷⁷, siendo la preponderante la del H-5 (70%) y en menor grado la de los H-2 o H-4. Pero entonces, evidentemente, debe producirse la migración de un hidrógeno de otra porción de la molécula, hacia el anillo A; este hidrógeno resultó ser el 8 β .

Un mecanismo posible para la formación de este pico base (Fig. 5) podría comenzar por el ión molecular c y homólisis

del enlace 9-10 (d) . La transformación de este último ión en el indicado por e se ve favorecida ya que la migración del hidrógeno se produce en un estado de transición cíclico de seis miembros, durante la formación del doble enlace Δ^8 . La descomposición del fragmento e también ocurre a través de un estado de transición cíclico de seis miembros, produciendo el sistema aromático f'. La gran estabilidad de este fragmento favorece su formación. (Fig. 5)

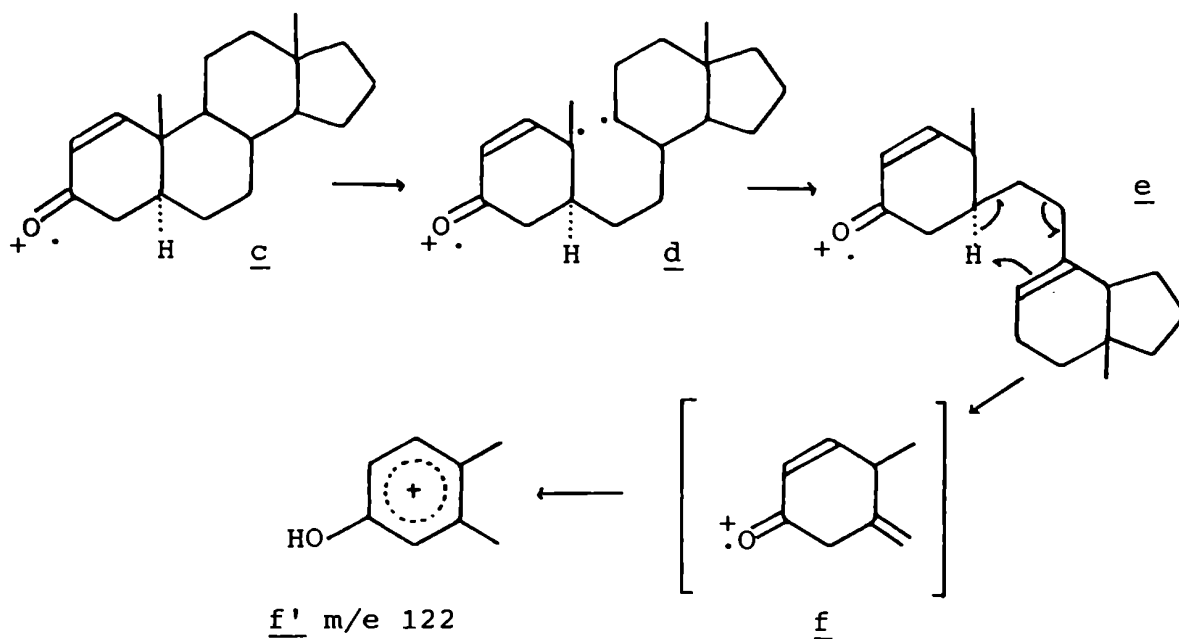


Figura 5

Una ruta opcional sería la que involucra una transferencia de hidrógenos diferente (Fig. 6), que estaría más favorecida debido a la mayor conjugación del ión g respecto a e.

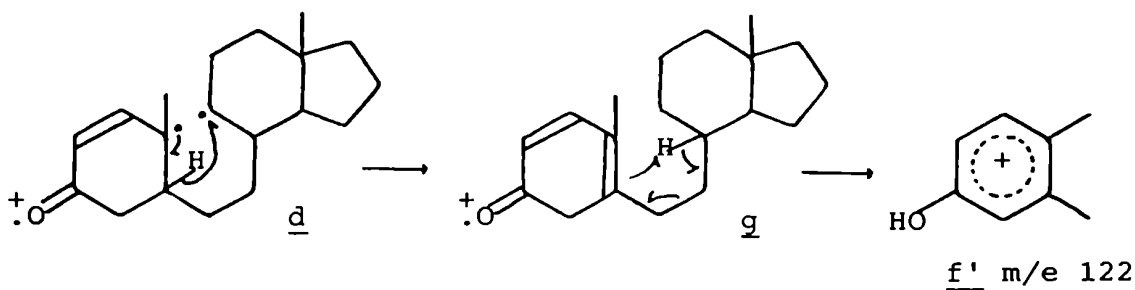
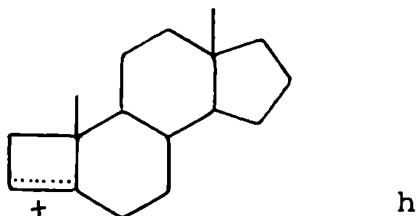


Figura 6

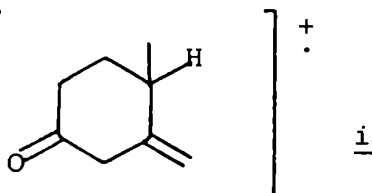
En el caso de Δ^4 -androst-3-ona 73, el pico a m/e 230 (M-42) se origina posiblemente en forma análoga a la del compuesto 72 generándose el ión h.



Al igual que en el caso de su análogo M-84 del espectro de 72, el origen del ión M-85 en el espectro de 73 no es conocido con certeza, siendo la ruptura formal la indicada en la figura 3.

El ión a m/e 149, diagnóstico para este tipo de cetonas α,β -insaturadas, proviene del ión molecular por pérdida de 123 u.m.a.⁷⁸. Se demostró que este fragmento se genera con migraciones de hidrógenos, siendo los implicados H-8, H-15 y H-14.

El ión de m/e 124 (i) se produce por fisión de los enlaces 9-10 y 6-7 en la que está involucrada la migración de los H-8, H-11, H-15 y H-14.



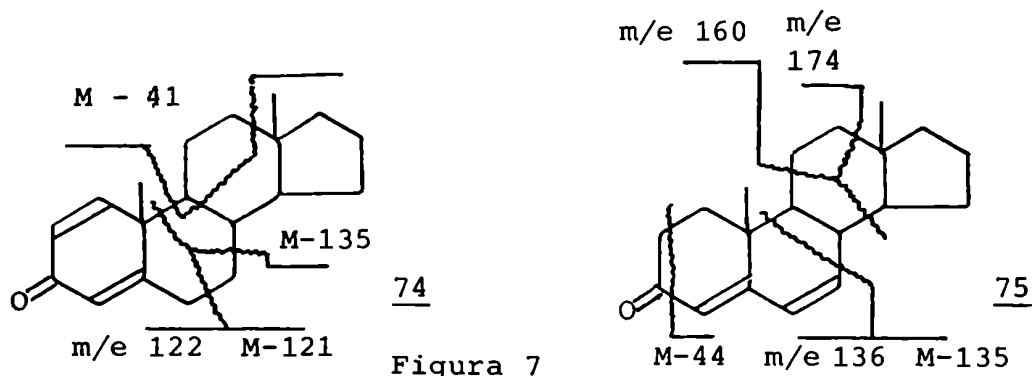
Los detalles de los mecanismos mediante los cuales se producen estos fragmentos se encuentran en el Capítulo IV, pág.83.

Análisis de los espectros de masas de los 3-cetoesteroides diinsaturados

Los dos 3-cetoesteroides diinsaturados conjugados de origen natural son los $\Delta^{1,4}$ y $\Delta^{4,6}$.

Estos isómeros son fácilmente diferenciables por espectrometría de masas ya que presentan un sólo pico en común, el correspondiente a M-135, aunque provenga en cada caso de mecanismos muy diferentes.

En la figura 7 se diagraman las principales rupturas para 1,4-androstadien-3-ona 74 y 4,6-androstadien-3-ona 75.



En el caso de $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides se produce un aumento en la intensidad de los picos provenientes de la ruptura del anillo B, sobre todo de aquella que origina la señal de m/e 122. Esto se debe a que el enlace 9-10 está activado por ser doblemente alílico.

El análisis de los espectros de masas de derivados convenientemente deuterados⁷⁸ indicó que se produce migración de dos hidrógenos y que ésta es muy específica ya que C-8 y C-11 proveen el 93% de los hidrógenos itinerantes. El mecanismo postulado para este proceso se muestra en la figura 8.

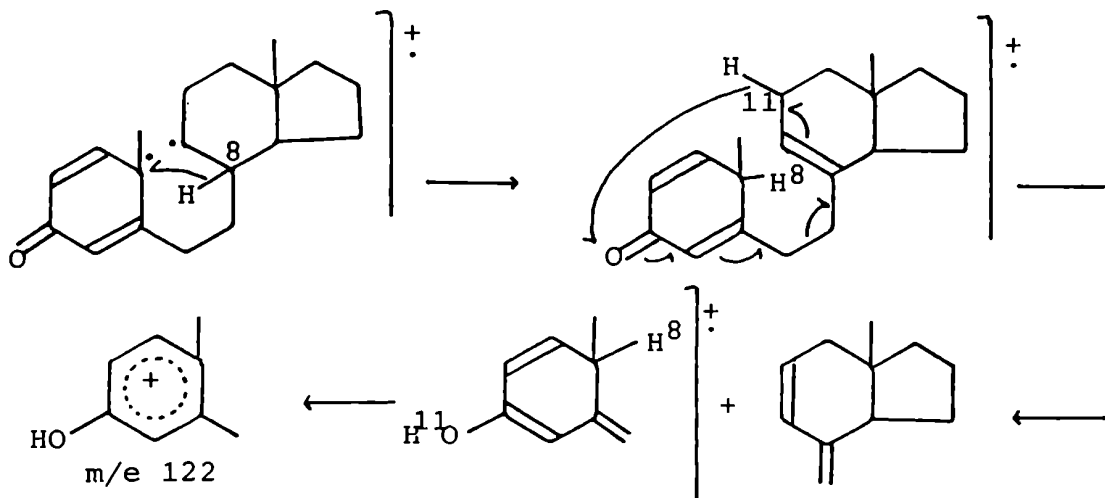


Figura 8

Además, existe una pequeña contribución de los hidrógenos de C-14 (Fig. 9).

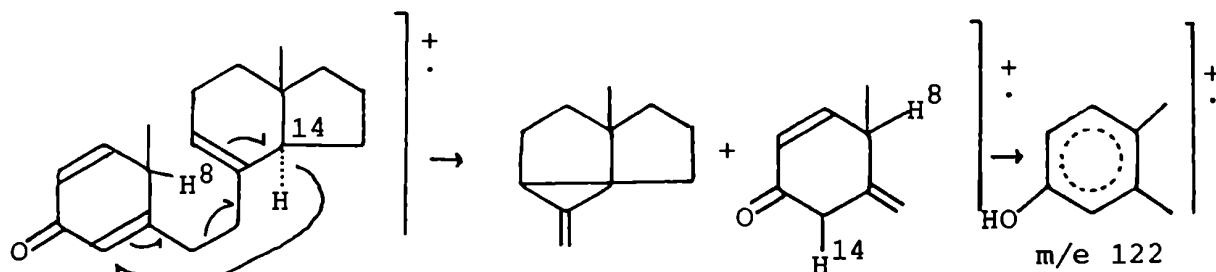


Figura 9

En ambos casos la fragmentación del anillo B se inicia por una ruptura concertada del enlace 9-10 y finaliza con la homólisis de la unión 6-7 y la migración de un hidrógeno alílicamente activado.

El ión M-121 tiene una intensidad menor que el antes discutido (m/e 122) ya que este último es el que produce la mayor parte de la corriente iónica.

Nuevamente, experimentos de marcación con deuterio indicaron que migraba un solo hidrógeno proveniente principalmente de C-8 y en forma minoritaria de C-11 y C-14.

La migración directa de un hidrógeno de C-8 a C-10 facilita la escisión del enlace 6-7 para producir el catión k alílicamente estabilizado. Este es el proceso más simple por el que se origina este ión (Fig. 10).

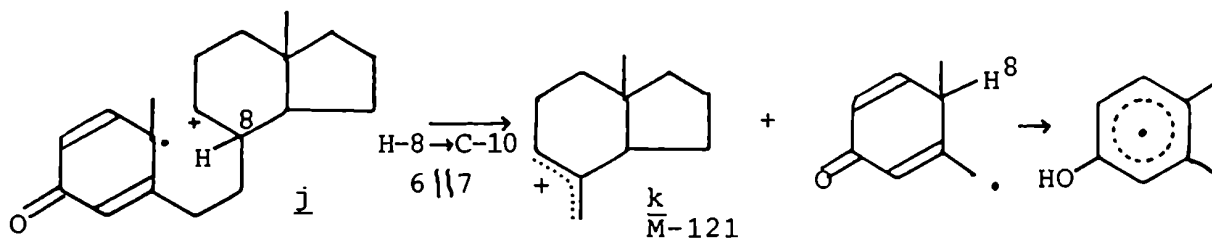


Figura 10

La migración del hidrógeno de C-14 debe estar precedida por un desplazamiento 1→2 del hidrógeno de C-8 a C-9 para

generar así un ión molecular más estable l, que permita la migración de un hidrógeno de C-14 a C-10 y la ruptura homolítica del enlace 6-7 (Fig. 11) para formar finalmente el ión M-121 (m).

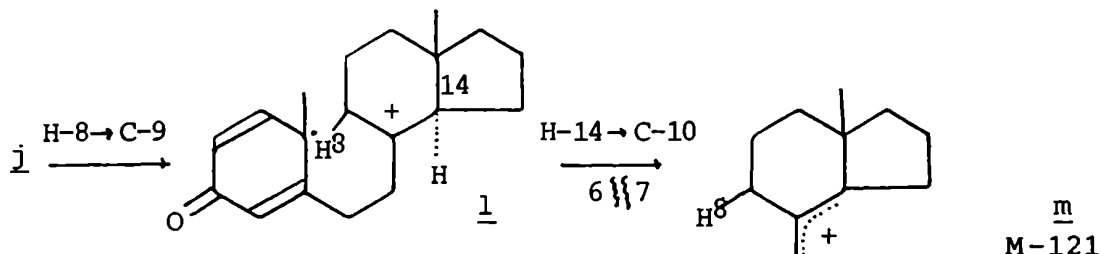


Figura 11

La migración de un H-11 es poco previsible. El mecanismo más plausible parecería ser el que involucra la transferencia inicial de un H-11 al oxígeno, para generar la especie fenólica n. Un desplazamiento posterior 1,3 de H-8 a C-11 se produciría en forma concertada con escisión del enlace 6-7, formando el catión bencílicamente estabilizado o (Fig.12).

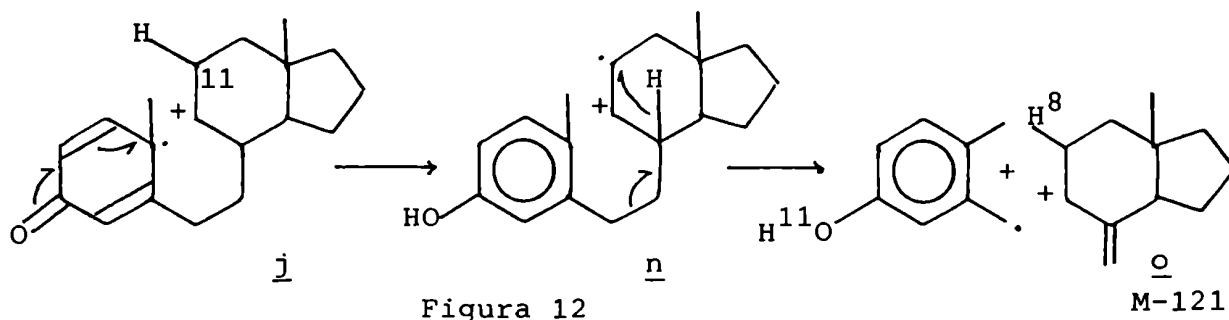


Figura 12

El ión M-135 que aparece en todos los espectros de $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides se genera, al igual que los dos anteriores por fragmentación del anillo B.

Este ión resulta de la fisión de los enlaces 9-10 y 7-8 con la transferencia neta de un hidrógeno desde el fragmento cargado. Pero los espectros de masas de derivados marcados de mostraron que en realidad son tres los hidrógenos que intervienen en el reordenamiento. Estos provienen principalmente de C-11

C-8 y C-6.

La transposición inicial de un hidrógeno de C-8 a C-10 ($j \rightarrow p$) necesita una transferencia recíproca de C-6 a C-8. La migración de un H-11 al oxígeno y la posterior ruptura del enlace 7-8 doblemente activado alílicamente produce un radical conjugado y un catión alílico \underline{r} (Fig. 13).

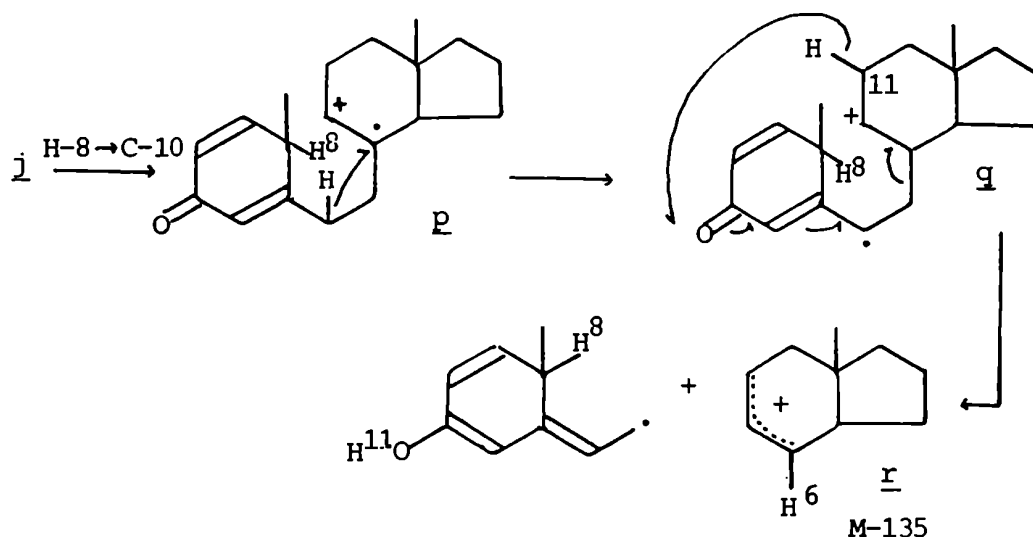


Figura 13

Es probable que la migración de un solo hidrógeno también contribuya en cierto grado a la formación del ión M-135, formando \underline{r}' (Fig. 14).

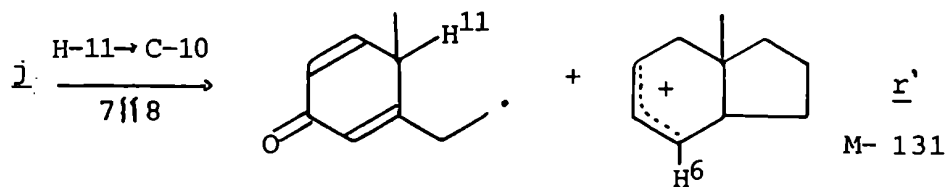


Figura 14

Finalmente, una de las señales más pequeñas, pero distinguibles, en la zona del ión molecular es la que aparece a M-41. Este ión se genera por pérdida directa de $C_3H_5^{\cdot}$ a partir del ión molecular. Por marcación con D en C-12 se observó que

este carbono se perdía durante el proceso de fragmentación, determinándose además por marcación del C-11 que sólo un átomo de deuterio unido a este carbono permanecía en la especie cargada. Estos resultados sugieren que la pérdida de $C_3H_5^+$ involucra a C-9, C-11 y C-12, mediante el mecanismo que se detalla en la figura 15. El desplazamiento observado del H-8 corroboraría esta postulación. (Fig. 15)

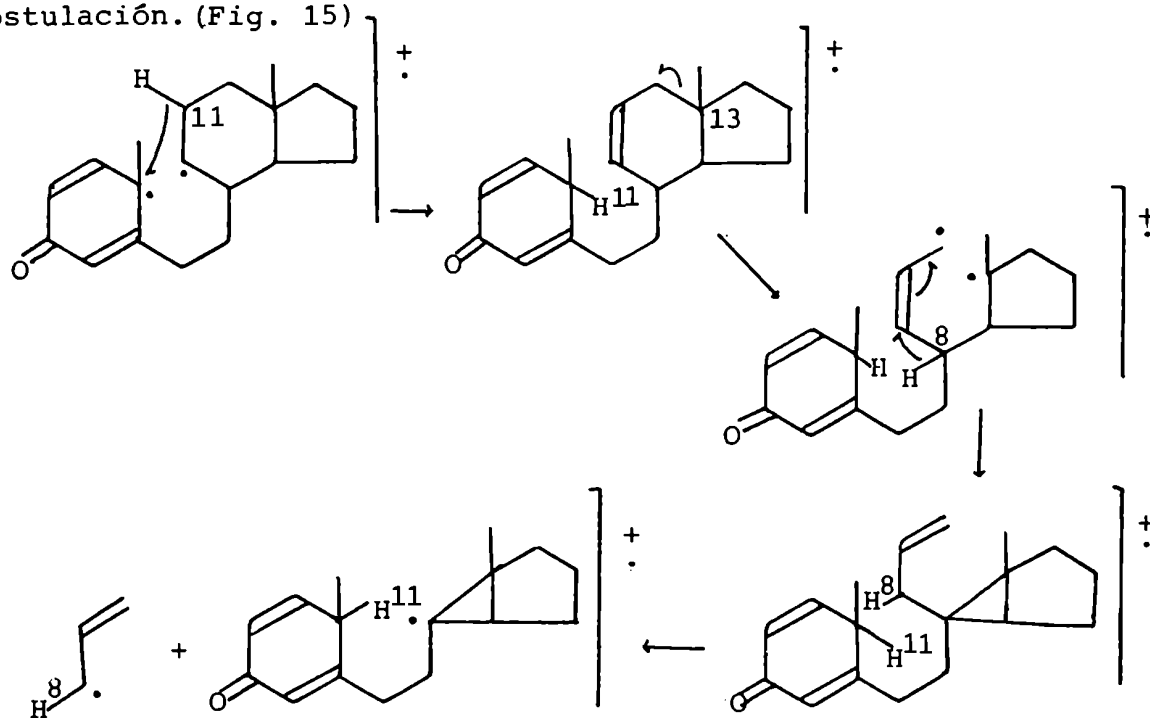


Figura 15

Como se mencionó anteriormente la única señal común en los espectros de masas de los $\Delta^{1,4}$ y $\Delta^{4,6}$ -3-cetoesteroides es M-135. Estos fragmentos tienen distinto origen ya que la existencia del doble enlace entre C-6 y C-7 impediría la fragmentación del anillo B. Por consiguiente, en estos últimos compuestos los hidrógenos itinerantes también son diferentes (Fig. 16).

Otros tres iones que son de importancia en los espectros de masas de los $\Delta^{4,6}$ -3-cetoesteroides son los de m/e 136, 160 y 174. Las estructuras postuladas para dichos iones se esquematizan en la figura 17.

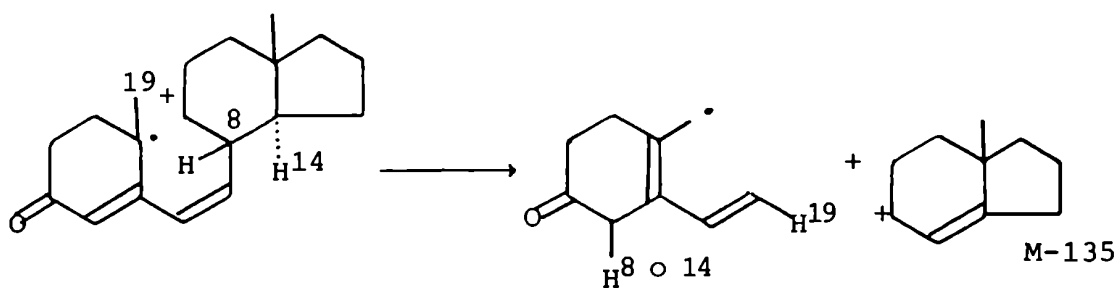


Figura 16

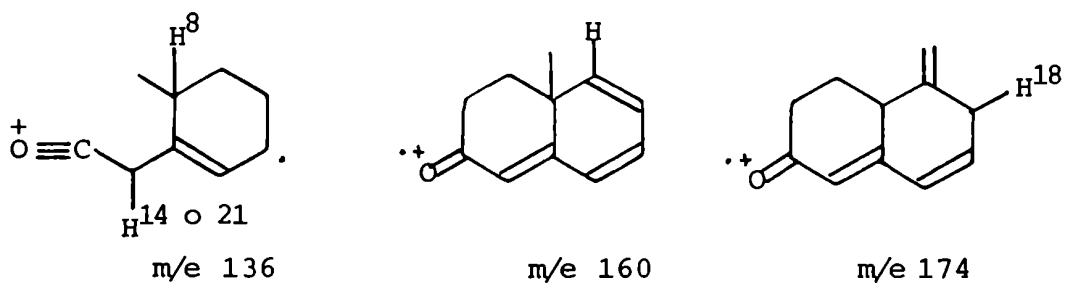


Figura 17

Finalmente, otra fragmentación que es de valor diagnóstico para este tipo de compuestos, aunque de baja intensidad, es la que se observa a M-44 (Fig. 18). Esta se genera mediante un mecanismo complicado produciéndose la pérdida de C_2H_4O a partir del ión molecular.

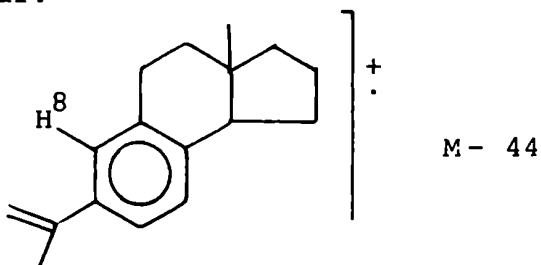


Figura 18

El detalle de los mecanismos por los cuales se forman todos estos fragmentos se discuten en el Capítulo IV pág. 89.

Resulta interesante analizar cómo se modifica el patrón de fragmentaciones de estas dienonas al aumentar el número

de dobles enlaces. En el caso de los $\Delta^{1,4,6}$ -3-cetoesteroides⁷⁰ se observa que la única señal importante (pico base) es la correspondiente a M-133. El mecanismo a través del cual transcurre esta fragmentación es completamente análogo al de la formación del M-135 de los $\Delta^{4,6}$ -3-cetoesteroides.

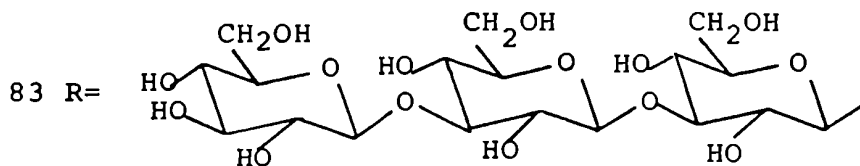
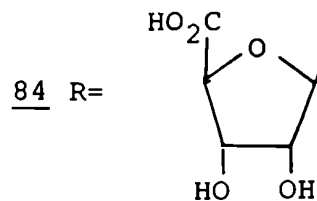
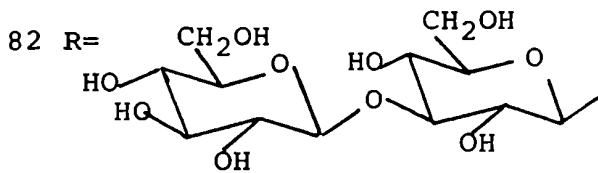
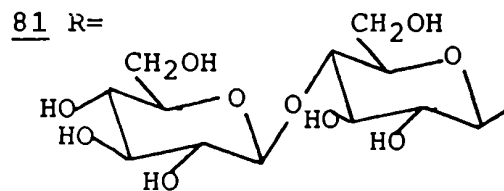
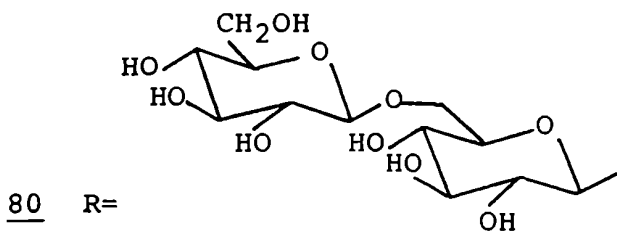
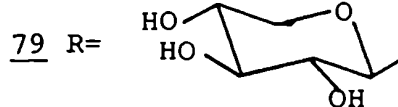
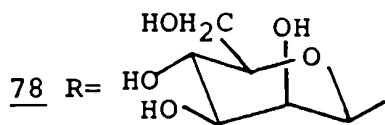
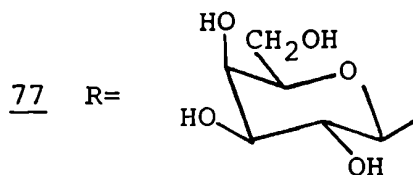
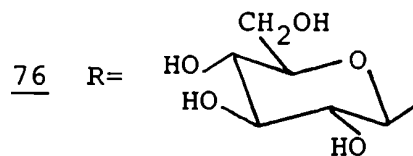
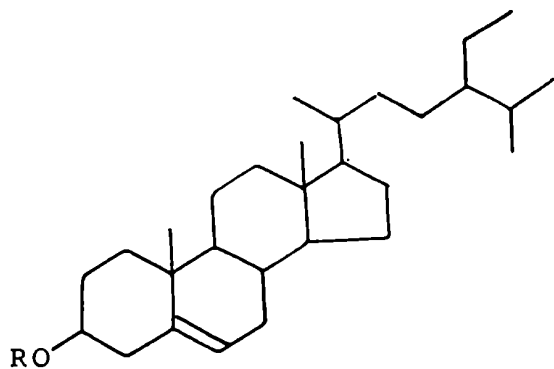
GLICOSIDOS DE ESTEROLES

Los glicósidos de esteroides y sus ésteres atrajeron la atención de fisiólogos y bioquímicos por su amplia distribución en plantas superiores y su posible función a nivel de membranas⁷⁹.

Aunque se recopilaron muchos datos sobre la distribución y biosíntesis de estos compuestos se carece de suficientes estudios sobre metabolismo y funciones fisiológicas de los mismos.

La aglicona de estos compuestos está estructuralmente relacionada con los fitoesteroides que se encuentran en la misma planta en forma libre o esterificados⁸⁰. Por otra parte, se demostró que no existe vinculación cuantitativa entre los glicósidos de esteroides y los esteroides libres^{80,81}.

En el caso particular de los glicósidos conocidos de sitosterol, el azúcar ampliamente mayoritario es la glucosa^{76=XII}^{82,83} siguiéndole en orden de importancia la galactosa⁷⁷^{84,85,86}. Hasta el momento, sólo fueron descritos por única vez los siguientes glicósidos de sitosterol: 3-O- β -D-manopiranosido⁷⁸⁸⁷, 3-O- β -D-xilopiranosido^{79=X}⁸⁸, los di y tri-glicósidos: 3-O- β -genciobiosido⁸⁰⁸⁹ y 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopiranosido⁸¹, 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosido⁸² y 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopiranosido⁸³⁹⁰ y la pentosa urónica: 3-O- α -D-riburonofuranosido^{84=XI}⁹¹.



Los glicósidos de esteroides están presentes en las plantas vasculares y están, probablemente, ampliamente distribuidos en musgos y helechos, existiendo pocas descripciones de su aislamiento en hongos y algas^{92,93}. También existen estudios en procariotas encontrándose glicósidos de esteroides en algunas cepas de *Mycoplasma*.

En general estos compuestos están acompañados por los correspondientes derivados acilados con un ácido graso unido a la posición seis del azúcar (Fig. 19). Este ácido graso consiste en uno de los presentes en los lípidos de la misma planta, siendo los más comunes palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico^{94,95,96}.

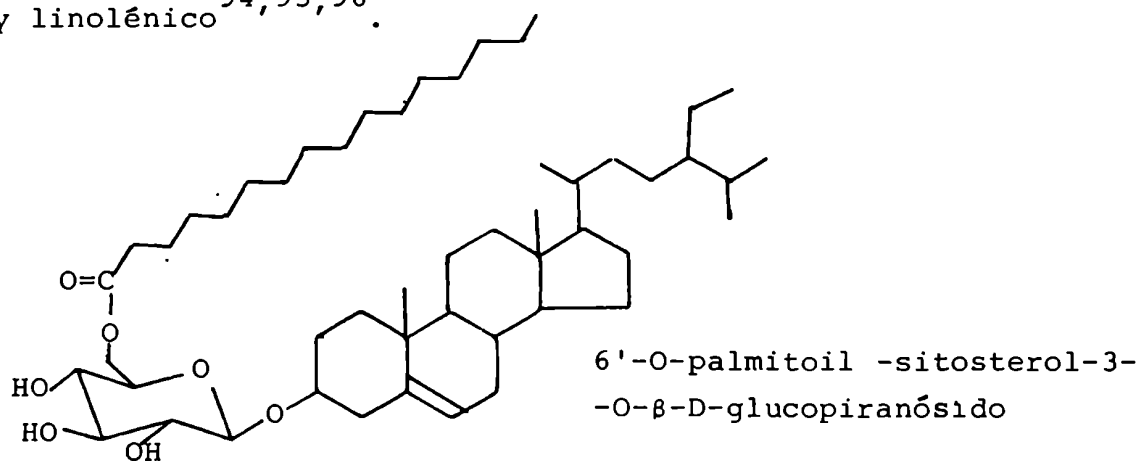


Figura 19

La biosíntesis enzimática de los glicósidos de esteroides fue estudiada primeramente en homogenatos de soja⁹⁷ y luego fue observada en diferentes tejidos y fracciones subcelulares de muchas plantas. Todas estas preparaciones utilizaron como sustratos UDP-¹⁴C-glucosa exógena y esteroides endógenos sin marcar para producir esteril-¹⁴C-glicósido. Se observó también incorporación cuando se administraron esteroides marcados⁹⁸.

El esteroide preferido como sustrato es sitosterol, aunque estigmasterol, α-espinasterol, ergosterol y colesterol también son efectivos^{99,100}. Las condiciones necesarias para la glucosidación demostraron ser la planaridad de los anillos A y B (cuando éstos son trans o existe un doble enlace en C-5) y la

configuración β del grupo hidroxilo. El número y posición de los dobles enlaces en el ciclo y/o en la cadena lateral, así como la presencia de grupos alquilo en C-24 son de importancia secundaria e influyen sólo en la velocidad de glicosidación¹⁰¹. En cambio, los triterpenos tetra- y pentacíclicos, relacionados estructuralmente con los esteroides como lanosterol, cicloartenol o β -amirina no son glucosidados por estas enzimas.

Como donador de hexosas el nucleótido más efectivo es UDP-glucosa. TDP-glucosa es menos efectiva y ADP-, CDP-, GDP-, IDP-glucosa y UDP-ácido glucurónico son casi inefectivos⁹⁷.

Los estudios realizados¹⁰¹ indican que la UDP-glucosa esteroiltransferasa está localizada específicamente en las membranas de Golgi. Una enzima similar parece estar presente también en tejido animal¹⁰².

Se conoce muy poco sobre el metabolismo de estos glicósidos, aunque algunos experimentos evidencian la degradación de los mismos. Cuando se administraron glicósidos de esteroides marcados a hojas de *Pelargonium hortorum* se encontró que éstos se hidrolizaban parcialmente luego de su reabsorción¹⁰³.

Durante la germinación de semillas de tabaco se observó una disminución en la cantidad de los glicósidos de esteroides mientras que se producían esteroides libres¹⁰⁴.

Aunque se sabe muy poco también acerca de las funciones fisiológicas de los esteroides en las plantas¹⁰⁵ se les asigna funciones similares a las que tienen éstos en las células animales, es decir, constituyentes de membranas celulares y hormonas o precursores de éstas. Ambas funciones pueden ser atribuidas teóricamente a los glicósidos de esteroides con el agregado de una tercera función metabólica ya que pueden actuar como compuestos de almacenamiento o como transportadores de esteroides.

Las evidencias acumuladas indican que estos glicósidos componen las estructuras de las membranas junto con los esteroides libres. Parece posible que el proceso reversible de glicosidación y desglicosidación de esteroides que ocurre en las membranas de células vegetales pueda tener un efecto regulatorio so

bre la función y organización de la membrana debido a cambios en las interacciones lípidos-lípidos y/o lípidos-proteínas⁹⁹.

Solamente existen observaciones individuales de sus posibles roles como hormonas o precursores. Estigmasterol-3-O-β-D-glucósido favorece el efecto de crecimiento provocado por auxinas en *Avena coleoptiles*, aunque no se descartó adecuadamente en este experimento la posibilidad de una hidrólisis intermedia.

En plantas de *Digitalis* el ¹⁴C-colesterol-3-O-β-D-glucósido es transformado en espirostanol¹⁰⁶. Esto significa que los glicósidos de esteroides pueden actuar como precursores de distintos esteroides cuya importancia biológica es ampliamente conocida.

Debido a que sus estructuras incluyen hidratos de carbono, los glicósidos de esteroides podrían tener una función de almacenamiento¹⁰⁷. Hecho corroborado por el aumento observado en el contenido de los mismos durante la maduración de semillas de soja y una disminución durante la germinación de semillas de tabaco¹⁰⁴. De cualquier forma su importancia como compuestos de almacenaje se ve disminuida debido a la relativamente pequeña cantidad en que se encuentran.

Se sugirió, además, que actúan como "transportadores" de esteroides ya que en plantas de *Digitalis*, alimentadas con ¹⁴C-mevalonato, los glicósidos de esteroides se marcan más rápidamente que los esteroides libres¹⁰⁷. Si este fuera el caso tendría que ser detectable el transporte de estos glicósidos dentro de la planta. En realidad, se aislaron de tallos y corteza de *Pelargonium* glicósidos marcados que habían sido suministrados a través de hojas¹⁰³. Se desconoce si los glicósidos son transportados inalterados o si son hidrolizados y posteriormente resintetizados.

El análisis estructural de estos compuestos se realiza por métodos químicos y espectroscópicos (IR, EM, ¹H-RMN y ¹³C-RMN). Normalmente, se obtiene mayor información de los dos últimos.

Elucidación estructural de glicósidos de esteroides por espectrometría de masas

El espectro de masas de los glicósidos de esteroides acetilados muestra los espectros superpuestos de la aglicona y del correspondiente azúcar acetilado. Las señales provenientes de las posibles agliconas, es decir, los Δ^5 -esteroides se discuten en la pág. 79.

Los espectros de los azúcares son prácticamente coincidentes con los respectivos O-metil-peracetil azúcares, salvo por supuesto por la diferente glicosidación.

Como es de esperar los epímeros no pueden ser diferenciados debido a que exhiben espectros muy similares, como se deduce de los correspondientes a pentaacetil- β -D-manopiranososa y pentaacetil- β -D-galactopiranososa¹⁰⁸ (Fig. 20 y 21).

El aspecto más valioso de estos espectros es la sensibilidad del método respecto del tamaño del anillo, lo que permite distinguir derivados furanósicos de piranósicos, como por ejemplo en la pentaacetil- β -D-galactosa (Fig. 21 y 22).

La mayor parte de los espectros de masas de los O-metil azúcares acetilados coincide con los de los azúcares correspondientes peracetilados ya que el sustituyente de C-1, o inclusive ese átomo de carbono es perdido con gran facilidad¹⁰⁹. Así por ejemplo el espectro de tetraacetilmetil- α -D-manopiranososa (Fig. 23) exhibe picos a la misma relación m/e que los del espectro de pentaacetil- β -D-manopiranososa (Fig. 20), con excepción de los que aparecen a m/e 243, 302, 363 y 405.

Un modo muy importante de fragmentación de estos poliacetatos¹⁰⁸ (corroborada por la existencia de picos metaestables) es la pérdida de ácido acético (60 u.m.a.), proceso muy conocido para ésteres de este ácido, y la pérdida de cetena (42 u.m.a.). Este último proceso parece estar muy favorecido por la pérdida previa de ác. acético ya que la doble ligadura que se genera juega un papel importante. El mecanismo que se sugiere se muestra en la figura 24.

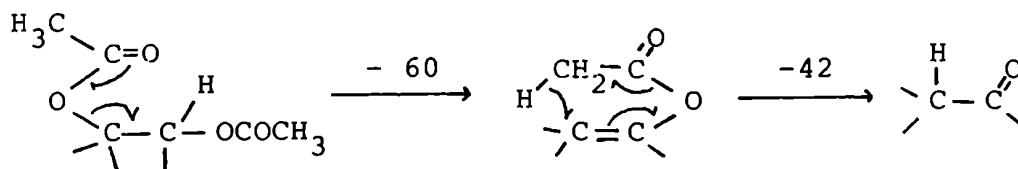


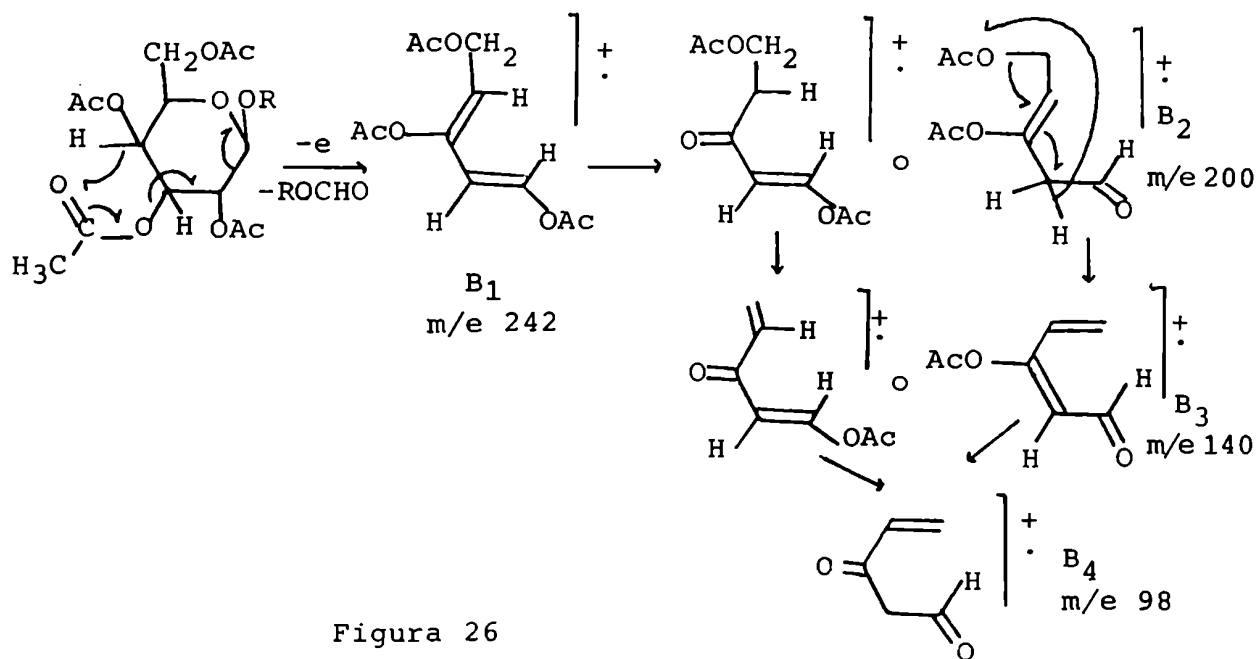
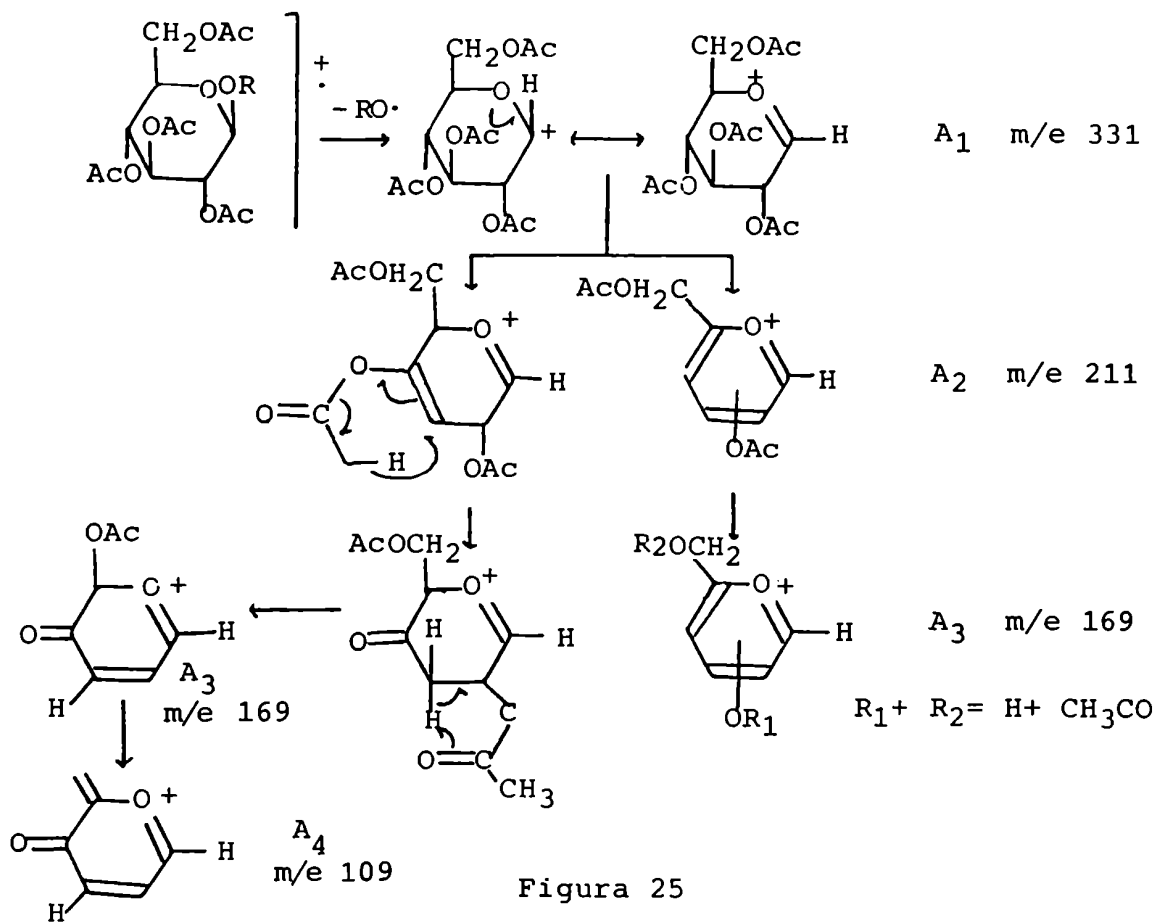
Figura 24

Las hexopiranosas generan tres series de picos. La primera de éstas (serie A) comienza con un ión de m/e 331 (A_1) que proviene de la pérdida del sustituyente de C-1. Posteriores pérdidas de ác. acético y cetena generan las restantes señales de la serie. En la figura 25 se esquematizan dichas rupturas. Esta serie de fragmentaciones es más pronunciada en los espectros de los metil y fenil tetraacetatos que en los pentaacetatos¹⁰⁹.

Otra serie de fragmentaciones que aparece en la mayoría de estos espectros (serie B) es la que comienza con la señal de m/e 242 (B_1)¹⁰⁹. En dicha fragmentación se pierde el C-1 con su sustituyente más el oxígeno del acetal y una molécula de ác. acético. Nuevamente a partir de este ión (B_1) por pérdida de cetena y acético, se generan los restantes miembros de esta serie (Fig.26).

Las fragmentaciones de esta serie (B) parecen ser más importantes si el C-5 no está sustituido como en el caso de las pentopiranosas o en fructopiranosas. Esta serie también es muy sensible a la sustitución de C-2, como se evidencia en el espectro de 2-desoxiglucosa donde están prácticamente ausentes. Esto puede deberse a que el ión de m/e 242 que origina esta serie se forma por ruptura del enlace entre C-1 y C-2 con retención de la carga en C-2 donde se encontraría estabilizada por la presencia de un sustituyente como el grupo acetoxi.

En los espectros de las hexopiranosas se observan señales muy intensas a m/e 157 y 115 acompañadas por una de menor intensidad a m/e 73¹⁰⁸. Del análisis de derivados deuteroacetilados se postularon las fragmentaciones que se indican en la figura 27 (serie C). El ión alílico C_1 puede estar favorecido respecto del ciclopropilo porque además de estar más estabilizado, contiene un doble enlace que facilita la eliminación de cetena para formar el abundante ión C_2 .



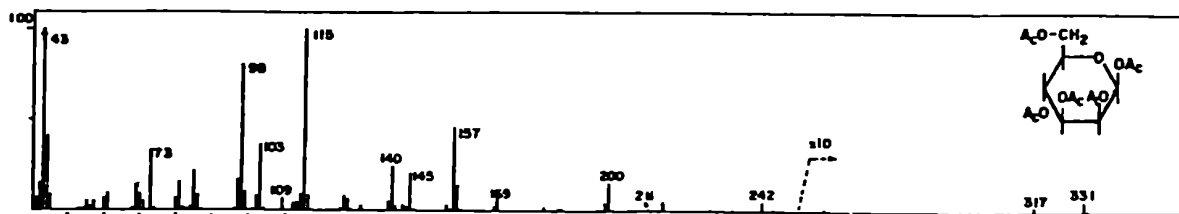
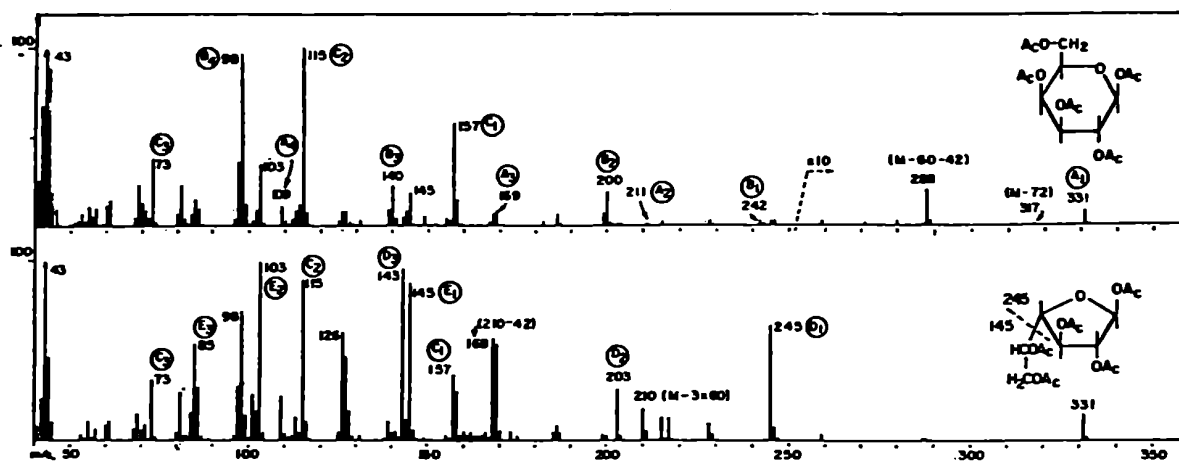


Figura 20



Figuras 21 y 22

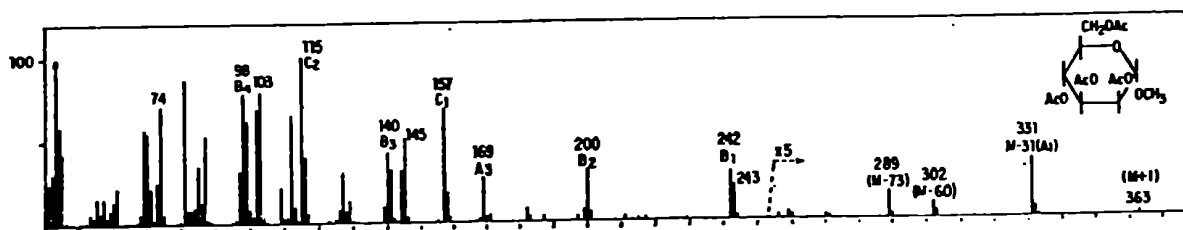


Figura 23

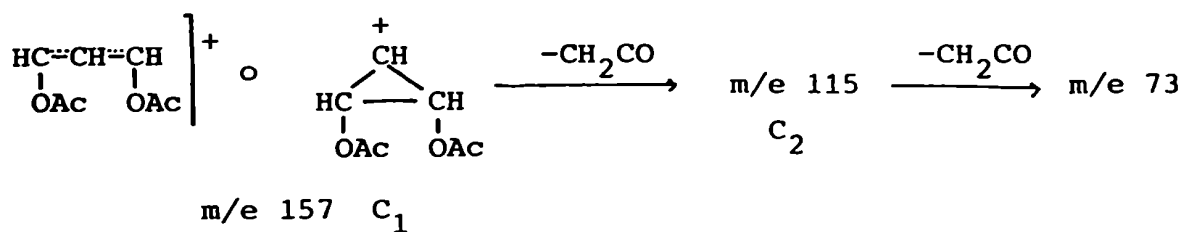


Figura 27

Como la señal de m/e 157 aparece en el espectro de fructopiranososa peracetilada se deduce que el C-1 no forma parte de este fragmento ya que si no, debería aparecer a 58 o 72 u.m.a. más. Como también aparece en los espectros de las tetraacetil pentosas se excluye también el C-6. Finalmente, por análisis de espectros de compuestos relacionados¹⁰⁸ se deduce que en el ión C₁ están presentes los C-2, C-3 y C-4.

Por último, en los espectros de todos estos poliacetatos se observan dos picos de intensidad considerable a m/e 103 y 145. Por estudios con marcación con deuterio¹⁰⁸ se determinó que estas especies contenían dos y tres acilos respectivamente, por lo que se postularon las siguientes estructuras:



Aunque estas especies parecen bastante inusuales a primera vista, el fragmento de m/e 103 involucra un proceso análogo a la eliminación de especies protonadas como H₃O⁺, NH₄⁺, CH₃OH₂⁺ o CH₃CO₂H₂⁺ ya que consiste en la pérdida de anhídrido acético protonado (CH₃CO)₂OH⁺¹⁰⁸. La especie de m/e 145 puede considerarse como el producto de abstracción de un ión acetonio en lugar de un protón. Cabe considerar además, la alta estabilización de estas especies debido a la alta concentración de acilos.

Estos son los iones comunes tanto a las hexosas peracetiladas como a los metil glicósidos acetilados, pero éstos últimos además presentan cuatro señales, como se mencionó anteriormente, a m/e 243, 302, 363 y 405. Estas dos últimas corresponden a M+1 y M+43 respectivamente. Aunque el ión molecular no se observa en ninguno de estos derivados debido a la facilidad con que sufren fragmentaciones, la presencia de estas especies indica la tendencia particular de los metil glicósidos a formar iones oxonios. Por marcación con deuterio se comprobó que las 43 u.m.a. provienen de una unidad de acetilo¹⁰⁹.

Las otras dos señales corresponden nominalmente a M-60 y M-60-59. Estudios con derivados deuteroacetilados¹⁰⁹ indicaron que la pérdida de 60 u.m.a. no provienen de ác. acético ya que en estos compuestos se observan las señales a M-60 y M-60-62.

Como estas fragmentaciones están evidentemente asociadas con la presencia del grupo metoxilo, es decir del acetal, se postula primeramente la ruptura del enlace entre C-1 y C-2 con retencción de la carga en el C-1. Este clivaje está muy favorecido porque se genera así un ión carbonio muy estabilizado por las dos funciones éter vecinas. La ruptura posterior de la unión entre el C-5 y el oxígeno resulta en la eliminación de una molécula neutra de formiato de etilo y la formación de un nuevo ión-radical de m/e 302 que contiene todavía los cuatro grupos acilo. La pérdida de uno de estos grupos acilo origina un ión carbonio insaturado (m/e 243) sin aumentar el número total de iones y radicales, siendo ésto un prerrequisito para una fragmentación energéticamente favorauble

Alternativamente, se puede eliminar una molécula de ác. acético, generándose así el radical que conduce al fragmento B₁ (m/e 242) (Fig. 28)

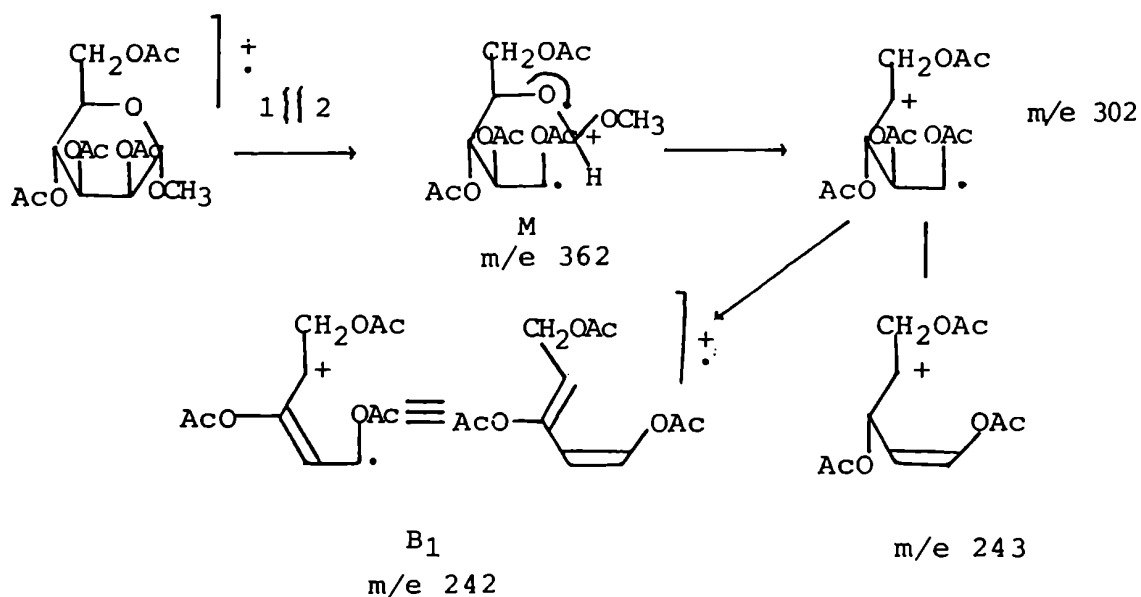


Figura 28

Las rupturas hasta ahora analizadas corresponden a metil glicósidos de hexosas piranósicas.

Si se comparan los espectros de masas de los isómeros furanósicos y piranósicos de un azúcar, como es el caso de pentaacetil- β -D-galactopiranososa (Fig. 21) y pentaacetil- β -D-galactofuranosa (Fig. 22), se observa una gran diferencia entre ellos¹⁰⁸. Esta diferencia no es sólo debida a la variación en el tamaño de los anillos sino también a la distinta cadena lateral. En la furanosa una cadena de dos átomos de carbono está unida al anillo tetrahidrofurano. Esta cadena se encuentra cerca del oxígeno hemiacetálico lo que facilita mucho la escisión del enlace entre C-4 y C-5; la retención de la carga en el C-4 conduce al fragmento abundante m/e 245 (D_1)¹⁰⁸. Si la carga se retiene sobre el C-5 se genera un ión de m/e 145 (E_1). Ambas especies cargadas se descomponen posteriormente por sucesivas pérdidas de ác. acético y cetona, generando los picos de m/e 245, 203, 143, 145, 103 y 85. Las estructuras propuestas en la figura 30 están corroboradas por los resultados del espectro de masas del correspondiente derivado per deuterioacetilado.

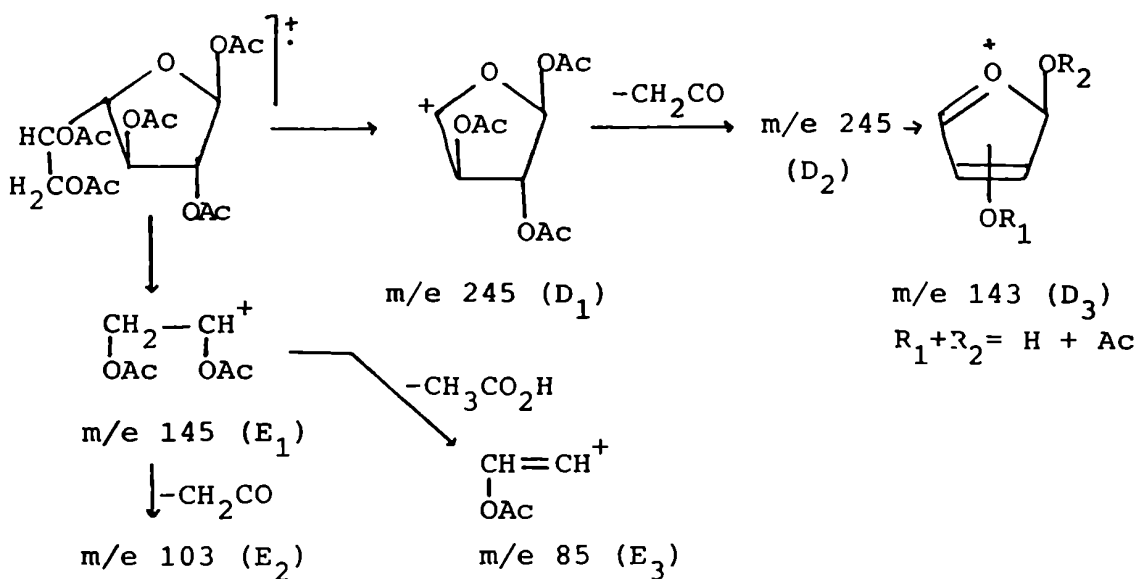


Figura 30

En las furanosas peracetiladas como en todos los poli-acetatos se forman los iones di y trioxonios (serie C) (Fig. 27).

Finalmente, es de remarcar la intensidad del picó m/e 331 en los espectros de las hexosas furanósicas lo que indicaría que la pérdida de un sustituyente de un carbono que posee un oxígeno hemiacetálico está más favorecida en anillos de cinco miembros que en los homólogos de seis.

Como puede observarse en el espectro de masas de la tetraacetil- β -D-ribopiranososa (Fig. 31), el espectro de las aldopentosas peracetiladas presenta las mismas fragmentaciones que las hexosas análogas, apareciendo por supuesto las señales de las series A y B a 72 u.m.a. menos¹⁰⁸.

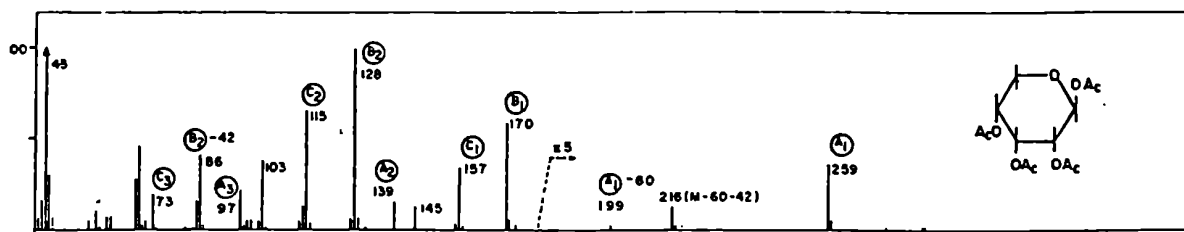


Figura 31

Elucidación estructural de glicósidos de esteroides por espectroscopía de ^1H -RMN

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica es una herramienta muy importante para la determinación estructural de los glicósidos de esteroides.

Nuevamente, como en general en todos los glicósidos, conviene analizar por separado las señales provenientes de la aglicona y del azúcar.

Si bien se realizó el estudio de esteroides naturales y sintéticos relacionados a las series colestano, ergostano y estigmastano utilizando espectrómetros de 40, 60, 90 o 100 MHz¹¹⁰⁻¹¹⁸ que resultaron de gran interés para estudios posteriores de nuevos es-

teroles, se encontraban a menudo problemas para distinguir isómeros que sólo diferían en la estereoquímica de un enlace insaturado o de un sustituyente alquílico.

Utilizando espectrómetros de 100 MHz los isómeros que mejor se distinguen son el campesterol (24 α -metilo) 85=IV y el 22,23-dihidrobrasicasterol (24 β -metilo) 86 (Fig. 32).

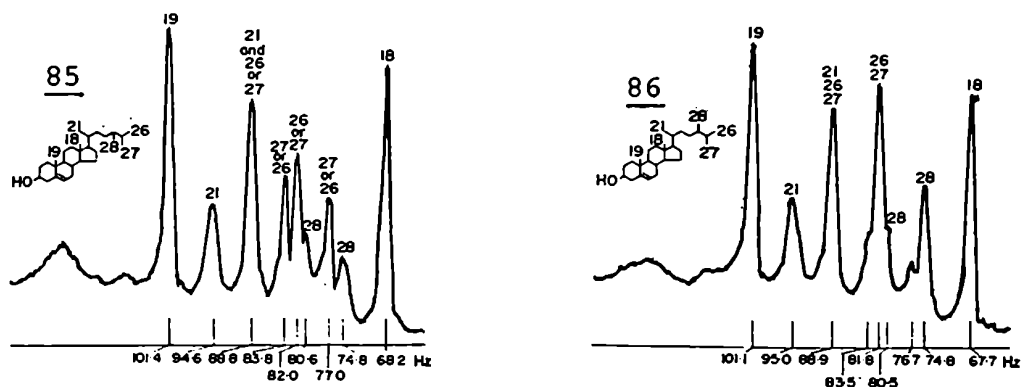
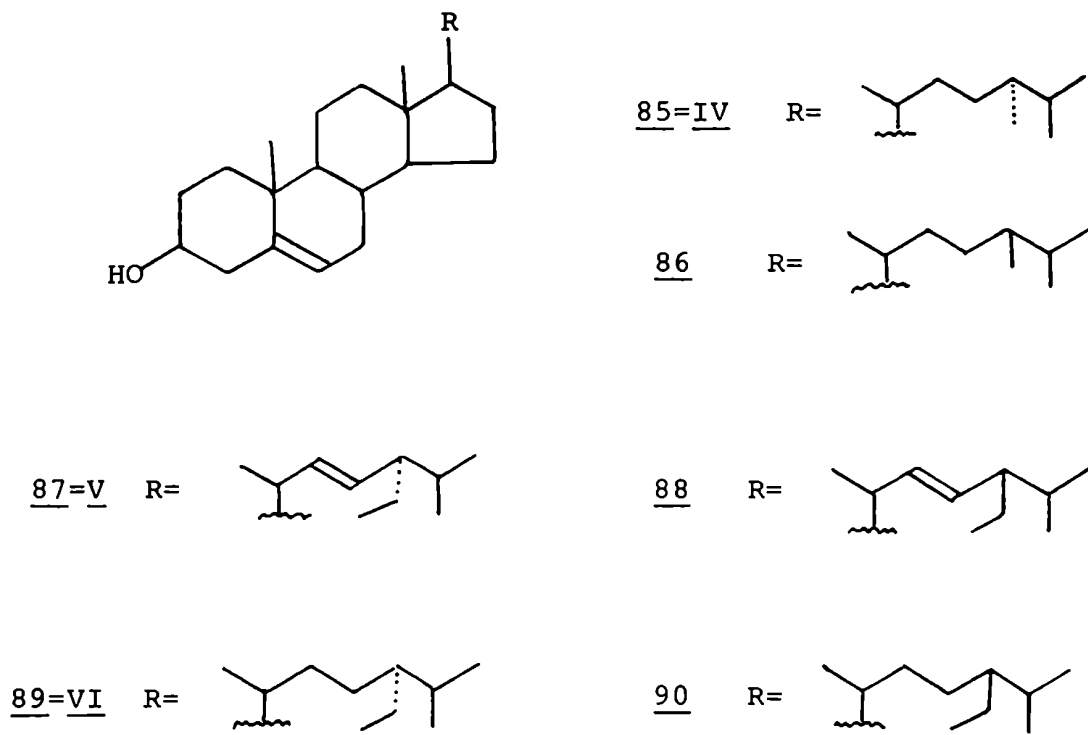


Figura 32



Una explicación posible para esta diferenciación implicaría una rotación impedida alrededor del enlace entre C-24 y C-25 que provocaría así la no equivalencia entre los Me-26 y Me-27, la cual se pone en evidencia al analizar los rotámeros preferidos que se generan al rotar dicho enlace (Fig. 33).

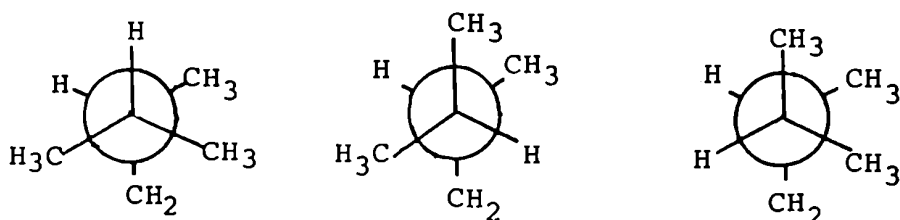


Figura 33

En el caso de los 24-etil epímeros, como estigmasterol 87=V (24 α -etilo) y poriferasterol (24 β -etilo) 88 o los correspondientes dihidroderivados sitosterol 89=VI y dihidroporiferasterol 90, la única diferencia que existe en el perfil de los correspondientes espectros de $^1\text{H-RMN}$ es la distinta intensidad de los picos (Fig. 34)

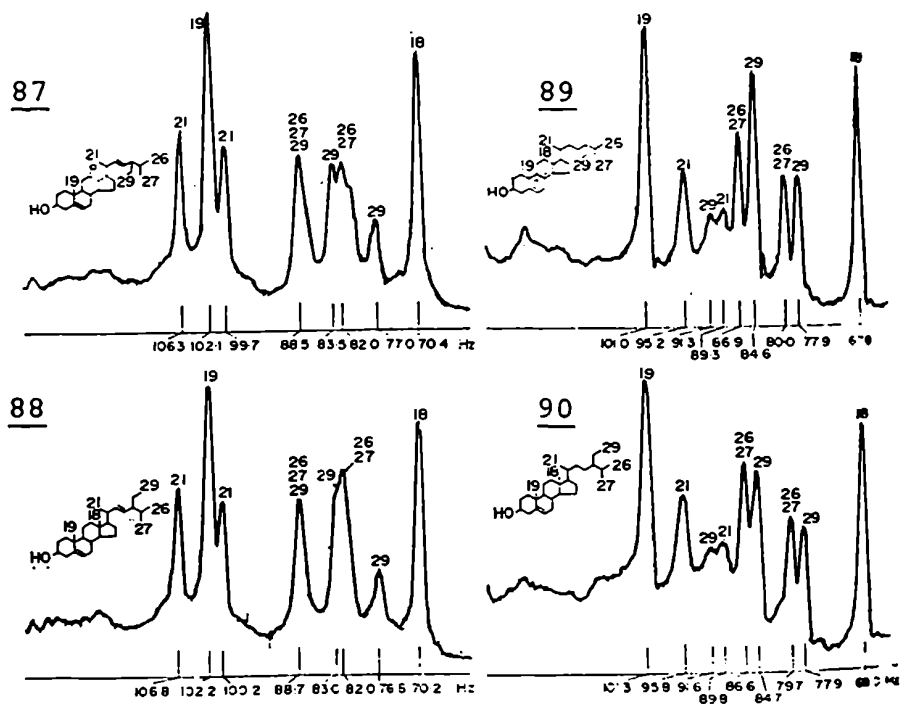


Figura 34

Como estas variaciones pueden ocurrir por el uso de distintos instrumentos, operadores o condiciones experimentales, este método no resulta apto para la determinación de la estereoquímica de la cadena lateral de estos isómeros.

En estos espectros los picos que aparecen a 77,9 y 84,6 ppm tienen un área considerablemente superior a la esperada para los protones del Me-29. Una explicación para esto, que parece ser ratificada por los espectros a 220 MHz, es que en estas señales existe la contribución de los protones de Me-27 o Me-26.

Sin embargo, pueden inferirse, a partir del análisis de los espectros de ^1H -RMN a 90-100 MHz, conclusiones interesantes acerca de los desplazamientos que provocan distintos sustituyentes sobre los metilos. Por ejemplo, las señales de los Me-18 y Me-19 en Δ^5 -esteroides aparecen respectivamente a 0,69-0,73 y 1,02-1,06 ppm, mientras que los Δ^7 presentan dichas señales a 0,54-0,56 y 0,80-0,84 ppm.

La introducción de un doble enlace en C-22 produce un desplazamiento a campos menores de los dobletes generados por los Me-21 y Me-28 en el caso de los 24-metil- Δ^{22} -esteroides y del doblete de Me-21 para los 24-etil- Δ^{22} -esteroides.

En la tabla 1 se detallan los desplazamientos de metilos producidos por distintas sustituciones del esqueleto colestano 91

	Me-21	Me-26 y 27	Me-19	Me-18
colestano	0,898	0,861	0,778	0,645
9(11)-en-	-0,008	-0,008	0,126	-0,078
14-en-	0,010	0,008	0,018	0,250
3 -acetoxi-	0,002	-0,001	0,042	0,003
14 -hidroxi-15-oxo-	0,048	0,009	0,215	0,150
14 ,15 -dihidroxi-	0,023	0,006	0,178	0,142
24-metil-	-0,081	-0,083	-0,009	-0,008
24-etil-	-0,030	-0,062	-0,008	-0,009

Tabla 1

Resumiendo y comparando los resultados presentados en la literatura no se puede obtener una única conclusión respecto de la utilidad de la ^1H -RMN de 100 MHz para la determinación de epímeros. Así por ejemplo, utilizando un espectrómetro de 90 MHz¹²², los Me-26 y 27 de los esteroides con sustituyentes metilo y etilo en C-24 son no-equivalentes y aparecen como dos grupos de dobletes mientras que en el colesterol, 24-metilen- y 24-etiliden-derivados dichos metilos son equivalentes y se muestran como un solo doblete.

Por otra parte, en el espectro de ^1H -RMN de campesterol (24 α -metil-) (85) a 100 MHz¹²² se observan cuatro picos correspondientes a Me-26 y Me-27, mientras que en el del 22,23-dihidrobrasicasterol (86), también a 100 MHz, se observan dos señales acompañadas por dos esbozos de picos. Esta observación sería la consecuencia de una distinta velocidad de rotación del enlace entre C-24 y 25. En los espectros de sitosterol (89) y clionasterol 90¹¹² se observa un solo doblete aunque como se dijo anteriormente las dos señales restantes podrían estar superpuestas con otras. Los espectros de estigmasterol (87) y poriferasterol (88) presentan los metilos unidos a C-25 como un único doblete.

Finalmente, los espectros realizados a 100 MHz de los derivados de colestano por otros autores¹¹³ muestran resultados diferentes. Mientras los derivados de colestano y ergostano (24-metil-) presentan un solo doblete para los Me-26 y 27, todos los derivados de estigmastano (24-etil-) muestran dos dobletes resueltos, separados por aproximadamente 0,02 ppm. La comparación es válida ya que los campos a los que aparecen los Me-26 y 27 en estos derivados varía muy poco y se encuentran, además, los valores informados para los esteroides en este rango.

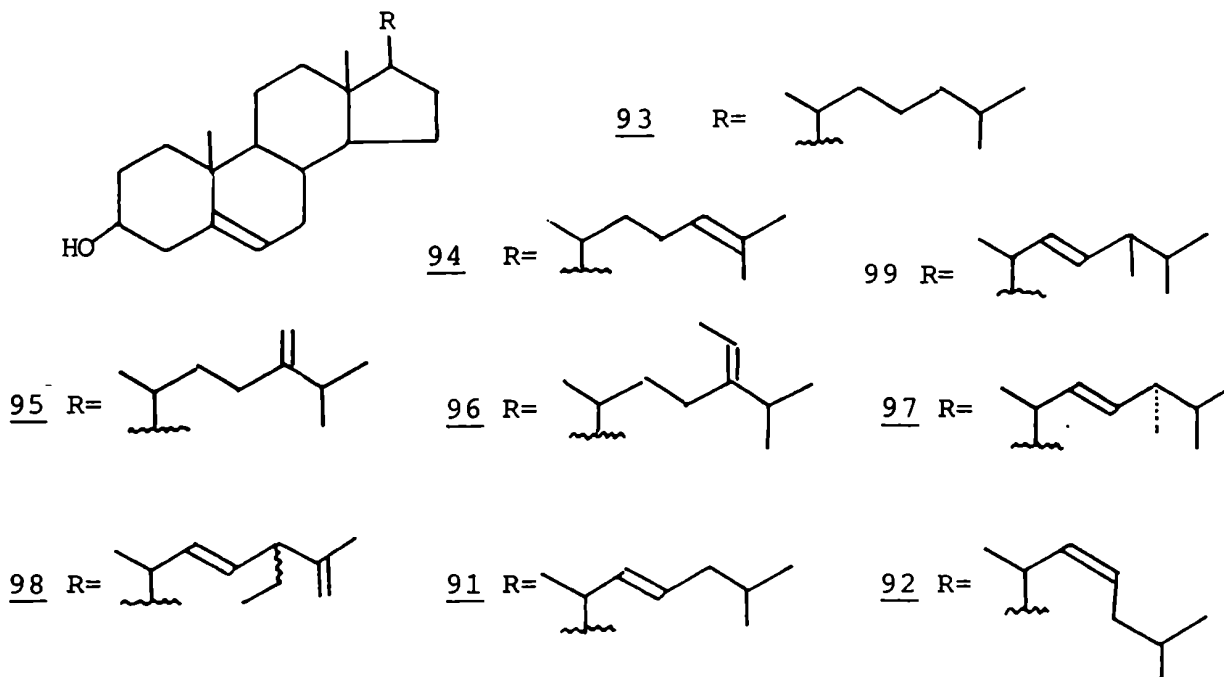
Se realizó un estudio muy útil que permite determinar diferentes configuraciones espaciales de dobles enlaces y cadenas laterales alquílicas de esteroides, utilizando equipos de 90 o 100 MHz y un reactivo de desplazamiento¹¹⁹⁻¹²¹, el tris 1,1,1,2,2,3,3,3-heptafluoro-7,7-dimetiloctano-4,6-dionato de iterbio, $\text{Yb}(\text{fod})_3$ ¹²². Se eligió este reactivo por su mayor capacidad coordinadora con

un sustrato que contenga oxígeno y además por su mayor solubilidad en los solventes usados comúnmente en $^1\text{H-RMN}$, como Cl_3CD .

En presencia de este reactivo los protones de los metilos de los esteroides sufren un corrimiento a campos menores sin que se produzca un notable ensanchamiento de banda, mientras que las constantes de acoplamiento permanecen virtualmente inalteradas. La utilidad de este método queda ilustrada por la comparación de los espectros de, por ejemplo, $\text{cis } \Delta^{22}$ -colesterol 92 con y sin $\text{Yb}(\text{fod})_3$ (Fig. 35) .

Al graficar los desplazamientos químicos de los protones de las metilos versus la relación molar de $\text{Yb}(\text{fod})_3$ agregada a los sustratos, se obtiene una buena linearidad. Mediante estos gráficos puede verificarse la asignación de una determinada señal, en ausencia del reactivo de desplazamiento, haciendo la correspondiente extrapolación.

Se estudiaron los desplazamientos observados en los espectros de Δ^5 -esteroides con cadena lateral saturada de ocho átomos de carbono (93), Δ^{24} - (94), Δ^{24} -metilen- (95), Δ^{22} - (92 y 91) Δ^{24} -etiliden- (96), 24-metil- (85 y 86), 24-etil- (89 y 90), 24-metil- Δ^{22} - (97 y 99), 24-etil- Δ^{22} - (87 y 88) y 24-etil- $\Delta^{22,25(27)}$ -esteroides (98)



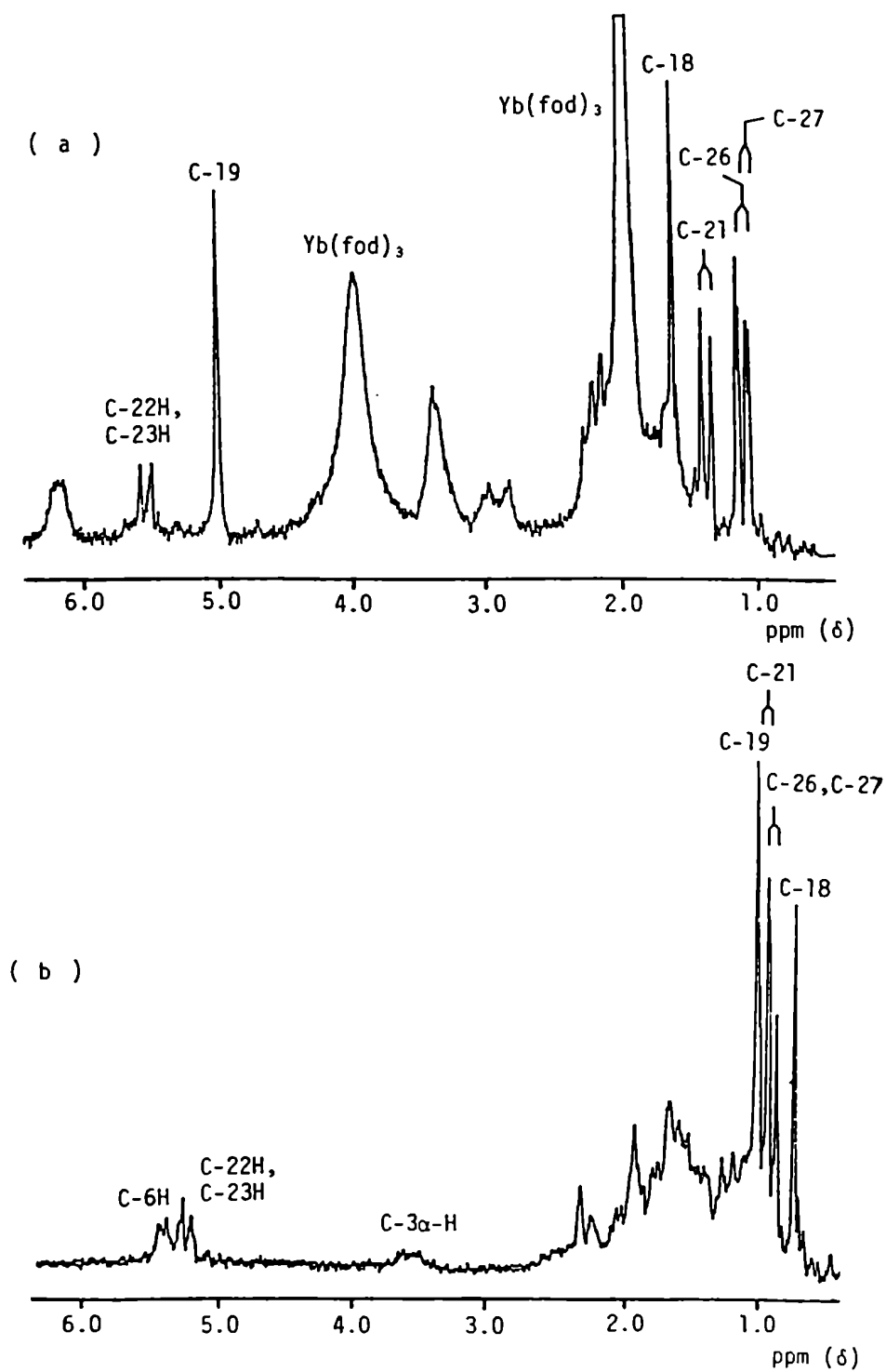


Figura 35: Espectros de ^1H -RMN a 90 MHz de *cis*-22-deshidrocolesterol 92 a) con y b) sin $\text{Yb}(\text{fod})_3$ en Cl_3CD .

En el caso particular de los 24-etil- Δ^5 -esteroles (87-90) como se mencionó anteriormente, la configuración en C-24 no podía ser detectada en los espectros normales a 90 MHz. En presencia de $\text{Yb}(\text{fod})_3$ los metilos de C-26, C-27 y C-29 de estos epímeros sufren un desplazamiento similar, pero la remoción de otras señales de metilenos y metilos producida por este reactivo y que complicaban la zona de los metilos de C-26, C-27 y C-29, permite observar patrones espectrales suficientemente distintos como para poder determinar sin ambigüedades la configuración del C-24. En la figura 36 se muestran las señales que aparecen a mayor campo, de dos pares de 24-etil-epímeros: sitosterol/clionasterol (89/90) y estigmasterol/poriferasterol (87/88)

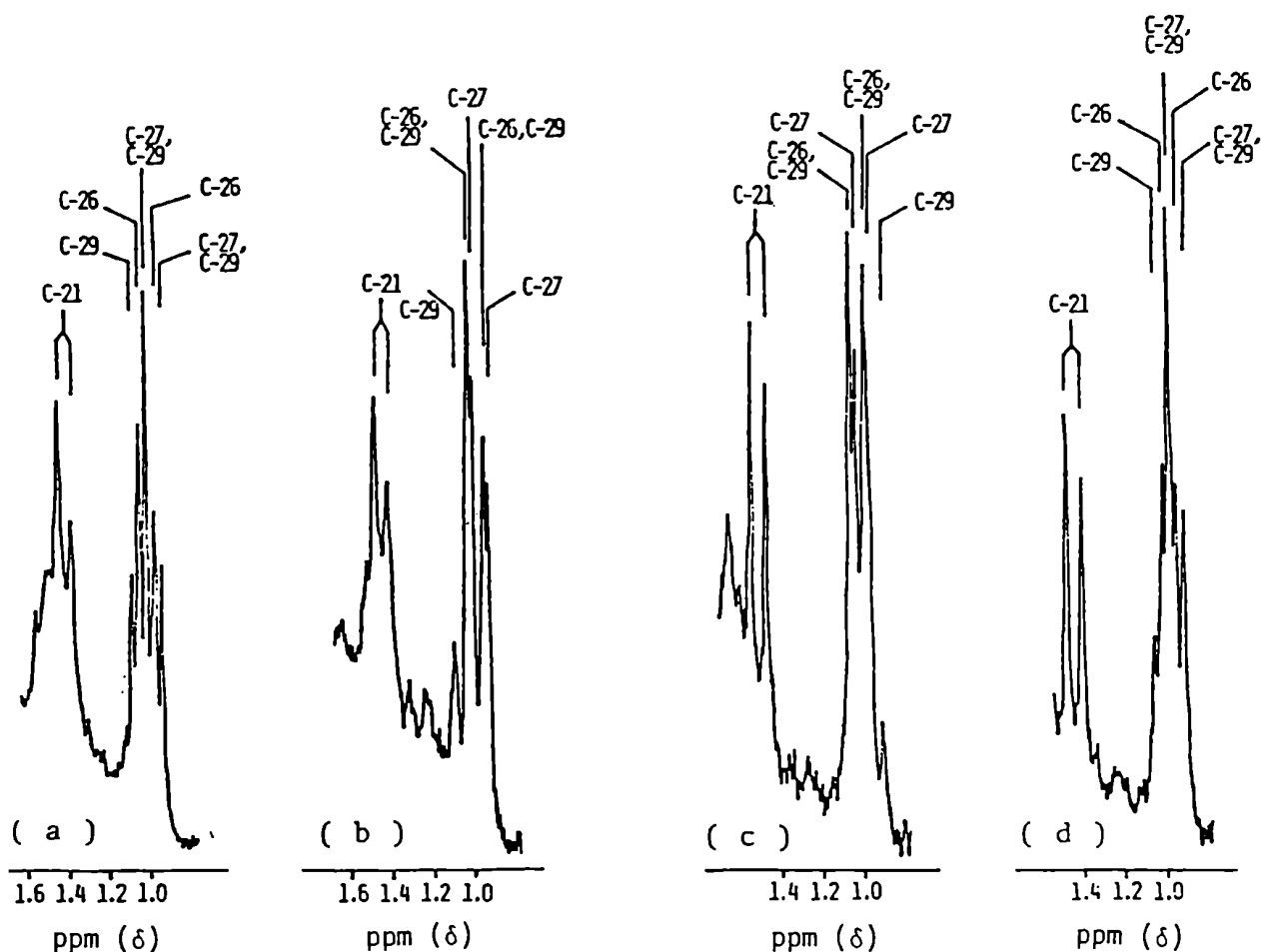


Figura 36: Espectros de ^1H -RMN a 90 MHz con $\text{Yb}(\text{fod})_3$ en Cl_3CD de a) sitosterol 89, b) clionasterol, c) estigmasterol 87 y d) poriferasterol 88.

El problema de distinción de estereoisómeros de esteroides se resolvió recientemente mediante el uso de espectrómetros de 220, 270 y especialmente de 360 MHz con superconductores¹²³⁻¹³¹.

Utilizando esta metodología, se observa en la región de campos altos de los espectros de muchos fitoesteroles un patrón de señales que revela la no-equivalencia de los dos grupos metilos de la unidad isopropilo.

En el caso particular que nos interesa, los 24-etil-esteroides, se observa analizando los correspondientes espectros a 220 MHz la no-equivalencia de los grupos metilos aunque la separación de las señales es menor que en el caso de la serie 24-metil.

De cualquier manera, la mejor señal diagnóstico es el triplete del Me-29 que se encuentra desprotegido en la serie (24-S) en aproximadamente 0,006 ppm, provocando un patrón de señales diferente para las dos series (Fig. 37)¹²⁴. Además, la presencia de sustituyentes en los anillos A y/o B (de los Δ^5 -esteroides) no modifica este resultado.

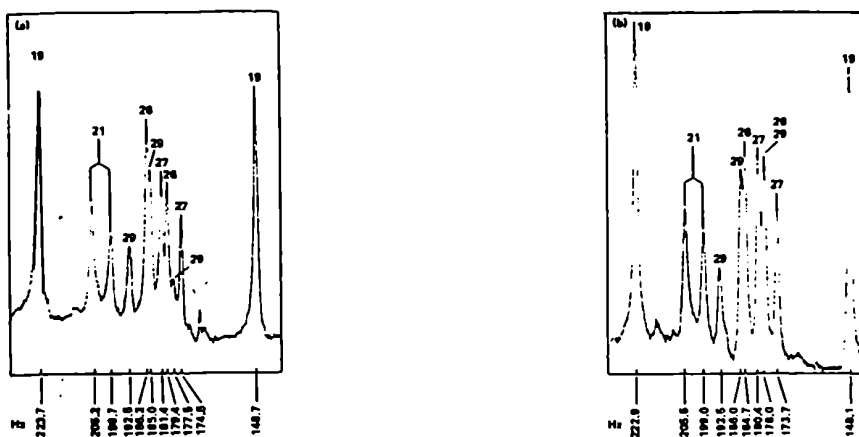


Figura 37: Espectros de ^1H -RMN a 220 MHz de a) acetato de sitosterol (24-R) y b) acetato de clionasterol o 22,23-dihidroporiferasterol (24-S) en Cl_3CD .

Mientras que la existencia de dobles enlaces en los anillos afecta marcadamente al Me-21, el desplazamiento químico de este grupo no se afecta por la estereoquímica de C-24 en los espectros realizados en Cl_3CD . En cambio, si el solvente utilizado es C_6D_6 se produce una diferenciación mayor de las señales de Me-21 y Me-29 entre ambos epímeros. Ambas señales aparecen a campos menores en la serie β (24-S). Se ve así que la utilización de solventes aromáticos da una indicación más clara de la estereoquímica de estos epímeros. En la figura 38 se muestran los espectros de los dos 24-etil-esteranos epímeros realizados en C_6D_6

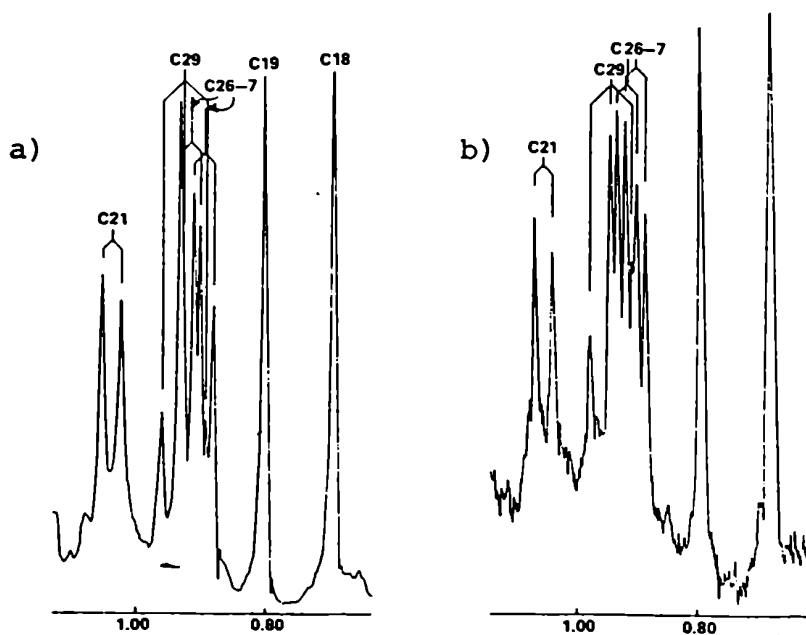


Figura 38: Espectros de ^1H -RMN en C_6D_6 a 220 MHz de a) 5 α -estigmastano y b) 5 α -poriferastano.

La espectroscopía de ^1H -RMN también es una ayuda para la identificación de la o las unidades de hidratos de carbono unidas al estero¹³³l, en especial si el glicósido se encuentra acetilado.

Como se concluye del análisis de las tablas 2 y 3¹³⁴, es posible mediante este método determinar la identidad de por ejemplo la pentopiranos¹³⁴a presente.

Configuración	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-5'
α -D-ribo	4,71(d)	5,03(t)	5,42(t)	5,00(m)	3,95(c)	3,62(o)
β -D-ribo	4,69(d)	4,91(sx)	5,33(t)	5,06(m)	3,97(c)	3,72(c)
α -D-arabino ^a	4,34(d)	5,09(c)	5,03(c)	5,24(o)	4,03(c)	3,63(c)
β -D-arabino	4,91(d)	5,07(o)	5,30(c)	5,27(m)	3,97(c)	3,63(c)
α -D-xilo	4,87(d)	4,79(c)	5,42(t)	4,92(m)	3,77(c)	3,53(t)
β -D-xilo	4,51(d)	4,83(c)	5,17(t)	4,88(sx)	4,06(c)	3,46(c)
α -D-lixo ^b	4,63(d)	5,16(c)	5,22(c)	5,10(sx)	3,85(c)	3,58(c)
β -D-lixo	4,71(d)	5,29(c)	5,08(c)	4,97(o)	4,09(c)	3,43(o)

Tabla 2: Desplazamientos químicos (δ) de los hidrógenos de metil-aldopentopiranosidos peracetilados en acetona-d₆ a 100 MHz y 31°C.

^a En Cl₃CD. ^b Medido a 220 MHz.

Configuración	J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	J _{4,5'}	J _{5,5'}
α -D-ribo	3,3	3,4	3,3	7,7	3,9	11,6
β -D-ribo	4,0	3,6	3,4	3,0	5,2	12,5
α -D-arabino ^a	6,1	9,0	3,7	3,1	1,7	13,1
β -D-arabino	3,2	11,7	3,3	1,3	1,8	13,2
α -D-xilo	3,5	9,3	9,2	5,7	11,1	10,9
β -D-xilo	7,2	8,6	8,6	5,0	9,3	11,7
α -D-lixo ^b	2,2	3,4	9,7	5,1	9,5	11,0
β -D-lixo	2,2	3,2	7,9	3,8	7,1	12,0

Tabla 3: Constantes de acoplamiento (Hz) de los hidrógenos de metil-aldopentopiranosidos peracetilados en acetona-d₆ a 100 MHz y 31°C.

^a En Cl₃CD. ^b Medido a 220 MHz.

Si bien la combinación de los datos de estas tablas permitirían la determinación de este tipo de azúcares, la interpretación del espectro se dificulta debido a la superposición de las señales de los H-2, H-3 y H-4.

Sin embargo, una conclusión importante que puede obtenerse

nerse de este método espectroscópico es si el azúcar está en forma piranósica o furanósica.

Las correspondientes asignaciones de los hidrógenos de las pentosas peracetiladas figuran en las tablas 4 y 5¹³⁴.

Configuración	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-5'
α -D-ribo	6,41	5,24	5,30	4,34	4,15	3,97
β -D-ribo	6,18	5,34	5,36	4,39	4,34	4,15
α -D-arabino	6,21	5,21	5,35	4,50-4,00 (3H)		
β -D-arabino	6,35	5,05 (2H)				
α -D-xilo	6,41	5,30	5,54	4,63	4,26	4,10
β -D-xilo	6,15	5,35	5,40	4,50	4,34	4,21
α -D-lixo	6,28	5,37	5,61	4,59	4,31	4,17
β -D-lixo	6,36	5,29	5,63	4,52	4,34	4,21

Tabla 4: Desplazamientos químicos en $^1\text{H-RMN}$ a 100 MHz (ppm) de las tetraacetil-aldopentopiranosas, en acetona- d_6

Configuración	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-5'
α -D-ribo	6,08 d	5,15 t	5,58 t	5,08 m	4,01 c	3,74 c
β -D-ribo	5,96 d	5,00sp	5,46 t	5,24 m	4,10 c	3,84 c
α -D-arabino	5,73 m	5,28-5,17 m			3,96 m	
β -D-arabino	6,27 d	5,21 o	5,32 m	5,35 m	4,18 c	3,79 c
α -D-xilo	5,71 d	4,99 c	5,46 t	5,01 o	3,90 c	3,70 t
β -D-xilo	5,78 d	4,96 c	5,26 t	4,93 m	4,11 c	3,62 c
α -D-lixo	5,95 d	5,19 t	5,21 c	5,12sx	3,96 c	3,71 c
β -D-lixo	6,06 t	6,32-6,22m		4,99 m	4,18 c	3,62sx

Tabla 5: Desplazamientos químicos en $^1\text{H-RMN}$ a 100 MHz (ppm) de las tetraacetil-aldopentopiranosas, en acetona- d_6 .

Del análisis de las tablas 4 y 5 puede concluirse que los desplazamientos químicos de los H-1, H-4, H-5 y H-5' permiten diferenciar entre ambos ciclos. La comparación es válida ya que en Cl_3CD y acetona- d_6 los espectros son casi coincidentes.

Estos resultados se resumen en la tabla 6.

Pentosas	H-1	H-4	H-5	H-5'
peracetiladas				
furanosas	6,15-6,41	4,34-4,63	4,15-4,34	3,97,4,21
piranosas	5,71-6,27	4,93-5,35	3,90-4,18	3,62-3,84

Tabla 6: Rango (ppm) en el que aparecen las señales de los hidrógenos 1, 4, 5 y 5' de las pentofuranosas y pentopiranosas peracetiladas.

Para los metil glicósidos de pentosas acetiladas es de esperar aproximadamente la misma relación de δ para H-4, H-5 y H-5' de las formas piranósicas y furanósicas. Sin embargo, para el caso del H-1 se prevee que el campo al que aparezca en ambas formas sea de 1,3 ppm menor debido a la distinta sustitución.

Aunque no se encontraron en literatura los datos necesarios para hacer la correspondiente interrelación para el caso de los derivados de hexosas piranósicas y furanósicas, cabe esperar debido a las variaciones estructurales de ambos tipos de compuestos, relaciones de desplazamientos químicos similares al caso de las pentosas.

Elucidación estructural de glicósidos de esteroides mediante espectroscopía de ^{13}C -RMN

La espectroscopía de ^{13}C -RMN es la técnica que mayor información brinda respecto a la estructura de estos glicósidos.

La aglicona, es decir los esteroides, fueron analizados por este método ya hace mucho tiempo. Las asignaciones originales de las señales de colesterol fueron realizadas por Reich y col.¹³⁵

En posteriores trabajos algunas de estas señales debieron ser intercambiadas^{136,137}, hasta que finalmente las asignaciones fueron confirmadas por un interesante estudio realizado por

Popják y col.¹³⁸ sobre la biosíntesis de colesterol utilizando mevalonato marcado simple y doblemente con ^{13}C . Estos autores estuvieron en condiciones de establecer por primera vez que el C-27 del metilo pro-(S) proveniente del C-3' de mevalonato resonaba a campos menores que el C-26 del metilo pro-(R), que es originado por el C-2 de mevalonato. De esta forma, las señales de los demás esteroides que poseen el esqueleto del colesterol pudieron ser asignadas fácilmente tanto en sus espectros con desacople de banda ancha de ^1H , con desacople off-resonance y en los espectros de alta resolución¹³⁹⁻¹⁴¹.

Para los esteroides con cadena lateral sustituida y saturada, las asignaciones de las señales de la misma fue realizada¹¹³ por comparación directa con datos publicados sobre alcanos modelos¹⁴², combinados con cálculos en base a parámetros aditivos de los desplazamientos químicos¹⁴³.

Una característica que diferencia los isómeros 24-S y 24-R de los esteroides es el campo al que aparecen los C-20 y C-24. En la serie 24-R estos carbonos producen señales a campos mayores que los respectivos isómeros 24-S. Además, en la serie 24-S el C-26, pro-(R), aparece a δ menores que el C-27, mientras que los isómeros 24-R presentan la relación inversa de desplazamientos. También se observan diferencias en ambas series, de las señales provenientes de los C-17, C-21 y C-23.

Estos desplazamientos no dependen en general de variaciones en los anillos esteroidales. Así es como a pesar de las diferencias estructurales entre los esqueletos de colesterol⁹³ y cicloartenol¹⁰⁰ puede asignarse configuración S al C-24 de cicloartenol¹⁰⁰¹⁴⁶ a partir de los datos del correspondiente 24-metil colesterol.

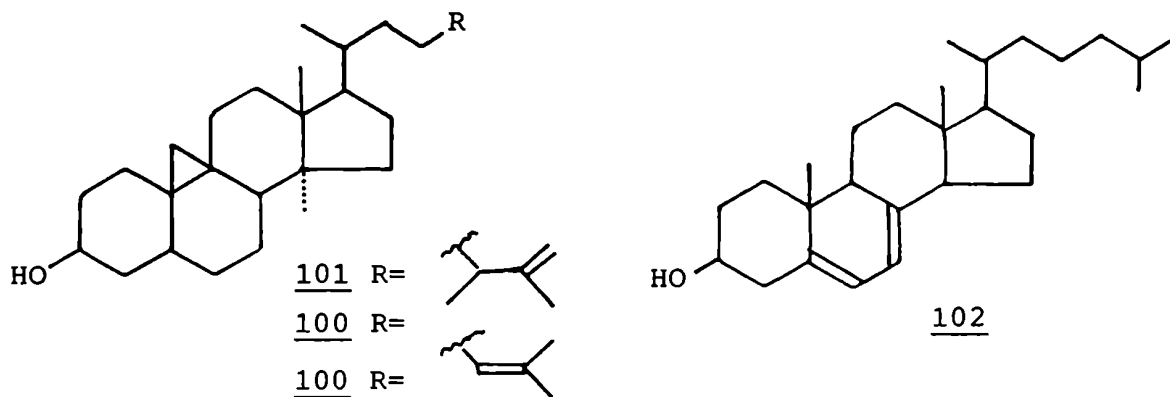
Mayor discusión sobre el tema se encuentra en el Capítulo IV, pág. 107.

No sólo se han estudiado los espectros de los esteroides con sustituyentes alquílicos en C-24, sino también aquéllos sustituidos por hidroxilos. Se analizaron por ejemplo, los pares epiméricos 24-hidroxi-, 24,25-dihidroxi- y 1,24-dihidroxi-colestere

rol, ya que fue demostrada la importancia biológica de la estereoquímica de C-24 de estos compuestos, siendo los isómeros R más activos que los correspondientes S^{144,145}. Este método espectroscópico resultó también de utilidad para la determinación de la configuración de C-22 en colesteroles sustituidos en dicha posición¹⁴⁷.

La asignación de las señales de una cadena lateral insaturada fue llevada a cabo recientemente, para el caso del ergosterol 102, por Cushley y col.¹¹³. Este estudio permite determinar el origen⁴ de las señales de compuestos relacionados como (22E, 24R)- y (22E,24S)-24-metil colest-5,22-dien-3- β -ol 97 y 99, aunque las señales de los C-21, C-26 y C-27 permanecían aún inciertas. Las dos últimas fueron asignadas por comparación con los datos de E- y Z-5-metilhex-22-eno.

La resonancia del C-21 resulta insensible a la estereoquímica del doble enlace Δ^{22} , pero los datos espectrales de demosterol 94 demuestran que es afectada por la posición del mismo.



La espectroscopía de ¹³C-RMN es un método útil para analizar la composición de mezclas de los epímeros de C-24. Como los tiempos de relajación spin-red correspondientes a los carbonos de las cadenas laterales de ambos isómeros deben ser muy similares, la composición puede obtenerse de las intensidades relativas de las señales respectivas. Por ejemplo, la mezcla de esteroides proveniente de soja contiene 34% de 22,23-dihidrobrasicasterol 86 y 66% del 24 R-metil-colesterol.

La espectroscopía de ^{13}C -RMN también es una herramienta clave para el conocimiento estructural del azúcar del glicósido.

Breitmaier y col.¹⁴⁸ demostraron que el reemplazo en C-1 de un grupo hidroxilo por un metoxilo provoca un desplazamiento de 7-10 ppm a campos más bajos, siendo el mismo para anillos furanósicos como piranósicos.

El pasaje de una pentopiranososa peracetilada al correspondiente metil-glicósido genera un desplazamiento de magnitud similar y en igual sentido que el anterior¹⁴⁹. Si se supone un corrimiento análogo para los anillos furanósicos, pueden entonces compararse y sacar conclusiones sobre los valores de δ de los correspondientes derivados peracetilados ya que de éstos se poseen todos los datos necesarios (Tablas 7 y 8)^{149,202}.

Configuración	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
α -D-xilo	88,94	69,20	69,20	68,84	60,52
β -D-xilo	91,72	69,33	70,75	68,10	62,53
α -D-arabino	92,16	68,24	69,86	67,26	63,82
β -D-arabino	90,40	67,25	68,70	66,94	62,85
α -D-lixo	90,66	68,24	68,24	66,55	61,94
β -D-lixo	90,0	-	-	-	-
α -D-ribo	88,71	67,14	65,58	66,49	59,27
β -D-ribo	90,68	67,13	66,03	66,03	62,45

Tabla 7: Desplazamientos químicos en ^{13}C -RMN a 22,6 MHz (ppm) de tetraacetil-aldopentopiranosas.

Configuración	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
α -D-xilo	92,81	75,25	73,84	75,40	61,59
β -D-xilo	98,85	79,44	74,27	79,88	62,33
α -D-arabino	99,37	80,60	76,88	82,44	63,05
β -D-arabino	93,72	75,38	74,82	79,72	64,53
α -D-lixo	98,04	75,01	70,57	77,01	62,43
β -D-lixo	93,20	70,52	68,52	77,74	62,77

Continuación de la tabla 8:

Configuración	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
α -D-ribo	94,07	69,98	69,78	81,64	63,30
β -D-ribo	98,12	74,08	70,47	79,20	63,60

Tabla 8: Desplazamientos químicos en ^{13}C -RMN a 25,2MHz (ppm) de tetraacetil-aldopentofuranosas.

Del análisis de las tablas 7 y 8 se infiere que puede determinarse a primera vista si la pentosa es piranósica o furanósica, ya que la presencia de una señal por encima de 71 ppm (excluida la de C-1) permite desechar la primera posibilidad.

Un hecho que facilita mucho, además, la determinación del tamaño del ciclo es que las zonas en las que aparecen las señales de los C-1, C-2 y C-4 de ambas formas son excluyentes. Esto se resume en la tabla 9.

Pentosas

peracetiladas	C-1	C-2	C-4
piranosas	88,71-92,16	67,13-69,20	66,03-68,84
furanosas	92,81-99,37	69,98-80,60	75,40-82,44

Tabla 9: Rango en que aparecen las señales de los C-1, C-2 y C-4 en las pentopiranosas y pentofuranosas peracetiladas

Aunque no se puede hacer un análisis tan exhaustivo para las hexosas, se pueden comparar los valores correspondientes para los metil glicósidos de α - y β -galactofuranosa y galactopiranosas (Tabla 10), que son los únicos encontrados de la serie furanósica¹⁵⁰.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Me- α -D-galactopiranósido	100,5	69,4	70,6	70,4	71,8	62,3
Me- β -D-galactopiranósido	104,9	71,8	73,9	69,8	76,2	62,1
Me- α -D-galactofuranósido	103,1	77,4	75,5	82,3	73,7	63,4
Me- β -D-galactofuranósido	109,2	81,9	77,8	84,0	72,0	63,9

Tabla 10: Desplazamientos químicos en ^{13}C -RMN a 25,2 MHz (ppm) de los metil-galactósidos

Como puede observarse, las señales de los C-2 y C-4 difieren suficientemente como para poder predecir una generalización análoga a la de las pentosas.

Estos mismos autores¹⁵⁰ encontraron que el reemplazo del grupo hidroximetilo (CH_2OH) por hidrógeno, en el caso de las series galacto/arabino, manteniendo la misma configuración de los restantes sustituyentes produce un corrimiento a campos mayores de la señal de C-5 y a campos menores de la de C-4, pero no afecta los desplazamientos químicos de los demás carbonos (Tabla 11).

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Me- α -D-arabinofuranósido	109,3	81,9	77,5	84,9	62,4
Me- α -D-arabinofuranósido -					
Me- β -D-galactofuranósido	+0,1	0	-0,3	+0,9	-9,6
Me- β -D-arabinofuranósido	103,2	77,5	75,7	83,1	64,2
Me- β -D-arabinofuranósido -					
Me- α -D-galactofuranósido	+0,1	+0,1	+0,2	+0,8	-9,5

Tabla 11: Desplazamientos químicos en ^{13}C -RMN de los metil-arabinofuranósidos y diferencias de los mismos respecto de los metil-galactofuranósidos respectivos.

La similitud de los parámetros aditivos que dan cuenta de este cambio funcional, tanto para los anómeros α como β , permitirían predecir su aplicabilidad para las restantes series.

Utilidad de la CGL en la elucidación estructural de glicósidos de esteroides

Una vez realizada la hidrólisis ácida del glicósido, es posible analizar por separado el azúcar y la correspondiente glicona.

Desde hace mucho tiempo se demostró que la CGL era una herramienta importante para la separación y purificación de esteroides¹⁵¹. En un estudio posterior se pudieron diferenciar noventa

ta y dos esteroides, excepto los pares de epímeros de C-24¹⁵².

La posibilidad de separar diastereoisómeros de tocoferol¹⁵² por CGL con columna capilar sugirió a Thompson y col.¹⁵⁴ la idea de aplicar esta técnica a los epímeros de esteroides. Para ello, se analizaron¹⁵⁴ nueve pares de epímeros de C-24 de esteroides trimetilsililados utilizando una columna capilar SP-2340 de 115 m de longitud y 0,25 mm de diámetro. El desarrollo del cromatograma fue isotérmico a 185 o 195 °C.

Se observó que los epímeros 24 β que tenían cadena lateral saturada se eluían antes que los esteroides 24 α, mientras que ese orden se invertía cuando la cadena lateral presentaba una insaturación en C-22.

Anteriormente se intentó con éxito la separación de epímeros de C-24 de 5 α-colestanos y acetatos de 5α-colestanol¹⁵⁵ utilizando una columna capilar DEGS:PEGS, 75:25, de 100 m de longitud y 0,24 mm de diámetro. La programación de temperatura fue de 40-160 °C con una velocidad de calentamiento de 4°C/min..

El inconveniente que presentaba este método era el tiempo necesario para obtener la separación ya que en el caso de los esteroides era de aproximadamente tres horas, mientras que para los acetatos éste era superior a ocho horas.

CAPITULO III
ACCION HIPOGLUCEMIANTE

ACCION HIPOGLUCEMIANTE

Debido a que *Bauhinia candicans* es una planta ampliamente usada con fines homeopáticos contra la diabetes, resulta interesante analizar las generalidades de esta enfermedad así como los agentes hipoglucemiantes utilizados para contrarrestarla.

La concentración normal de azúcar sanguíneo determinada con los métodos más modernos varía entre 79 y 100 mg por 100 ml. Cifras de 120 a 130 mg son ya sospechosas, y por encima de 150 mg deben considerarse ciertamente patológicas, es decir, existe hiperglicemia o diabetes.

En seres normales, la hiperglicemia se encuentra contrarrestada mediante el aumento de la combustión muscular y de la glucogenogénesis hepática y muscular.

Sin embargo, existen trastornos importantes del metabolismo de los hidratos de carbono, como es el caso de la diabetes mellitus. Esta es una alteración del metabolismo en la cual la velocidad máxima de combustión de hidratos de carbono está por debajo de la normal, a la vez que se ha perdido, en menor grado, la facultad de almacenar glucógeno. Clínicamente se caracteriza por hiperglicemia, glucosuria, polidipsia, poliuria, adelgazamiento y acidosis que evoluciona hacia el coma. La glucemia que en los casos leves llega a ser de 150 a 250 mg/100ml, alcanza en los casos más graves hasta 300 a 500 mg/ml.

Esta patología es debida a una producción insuficiente de la hormona insulina, segregada por el páncreas ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Medicamentos utilizados contra la diabetes

Para el tratamiento de esta enfermedad existen tres grupos principales de medicamentos:

A) Insulina

B) Sulfonilureas

C) Biguanidinas

A) La insulina está compuesta por dos péptidos: A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos). Ambas cadenas están unidas entre sí por dos puentes disulfuro, existiendo además en la cadena A un puente sulfuro adicional. Aunque se desconoce el mecanismo molecular de acción de la insulina, se sabe cuáles son los cambios metabólicos que produce en los tejidos. En las células musculares y grasas favorece la entrada de glucosa y en las hepáticas y musculares activa la transformación de glucosa en glucógeno.

La administración de este medicamento responde evidentemente a una terapia de sustitución, teniendo el inconveniente de no poder ser administrada por vía oral ya que por ser un péptido quedaría inactivado por las enzimas digestivas.

B) En la búsqueda de hipoglucemiantes administrables por vía oral y basándose en observaciones de Janbon y col. (1942) se lograron sintetizar una serie de sulfonilureas que demostraron ser hipoglucemiantes usables clínicamente (Fig. 39) ¹⁶⁰.

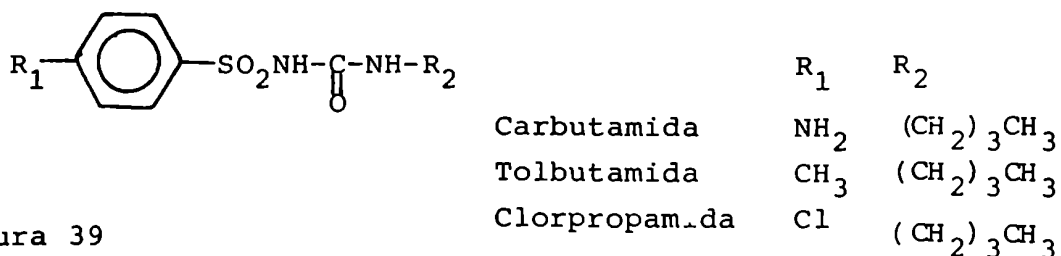
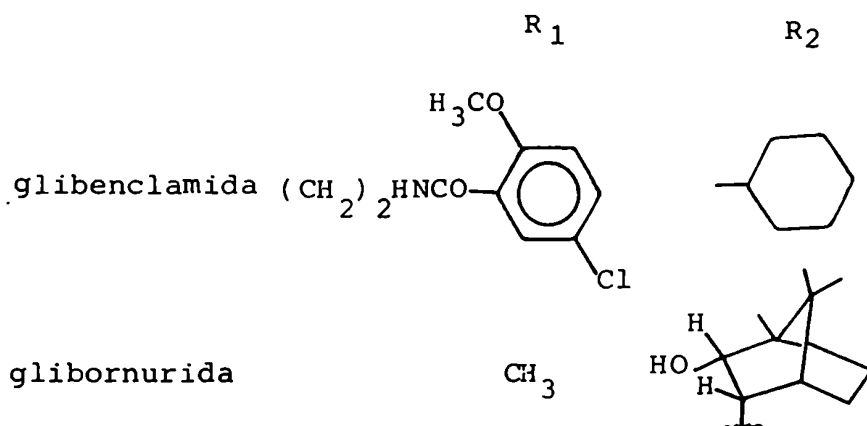


Figura 39



El grupo arilo presente en estas sulfonilureas aumenta la potencia de dichos compuestos. El grupo amino de la carbutamida le confiere propiedades antibacterianas y cierta toxicidad. El cambio de ese grupo amino por un metilo (tolbutamida) hace perder esa acción antibacteriana y disminuye la toxicidad de la droga, pero también disminuye su potencia hipoglucemiante¹⁶¹.

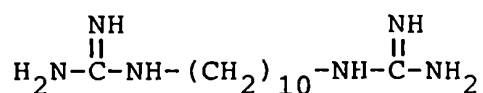
El efecto inverso sobre la potencia, lo produce el cambio del grupo metilo por un cloro (clorpropamida), aumentando también la duración de su acción.

En estas sulfonilureas existe además una cadena alifática sustituyendo un hidrógeno de la urea. Esta sustitución confiere potencia a las drogas hipoglucemiantes siempre que dicha cadena tenga como mínimo tres átomos de carbono.

La administración de sulfonilureas puede realizarse por vía oral o intravenosa. La caída de la glucemia depende de la dosis pero nunca es muy intensa, siendo mucho menos potentes que la insulina.

Un rasgo importante de las sulfonilureas es que necesitan la presencia de insulina en el organismo para que produzcan sus efectos, siendo ineficaces en los animales y sujetos pancreatectomizados. En cuanto al modo de acción, se acepta que actúan estimulando la secreción de insulina, ya que estas drogas no actúan en ausencia de páncreas.

C) En 1918, Watanake¹⁶² observó que la guanidina disminuía la glucosa en sangre de animales. Como era muy tóxica se comenzó el desarrollo sintético de compuestos análogos con posible actividad terapéutica. Estos estudios condujeron a la decametilendiguandina que se introdujo clínicamente en 1926.



Decametilendiguandina

Posteriormente se descubrió que su acción antidiabética se basaba en producir una lesión hepática.

Las biguanidinas más utilizadas¹⁶³ en la actualidad son la fenetilbiguanidina (fenformina) y butilbiguanidina (buformina). La fenformina es la más potente de todas las drogas hipoglucemiantes sintéticas.

Las biguanidinas producen descenso de la glucemia en los animales y sujetos sin páncreas, pero no se ha demostrado que puedan mantenerse durante un lapso prolongado sin insulina. A diferencia de las sulfonilureas la fenformina actúa también en la diabetes juvenil grave (sin actividad insulínica demostrable en el plasma), pero en este caso la droga debe emplearse siempre con insulina.

El modo de acción de estas drogas se atribuye a:
 1°) producción de anoxia tisular con aumento de glucólisis anaeróbica y aumento de la captación de glucosa por el músculo
 2°) producción de inhibición de los antagonistas de insulina en el plasma.

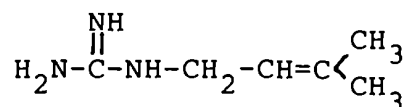
Compuestos hipoglucemiantes de origen natural

Desde hace mucho tiempo pareció ser una buena posibilidad para lograr drogas hipoglucemiantes la búsqueda de modelos en el Reino Vegetal¹⁵⁹.

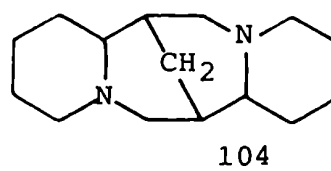
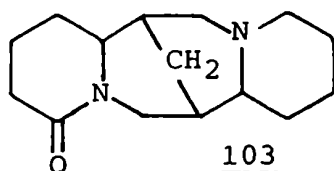
Parece ser que la semilla de *Galega officinalis* fue la primera droga de origen vegetal reconocida como hipoglucemiante¹⁶⁴. Collip en 1921, inicia el estudio científico de la actividad hipoglucemiante de plantas, preparando extractos por distintas técnicas¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

Se separaron principios activos que modificaban la curva de hipoglucemia provocada en el conejo, de la corteza de *Coutarea latiflora*¹⁶⁸ y *Vinca rosea*. El proveniente de esta última especie se cree que ejerce su acción sobre los centros nerviosos de la glucorregulación.

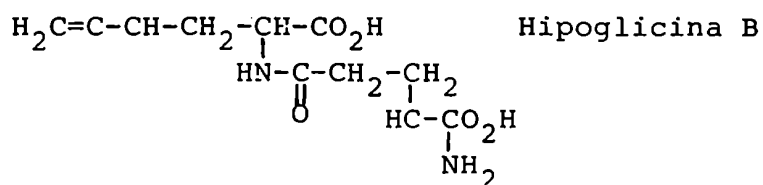
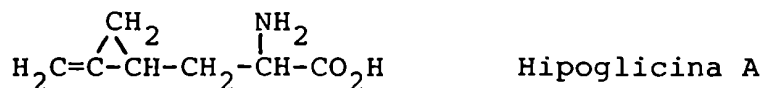
Un alcaloide como la galeguina extraída de *Galega officinalis*¹⁶⁹ baja la glucemia en el diabético, administrada en dosis de 2 mg/kg de peso. Barger y White¹⁶⁹ determinaron su estructura que resultó ser la siguiente:



Otros alcaloides como la lupanina 103 y la lupinidina 104 (esparteína) extraídos de *Lupinus albus* y *Lupinus termis* ejercen un efecto significativo hipoglucemiante en ratas diabéticas 170-172



Blighia sapida debe su actividad a aminoácidos y es uno de los vegetales de mayor acción hipoglucemiante. La ingesta del fruto inmaduro provoca la llamada "enfermedad del vómito"¹⁷³, consecuencia de la intensa hipoglucemia que ocasiona. En la semilla inmadura se aislaron¹⁷⁴ un aminoácido y un dipéptido responsables de este trastorno. Renner, Johl y Stoll^{175,176} determinaron las estructuras de los mismos que resultaron ser:



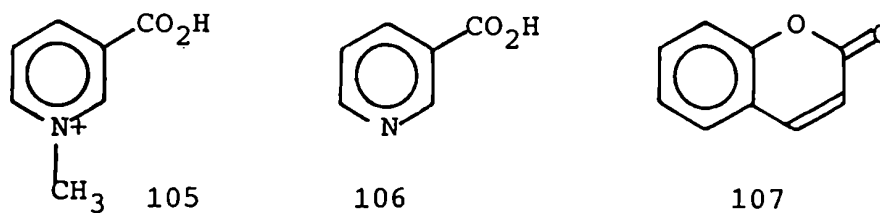
Hugh Jones¹⁷³ interpreta que su influencia se ejerce

por inhibición de sistemas enzimáticos que intervienen en el metabolismo de los glúcidos.

Se encontraron también aminoácidos en una fracción activa de *Lagerstroemia flos-reginae*¹⁷⁷ que fueron identificados como alanina, isoleucina, metionina y ácido α -aminobutírico.

Otra leguminosa muy estudiada por su reconocida acción hipoglucémica y además antipelagra es *Trigonella foenum*. El mismo efecto suavemente hipoglicémico que ejercen sus semillas lo produce su alcaloide mayoritario trigonelina 105=XVI

Otros componentes de esta planta son el ácido nicotínico 106 y cumarina 107. El primero de éstos tiene una actividad mucho más potente aunque su efecto persiste por un período muy corto, mientras que la cumarina es aún más potente y su acción se prolonga durante veinticuatro horas pero su toxicidad es elevada.



Existen muchas otras plantas conocidas por su actividad hipoglucemiante como *Poligonatum officinale*, *Vaccinium myrtillus*⁵¹ y *Syzugium jambolanum* o *Eugenia jambolana*¹⁷⁸. Es de notar que muchas de las especies a las que se les adjudica esta acción pertenecen a la familia *Leguminosae*, como por ejemplo las anteriormente mencionadas *Trigonella foenum*, *Lupinus termis* y *L. alba*, *Galega officinales* y además *Medicago sativa*⁵¹, *Acacia milanoxylon* y *Leucaena leucocephala*¹⁷⁹.

Entre las Leguminosas el género *Bauhinia*, no muy estudiado químicamente, incluye por lo menos tres especies a las que se le adjudican propiedades hipoglucemiantes: *Bauhinia retusa*, *B. forficata* y *B. candicans*. Como se mencionó anteriormente sólo se estudiaron algunos flavonoides de la primera especie mientras que de las otras dos no existen datos químicos previos a este trabajo.

Los estudios farmacológicos realizados con las pro -

teinas aisladas de semillas de *B. retusa* en ratones normales provocó un descenso en la concentración de azúcar en sangre de 29,9% y de colesterol de 29,5%. Las mismas experiencias realizadas con ratas diabéticas alloxánicas demostraron ejercer una hipoglucemia e hipocolesterolemia respecto de los niveles de los controles¹⁸⁰.

Para el caso de *B. forficata* se confirmó mediante experimentos con perros, que tanto las infusiones, decocciones o extractos fluídos de sus hojas ejercían una acción favorable sobre el azúcar en sangre⁴⁸.

El primer estudio que se conoce sobre la actividad de *B. candicans* fue realizado por Gallo en 1941⁴⁹, el resultado del mismo indicó que la ingestión por vía oral de extractos de esta especie no tiene acción hipoglucemiante sobre el perro normal, con hiperglicemia provocada, ni sobre perros diabéticos o con diabetes por pancreatectomía total. Posteriormente se realizó otro análisis con conejo normales o con hiperglucemia por ingestión de glucosa, utilizando extractos de hojas o bien directamente hojas molidas⁵¹. En estas condiciones tampoco se observó disminución del nivel de azúcar en sangre.

Debido a que las especies *B. forficata* y *B. candicans* están muy relacionadas botánicamente, a la gran difusión popular y en medicina homeopática de las infusiones de estas plantas, se consideró oportuno realizar un estudio químico de la especie *B. candicans* y complementariamente hacer un nuevo estudio farmacológico para ratificar o rectificar los resultados hasta ahora obtenidos.

CAPITULO IV
DISCUSION DE LOS RESULTADOS
OBTENIDOS EN ESTA TESIS

DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

ESTUDIO QUIMICO DE BAUHINIA CANDICANS BENTH.

Tratamiento del material vegetal

Las hojas y ramas de la especie *Bauhinia candicans* fueron secadas y molidas y posteriormente extraídas con éter de petróleo, tareas realizadas como se detalla en la parte experimental.

Al concentrar el extracto resultante se observó la separación de un sólido que se aisló por filtración (precipitado de éter de petróleo). Por evaporación del filtrado se obtuvo el extracto de éter de petróleo.

Una vez seco el residuo vegetal obtenido en el paso anterior, se re-extrajo con etanol y por evaporación del solvente se obtuvo el extracto etanólico.

Las flores frescas de esta misma especie vegetal fueron trituradas y simultáneamente extraídas con etanol en licuadora. Por evaporación del solvente se obtuvo el extracto etanólico de flores.

A partir de estas cuatro fracciones primarias se aislaron e identificaron los compuestos detallados a continuación. El proceso separativo utilizado para el aislamiento de cada uno de éstos está indicado en la parte experimental.

Análisis del precipitado de éter de petróleo

Triacotanol I

Luego de sucesivas cromatografías en columna de sílicagel de la fracción dos de la columna del precipitado de éter de petróleo, y de recristalizar de Cl_3CH -acetona, se obtuvo un sólido

do que por c.c.d. de sílicagel daba una sola mancha en varios sistemas de solventes y revelaba rosa con $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{c})$. $R_f = 0,57$ (Cl_2CH_2) $R_f = 0,45$ (Cl_2CH_2 : E.P.; 3:2).

El análisis por CGL (OV-17 3%, 1,8 m; 240°C, isot.) reveló que la pureza era del 95,37%; t_R : 12,77 min..

El espectro IR presentaba absorciones en la zona correspondiente a tensión O-H (3200 cm^{-1}), deformación O-H y estiramiento C-O (1070 y 1460 cm^{-1}), además de las absorciones características de una cadena hidrocarbonada. Estas observaciones predicaban evidentemente que se trataba de un alcohol.

El espectro de ^1H -RMN (Fig.40) mostró un singulete ancho deformado a 0,85 ppm que integraba para tres hidrógenos, señal característica de un metilo terminal de una cadena hidrocarbonada, un singulete a 1,28 ppm correspondiente a los hidrógenos metilénicos y un multiplete a 3,62 ppm que integraba para dos hidrógenos asignable a los hidrógenos metilénicos de C-1 de un alcohol primario.

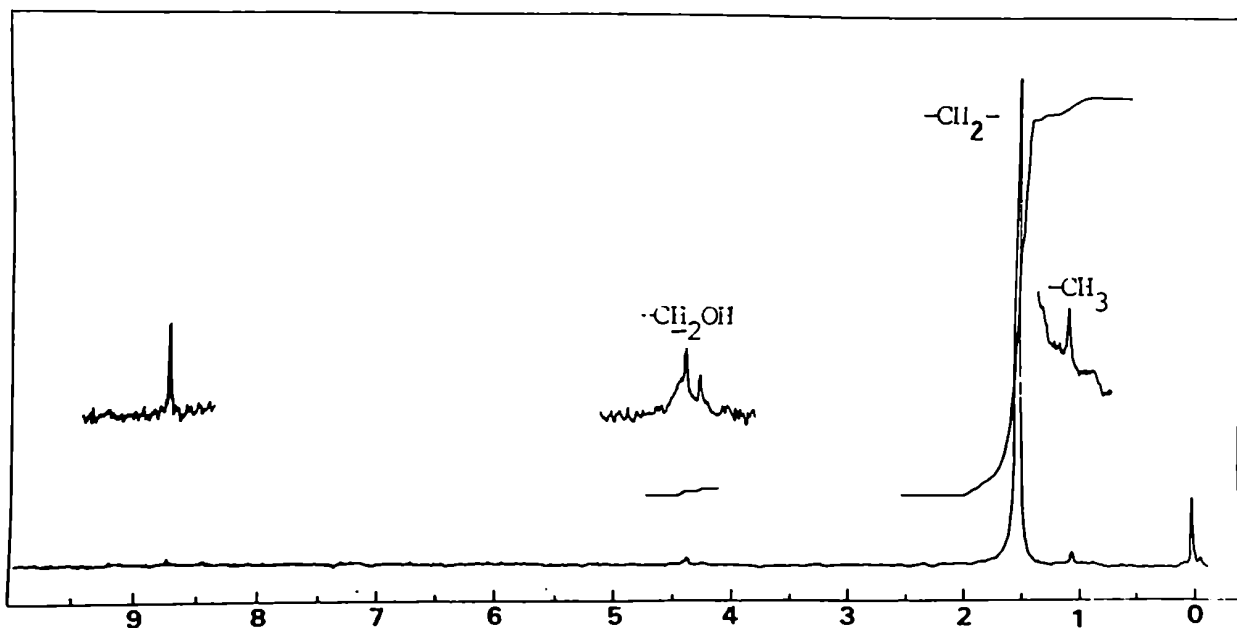


Figura 40

El análisis de los resultados obtenidos por CGL-EM permitió determinar que se trataba de un alcohol lineal de treinta átomos de carbono (triacontanol I) ya que la señal del fragmento de mayor masa correspondía a m/e 420 atribuible al ión molecular deshidratado (438-18) (Fig.41).

Finalmente se verificaron estas conclusiones mediante la comparación contra testigos por CGL

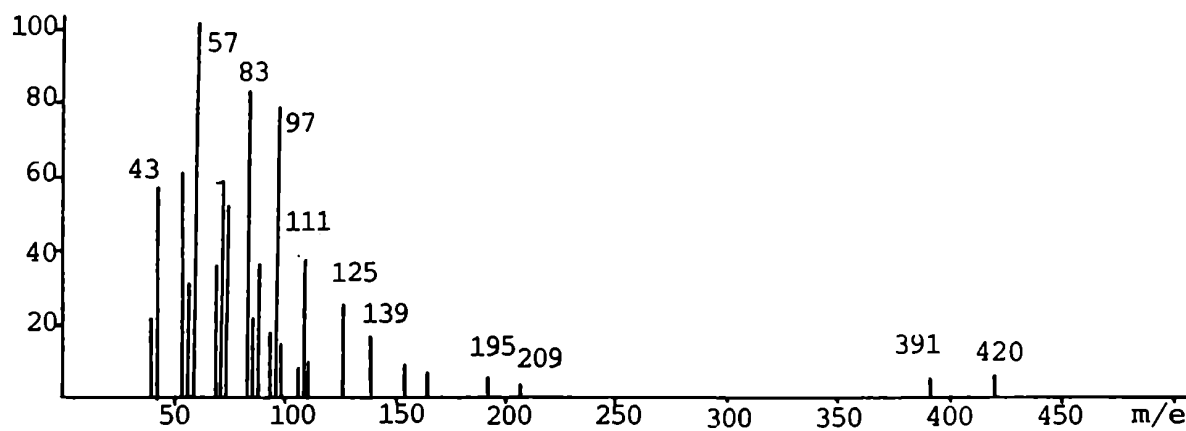


Figura 41

Alcoholes lineales

Se estudió también la fracción donde se encontraba el triacontanol sin las posteriores purificaciones.

El análisis del cromatograma obtenido por CGL en condiciones isotérmicas (Fig.42) mostró la existencia de una serie homóloga, cuyos componentes fueron caracterizados mediante testigos y graficando el logaritmo del tiempo de retención ($\ln t_r$) en función del número de átomos de carbono del alcohol.

Los parámetros calculados por cuadrados mínimos correspondientes a dicha recta son los siguientes:

ordenada al origen: -6,166

pendiente: 0,2968

coeficiente de correlación: 0,967

En la tabla 12 se dan los valores de los tiempos de retención observados (t_r), los $\ln t_r$ y el porcentaje de cada uno de los alcoholes presentes.

Tabla 12

	n-C ₂₆	n-C ₂₇	n-C ₂₈	n-C ₂₉	n-C ₃₀	n-C ₃₁
t_r	5,15	6,54	8,07	10,29	12,91	16,12
$\ln t_r$	1,639	1,878	2,088	2,331	2,558	2,780
%	1,56	0,30	6,59	3,37	87,91	0,27

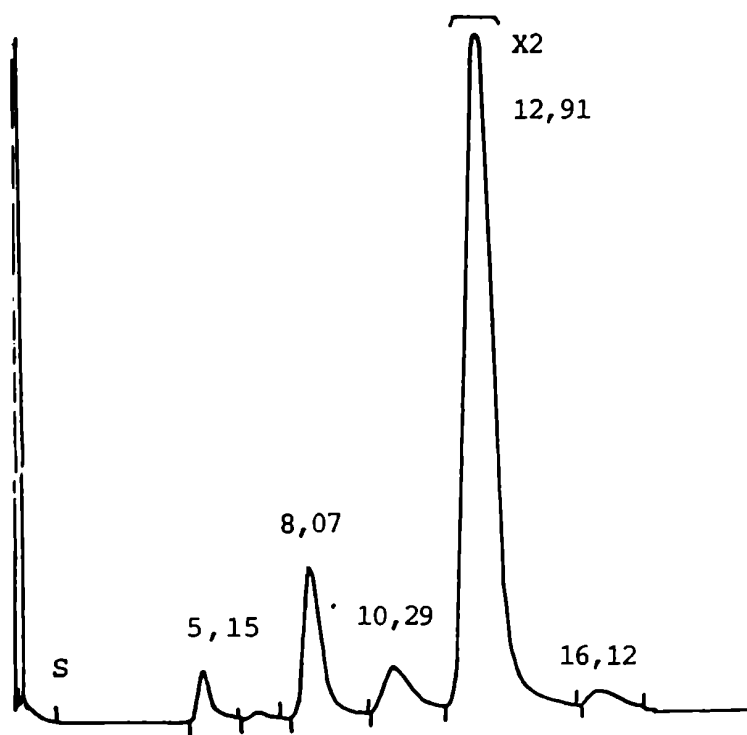


Figura 42

Esteroides

De la fracción tres de la columna del precipitado de éter de petróleo, se obtuvo mediante cromatografía a presión, utilizando como solventes de elución Cl_3CH con gradientes de metanol y

posterior recristalización de metanol, una fracción que daba positivo la reacción de Liebermann-Burchardt.

El análisis mediante CGL (SE-30, 3%; 1,8 m; 270°C, isot.) (Fig.43) reveló la existencia de una mezcla. Utilizando una columna capilar (SP-2100, diám. 0,2 mm y longitud 15 m) (Fig.44) para esta misma mezcla, se puede apreciar la variación del poder resolutivo de estos dos métodos.

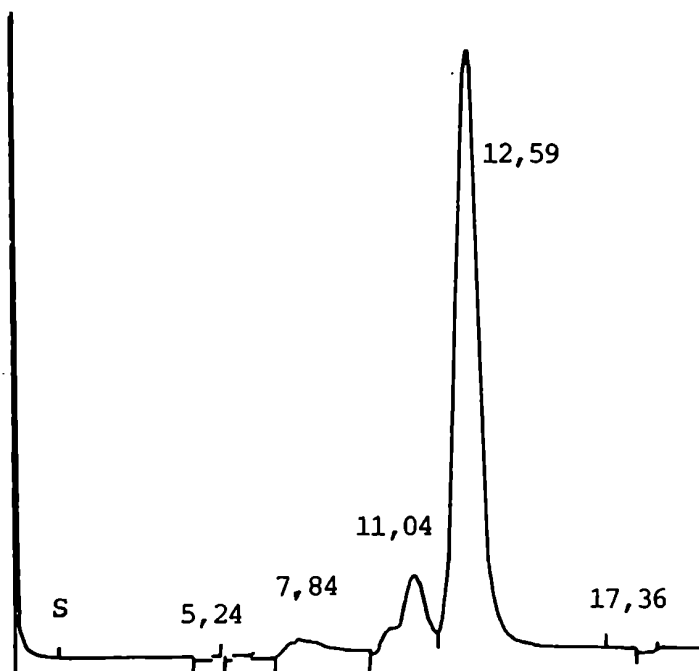


Figura 43

Debido a las características de esta fracción (test de Liebermann-Burchardt y R_f coincidente con el de una mezcla de esteroides testigos) se hizo la comparación cromatográfica, en las condiciones citadas anteriormente, con una mezcla testigo de esteroides coincidiendo los t_r correspondientes a campesterol IV, estigmasterol V y sitosterol VI. Para verificar este resultado y determinar la identidad de los compuestos correspondientes a los restantes picos observados en el cromatograma, se realizó el análisis de esta mezcla por CGL-EM.

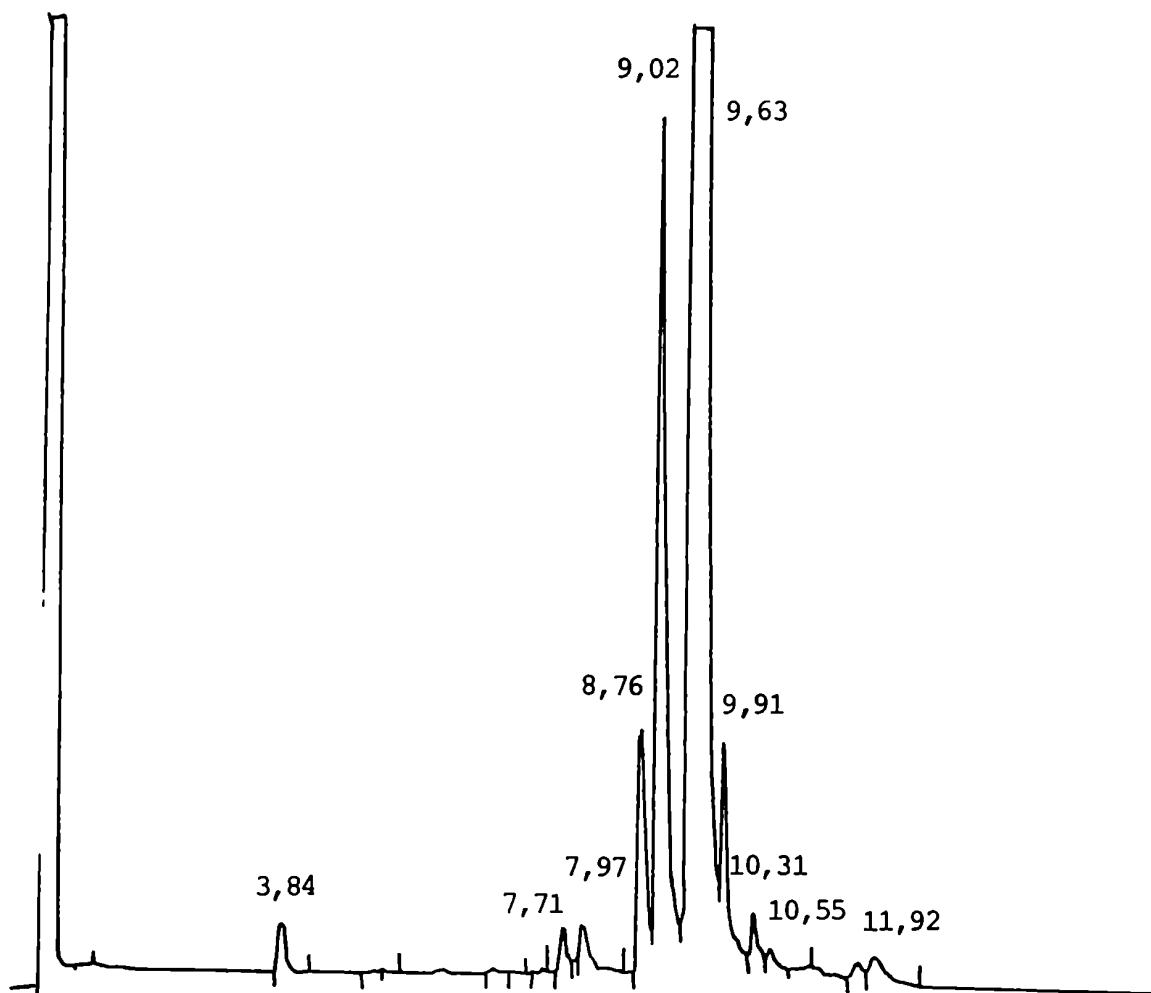


Figura 44

Estigmasta-1,3,5-dieno II

Se pudo detectar así la presencia de un compuesto cuyo ión molecular era M^+ 394. Se observaba además (Fig. 45) la pérdida de 15 u.m.a. correspondiente a un metilo angular, M^+-15 (m/e 381), a sí como también la pérdida de la cadena lateral a m/e 253 correspondiente a M^+-141 , lo que indica que esta cadena es saturada y tiene diez átomos de carbono. Otra señal que confirma esta supo-

sición es la que aparece a m/e 211 que es producida a partir del ión molecular por pérdida de la cadena lateral y el anillo D.

A partir de estos datos y de la ausencia de otras rupturas que indicaran la presencia de algún grupo funcional con heteroátomos, se propone que se trata de un hidrocarburo esteroidal con tres insaturaciones cíclicas.

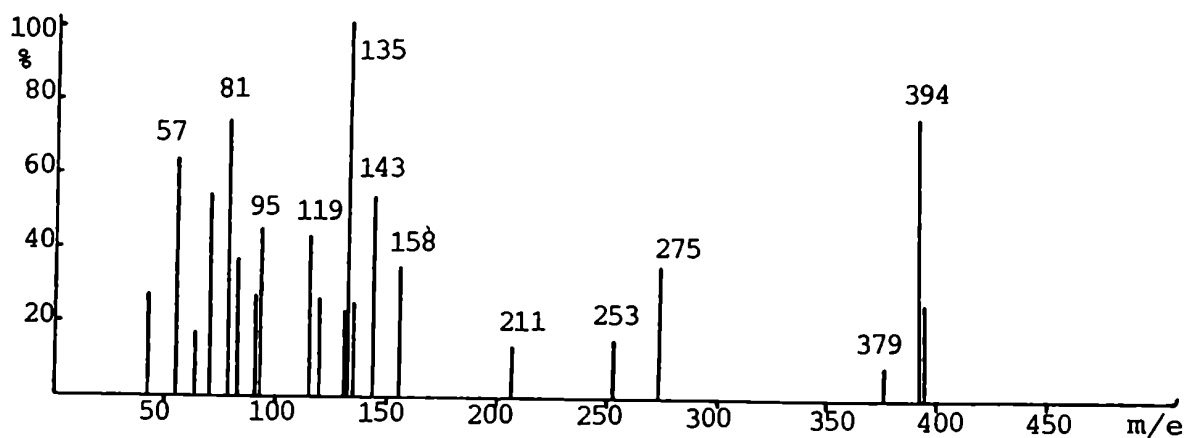
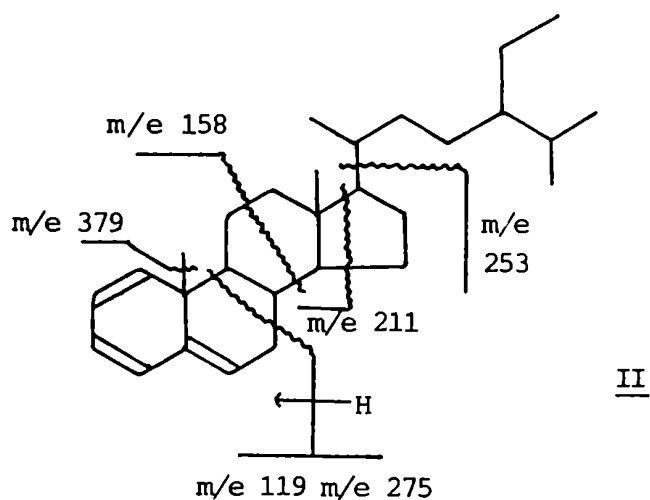


Figura 45



Los fragmentos m/e 119 y 275 son muy importantes desde el punto de vista estructural, por su abundancia relativa y en especial por la información que brindan sobre la posible ubicación de los dobles enlaces. Considerando estas masas, el número de insaturaciones y que las rupturas favorecidas son las alílicas, se postula que estas señales se obtendrían por retención de carga de los dos fragmentos que se generarían al producirse la escisión de los enlaces entre C-7 y C-8, y entre C-9 y C-10 con migración de hidrógeno desde la porción que contiene los anillos C y D a la que contiene el anillo A. Esto indicaría que los dobles enlaces estarían ubicados en las posiciones 1, 3 y 5.

A partir del ión m/e 275 se generan otras dos señales importantes: el pico base que aparece a m/e 135, que corresponde a la pérdida de la cadena lateral y la señal a m/e 93 correspondiente a la pérdida de cadena lateral y del anillo D (C-15, C-16 y C-17).

Otra señal que avalaría los postulados más arriba mencionados, acerca de que las tres insaturaciones se encontrarían en los anillos A y B, es la de m/e 158 que correspondería al fragmento producido por ruptura de los enlaces entre C-11 y C-12 y entre C-8 y C-14 con retención de la carga en el fragmento que contiene los anillos A y B. La pérdida de 15 u.m.a. a partir de la señal de m/e 158 justificaría el pico importante que se observa a m/e 143.

De las consideraciones anteriores y del tiempo de retención observado (ya que el acetato, del correspondiente $\Delta^{1,5}$ esteroide generaría un espectro similar), se propone para este compuesto que su estructura es estigmasta-1,3,5-trieno II.

Estigmasta-3,5-dieno III

Muy cercano al pico anterior se observó en el cromatograma otro que correspondía a una sustancia, cuyo ión molecular era 396. En la región de masas altas son apreciables las señales a m/e 381, correspondiente a la pérdida de un metilo angular y a m/e 275, que al igual que en el caso del compuesto II puede deberse a

la ruptura de los enlaces entre C-7 y C-8 y entre C-9 y C-10 con retención de carga en el fragmento que contiene los anillos C y D y, análogamente que en el esteroide triinsaturado, con migración de hidrógeno desde esta porción de la molécula (Fig. 46).

Esta ruptura se puede considerar como un síntoma bastante concluyente de la ubicación de un doble enlace ya que si éste es Δ^5 , los enlaces que se escinden son alílicos. La masa de este ión s implicaría una cadena lateral saturada, con diez átomos de carbono. Esta suposición se ve avalada por la existencia de los fragmentos m/e 255 y 213 correspondientes a la pérdida de 141 u.m.a. (cadena lateral) a partir del ión molecular y a la pérdida de 141 + 42 u.m.a. a partir del mismo ión, respectivamente.

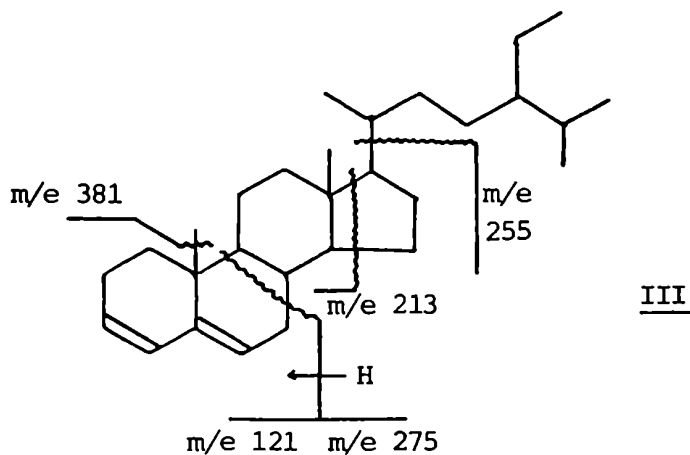
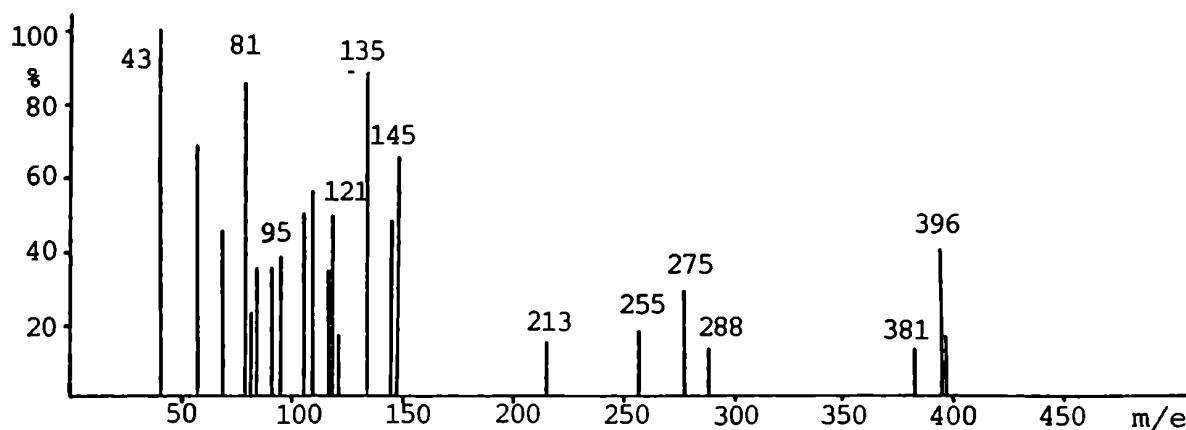


Figura 46

Se postula la ubicación de la otra insaturación entre C-3 y C-4 ya que el pico m/e 288 corresponde a la pérdida de 108 u.m.a. a partir del ión molecular, siendo ésta típica de los acetatos de Δ^5 -esteroles luego de la eliminación de una molécula de ácido acético¹⁸². Es de esperar que la eliminación conduzca a la formación de un doble enlace que pueda conjugarse con el del C-5, de aquí la postulación de la insaturación entre C-3 y C-4. De igual forma, la señal de m/e 81 que es el pico base en el espectro de masas de este compuesto, también lo es del acetato de sitosterol¹⁸². Es descartable la posibilidad de que se trate de dicho éster ya que se probó experimentalmente que el t_r del acetato, en iguales condiciones que las especificadas más arriba, es mucho mayor que el del compuesto III.

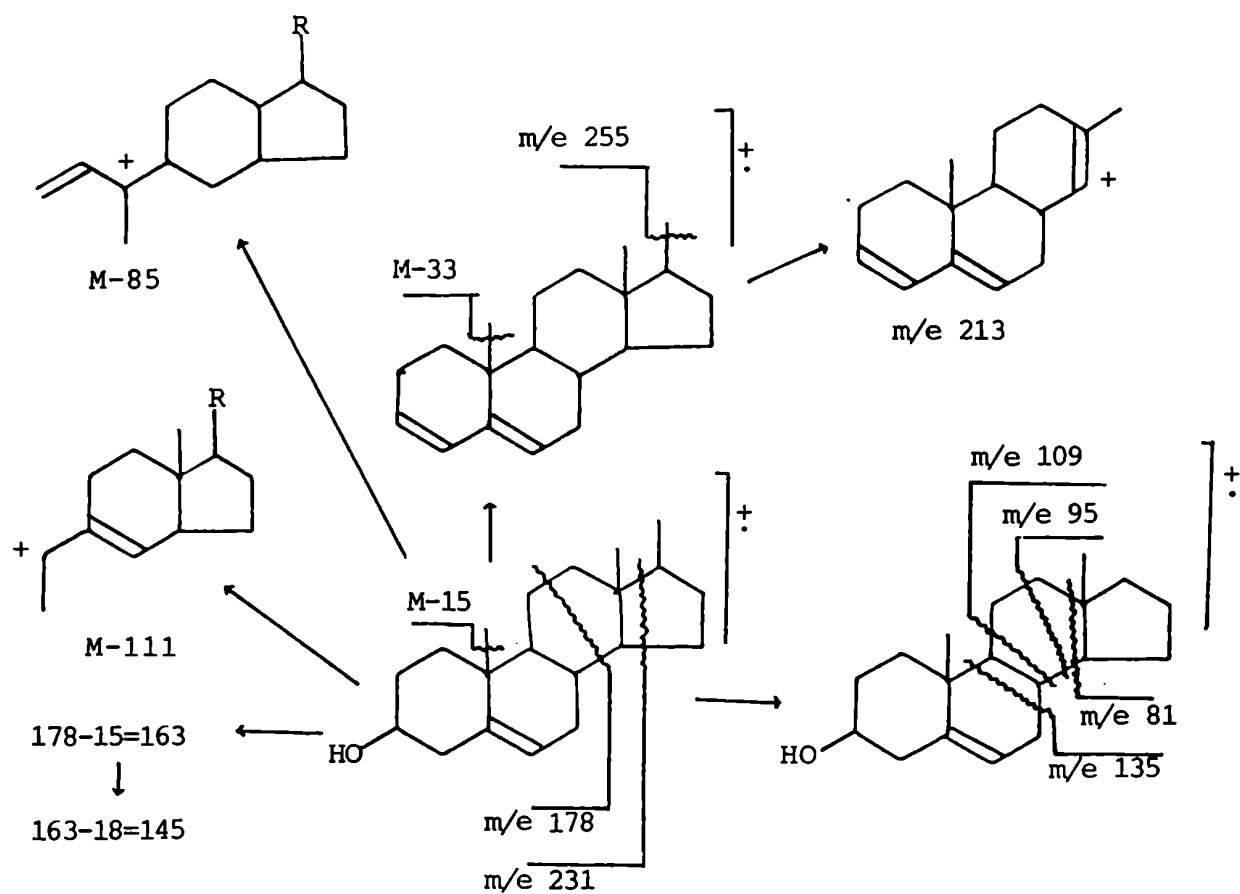
Todas estas conclusiones inducen a identificar al compuesto III como estigmasta-3,5-dieno.

Campesterol IV, estigmasterol V y sitosterol VI

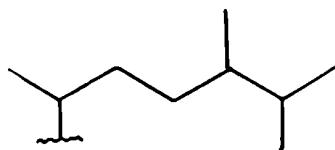
Del análisis de los tres picos siguientes del cromatograma se determinó que los iones moleculares de los correspondientes compuestos eran 400, 412 y 414, presentando además un patrón de rupturas común (Fig. 47-50).

Se observan las señales originadas por pérdidas de metilo, agua, metilo más agua, de cadena lateral, cadena lateral + 42, pérdida de 85, 111 y 139 a partir del ión molecular. También aparecen los iones característicos de estos Δ^5 -esteroles a m/e 145, 95 y además algunos relacionados con todos los anteriores como 163, 135, 109 y 81^{183,184}.

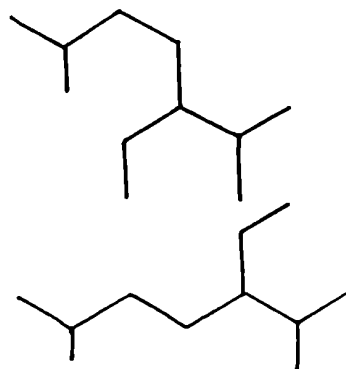
En el caso del compuesto cuyo ión molecular es 412 (V) se observa un fragmento importante a m/e 369, que implica la pérdida de 43 u.m.a. a partir de dicho ión molecular. Esta pérdida es característica de una cadena lateral con un doble enlace en posición 22, ya que la eliminación del isopropilo (C-25, 26 y 27) se ve favorecida por una escisión alílica.



Campesterol IV R=



Stigmasterol V R=



Sitosterol VI R=

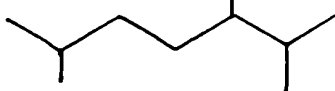


Figura 47: Rupturas características de Δ^5 -esteroides.

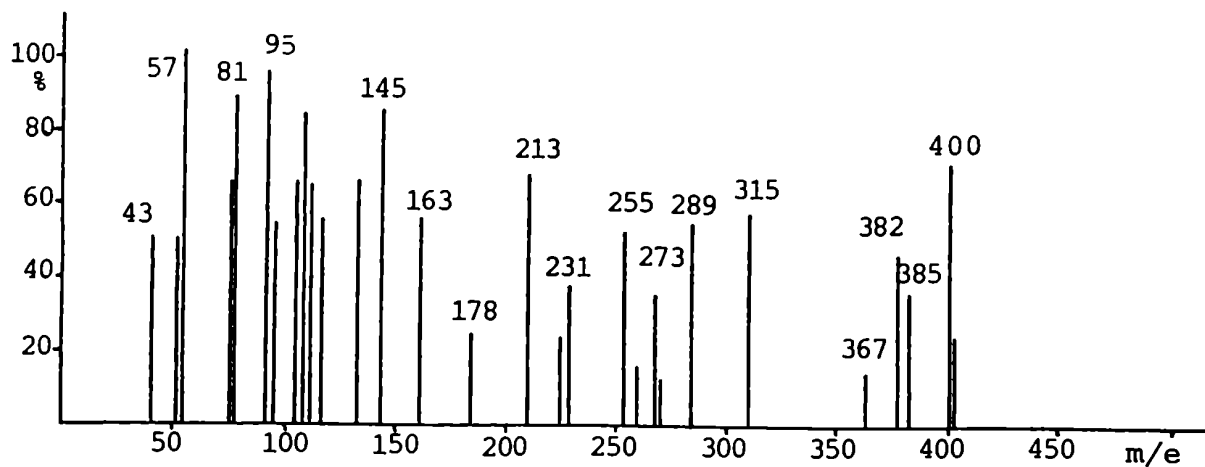


Figura 48: Espectro de masas de campesterol IV.

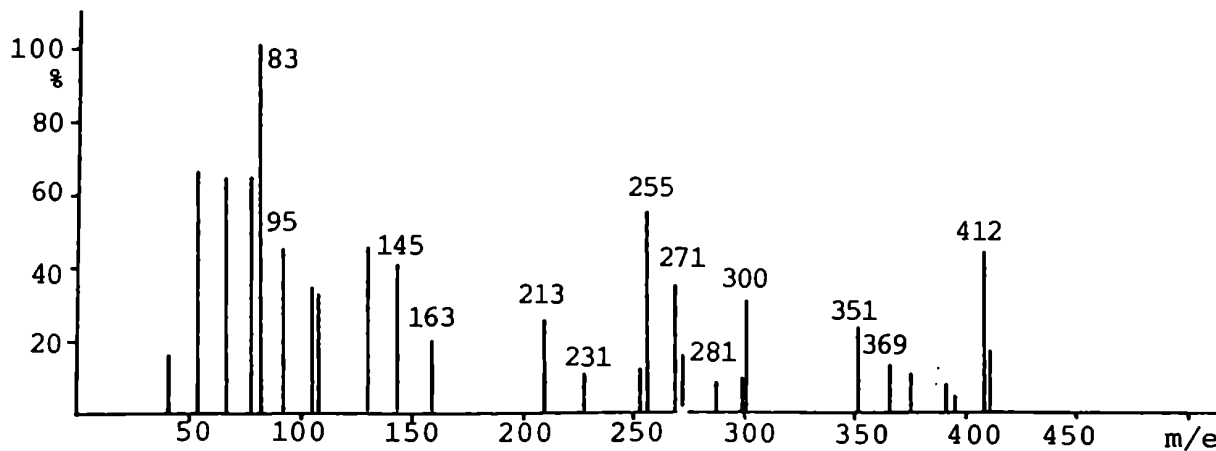


Figura 49: Espectro de masas de stigmasterol V.

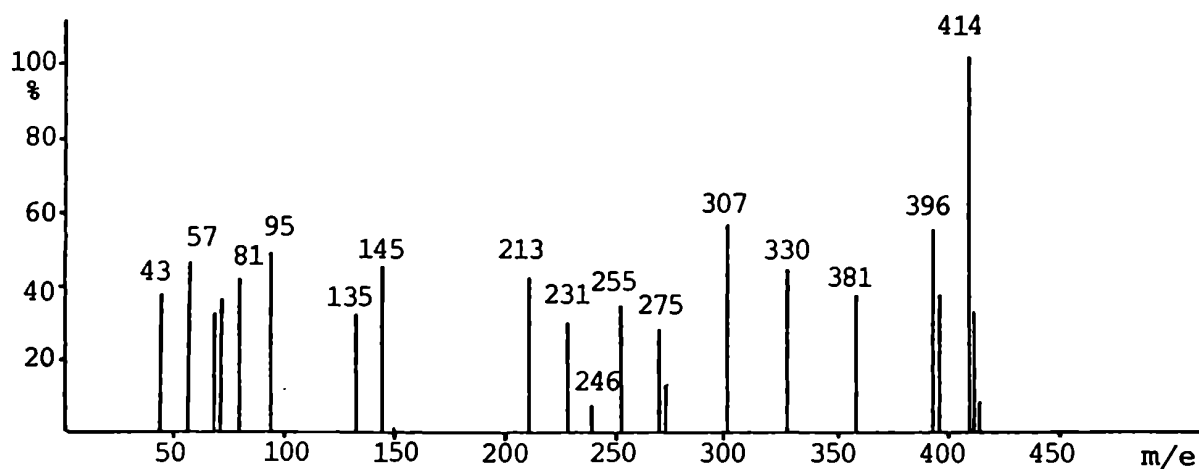


Figura 50: Espectro de masas de sitosterol VI.

Además de la pérdida de la cadena lateral insaturada a partir del ión molecular ($M-139$), se encuentra la fragmentación correspondiente a la pérdida de la cadena lateral saturada, producto de la migración de dos hidrógenos¹⁸⁵. Esta transferencia de hidrógenos ocurre desde C-14 y C-17 hacia el doble enlace localizado en C-22 (Fig. 51), por lo que junto con la pérdida de 43 u.m.a. son las rupturas diagnósticas para la localización del doble enlace en la cadena hidrocarbonada unida a C-17.

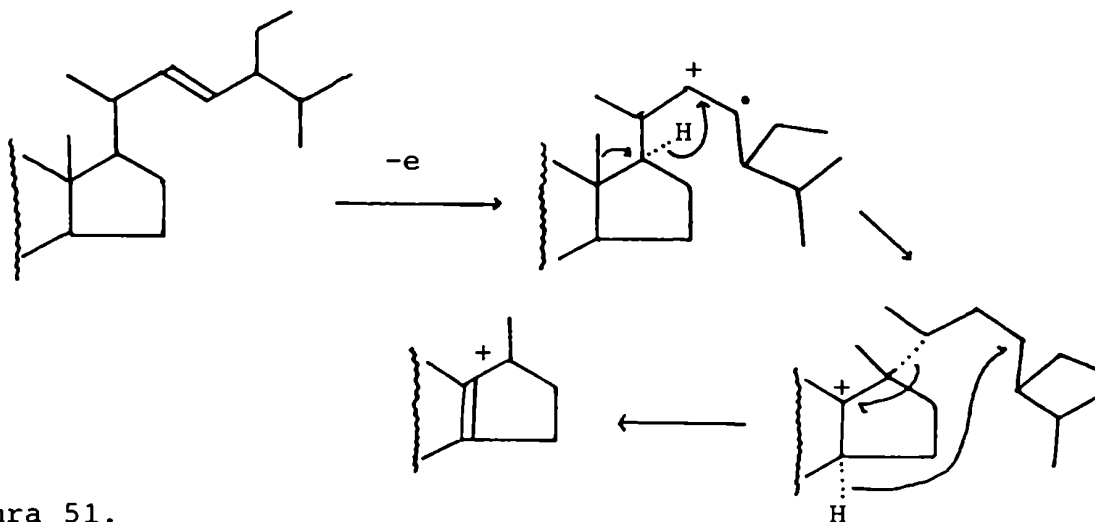


Figura 51.

Como se mencionó anteriormente la comparación cromatográfica indicó la identidad de estos compuestos como campesterol IV, estigmasterol V y sitosterol VI, confirmándose este resultado con las conclusiones a las que se puede arribar mediante el análisis de sus respectivos espectros de masas.

Cetoesteroides

Continuando el análisis por espectrometría de masas de los subsiguientes picos del cromatograma se observa que los iones moleculares presentan una relación m/e 412, 410 y 410.

Estigmast-4-en-3-ona VII

El pico más intenso del espectro cuyo ión molecular es 412 aparece a m/e 124 (Fig. 52).

Se observan además señales a m/e 271, 244 y 299, que corresponden respectivamente a M-141, M-141-27 y M-141-42, las que indican claramente que la cadena lateral es saturada y tiene diez átomos de carbono.

El pico a m/e 271 señala la existencia en el ciclo esteroidal de un oxígeno y dos insaturaciones. Debido a la ausencia del correspondiente M-H₂O, cabe esperar que se trate de una cetona insaturada, lo que está de acuerdo con el pico base que es característico de Δ^4 -3-cetoesteroides^{185,186}.

Mediante técnicas de marcación con deuterio⁷⁷ se determinó que la señal de m/e 124 se generaba por fisión del enlace 9-10, activado alílicamente, que está favorecida también por disminuir la compresión estérica del sistema fusionado de los anillos A y B, y por una posterior migración de hidrógenos. Esta puede producirse por varios mecanismos ya que en esos procesos están involucrados los hidrógenos 8, 11, 15 y 14.

Si los hidrógenos itinerantes son los 8 y 11 no está

establecido cuál es el que migra primero, siendo los posibles mecanismos los que se detallan en la figura 53.

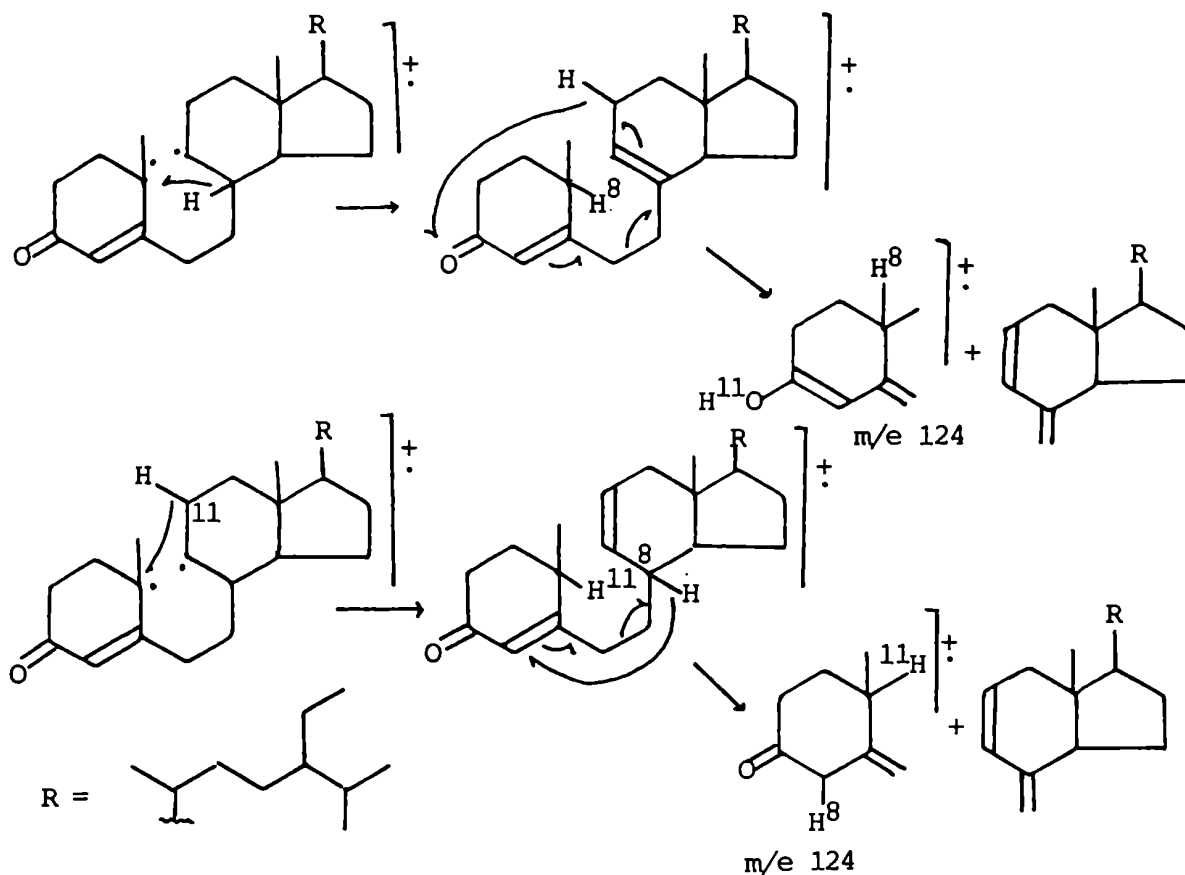


Figura 53

Pero mediante estos estudios de marcación se determinó que el H-11 sólo contribuye, como segundo hidrógeno itinerante, en menos del 50% de los iones de m/e 124 formados. Como el H-15 se incorpora junto con H-8 en un porcentaje muy considerable (comparable al de H-11) en este ión, se postula como explicación, un desplazamiento sigmatrópico 1,3 de un H-14 hacia el C-9, generándose así un dieno ionizado que es más estable termodinámicamente. La posterior migración del H-15 (alílico) al C-4 induce la ruptura del enlace entre C-6 y C-7 produciéndose así el ión m/e 124 y un dieno neutro (Fig. 54).

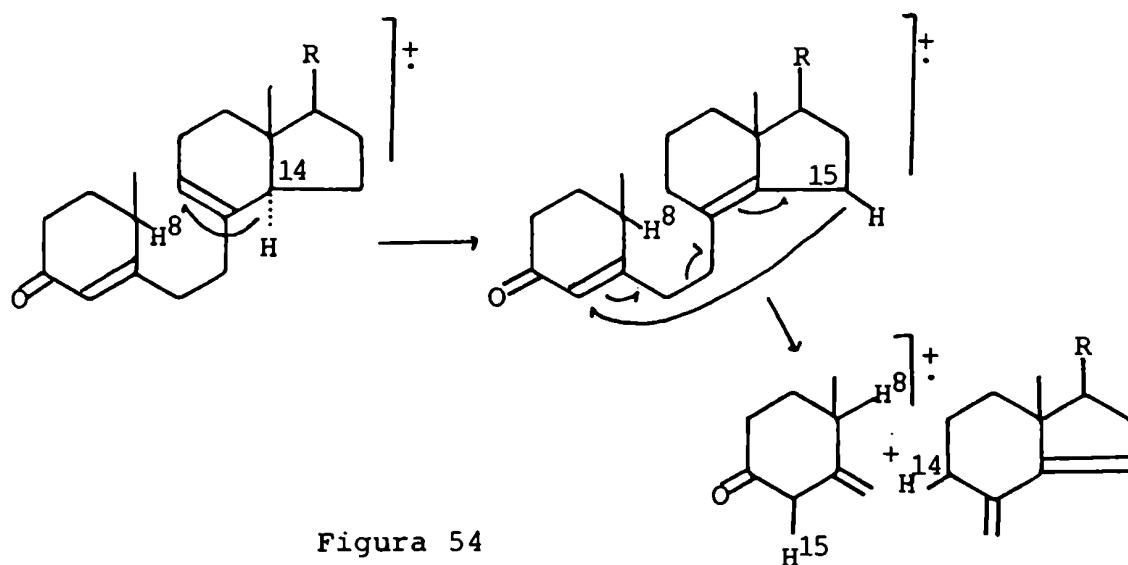


Figura 54

Se observó además que el H-14, que es alílico, puede a cercarse adecuadamente al C-14 como para producirse una migración de aquel hidrógeno hacia esta posición. Este desplazamiento ocurre pero no en igual magnitud que en el caso del H-11 o H-15, ya que el fragmento neutro que se genera al escindirse el anillo B, es de un mayor contenido energético que el que se produce en esos casos ⁷⁸ (Fig. 55).

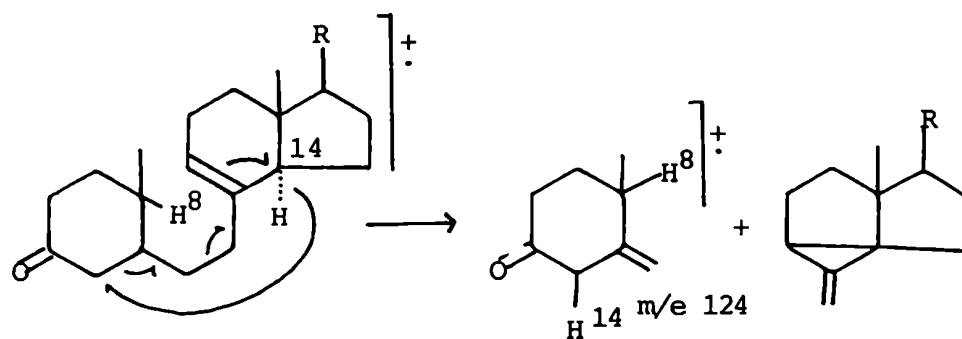


Figura 55

Otra señal que da información acerca de la ubicación del grupo carbonilo y del doble enlace, es la que aparece a m/e 327 correspondiente a M-85 ya que es característica de los Δ^4 -3-cetoesteroides. Estudios realizados por Djerassi y col. ⁷⁸ indican que este ión no proviene del molecular sino del M-42 y que se

origina por medio de un proceso complicado y aún no esclarecido, que involucra la ruptura de las uniones 9-10, 5-10 y 3-4 y la migración de dos hidrógenos desde este fragmento cargado (Fig.56):

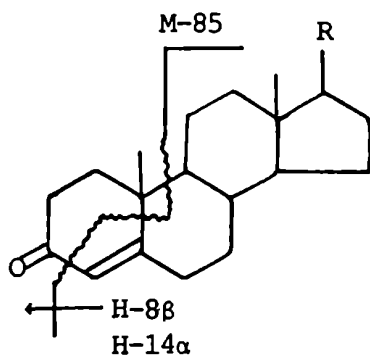


Figura 56

El ión padre de éste, es decir M-42, puede formarse por un proceso como el que se ejemplifica en la figura 57 o por otro menos probable que involucraría la migración de un hidrógeno de C-4 a C-2.

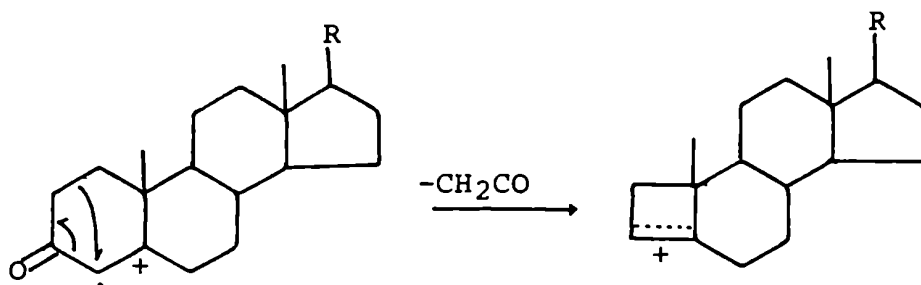


Figura 57

Otro ión de abundancia considerable en este tipo de compuestos es M-123, que se origina, como en el caso del m/e 124 por ruptura de los enlaces 6-7 y 9-10, pero con retención de carga en la porción que contiene los anillos C y D.

Los hidrógenos itinerantes son los mismos que los involucrados en la formación del ion m/e 124, con excepción del H-11 ya que esta migración no transforma en alílico al enlace 6-7 y por consiguiente no favorece su escisión. En la figura 58 se esquemmatizan los mecanismos que justifican las migraciones de hidrógenos observadas por técnicas de marcación⁷⁸.

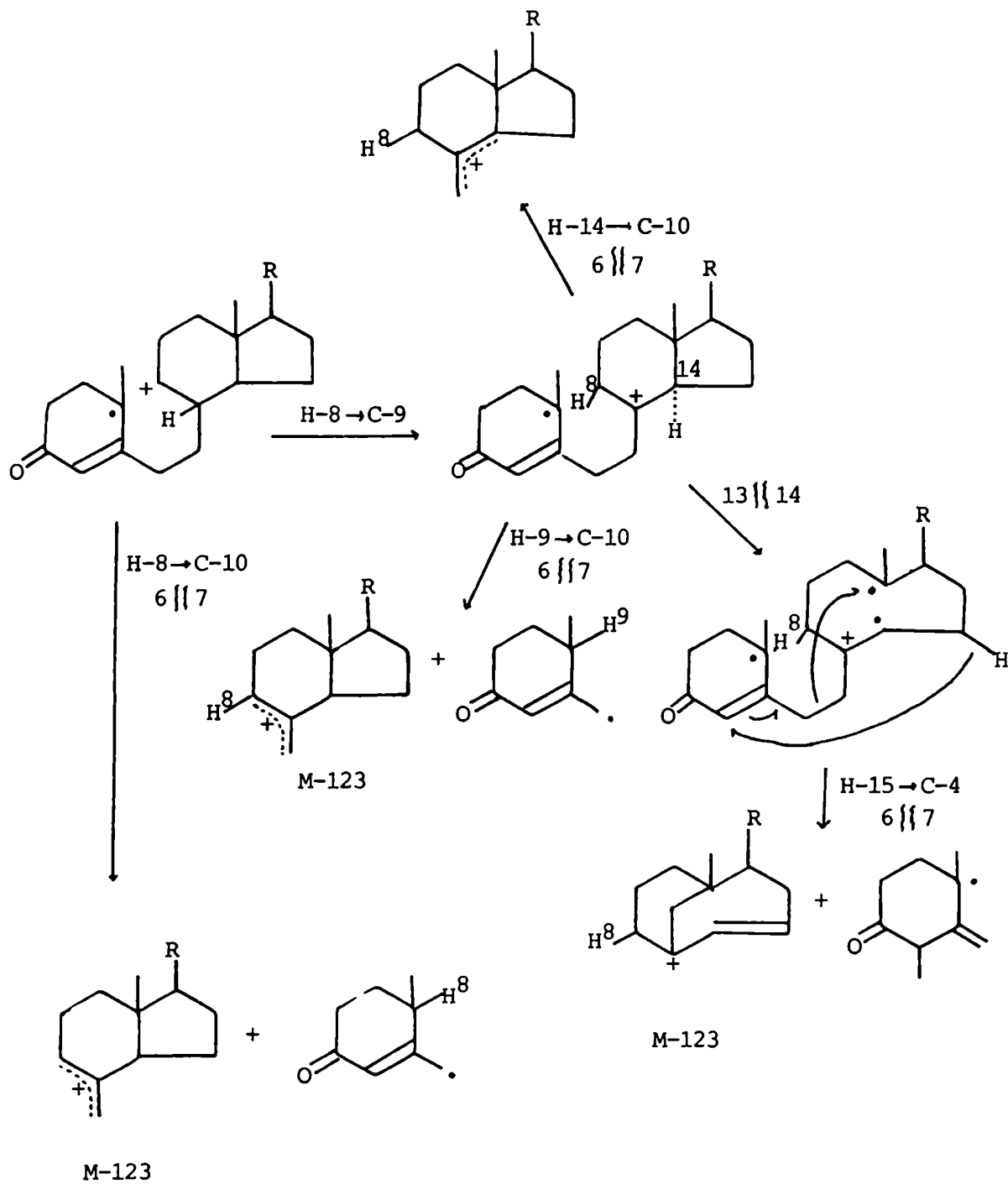


Figura 58

Como se puede observar el primer paso es la ionización del enlace 9-10, localizándose la carga en C-9. Este proceso competiría con el análogo en el cual la carga se localiza en el C-10 para generar el ión de m/e 124. En el caso de la transferencia de H-9 debe postularse un desplazamiento 1,2 de hidrógenos desde el C-8 al C-9 para generar un ión más estable que puede sufrir posteriormente las rupturas graficadas y de esta forma explicar los resultados observados. Además, si no se postulara este desplazamiento, se debería plantear la escisión directa de dos enlaces de un mismo átomo de carbono, siendo ésta una reacción altamente desfavorable.

Todas las rupturas analizadas están en concordancia con las esperadas para estigmast-4-en-3-ona y por consiguiente puede concluirse que ésta es la identidad del compuesto VII.

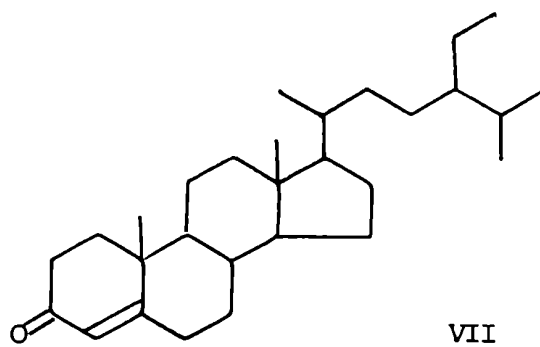
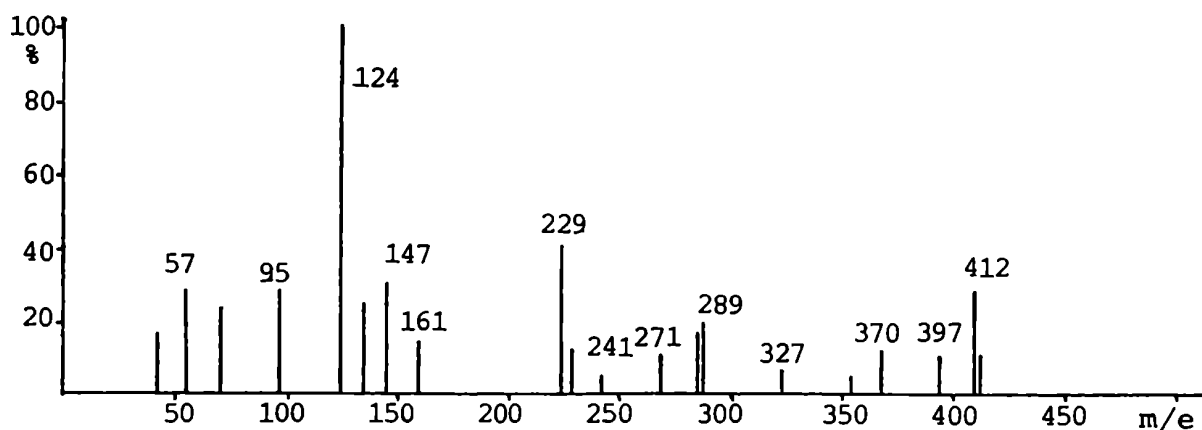


Figura 52

Estigmasta-4,6-dien-3-ona VIII

Uno de los compuestos (VIII) que presenta su ión molecular a m/e 410, muestra como pico base de su espectro de masas la señal m/e 136. Además de las ya mencionadas, aparecen en dicho espectro las correspondientes a M-44, M-135, m/e 160 y m/e 174, siendo todas estas fragmentaciones diagnósticas para esqueletos del tipo $\Delta^{4,6}$ -3-cetoesteroides.

Tanto el ión molecular como las señales que involucran fragmentaciones en las que participa la cadena lateral, como por ejemplo: 269 (M-141), 241 (M-141-28), y 227 (M-141-42) indican que dicha cadena hidrocarbonada tiene diez átomos de carbono y que es saturada (Fig. 59).

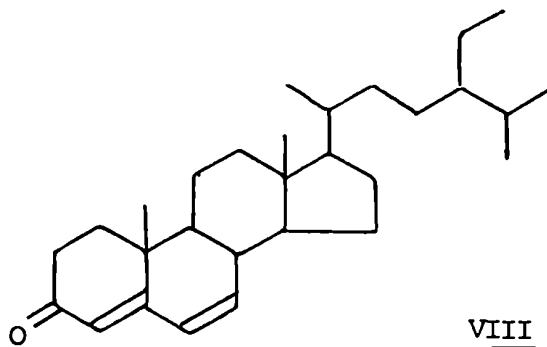
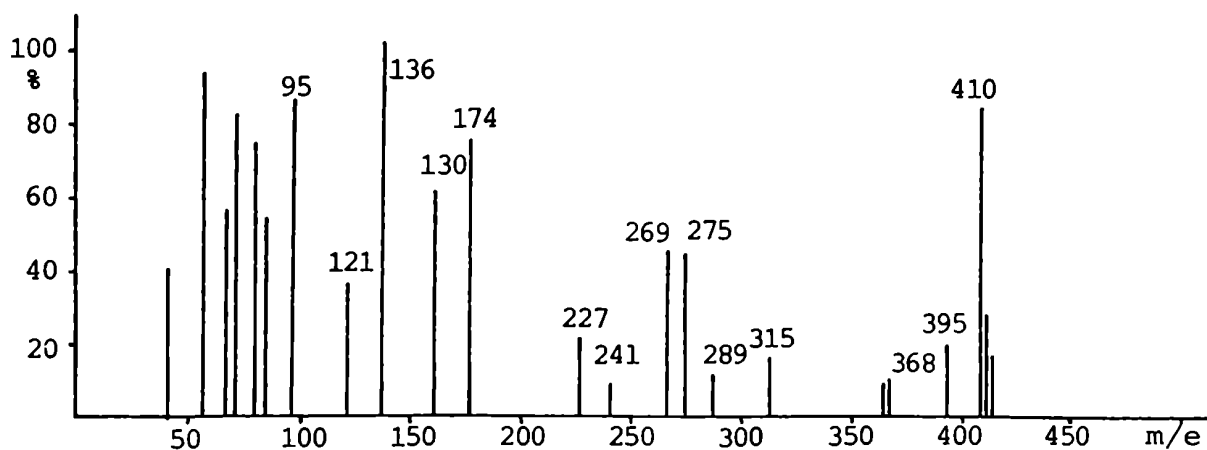


Figura 59

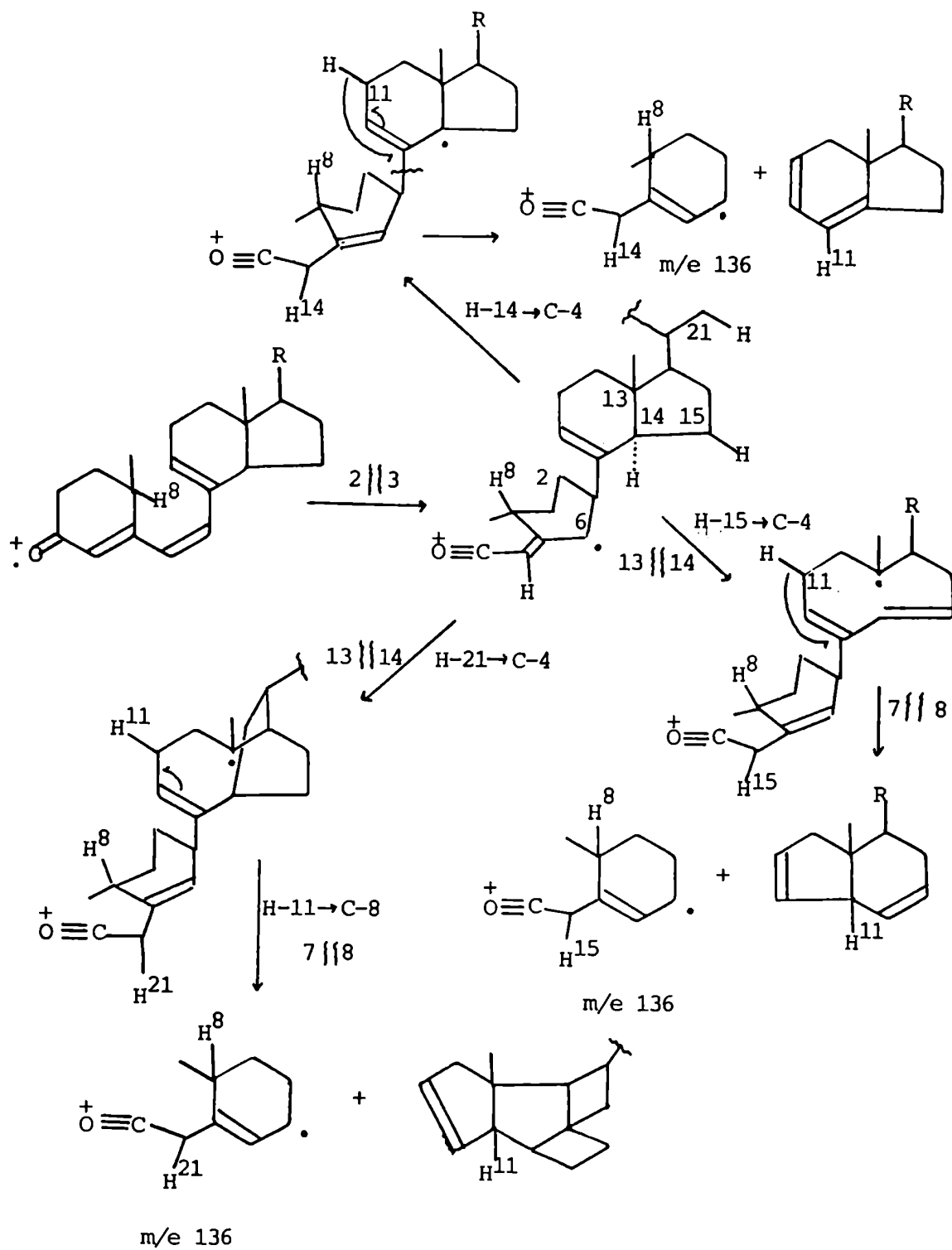


Figura 60

La señal a m/e 136 debe producirse por expulsión de los anillos C y D a partir del ión molecular e involucra la migración, hacia el fragmento que contiene el anillo A, de dos hidrógenos⁷⁰.

Un análisis preliminar no induciría a predecir esta fragmentación ya que se esperaría que la presencia del doble enlace en posición seis bloqueara cualquier tipo de ruptura del anillo B^{187,188}.

Para explicar esta aparente escisión de un enlace vinílico, Djerassi y col.⁷⁸ postularon algún tipo de migración de hidrógeno o de reordenamiento estructural, de tal forma que antes de que ocurra la ruptura del enlace 7-8, la hibridización del C-7 sea sp^3 . De esta manera disminuiría la densidad electrónica en C-7, permitiendo así que la unión 7-8 sea más susceptible de homólisis.

De los datos obtenidos por marcación con deuterio se⁷⁸ dedujo que la mayor fuente de hidrógenos era el C-8 y luego con menor importancia C-15, C-21, C-11, C-12 y C-17. El que se produzcan migraciones desde centros tan lejanos como C-21 indicaría que existen fragmentaciones y/o reordenamientos significativos, que pueden adjudicarse al mayor tiempo de vida media del ión molecular debido a la estabilidad que le confiere la conjugación del carbonilo.

Se postula como primer paso⁷⁸, la ruptura del enlace alílico 9-10, análogamente a lo que ocurre en los Δ^4 -3-cetoesteroides. La posterior ruptura de la unión entre C-2 y C-3 (α al carbonilo, que es una fragmentación típica de cetonas¹⁸⁹) y la formación de un enlace entre el C-7 y el radical oxigenado en C-2, origina un ión oxonio que tiene la hibridización deseada para C-7. De esta forma se vuelven accesibles varias posiciones de los anillos C y D para sufrir abstracciones de hidrógeno. Los posibles caminos a seguir están esquematizados en la figura 60.

Mediante los reordenamientos y migraciones de hidrógenos planteadas se logra activar para la homólisis el enlace vinílico 7-8.

Un ión muy importante respecto de su intensidad y que se origina también por escisión de los enlaces 9-10 y 7-8, pero con retención de la carga en el fragmento que contiene los anillos C y D⁷⁸, es el que aparece a m/e 275, correspondiente a M-135. Los datos de marcación establecieron que los hidrógenos itinerantes son H-8 y H-14 .

El paso inicial es la ionización, nuevamente del enlace 9-10 permaneciendo la carga sobre el C-9, ya que de lo contrario, se crearía una desfavorable conjugación de la carga con el carbonilo.

Luego se produce la migración del H-8 alílico hacia C-4 y finalmente se realiza la transposición del hidrógeno, también alílico, de C-19 a C-7 mediante una transposición sigmatrópica 1,5 a través de un estado de transición cíclico de seis miembros. Este proceso posibilita el cambio de hibridización necesario en C-7 ($sp^2 \rightarrow sp^3$) para facilitar la escisión del enlace 7-8. La fisión de esta unión hace recordar a la estudiada previamente en una investigación mecanística de ruptura de anillos D de esteroides¹⁹⁰. En ambos casos, una escisión directa generaría un carbeno ionizado, pero si se postula un desplazamiento 1,2 de hidrógeno (aunque también es posible un desplazamiento 1,3) antes de la homólisis, se genera un ión carbonio alílico. En este caso particular se sugiere la transferencia de un hidrógeno de C-14, o de otro carbono cercano, hacia C-8.

Una forma alternativa de explicar la generación del mismo fragmento involucrando la salida del H-14 de éste, implica la migración del hidrógeno cuaternario de C-14 a C-4, seguida por el desplazamiento del H-19 a C-7 y finalmente por la ruptura del enlace 7-8.

En la figura 61 se esquematizan ambos mecanismos.

La señal observada a m/e 174 también fue analizada por Djerassi y col.⁷⁰ demostrando por mediciones a alta resolución que su composición es $C_{12}H_{14}O$ y mediante técnicas de desenfoque que el ión molecular es su predecesor más importante.

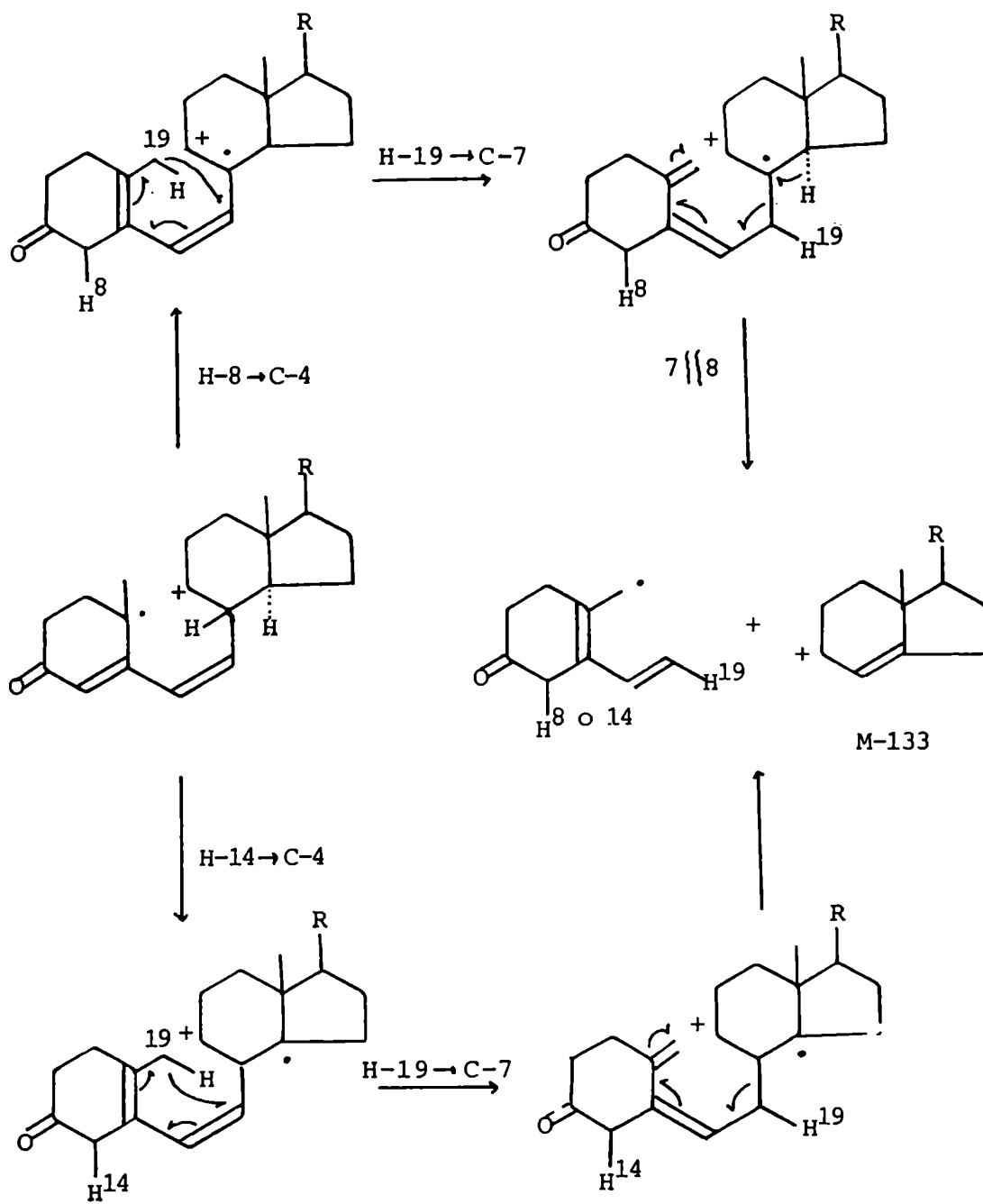


Figura 61

Los estudios con marcación con deuterio indicaron que existen dos procesos de transferencia de hidrógenos ⁷⁸. Uno que involucra dos migraciones recíprocas (de H-8, H-9, H-14 y H-18) y otra en la que interviene una sola transferencia recíproca (de H-9 y H-18). Este último proceso se esquematiza en la figura 62.

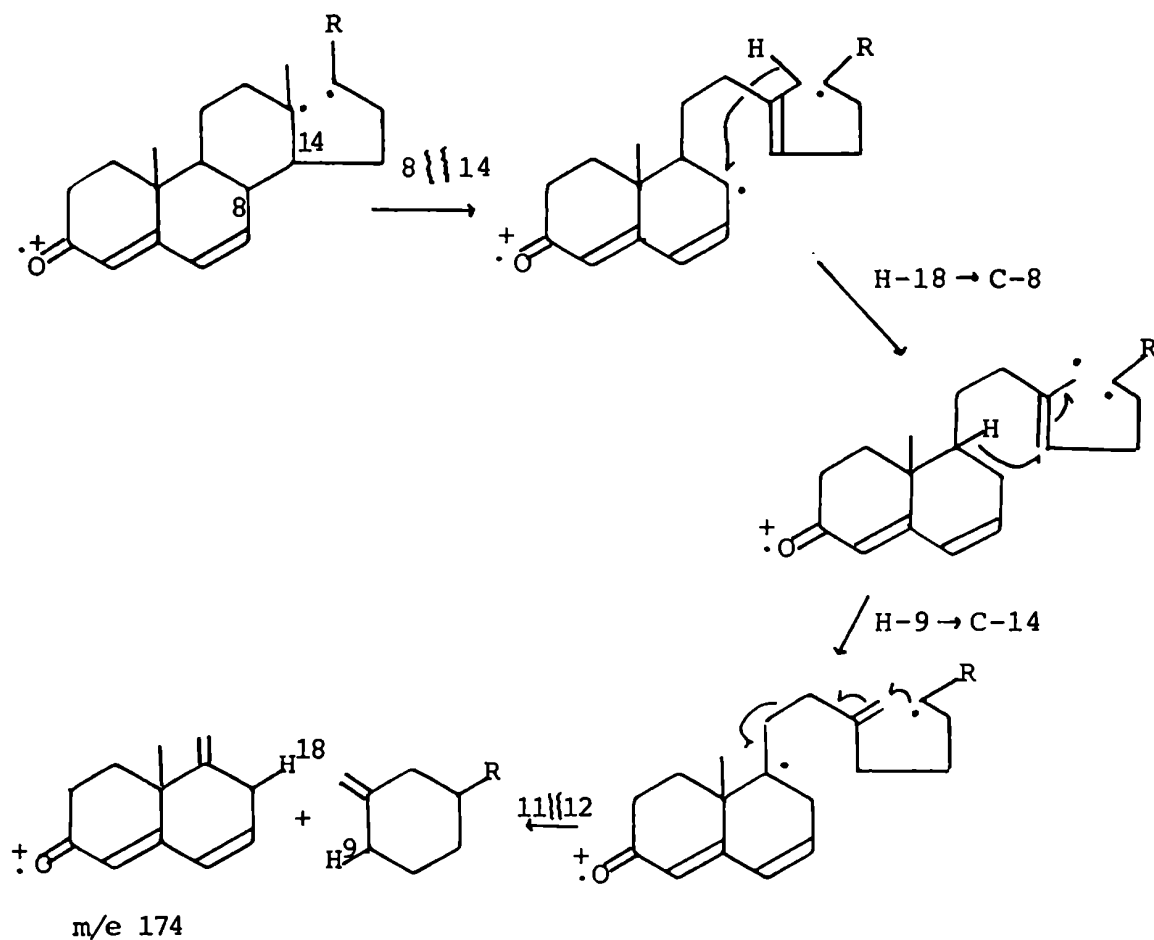


Figura 62

Comparando el fragmento de m/e 174 generado por el mecanismo anteriormente planteado con el que se formaría a partir de la ruptura directa de las uniones 8-14 y 11-12 (Fig.63), se puede concluir que el primero es energéticamente mucho más favorable.

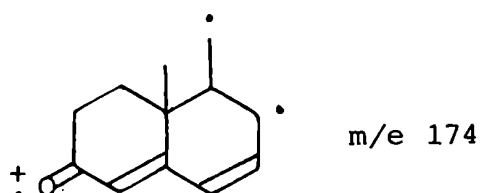


Figura 63

Otro ión que aparece en el espectro de masas del compuesto VIII (m/e 160) contiene un átomo de carbono menos que el discutido anteriormente.

Análogamente a lo que ocurre en el caso antes analizado, se produce la fisión del anillo C a través de los enlaces 8-14 y 9-11. En principio, este proceso se puede visualizar como el clivaje de la unión alílica entre C-8 y C-14 y posterior ruptura del enlace 9-11 para generar una trienona y un hidrocarburo bicíclico (Fig. 64).

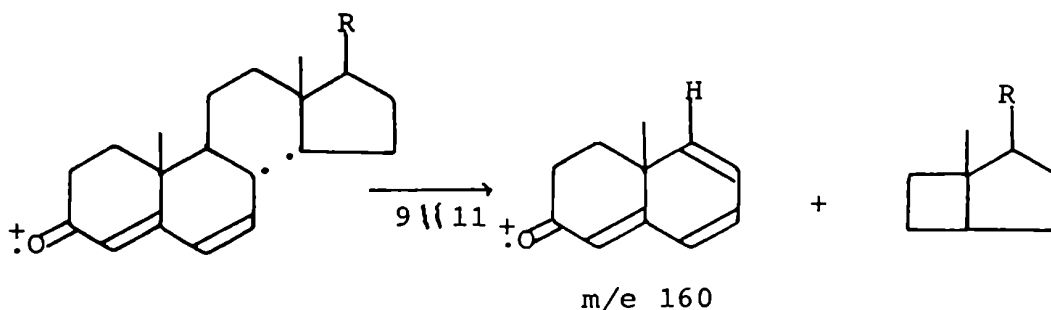


Figura 64

Pero los estudios de marcación con deuterio⁷⁰ indican que se producen migraciones de hidrógenos que involucran a los mismos hidrógenos que en el caso del ión m/e 174. Como es difícil generar un fragmento energéticamente más favorecido que la trienona de la figura 64, se postula que el H-9 que se transpone, es

reemplazado por el H-18 para formar el mismo ión radical m/e 160 (Fig. 65).

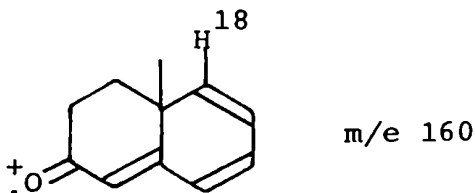


Figura 65

Como la especie cargada que se forma es la misma, tanto durante la fisión directa como en el proceso que comprende reordenamientos, es de esperar que el curso de la reacción de ruptura del anillo C esté gobernado por las estabilidades relativas de los fragmentos neutros resultantes⁷⁰. Es decir, para postular un mecanismo detallado de este proceso es necesario un análisis más profundo de la naturaleza de las posibles especies neutras.

Finalmente una señal característica de los $\Delta^{4,6}$ -3-cetoesteroides es la que corresponde a M-44, que aparece en el caso del compuesto VIII a m/e 366. Los estudios realizados indican que proviene de la pérdida de C_2H_4O a partir del ión molecular⁷⁰. El espectro de masas del derivado 2,2,4- d_3 - muestra que el fragmento cargado pierde los tres deuterios, lo que indica que el C-2 es eliminado del ión molecular. Es decir, que similarmente a lo que ocurre en los Δ^4 -3-cetoesteroides, se produce la fisión de los enlaces 1-2 y 3-4, pero además, la presencia del doble enlace en posición 6 produce la migración de dos hidrógenos, de C-4 y C-9.

Estos resultados pueden ser racionalizados por el mecanismo propuesto en la figura 66.

Por todo lo expuesto precedentemente, las señales observadas en el espectro de masas del compuesto VIII permiten determinar su identidad como estigmasta-4,6-dien-3-ona.

Este compuesto fue identificado en plantas vasculares solamente dos veces en trabajos previos al presente^{62,73}.

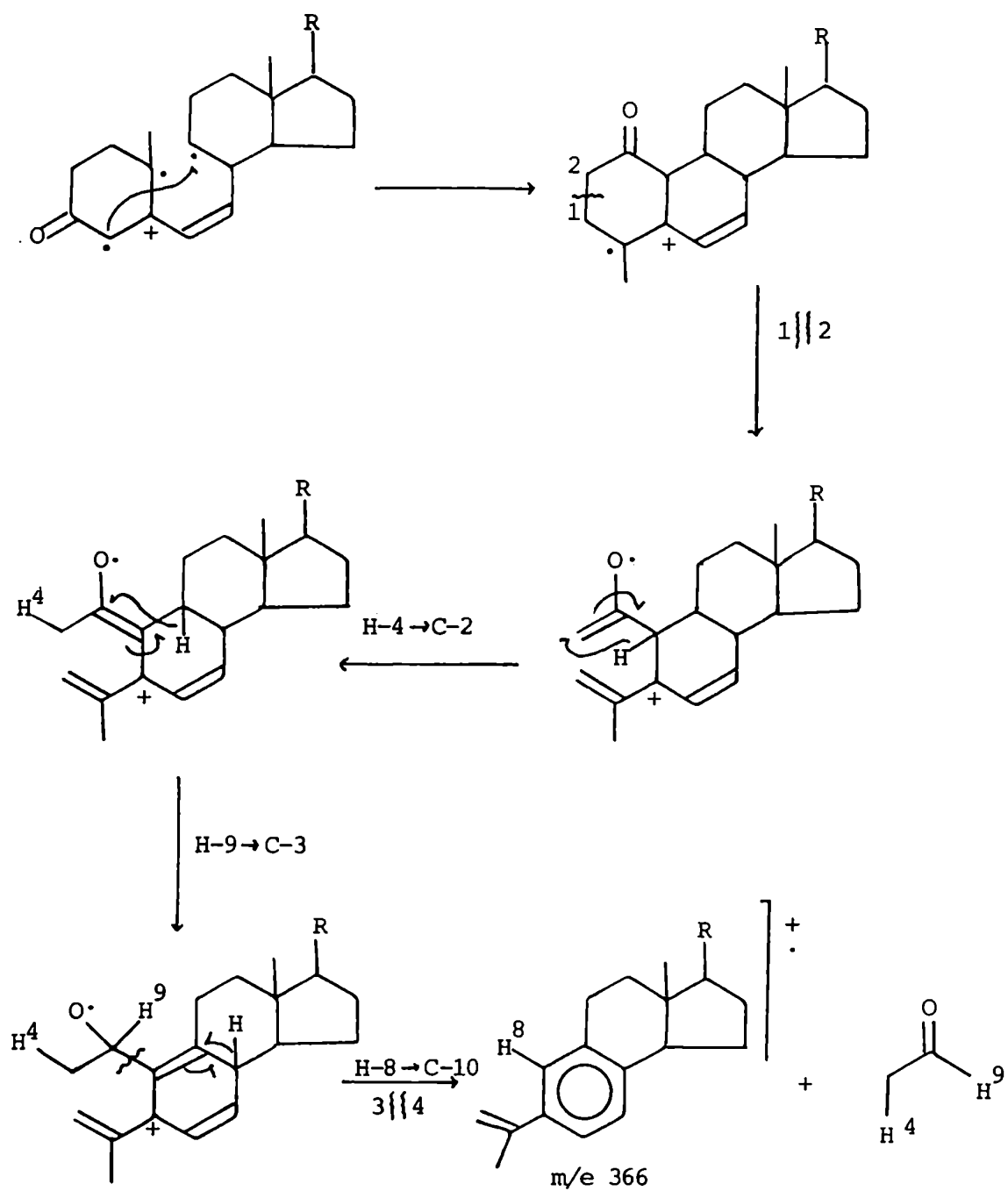


Figura 66

Estigmasta-3,5-dien-7-ona IX

El otro compuesto (IX) que presenta en su espectro de masas el ión molecular a una relación masa/carga idéntica a la del compuesto VIII, difiere de éste en su pico base que aparece a m/e 174. Esta última señal es característica de los $\Delta^{3,5}$ -7-cetoesteroides.

La fragmentación principal implicaría entonces, la ruptura de los enlaces 8-14 y 11-12. Esta formulación es substantiada por los espectros de masas de 6- α -deuterio-3- β -acetoxicolestan-7-ona y 6,6-dideuterio-3- β -acetoxicolestan-7-ona^{194,195}.

Mecanísticamente, la ruptura del enlace 8-14 procede, muy probablemente, como indica la figura 67.

La especie a se descompone posteriormente para generar los iones m/e 161, 174 y 187. El clivaje del enlace 9-11 se ve favorecido ya que el ión que se produce está estabilizado alílicamente.

La ruptura de la unión 12-13, que conduce a la formación del ión m/e 187, puede probablemente estar facilitada debido a que el radical que se genera en C-13 está estabilizado por el doble enlace presente entre C-14 y C-15 (Fig. 67).

Finalmente, si se postula la pérdida de H-9, seguida por la escisión del enlace entre C-11 y C-12, se generaría la especie m/e 174 que estaría muy favorecida por su completa conjugación.

En el espectro de colestan-7-ona¹⁹³ se observan las señales correspondientes a las rupturas antes mencionadas, aunque con intensidades mucho menores debido a la menor conjugación, lo que confirma la ubicación en C-7 del grupo carbonilo.

Además, aparecen los iones m/e 269 y 227 correspondientes respectivamente a M-cadena lateral y a M-cadena lateral-42, indicando que dicha cadena lateral es saturada y tiene diez átomos de carbono.

Todas las señales antes mencionadas están en total concordancia con las informadas para estigmasta-3,5-dien-7-ona IX¹⁹¹.

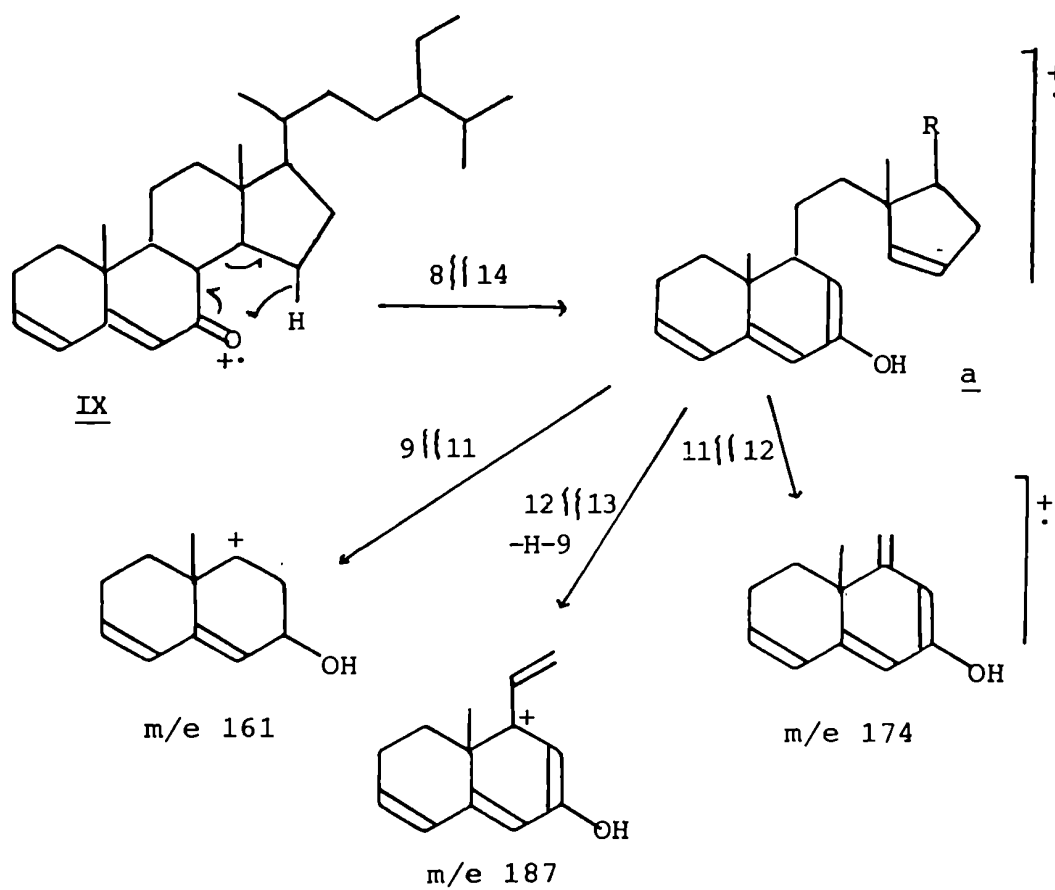
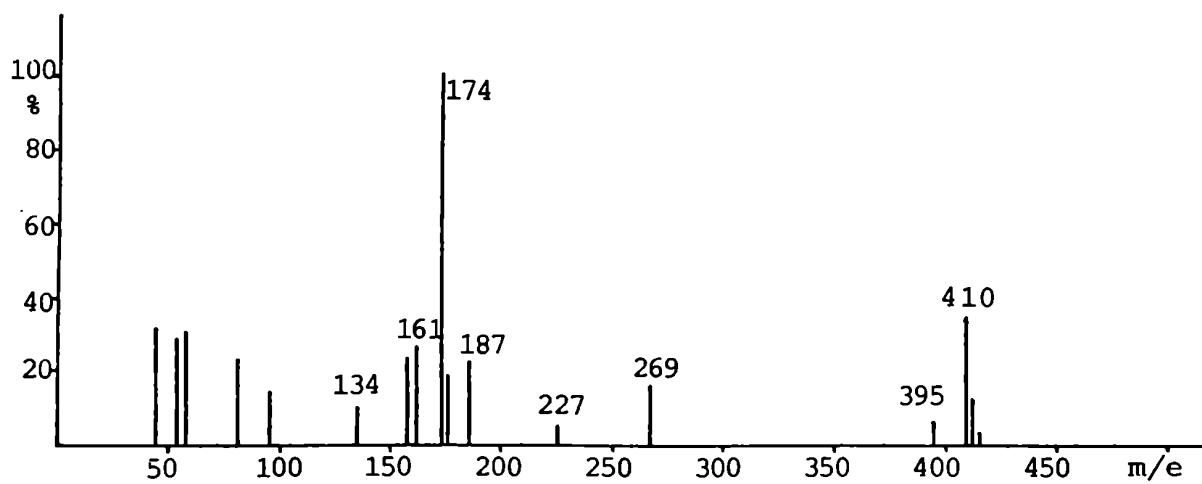


Figura 67

Análisis del extracto de éter de petróleo

Hidrocarburos

La primera fracción, es decir, la eluida con éter de petróleo de una columna de sílicagel de dicho extracto, resultó estar constituida por hidrocarburos.

Se llegó a esta conclusión por análisis mediante CGL (OV-17 3%; 1,8 m de longitud; 220°C, isotérmica) (Fig.68) y por CGL-EM utilizando la misma columna pero con programación de temperatura desde 180 a 280 °C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min..

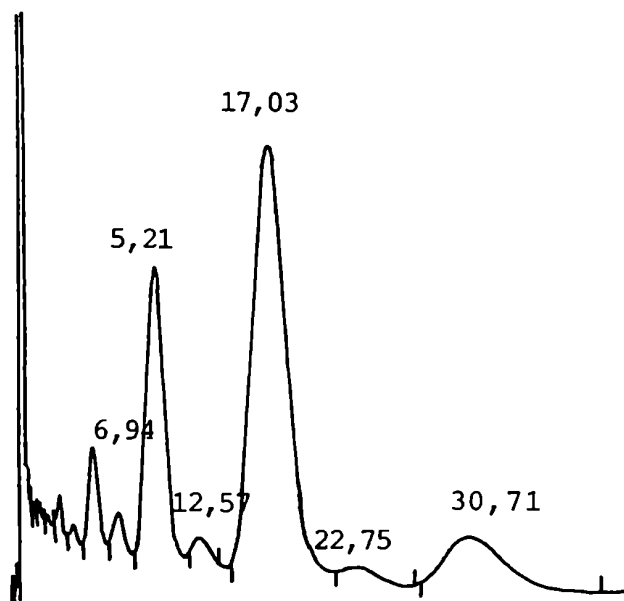


Figura 68

Los iones moleculares de los picos analizados difieren en 14 u.m.a. observándose en todos los espectros una caída exponencial en la abundancia de los fragmentos cargados¹⁸⁵.

Se determinó así la existencia de hidrocarburos linea-

les saturados, $C_{21}H_{44}$ a $C_{33}H_{68}$. Los más abundantes resultaron ser los de veintinueve y treinta y un átomos de carbono y en general los de número de carbonos impares más que los pares, debido a que los hidrocarburos se generan por descarboxilación de los ácidos grasos, siendo los de números pares de carbonos los más importantes¹⁹⁴.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 13.

	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃
T _r	1,04	1,33	1,73	2,24	2,94	3,90	5,21	6,94	9,30	12,57	17,03	22,75	30,71
ln T _r	0,392	0,285	0,548	0,806	1,078	1,361	1,651	1,937	2,230	2,531	2,835	2,125	3,425
%	0,06	0,05	0,16	0,11	0,72	0,43	3,03	1,80	20,70	0,33	57,61	2,16	12,03
M m/e	296	310	324	338	352	366	380	394	408	422	436	450	464

Tabla 13

Se llegó a la misma conclusión respecto de la composición de esta fracción mediante CGL en iguales condiciones que las mencionadas, de dos testigos de hidrocarburos lineales de cadena conocida y graficando posteriormente ln T_r en función del número de átomos de carbono.

Los parámetros calculados por cuadrados mínimos para dicha recta son:

ordenada al origen: -4,986

pendiente: 0,245

coeficiente de correlación: 0,964

Glicósidos de esteroides

Una fracción eluida de una columna de sílicagel H con Cl₃CH-acetato de etilo 50% resultó ser irresoluble mediante técnicas cromatográficas de adsorción, pero sí después de ser metilada en placa.

Como conclusión de este resultado se metiló la fracción con diazometano en éter etílico y se separaron los componentes re-

sultantes por cromatografía en columna. De esta forma se recolectaron tres fracciones compuestas por X, XIa y una tercera no estudiada, correspondiendo el compuesto X a una sustancia no metilable.

Estas fracciones debieron ser acetiladas para su total purificación obteniéndose así los compuestos Xb y XIb.

Sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido X

El espectro de masas del compuesto Xb (Fig.69) presenta en la zona de masas altas un pico de m/e 414 y el correspondiente a la pérdida de agua a partir de éste.

Los iones m/e 381 (M-18-15), 273 (M-141) y 213 (M-141-42-18) evidencian fragmentaciones típicas de un Δ^5 -esterol cuya cadena lateral tiene 141 u.m.a., es decir, es saturada y tiene diez átomos de carbono. Teniendo en cuenta el ión m/e 414 y las señales antes citadas se deduce que en el ciclo esteroidal debe haber una insaturación.

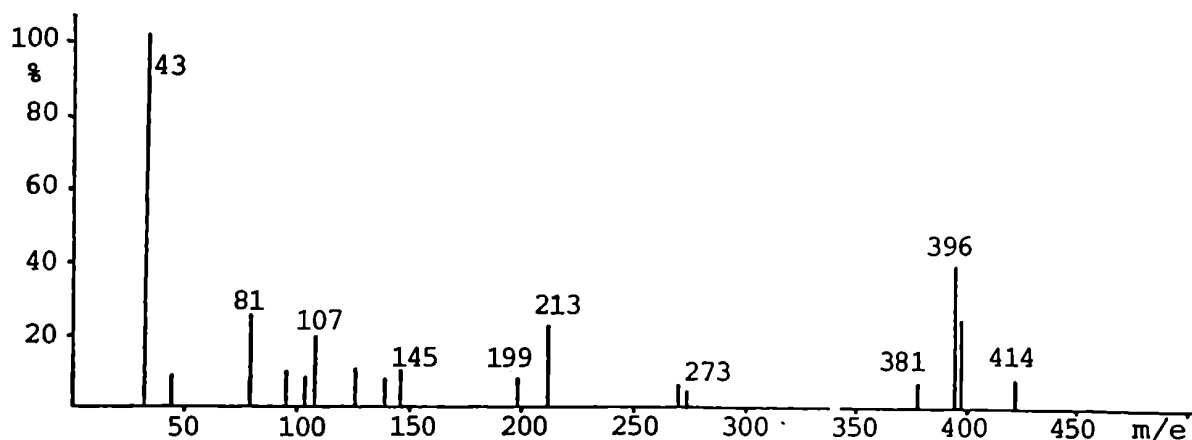


Figura 69

En la zona de masas bajas se observan los picos diagnóstico para una pentosa piranosica acetilada^{108,109} tales como los que aparecen a m/e: 199, 145, 139, 128, 103 y 43 (Fig. 70).

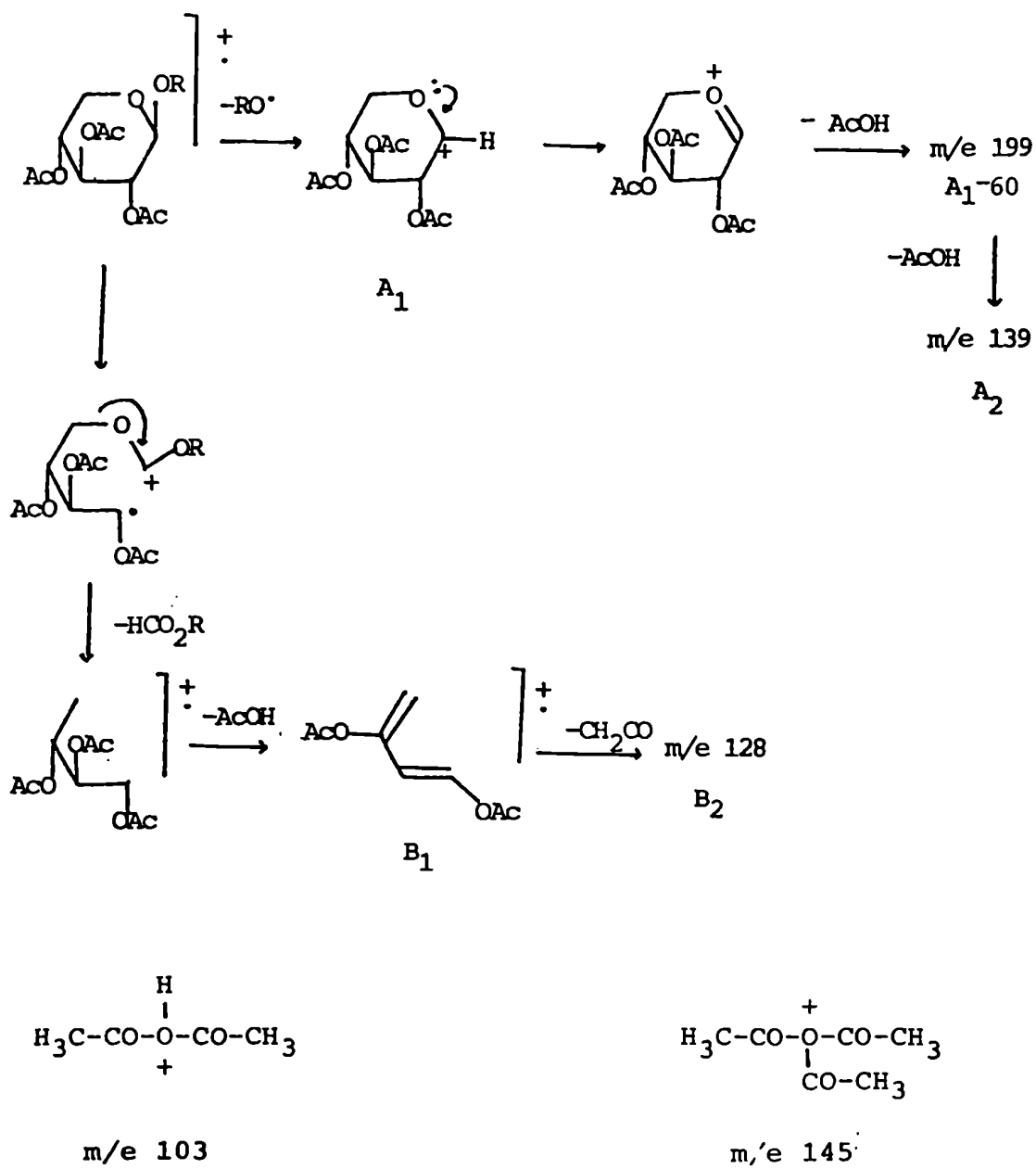


Figura 70

El espectro de ^1H -RMN (Fig.70) de este glicósido de esteroil acetilado(Xb) muestra a campos altos los picos característicos de una cadena lateral igual al colesterol con un sustituyente etilo en C-24¹¹².

Estas señales comprenden un singulete de Me-18 a 0,68 ppm, un doblete para los metilos equivalentes 26 y 27 a 0,83 ppm con $J=7$ Hz, un triplete de Me-29 centrado a 0,84 ppm con $J=6,7$ Hz, un doblete de Me-21 a 0,92 ppm con $J=3$ Hz y finalmente un singulete de Me-19 a 0,99 ppm.

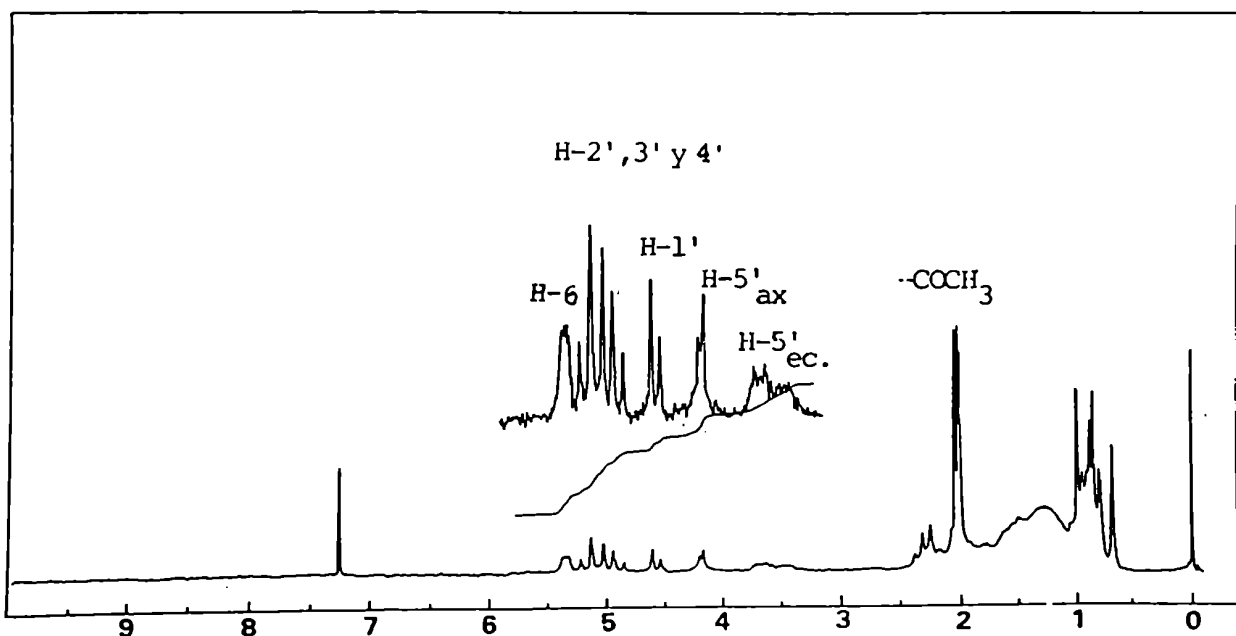


Figura 70

Tanto el diastereoisómero con configuración R en C-24 como el S, presentan las mismas señales, siendo la única diferencia observable la intensidad relativa de las señales de Me-26 y 27, y de Me-29. Como estas diferencias pueden ocurrir en diferentes corridas del mismo material, por uso de diferentes instrumentos, operadores o condiciones experimentales, este método espectroscópi

co no es determinante respecto de la configuración de C-24 (ver capítulo II, pág. 45).

Estos isómeros sólo son distinguibles mediante el uso de reactivos de desplazamiento¹²² o mediante el uso de espectrómetros de 220 MHz^{123,124,195,196} (ver capítulo II, pág. 48 y 51).

En el espectro de ¹H-RMN a 100 MHz del compuesto Xb se observan, además de las mencionadas, las señales correspondientes a tres acetilos que aparecen a 1,98; 2,00 y 2,03 ppm. A 3,48 ppm se centra un multiplete que integra para un hidrógeno que puede adjudicarse al hidrógeno de C-3 de un esteroide y la última señal perteneciente al núcleo esteroide se ubica a 5,35 ppm como un multiplete que integra para un hidrógeno y que coincide con la del H-6 de un Δ^5 -esteroide.

En la zona de 4-5 ppm se observa también un grupo de señales difíciles de asignar debido a la superposición de las mismas y que corresponden a los hidrógenos de una pentosa acetilada.

Para facilitar la asignación de estas señales se realizaron experimentos de doble resonancia (Fig. 71 y 72).

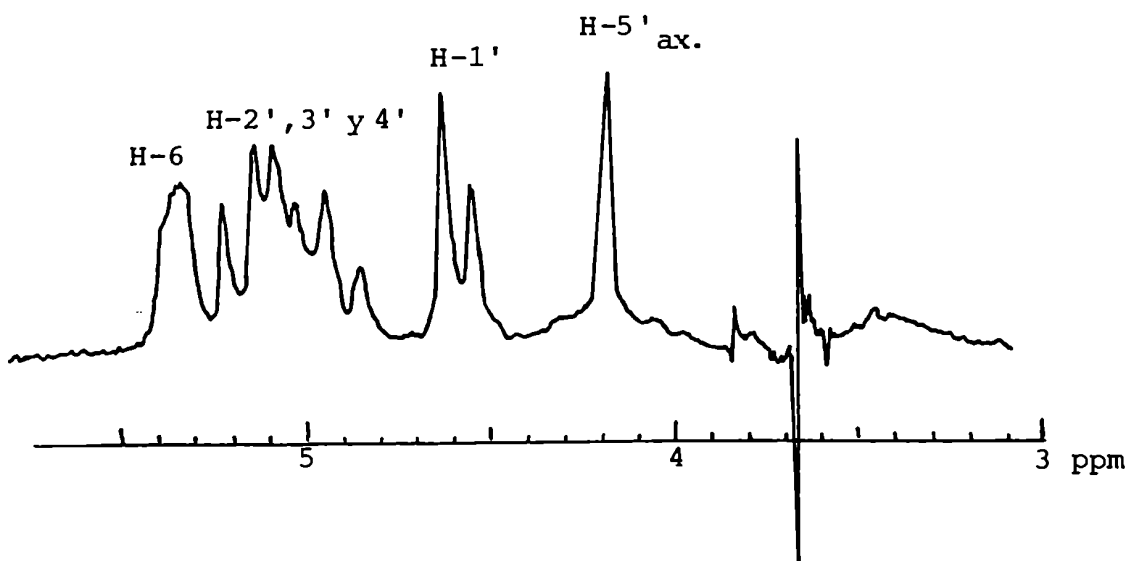


Figura 71

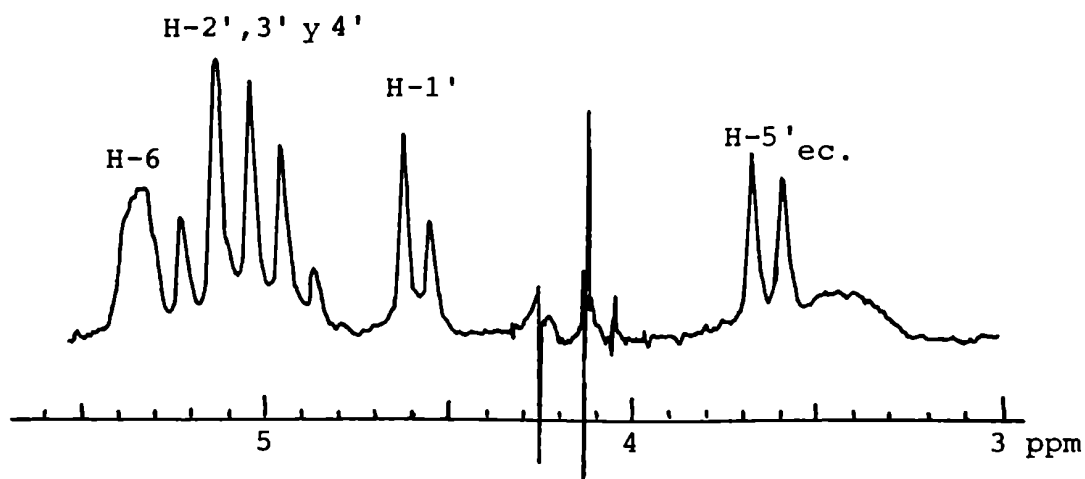


Figura 72

Del análisis de éstos se deduce que la señal del H-4' aparece como un multiplete superpuesto con las de H-2' y H-3', en la zona de 4,8-5,3 ppm y que las señales que aparecen a 4,19 y 3,71 ppm corresponden respectivamente a los H-5' ecuatorial y H-5' axial.

La señal del H-1' se presenta como un doblete centrado a 4,56 ppm con $J_{1',2'}=8$ Hz, lo que evidencia una relación axial-axial entre los hidrógenos involucrados. La señal a 4,94 ppm es adjudicable al H-2' mientras que la que aparece a 5,12 ppm lo es al H-3'. Ambas aparecen como triplete de $J=8$ Hz. Esto, nuevamente, indica una relación axial-axial entre todos los hidrógenos considerados.

Debido a que los valores de los desplazamientos químicos obtenidos para los H-4', H-5' ec y H-5' ax indican sin ambigüedad que la pentosa se encuentra en forma piranósica (ver capítulo II, pág. 55) y a la relación axial-axial entre todos los hidrógenos del azúcar, puede elucidarse la estructura del mismo como la de una xilosa piranósica cuya unión glicosídica es β . Hecho corroborado por la comparación de los valores de desplazamientos químicos obtenidos con los informados en literatura¹³⁴ para metil β -D-xilopiranosido peracetilado (Tabla 14).

	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5' _{ec}	H-5' _{ax}
Cita 134	4,51	4,83	5,17	4,88	4,06	3,46
Compuesto <u>Xb</u>	4,56	4,94	5,12	4,8-5,3	4,19	3,71

Tabla 14

Sin duda, los datos espectroscópicos que más información brindan sobre la estructura de este compuesto, son los que provienen del análisis del espectro de ^{13}C -RMN.

De este análisis surge claramente cuál es la configuración de C-24 del esteroide, ya que los valores de ambos diastereoisómeros (24 S y 24 R) difieren suficientemente como para diferenciarlos^{139,140}.

	Cita 139		<u>Xb</u>	Cita 140	
	<u>89</u>	<u>90</u>		<u>89</u>	<u>90</u>
1	37,31		37,0	37,1	
2	31,57		29,5	31,5	
3	71,69		79,9	71,5	71,4
4	42,25		38,7	42,1	
5	140,75		140,2	140,1	
6	121,59		121,9	121,1	
7	31,92		31,7	31,8	31,7
8	31,92		31,7	31,8	31,7
9	50,17		50,0	49,9	
10	36,51		36,6	36,3	
11	21,11		20,9	21,0	20,0
12	39,81		39,6	39,6	
13	42,33		42,2	42,1	
14	56,79		56,6	56,5	
15	24,32		24,2	24,2	
16	28,26		28,1	28,1	
17	56,11		55,9	55,8	
18	11,87		11,7	11,8	
19	19,40		19,2	19,3	
20	36,17	36,29	36,0	36,0	36,1
21	18,82		18,6	18,7	
22	33,95		34,0	33,8	33,6
23	26,13	26,43	26,0	26,0	26,3
24	45,85	46,07	45,7	45,6	45,8
25	29,18	28,98	29,2	29,0	28,8
26	19,84	19,07	19,6	19,0	18,9*
27	19,07	19,62	18,9	19,7	19,5*
28	23,00		23,0	23,0	22,9
29	12,32		11,8	11,9	12,2

Tabla 15: Desplazamientos químicos de los carbonos de sitosterol 89, clionasterol 90 y Xb.

* Mediante modelos moleculares se observa que la rotación alrededor del enlace entre C-24 y C-25 es restringida, observación avalada por los datos de cristalografía de rayos X de muchos derivados de ergostano¹³⁹ en los que se evidencia que la conformación más estable es aquella que tiene los H-24 y H-25 antiperiplanares. Si predominan estas conformaciones, puede observarse mediante modelos que el carbono del metilo pro-S (C-27) de la serie 24 R, tanto en el conformero a como en el c (Fig.73) es sinclinal con el metileno de C-28, es decir, existe un efecto γ -gauche entre el C-27 y el sustituyente de C-24. Este efecto no existe para el C-26 por lo cual éste debería aparecer a campos menores. En base a este razonamiento se toma como base para las asignaciones de las señales de estos carbonos las provenientes de la cita 139.

Como puede observarse en la tabla 15 los desplazamientos químicos obtenidos están en franca concordancia con los del isómero 24 a o 24 R.

Las pequeñas diferencias apreciables en los desplazamientos de C-20 y C-24 pueden deberse a que los dos epímeros de C-24 difieren en las poblaciones conformacionales de su cadena lateral. El conformero que tiene los grupos más voluminosos anti zig-zag (Fig 73) es el más estable (a y b); girando el enlace C-22\C-23 de forma tal que el isopropilo (C-25) siga siendo anti a la cadena hidrocarbonada, se genera el próximo isómero favorable en el cual los C-24 y C-20 son gauche (c y d).

Una posible explicación para el desplazamiento que sufren los C-20 y C-24 en la serie R puede adjudicarse a la interacción 1,3 entre el C-20 y el sustituyente en C-24.

Esta interacción en el caso de la serie R corresponde a un efecto γ gauche que sería el responsable del corrimiento a campos mayores de las señales de estos carbonos¹⁹⁷⁻²⁰⁰.

Como es conocido, existe un corrimiento de las señales de los C-2, C-3 y C-4 del colesterol al producirse la glucosidación²⁰¹

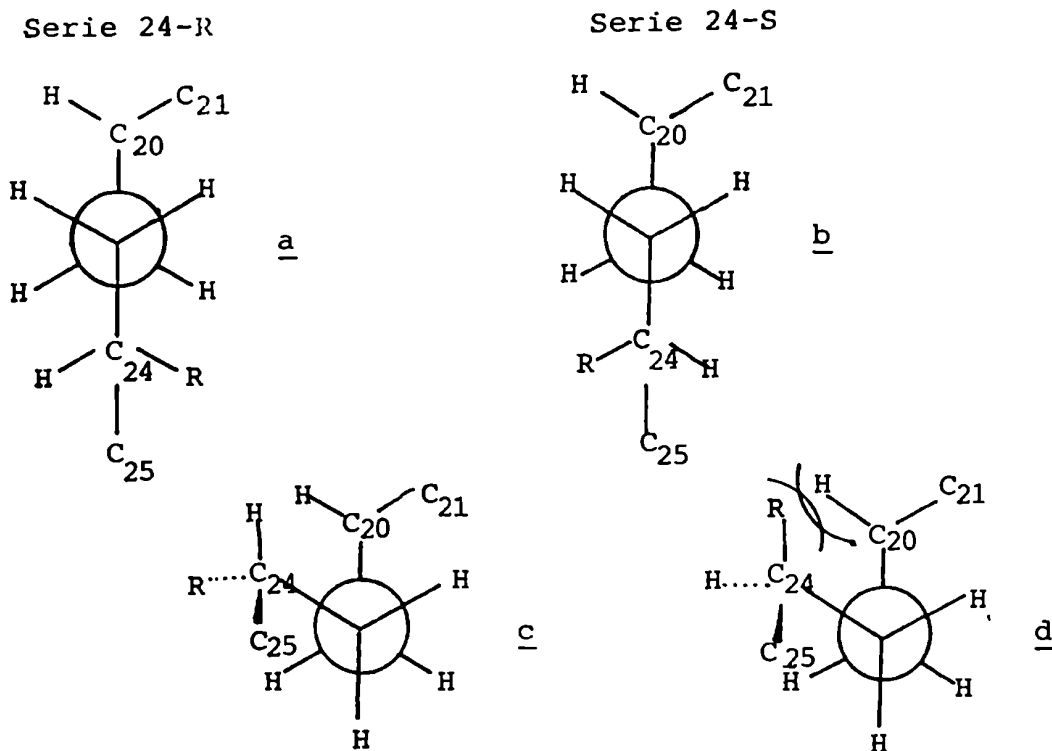


Figura 73

En caso de que la unión glucosídica sea β y que el glicósido se encuentre acetilado (76 a) la variación de los desplazamientos químicos ($\Delta\delta_1$), cuando los espectros se realizan en Cl_3CD , son las que figuran en la tabla 16, donde también se incluyen las diferencias de desplazamiento ($\Delta\delta_2$) obtenidas para el compuesto Xb.

$$\Delta\delta = \delta(\text{glicósido acetilado del alcohol}) - \delta(\text{alcohol})$$

	Cita 201	Este trabajo
	$\Delta\delta_1$ (ppm)	$\Delta\delta_2$ (ppm)
C-3	+8,1	+8,3
C-2	-2,6	-2,1
C-4	-3,7	-3,5

Tabla 16

El análisis del espectro de ^{13}C -RMN da información muy importante, también, sobre la estructura del azúcar glicosidado, que en el compuesto Xb se encuentra acetilado.

Una vez localizado el C-1, fácilmente asignable ya que es la única señal que aparece alrededor de 90-100 ppm, se observan otras cuatro señales que se encuentran entre 62 y 72 ppm.

Esto indica que la pentosa en cuestión está en forma piranósica, ya que el C-4 de las aldopentofuranosas acetiladas resuena entre 75 y 83 ppm²⁰³ (ver capítulo II, pág. 59).

Por comparación con los datos existentes en literatura ^{149,203} los únicos valores que se adecuan son los correspondientes al derivado de xilosa y en particular a los de la β -metil-xilopiranosa acetilada (Tabla 17)

Configuración del metil glicósido acetilado	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'
<u>Xb</u>	99,5	71,4 [#]	71,6 [#]	68,6	61,9
β -D-xilo ²⁰³	101,6	70,8	71,6	69,0	62,0
β -D-xilo ¹⁴⁹	100,95	70,21	70,99	68,32	61,30
α -D-xilo	96,40	70,46	69,10	68,77	57,66
β -D-arabino	97,62	68,43	69,28	67,20	60,25
α -D-arabino	101,91	69,28	70,38	67,92	63,24
α -D-lixo	98,41	69,26	68,23	66,57	59,42
β -D-ribo	99,37	68,31	65,97	66,68	61,09
α -D-ribo	97,49	67,52	67,39	66,09	57,91

[#] Estas asignaciones pueden ser intercambiadas.

Tabla 17

Se observa un desplazamiento respecto del valor esperado para el C-1 debido al efecto de la distinta glicosidación.

Si se define la variación de desplazamientos químicos de la siguiente forma:

$\Delta\delta = \delta(\text{glicósido acetilado del alcohol}) - \delta(\text{metil glicósido acetilado})$
considerando los valores informados en la cita 149, se obtiene pa-

ra el glicósido Xb, $\Delta\delta = -1,4$, mientras que haciendo la diferencia respecto de los valores de la cita 203 el $\Delta\delta$ obtenido es $-2,1$.

Se observó, además, que el desplazamiento que ocurre al comparar el colesterol-3-O- β -D-glucopiranosido acetilado ($\Delta\delta_1$) con el metil glucopiranosido acetilado es de $\Delta\delta = -2,1$ ppm.²⁰¹ Como se puede apreciar estos valores son comparables.

Si se asume, como es de esperar, que los resultados obtenidos en el análisis del glucósido de colesterol son aplicables al caso del compuesto Xb, el valor de desplazamiento químico del C-1 de este último glicósido debería ser, si fuera α , de 93,9 ppm, ya que el valor de $\Delta\delta$ en ese caso sería de $-2,5$ ppm.

Finalmente, se llevó a cabo la hidrólisis ácida del compuesto Xb, obteniéndose como producto de la misma sitosterol y xilosa. El primero de éstos se analizó por CGL contra testigos en columna capilar SP-2100 y el segundo como su alditol acetilado en columna ECNSS.

Adicionalmente se confirmó que la unión glicosídica es β , mediante la regla de Klyne²⁰⁴.

Esta regla se basa en la hipótesis de asumir que la rotación molecular de un compuesto es igual a la sumatoria de las rotaciones moleculares de cada una de las partes del mismo. Definiéndose como rotación molecular (M_D):

$$M_D = \frac{D \cdot PM}{100}$$

Evidentemente, con este método se obtiene un valor aproximado ya que como sólo involucra la aditividad de cierto parámetro no considera posibles cambios conformacionales que pueden producirse al pasar de un metil glicósido a un glicósido con una aglicona más compleja.

Teniendo en cuenta esta regla, y en base a los datos que figuran en la tabla 18 se calcularon las siguientes rotaciones moleculares²⁰⁵

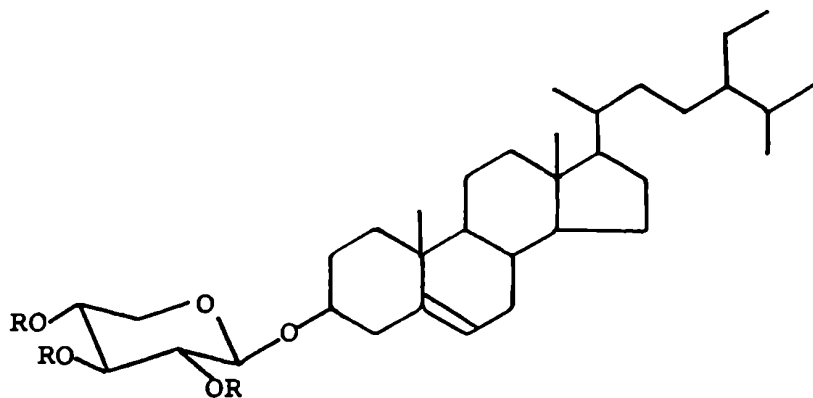
	M_D
Sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido acetilado	-329,5
Sitosterol-3-O- α -D-xilopiranosido acetilado	+193,4

	D	M _D
Metil- α -D-xilopiranosido acetilado	+119,5	+346,5
Metil- β -D-xilopiranosido acetilado	-60,8	-176,3
Sitosterol	-37	-153,2

Tabla 18: Datos de α_D medidos en Cl_3CH a 20°C y a $\lambda=5893 \text{ \AA}$ y las correspondientes rotaciones moleculares (M_D).

El valor de M_D calculado para el glicósido β se encuentra más cercano al hallado experimentalmente, confirmándose también mediante este método los resultados obtenidos a partir de datos espectroscópicos.

Todos los datos y conclusiones discutidas anteriormente indican claramente que el compuesto Xb es sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido acetilado, siendo el producto natural (X) el no acetilado. Este compuesto no había sido descrito en la literatura con anterioridad a este trabajo.



X R = H

Xb R = Ac

Sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranósido XI

Este compuesto, como se detalló anteriormente, fue separado por metilación de una fracción que estaba constituida por una mezcla de glicósido de esteroides, obteniéndose el glicósido metilado

do XIa. Posteriormente, fue purificado cromatográficamente, previa acetilación, aislándose el compuesto XIb.

Se realizó la reducción del compuesto XIb con H_4AlLi en THF. Posteriormente se hidrolizó el producto reducido en medio ácido, obteniéndose ribosa y sitosterol. La primera se identificó como su alditol acetilado (ribitol) por CGL con columna ECNSS y el segundo con columna capilar SP-2100.

El espectro de 1H -RMN del compuesto XIb (Fig. 74) muestra una gran analogía con el del compuesto Xb.

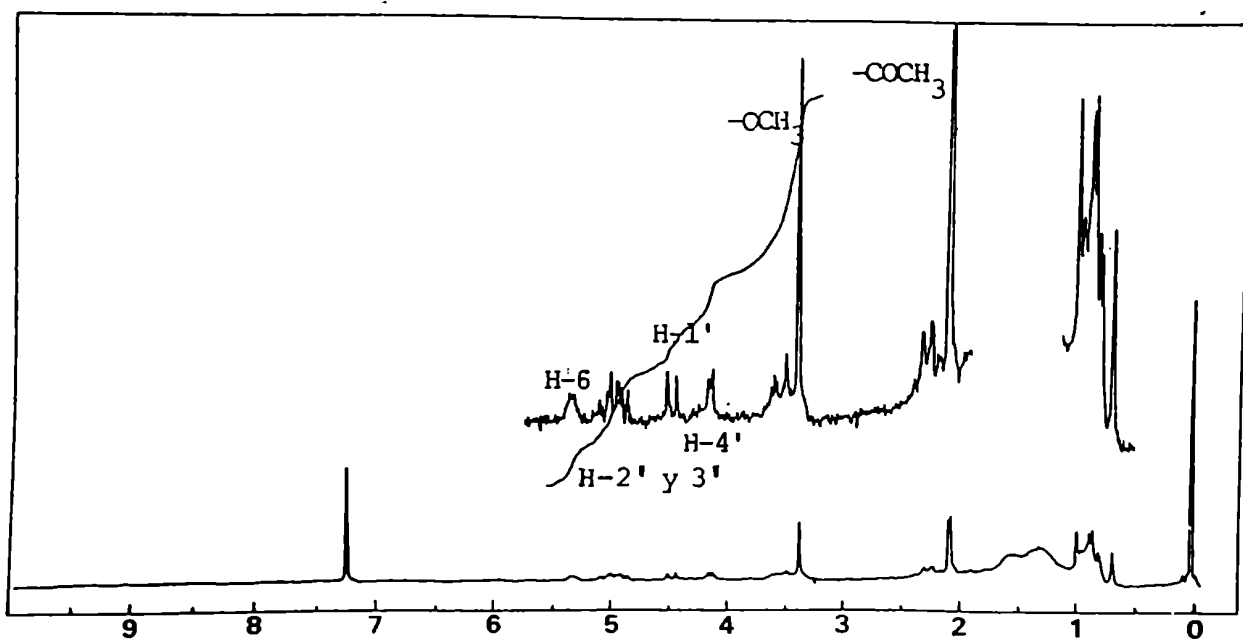


Figura 74

Se observa el mismo patrón de señales en la zona de $\delta < 1$ lo que nuevamente indica una cadena lateral como la del colesterol con un sustituyente etilo en el C-24. Debido a las razones antes detalladas, este método espectroscópico no permite determinar la configuración de dicho carbono¹¹².

La diferencia más evidente entre los espectros de Xb y XIb reside en la zona de 2-3 ppm, ya que en este caso sólo se ob-

servan dos señales correspondientes a acetilos a 2,09 y 2,10 ppm; observándose también a 3,39 ppm un singulete atribuible al metilo de un éster metílico.

Con respecto a las señales del hidrato de carbono se aprecian sólo cuatro en la zona de 4-5 ppm, que es en donde aparecen los hidrógenos de los azúcares acetilados.

Esto corroboraría la hipótesis de que se trata de un ácido urónico de una pentofuranosa. Dicha hipótesis es planteada por la existencia de sólo dos acetilos y un metilo de éster.

En literatura solamente se encontraron datos correspondientes a los metil glicósidos de riburonato de metilo trimetilsililado²⁰⁶. Estos valores son: $^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, Cl_3CD) ppm: 3,40 (s, $-\text{OCH}_3$ anómero β); 3,49 (s, $-\text{OCH}_3$ anómero α); 3,78 (s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 4,04 (d, $J_{2,3}=4$ Hz, H-2 o H-3); 4,46 (s, H-4); 4,52 (d, $J_{2,3}=4$ Hz, H-2 o H-3); 4,91 (s, H-1 anóm. β); 5,04 (d, $J_{1,2}=5$ Hz anóm. α).

También se encontraron los datos correspondientes a las pentofuranosas peracetiladas²⁰² (ver capítulo II, pág. 59).

Como consecuencia del análisis del espectro de $^1\text{H-RMN}$ realizado en base a los desplazamientos químicos de cada señal, se obtuvieron las siguientes asignaciones: el hidrógeno anomérico se presenta como un doblete a 4,50 ppm con un $J_{1,2}=7,5$ Hz; este valor de constante de acoplamiento indica una unión glicosídica α ²⁰⁷, ya que los valores para unión β son menores que 0,5 Hz.²⁰⁸

La otra señal que tuviera entre sus constantes una de esa magnitud correspondería al H-2'. Por esta causa se asignó como tal a la de 5,05 ppm que se aprecia como un doblete cuyas constantes de acoplamiento son $J_{1,2}=7,5$ Hz y $J_{2,3}=10$ Hz.

A 4,16 ppm se observa un doblete con $J=5$ Hz, que por aparecer a campos tan altos y estar sólo acoplado con otro hidrógeno, se lo asignó al H-4'.

Finalmente, la señal que, por los datos antes mencionados, debía aparecer como un doblete de $J_{2,3}=10$ Hz y $J_{3,4}=5$ Hz, atribuible al H-3', se observó a 4,97 ppm.

Los desplazamientos químicos de estas señales no son de un gran valor diagnóstico respecto de la estructura del azúcar, pe

ro sí lo son, las constantes de acoplamiento observadas.

A partir de éstas puede determinarse aproximadamente la conformación preferida en la que se encuentra la ribosa.

Existen vinculaciones entre la constantes de acoplamiento observadas y el rango de ángulos diedros que forman los hidrógenos de dos carbonos contiguos. Una aproximación es la que se muestra en la tabla 19^{207,209,210}.

J (Hz)	rango de ángulos diedros (°)
-0	80-100
-2	50-70, 110-130
-5	30-50, 130-150
-7	20-40, 140-160
>8	0-20, 160-180

Tabla 19

En función de las constantes medidas empíricamente pueden hacerse las siguientes presunciones aproximadas: el valor tan alto de $J_{2',3'}$ evidencia un ángulo diedro de $\sim 0^\circ$ ya que los H-2' y 3' de la ribosa son cis; el valor de $J_{3',4'} = 5$ Hz ubicaría al ángulo diedro involucrado entre los rangos de $30-50^\circ$ y $130-150^\circ$, por ser los H-3' y 4' trans el rango correspondiente sería de $130-150^\circ$.

En la constante de acoplamiento entre los H-1' y H-2' hay que tener en cuenta el efecto que tiene sobre ésta el hecho de poseer el C-1' dos sustituyentes oxigenados.

Existen ecuaciones más o menos exactas en las cuales se considera la influencia de las electronegatividades de los sustituyentes sobre el valor de la constante de acoplamiento, como la siguiente²¹¹:

$$J = J^\circ (1 - y \Delta x)$$

siendo y una constante que toma distintos valores según que el acoplamiento sea cis, trans o exista un metilo terminal, y Δx es la diferencia de electronegatividades entre el sustituyente y el hidrógeno.

Este tipo de ecuación no es fácilmente aplicable a este caso particular pero sí puede tomarse en cuenta esta influencia

mediante una aproximación.

Se observaron²⁰⁷ las diferencias que existían en un azúcar entre sus $J_{1,2}$ y $J_{4,5}$ cuando el ángulo diedro formado en cada caso es semejante y se llegó a la conclusión que una corrección adecuada para $J_{1,2}$ sería sumarle 1,5 Hz.

Aunque es razonable esperar que el valor de este término de corrección no sea independiente del ángulo formado, es de notar, que estudios realizados con una serie de hexaclorobiciclo[2,2,1]heptenos con un sustituyente de electronegatividad variable²¹², corroboró que la variación es pequeña.

Por consiguiente, al aplicar esta corrección en este caso, el J a considerar sería de 9 Hz ($J_{1,2} = 7,5 + 1,5$).

Según los valores presentados en la tabla 19 el rango de ángulos que corresponderían a ese J sería 0-20° ya que la unión glicosídica implicada es α .

En literatura se detallan²⁰⁹ los ángulos diedros aproximados para las veinte conformaciones simétricas posibles para β -ribofuranósidos. En la tabla 20 figuran los correspondientes a α -ribofuranósidos.

Conformación	H_1-H_2	H_2-H_3	H_3-H_4
E_1	50	30	120
2T_1	60	50	100
2E	50	50	90
2T_3	50	60	90
E_3	30	50	70
4T_3	20	50	60
4E	0	30	70
4T_0	20	20	50
E_0	30	0	90
1T_0	50	20	100
1E	50	30	120
1T_2	60	50	140
E_2	50	50	150
3T_2	50	60	170

Continuación de la tabla 20

Conformación	H ₁ -H ₂	H ₂ -H ₃	H ₃ -H ₄
² E	30	50	170
³ T ₄	20	50	180
E ₄	0	30	170
⁰ T ₄	20	20	170
⁰ E	30	0	150
⁰ T ₁	50	30	150

Tabla 20: ángulos diedros entre los hidrógenos considerados, para las veinte conformaciones simétricas posibles de α -ribofuranósidos. Los símbolos T y E designan respectivamente las conformaciones torcidas (Twist) y sobre (Envelope), los supraíndices indican el átomo desplazado sobre el plano de referencia definido por los átomos restantes del anillo y el subíndice indica el átomo que está por debajo del mismo.

Considerando el rango amplio de 0-20° para el ángulo formado entre los H-2' y 3' (ya que debido al valor tan grande de la correspondiente constante de acoplamiento es de esperar que sea $\sim 0^\circ$), vemos que para el caso de tratarse de un α -ribofuranósido las conformaciones posibles son ⁴T₀, E₀, ¹T₀, ⁰T₄ y ⁰E. De éstas se descartan ⁴T₀, E₀, ¹T₀ y ⁰T₄ por no tener el ángulo formado por los H₃-H₄ el rango requerido.

Por último, la única conformación que se adecua a los J observados sería ⁰E.

Puede tenerse una idea más cercana de los ángulos comprometidos mediante la aplicación de la ecuación de Karplus²¹¹.

$$\begin{aligned}
 J &= k_1 \cos^2 \phi - C & 0^\circ \leq \phi < 90^\circ & & k_1 &= 8,5 \text{ Hz} & C &= 0,28 \text{ Hz} \\
 J &= k_2 \cos^2 \phi - C & 90^\circ \leq \phi < 180^\circ & & k_2 &= 9,5 \text{ Hz} & C &= 0,28 \text{ Hz}
 \end{aligned}$$

Los valores de las constantes k_1 , k_2 y C son variables, ya que se demostró la modificación de los mismos para distintas estructuras²¹³, como se evidencia en el caso que la constante de acoplamiento observada sea superior al máximo deducible a partir de estas ecuaciones y que es $J_{\text{máx.}} = 9,2 \text{ Hz}$.

Aunque en general k_2 es mayor que k_1 , puede considerarse una buena aproximación, si se desconocen los valores de las constantes, la siguiente: $k_1=k_2$, $C=0$.

Al tomar $C=0,28$ Hz se deduce que el J esperado para un ángulo diedro de 90° sería $-0,28$ Hz, pero cálculos mediante orbitales moleculares difieren respecto de esta predicción ya que el valor obtenido para J_{90° es de $+0,2$ Hz²¹⁴. Por esta razón, se prefiere tomar como parámetro intermedio $C=0$ Hz.

Si por los razonamientos anteriores se considera el ángulo que forman los H-2' y 3' de aproximadamente 0° , se deduce de esta ecuación aproximada que $k_1=k_2=10$ Hz. Este valor obtenido es bastante coincidente con los informados para otros sistemas²¹⁶.

A partir de estos datos pueden calcularse los ángulos diedros que forman los H-3'/H-4' y H-1'/H-2'.

Como la ecuación a utilizar es la siguiente:

$$\phi = \arcsin \left(\pm \sqrt{\frac{J}{k}} \right); \phi: \text{ángulo diedro}$$

se obtienen dos ángulos posibles que provienen de asignarle signos positivos y negativos a la raíz cuadrada.

En el caso de $\phi_{3',4'}$, se obtienen los siguientes valores $\phi_{3',4'}=45^\circ$; $\phi_{3',4'}=135^\circ$.

Pero de la tabla 20 se observa que el valor correspondiente a la conformación E_0 es 135° .

En el caso de $\phi_{1',2'}$, los ángulos que se calculan son $\phi_{1',2'}=18^\circ$; $\phi_{1',2'}=161^\circ$. Nuevamente, de la tabla 20 se deduce que el adecuado es $\phi_{1',2'}=18^\circ$.

A partir de estos datos puede obtenerse una idea más cercana del grado de plegamiento de la molécula y por consiguiente de los ángulos internos de la misma.

Para esto es necesario considerar un pentágono regular cuyos vértices serían 0,1,2,3 y 4 (Fig. 75) en el cual los puntos 1 y 4 son los únicos que se mueven respecto del plano generado por los otros tres²¹⁶. Las coordenadas están definidas como muestra la figura 75 y están expresadas en función de los lados del pentágono (como fracciones de enlaces C-C), que se suponen constantes para los

distintos plegamientos del mismo.

Se eligieron los ángulos internos de forma tal que la distribución fuese lo más simple posible. La que resultó ser más adecuada para considerar las conformaciones simétricas antes mencionadas, fue aquélla en la que los ángulos en los puntos 2 y 3 eran iguales entre sí (α), así como los de los puntos 4, 0 y 1 (β).

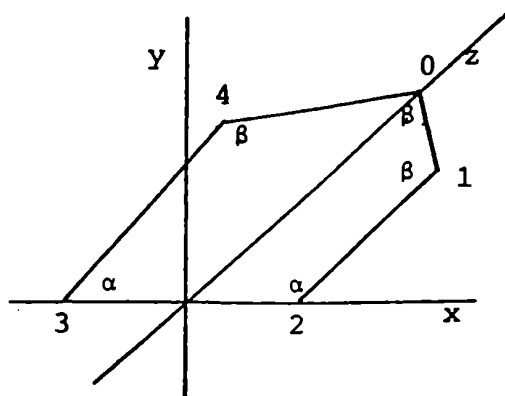


Figura 75

Las coordenadas de cada punto están relacionadas de la siguiente manera:

$$\begin{array}{lll} x_2 = -x_3 & x_1 = -x_4 & x_0 = 0 \\ y_3 = y_2 = 0 & y_1 = y_4 & \\ z_2 = z_3 = z_0 = 0 & z_1 = -z_4 & \end{array}$$

En esta última ecuación el signo positivo define las conformaciones E y el negativo las T.

El grado de plegamiento está así definido como la altura a la que se ubica el punto 1 por sobre el plano generado por los puntos 0, 2 y 3, es decir, el valor de z_1 . En función de este valor (z_1), pueden expresarse las restantes variables desconocidas (x_1 , y_1 , y_0 , α y β).

Al ángulo diedro que se mira a lo largo de la línea mn se lo llama ω_{mn} (no es el ángulo diedro que forman los hidrógenos, sino los átomos que están involucrados en el pentágono).

En las conformaciones E los puntos 1, 2, 3 y 4 son copla

nares y 0 sale fuera de este plano. Se define al ángulo de plegamiento θ al formado por los planos 1,2,3,4 y 4,0,1. En este tipo de conformaciones (E) es $\omega_{23}=0$.

En las tablas 21 y 22 se detallan estos parámetros para los dos tipos de conformaciones simétricas en función del grado de plegamiento.

z_1	θ°	ω_{12}°	ω_{01}°	α°	β°
0	0	0	0	108	108
0,1058	16,58	10,2	16,5	107,77	107,22
0,1575	24,70	15,1	24,55	107,46	106,22
0,2278	35,58	21,6	35,1	106,86	104,37
0,2802	43,57	26,2	42,7	106,26	102,52
0,3237	50,13	29,9	48,8	105,67	100,70
0,3616	55,78	33,0	53,9	105,07	98,93
0,3953	60,77	35,6	58,4	104,48	97,18
0,4259	65,32	37,9	62,4	103,89	95,46
0,4540	69,43	39,9	65,9	103,30	93,77
0,4800	73,25	41,7	69,2	102,71	92,11
0,5043	76,78	43,3	72,15	102,12	90,47

Tabla 21: Ángulos internos (α y β) y diedros ω en función del grado de plegamiento (z_1, θ) para conformaciones E.

z_1	ω_{23}°	ω_{12}°	ω_{01}°	α°	β°
0	0	0	0	108	108
0,1200	14,5	11,8	4,6	107,38	107,76
0,1786	21,5	17,6	6,65	106,62	107,76
0,2567	30,85	25,4	9,6	105,12	106,86
0,3130	37,6	31,1	11,7	103,64	106,26
0,3589	43,1	35,9	13,5	102,21	105,67
0,3973	47,7	39,9	15,0	100,78	105,08
0,4309	51,8	43,5	16,3	99,37	104,48
0,4602	55,4	46,7	17,6	97,99	103,89
0,4863	58,6	49,6	18,6	96,62	103,30
0,5098	61,6	52,4	19,5	95,26	102,71

Continuación de la tabla 22

z_1	ω_{23}°	ω_{12}°	ω_{01}°	α°	β°
0,5500	66,8	57,3	21,3	92,60	101,53
0,5833	71,4	61,6	22,7	01,0	100,37

Tabla 22 : ángulos internos (α y β) y diedros (ω) de un pentágono en función del grado de plegamiento (z_1) para conformaciones T.

Para utilizar los valores de estas tablas debemos transformar nuestros datos de ángulos diedros entre hidrógenos (ϕ) a los correspondientes ω_{mn} , teniendo en cuenta la relación que existe entre ambos parámetros, como se indica en la figura 76.

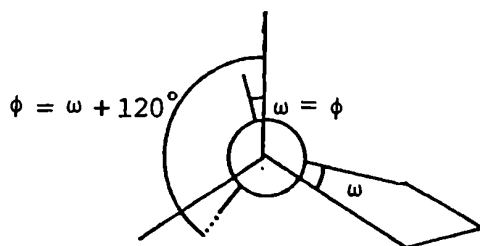


Figura 76

Haciendo este análisis para el compuesto XIb se obtienen los siguientes resultados:

$$\phi_{1',2'} = 18^\circ = \omega_{12} \quad \phi_{3',4'} = 135^\circ \quad \omega_{34} = 15^\circ \quad \phi_{2',3'} = \omega_{23} = 0^\circ$$

En todas estas conformaciones simétricas los valores de ω_{12} y ω_{34} deben ser iguales. Por consiguiente, los valores semejantes obtenidos en este caso justifican las aproximaciones realizadas. Si tomamos como valor de ω_{12} el promedio entre estos, es decir, $\omega_{12} = 16,5^\circ$ y para $\omega_{23} = 0^\circ$ vemos que sólo las conformaciones E que tienen un ángulo de plegamiento θ entre 24 y 35° cumplen con estos valores calculados.

Como se ve en el caso de conformaciones T los ángulos ω_{12} son menores que los correspondientes ω_{23} por lo cual estas conformaciones pueden ser desechadas para este caso. Si se toma como valor de $\omega_{23} = \phi_{2',3'} = 14,5^\circ$ y se aplica Karplus para despejar el

valor de k , y este valor de k ($k=10,72$ Hz) se utilizara para averiguar el valor de $\phi_{1',2'}$ y $\phi_{3',4'}$, se obtendría para el primero una asignación de $\phi_{1',2'} = \omega_{12} = 24^\circ$ y para $\phi_{3',4'} = 133^\circ$, es decir, $\omega_{34} = 13^\circ$ (haciendo la aproximación $k_1=k_2=k$; si se tomara un valor mayor para k_2 , $\phi_{3',4'}$ se haría más pequeño).

Estos resultados confirman las conclusiones antes realizadas.

Por consiguiente, se concluye que el azúcar del glicósido XIb se encuentra en una conformación sobre (E) con los cuatro átomos de carbono del ciclo en un plano y el oxígeno del acetal por sobre este plano, a una distancia $z_1 = 0,3$ Å. El ángulo de torsión θ es de 27° y los ángulos internos definidos como α y β son de $107,0$ y $106,7^\circ$, respectivamente.

El análisis del espectro de ^{13}C -RMN del compuesto XIb da información clave respecto de la aglicona, al igual que en el caso del compuesto Xb.

Se observan las señales de veintinueve carbonos coincidentes con las existentes en literatura para colesterol sustituido con un etilo en C-24. Observando las señales de los carbonos que permiten diferenciar ambos diasterómeros (Tabla 23) se identifica a la aglicona como el isómero 24 R, sitosterol.^{139,140}

	Cita 139		<u>XIb</u>	Cita 140	
	<u>89</u>	<u>90</u>		<u>89</u>	<u>90</u>
C-20	36,17	36,29	36,0	36,0	36,1
C-22		33,95	33,8	33,8	33,6
C-23	26,13	26,43	26,0	26,0	26,3
C-24	45,85	46,07	45,7	45,6	45,8
C-25	29,18	28,98	29,1	29,0	28,8
C-26	19,84	19,07	19,7	19,0	18,9*
C-27	19,07	19,62	18,9	19,7	19,5*
C-28		23,09	23,0	23,0	22,9
C-29		12,32	11,9	11,9	12,2

Tabla 23: Desplazamientos químicos de los carbonos de XIb que permiten la diferenciación entre sitosterol (89) y clionasterol (90).

* Caben las mismas consideraciones que las realizadas en la pág.107.

Nuevamente se observan variaciones, respectos de las esperadas para sitosterol, en los campos a los que aparecen las señales de los C-2, C-3 y C-4. Estos corrimientos ($\Delta\delta_3 = \delta_{\text{glicósido}} - \delta_{\text{aglicona}}$) producidos por el efecto de glicosidación se detallan en la Tabla 24. En la misma se pueden comparar éstos con los informados para el colesterol-3-O- α -glucospiranosido peracetilado²⁰¹ ($\Delta\delta_1$)

	Sitosterol <u>89</u>	<u>XIb</u>	$\Delta\delta_3$	$\Delta\delta_1$
C-2	31,5	28,2	-3,3	-3,9
C-3	71,6	79,8	+8,2	+7,3
C-4	42,2	39,7	-2,5	-2,6

Tabla 24

Respecto del azúcar, la información que se obtiene mediante este método espectroscópico también es de alto valor diagnóstico.

Se observan cuatro señales adjudicables a esta porción de la molécula, que aparecen a 99,8; 81,1; 71,9 y 69,0 ppm. La quinta señal correspondiente al C-5', que se encuentra como carboxilato de metilo, aparece en la zona de los carbonilos.

Al no encontrarse en literatura datos de ¹³C-RMN de pentofuranósidos urónicos acetilados, ni de metil glicósidos de pentofuranosas acetiladas ni libres (con excepción del metil- β -D-ribofuranósido²¹⁷), se intentó hacer un cálculo aproximado utilizando los ya existentes.

La información disponible, se refiere sólo a las pentofuranosas libres²¹⁷ o peracetiladas²⁰². A partir de estos últimos datos (A) y de los existentes para pentopiranosas acetiladas¹⁴⁹ (B) y sus metil glicósidos¹⁴⁹ (C) se calcularon los desplazamientos químicos aproximados a los que deberían aparecer los carbonos de los metil glicósidos acetilados de los correspondientes pentofuranósidos (D).

También se calcularon las variaciones de desplazamiento químico de los C-1, 2, 3, 4 y 5 al pasar del α - o β -metil glucopiranosido (G) al respectivo anómero del metil glicósido del glucuro

nato de metilo (H).

Analogando los C-1, 2, 4 y 5 de la piranosa a los C-1, 2, 3 y 4 de la furanosa y sumando estas variaciones a los valores obtenidos para los metil glicósidos acetilados de las pentofuranosas, se calcularon los δ de los derivados acetilados de los ésteres metílicos de los ácidos urónicos de las pentofuranosas (E).

Finalmente, al carbono anomérico se le hizo la corrección debida al efecto de sustituir el metilo del glicósido por la a glicona (sitosterol) (F).

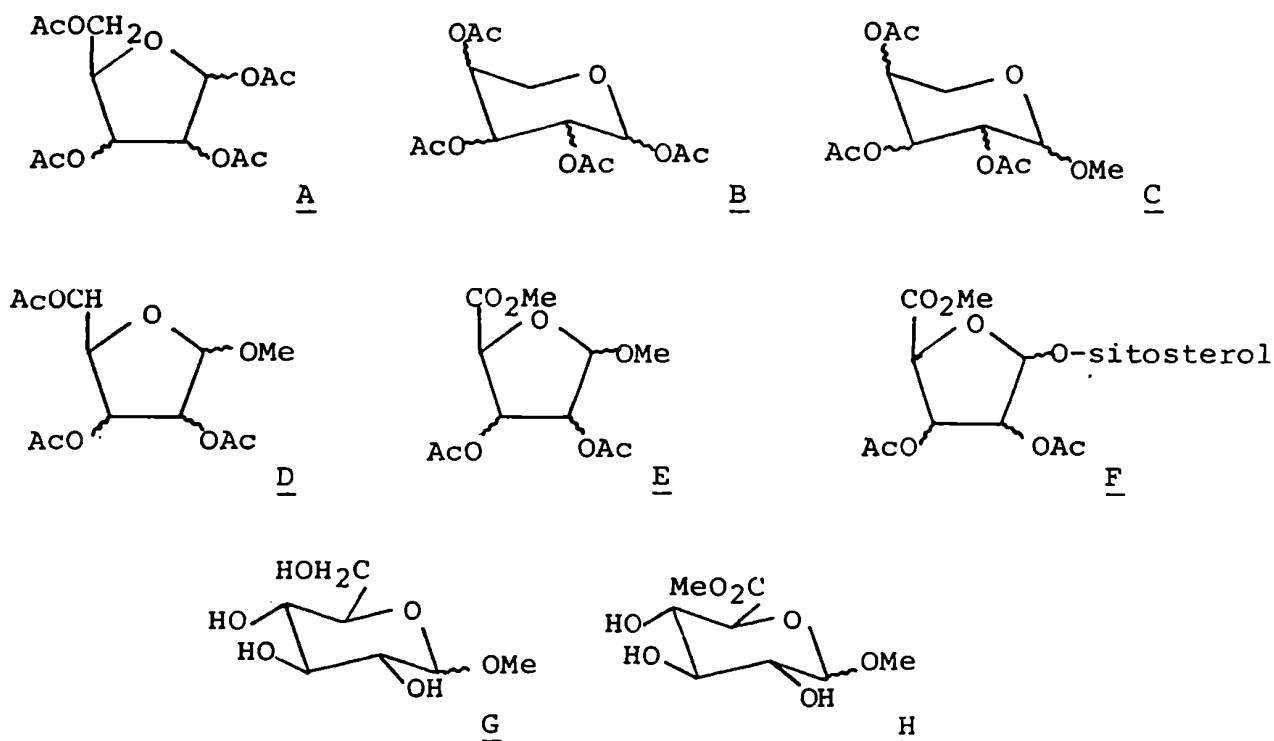
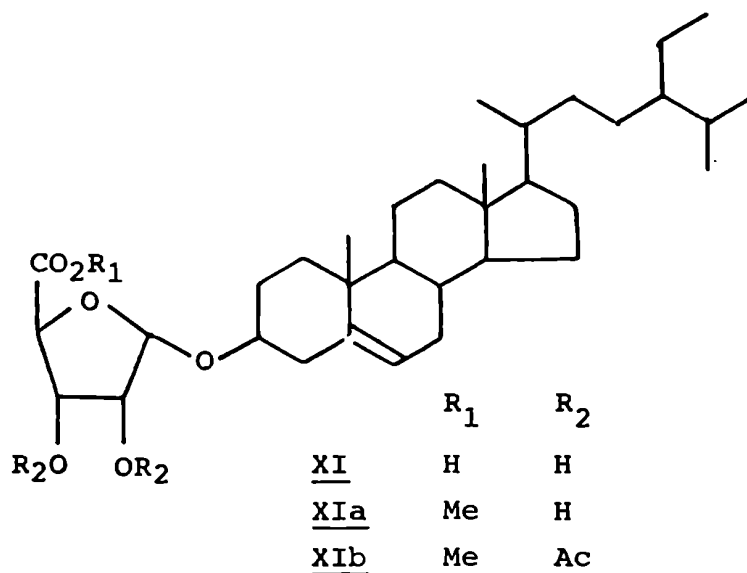


Figura 77

Con un ejemplo numérico puede aclararse la explicación anterior. En la tabla 25 se calculan los desplazamientos químicos para el derivado correspondiente de la α - y β -ribosa.

	Anómero α					Anómero β				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
A	94,1	70,0	69,8	81,6	63,3	98,1	74,1	70,5	79,2	63,6
B	88,7	67,1	65,6	66,5	59,3	90,7	67,1	66,0	66,0	62,4
$\Delta(A \rightarrow B)$	+5,4	+2,9	+4,2	+15,1	+4	+7,4	+7	+4,5	+13,2	+1,2
C	97,5	67,5	67,4	66,1	57,9	99,4	68,3	66,0	66,9	61,1
$D=C+\Delta(A \rightarrow B)$	102,9	70,4	71,6	81,2	61,9	106,8	75,3	70,5	80,1	62,3
$\Delta(G \rightarrow H)$	-0,5	+0,6	-1,8	+0,8	-	-0,3	+0,5	-1,6	+1,2	-
$E=D+\Delta(G \rightarrow H)$	102,4	71,0	69,8	82,0	-	106,5	74,8	68,9	81,3	-
$\Delta(E \rightarrow F)$	-2,5	-	-	-	-	-2,1	-	-	-	-
$F=E+\Delta(E \rightarrow F)$	99,9	71,0	69,8	82,0	-	104,4	74,8	68,9	81,3	-
<u>XIb</u>	99,8	71,9	69,0	81,1	-	99,8	71,9	69,0	81,1	-
$\Delta(F \rightarrow \text{XIb})$	+0,1	-0,9	+0,8	+0,9	-	+4,0	+2,9	-0,1	+0,2	-

Tabla 25: Cálculo de los desplazamientos químicos de los carbonos del azúcar de los anómeros α y β del éster metílico de sitosterol-3-O-riburonofuranósido peracetilado y comparación de éstos con los obtenidos experimentalmente para el compuesto XIb



Los valores de $\Delta(G \rightarrow H)$ se calcularon a partir de los siguientes datos²²⁷:

	Anómero α						Anómero β					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G	100,3	72,5	74,2	70,6	72,7	61,7	104,3	74,2	76,9	70,8	76,9	61,9
H	100,8	71,9	73,7	72,4	71,9	-	104,6	73,7	76,3	72,4	75,7	-
$\Delta(G \rightarrow H)$	-0,5	+0,6	+0,5	-1,8	+0,8	-	-0,3	+0,5	+0,6	-1,6	+1,2	-

Estas diferencias son respecto de una piranosa, para trasladarlos a una furanosa es necesario tener en cuenta la analogía entre los C-1, 2, 4 y 5 y los C-1, 2, 3 y 4 respectivamente.

Sólo se disponían de los datos de ^{13}C -RMN de los glicósidos α y β del glucuronato de metilo (H), por consiguiente, sólo pudieron calcularse los $\Delta\delta$ en estos casos. Como la mayor variación se observa en el carbono α al carboxilato y éste en la serie D tiene la misma configuración (a igualdad de derivados), se tomó como término correctivo para todos los azúcares analizados.

En particular, para el caso de ribosa α y β , todos los carbonos análogos tienen la misma configuración.

De los resultados así obtenidos y detallados en la tabla 25 se ve que existe una gran concordancia de los datos experimentales con los obtenidos para el correspondiente α -glicósido de ribosa.

Para verificar la aplicabilidad de este método como criterio de identificación se realizó el mismo cálculo para el resto de las pentofuranosas. El resultado de los mismos se encuentra en la tabla 26.

Por último, se verificó la exactitud de este procedimiento aplicando un método análogo para el cálculo de los desplazamientos químicos correspondientes al metil β -ribofuranósido (Tabla 27) ya que como se mencionó anteriormente éstos son los únicos valores, de este tipo de compuestos, suministrados por literatura.

Como puede observarse, las diferencias resultantes avallan, dentro de ciertos límites, la aplicabilidad de este tipo de cálculos.

	Anómero α					Anómero β				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
F (xilosa)	97,3	77,1	71,9	75,2	-	105,6	80,8	73,0	81,3	-
$\Delta(F_{xil.} - X_{Ib})$	-2,5	+5,2	+2,9	-5,9	-	+5,8	+8,9	+4,0	-0,2	-
F (arabinosa)	106,1	82,3	75,6	83,8	-	98,5	77,0	73,8	81,2	-
$\Delta(F_{ara.} - X_{Ib})$	+6,3	+10,4	+6,6	+2,7		-1,3	+5,1	+4,8	+0,1	-
F (lixosa)	102,7	76,7	77,9	77,9	-					
$\Delta(F_{lix.} - X_{Ib})$	+2,9	+4,8	+8,9	-3,2	-					

Tabla 26: Desplazamientos químicos calculados para los carbonos de los ésteres metílicos de los ácidos urónicos de pentofuranosas glicosidadas con sitosterol y peracetiladas (F), y comparación de los mismos con los obtenidos experimentalmente para XIb.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
β -D-ribofuranosa(J) ²¹⁷	101,2	75,6	70,3	82,7	62,9
β -D-ribopiranososa(K) ²²⁷	95,3	72,6	72,6	70,0	64,3
$\Delta(J \rightarrow K)$	+5,9	+3,0	-2,3	+12,7	-1,4
Me β -D-ribopiranosido(L) ²²⁷	103,8	70,4	72,6*	69,8*	65,5
Me β -D-ribofuranosido(M) (M = L + $\Delta(J \rightarrow K)$)	109,7	73,4	70,3	82,5	64,1
M (cita 217)	108,0	74,3	70,8	82,9	62,9
$\Delta(M_{calc.} - M_{cita})$	+1,7	-0,9	-0,5	-0,4	+1,2

Tabla 27: Cálculo de los desplazamientos químicos para los carbonos de Me β -D-ribofuranosido y comparación de los mismos con los valores informados en literatura.

* Estos valores fueron intercambiados respecto de los suministrados por la correspondiente cita.

Con todo este análisis se identifica al compuesto XIb como sitosterol-3-O- α -D-riburonato de metilo acetilado, siendo el producto natural sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranosido (XI). Este compuesto no había sido aislado previamente de otras fuentes naturales.

Análisis del extracto etanólico

Glicósidos de esteroides

En el percolado clorofórmico del extracto etanólico se encontraron, en forma minoritaria, los dos glicósidos identificados en el extracto de éter de petróleo (X y XI) y además un tercer compuesto de características similares (XII). Este último precipitaba al concentrar la solución clorofórmica y resultó ser, cuantitativamente, uno de los más importantes del extracto etanólico.

Sitosterol-3-O-β-D-glucopiranosido XII

La purificación del compuesto XII se llevó a cabo mediante cromatografías en columna de sílicagel H y mediante recristalización de acetato de etilo.

Por hidrólisis ácida del mismo se obtuvo glucosa que fue analizada como su alditol acetilado por CGL y sitosterol, identificado por el mismo método cromatográfico.

El espectro de masas del derivado acetilado de este compuesto (XIIa) (Fig. 78) muestra las señales características de un esteroide cuya cadena lateral tiene 141 u.m.a.. Estos picos diagnósticos son: 414; 398 (414-15); 396 (414-18); 381 (414-18-15); 275 (414-139); 273 (414-141); 255 (273-18); 229 (273-18-27); 213 (273-42-18). Siendo estas señales coincidentes con las obtenidas para sitosterol (VI=89).

Respecto del azúcar se observa el patrón de rupturas de talladas en la figura 79^{108,109}. Estas señales son características de glicósidos de hexosas acetilados.

El espectro de masas del glicósido libre XII sólo da información sobre la aglicona, aunque el mismo realizado a saturación (altas temperaturas) muestra el ión de m/e 576 correspondiente al ión molecular.

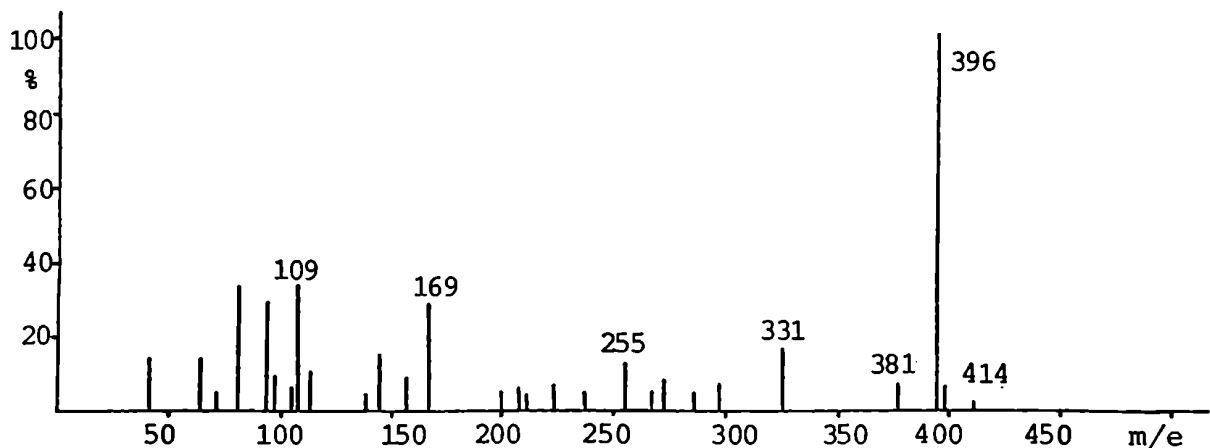


Figura 78

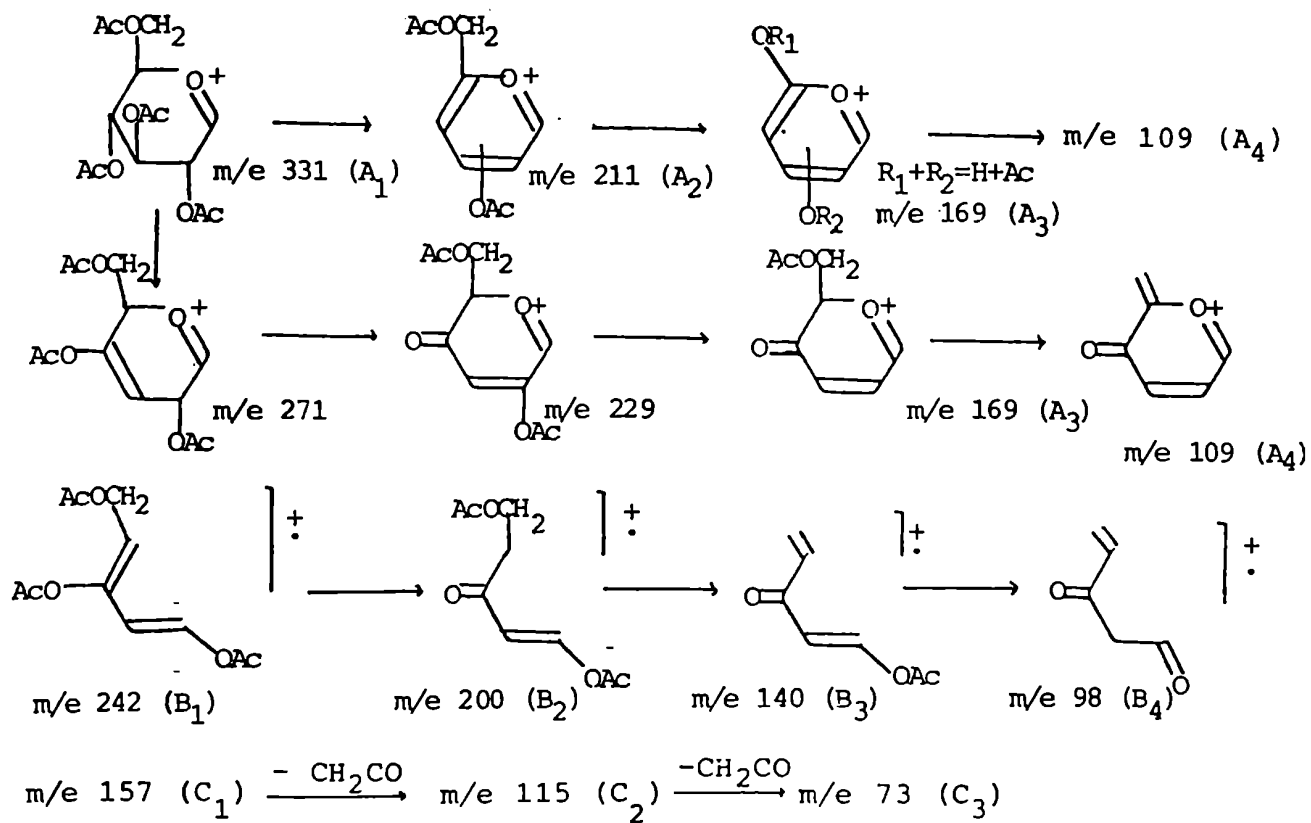


Figura 79: Fragmentaciones del azúcar del compuesto XIIIa. Los detalles de dichas rupturas se encuentran en el Capítulo II pág.36-42.

El espectro de ^1H -RMN de XIIa (Fig. 80) mostró nuevamente las señales características de la cadena lateral y de los metilos 18 y 19 de sitosterol¹¹². Se observan singuletes a 0,67 ppm (Me-18) y a 0,99 ppm (Me-19); dobletes a 0,83 ppm de $J=7$ Hz (Me-26 y Me-27) y a 0,90 ppm de $J=4,5$ Hz correspondiente a Me-21 y finalmente un triplete a 0,85 ppm de $J=7$ Hz adjudicable al Me-29.

Se observan también los cuatro singuletes indicativos de los cuatro acetilos a 2,00; 2,02; 2,05 y 2,08 ppm.

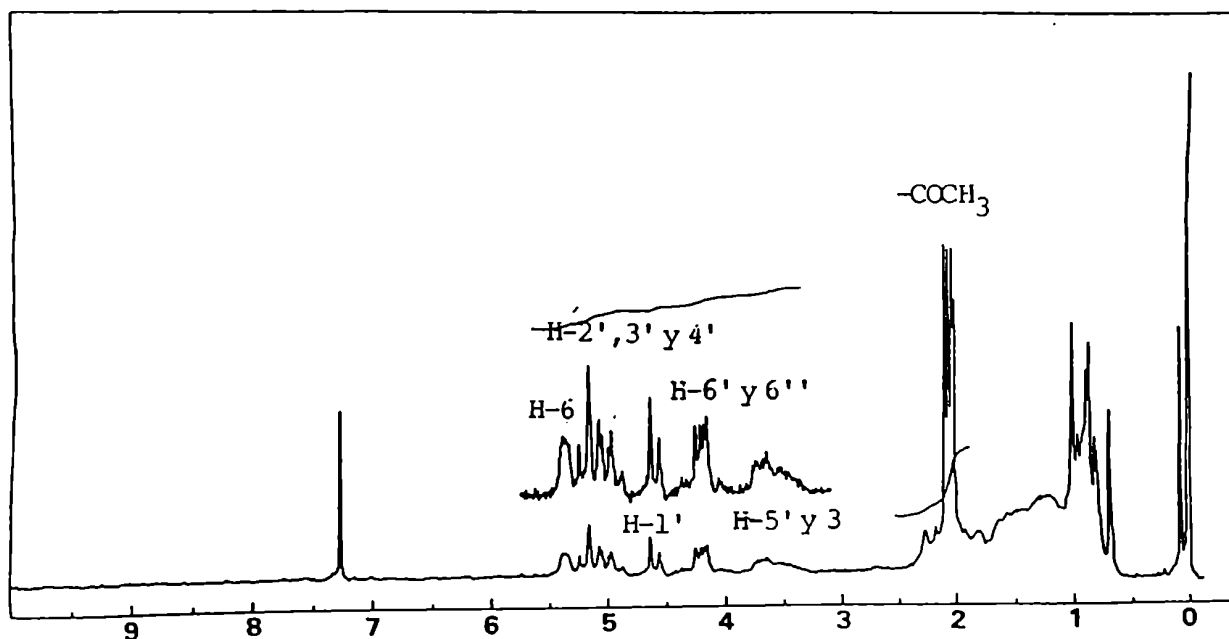


Figura 80

En la zona de los hidrógenos del azúcar acetilado, se puede asignar claramente el doblete de $J=8$ Hz centrado a 4,58 ppm al hidrógeno anomérico, mientras que en la zona de 5 ppm se observan las señales superpuestas de los $\text{H}-2'$, $\text{H}-3'$ y $\text{H}-4'$, apareciendo como tripletes de $J=8$ Hz.

La señal centrada a 4,96 ppm es adjudicable al $\text{H}-2'$, que debería formar un doblete, pero como $J_{2',3'}=J_{1',2'}=8$ Hz se

obtiene un triplete.

Las asignaciones de los H-3' y H-4' pueden ser intercambiadas. Uno de los doble dobles que colapsa a triplete está centrado a 5,06 ppm y el otro a 5,14 ppm. Nuevamente el hecho de que aparezcan como tripletes de igual constante de acoplamiento indica que $J_{3',4'}=J_{4',5'}=J_{2',3'}$.

Las señales de los H-6', H-6'' y H-5' correspondientes a un sistema ABX no son tan fácilmente asignables.

Los valores correspondientes a los desplazamientos químicos de dichos hidrógenos y a las constantes de acoplamiento involucradas, se obtuvieron a partir de los datos provenientes del sistema H-6'/H-6'' (AB) (ya que el H-5' (X) aparece como un multiplete irresoluto) y de las ecuaciones correspondientes a un sistema ABX²¹⁸. Estas ecuaciones se transcriben a continuación:

Línea	Origen	Ecuación que describe la posición de la línea
1	B(H-6')	$1/2(\nu_A + \nu_B) - 1/4(2 J_{AB} + J_{AX} + J_{BX}) - D_-$
2	B(H-6')	$1/2(\nu_A + \nu_B) - 1/4(2 J_{AB} - J_{AX} + J_{BX}) - D_+$
3	B(H-6')	$1/2(\nu_A + \nu_B) + 1/4(2 J_{AB} - J_{AX} - J_{BX}) - D_-$
4	B(H-6')	$1/2(\nu_A + \nu_B) + 1/4(2 J_{AB} + J_{AX} + J_{BX}) - D_+$
5	A(H-6'')	$1/2(\nu_A + \nu_B) - 1/4(2 J_{AB} + J_{AX} + J_{BX}) + D_-$
6	A(H-6'')	$1/2(\nu_A + \nu_B) - 1/4(2 J_{AB} - J_{AX} - J_{BX}) + D_+$
7	A(H-6'')	$1/2(\nu_A + \nu_B) + 1/4(2 J_{AB} - J_{AX} - J_{BX}) + D_-$
8	A(H-6'')	$1/2(\nu_A + \nu_B) + 1/4(2 J_{AB} + J_{AX} + J_{BX}) + D_+$

$$D_+ = 1/2 \left\{ \left[(\nu_A - \nu_B) + 1/2(J_{AX} - J_{BX}) \right]^2 + J_{AB}^2 \right\}^{1/2}$$

$$D_- = 1/2 \left\{ \left[(\nu_A + \nu_B) - 1/2(J_{AX} - J_{BX}) \right]^2 + J_{AB}^2 \right\}^{1/2}$$

Las magnitudes medidas en el espectro son las siguientes:

tes:

Línea	Ubicación (Hz)	Línea	Ubicación (Hz)
1	406	5	426
2	403	6	421
3	418	7	437
4	416	8	433

$$|J_{AB}| = 12,5 \text{ Hz}$$

$$D_- = 9,5 \text{ Hz}$$

$$D_+ = 8,5 \text{ Hz}$$

A partir de estos datos se obtuvieron los siguientes resultados:

$$\nu_A = 427,35 \text{ Hz}$$

$$\nu_B = 414,45 \text{ Hz}$$

$$J_{AX} = 3,65 \text{ Hz}$$

$$J_{BX} = 0,85 \text{ Hz}$$

Es decir la señal del H-6' estaría centrada a 4,14 ppm con un $J_{5',6'} = 0,85 \text{ Hz}$ y la del H-6'' a 4,27 ppm con un $J_{5',6''} = 3,65 \text{ Hz}$.

La señal del H-5' se observa como un multiplete centrado a 3,64 ppm y parcialmente superpuesto con el multiplete correspondiente al H-3 de la aglicona, que se encuentra centrado a 3,50 ppm. Por último, a 5,35 ppm aparece la señal asignable al hidrógeno olefínico (H-6) del sitosterol.

Los espectros de ^{13}C -RMN tanto del glicósido libre (XII) como del derivado peracetilado (XIIa), son categóricos respecto de la identidad y unión glicosídica del azúcar.

Como se desprende del análisis comparativo con los datos publicados en literatura²⁰⁵ para colesterol-3-O- β -D-glucopiranosido 108a, se trata de un β -D-glucopiranosido (Tabla 28).

	XII	<u>108</u>	XIIa	<u>108a</u>
C-1'	102,6	102,7	99,5	99,7
C-2'	75,3	75,2	71,9	71,8
C-3'	78,1	78,4	72,9	73,1
C-4'	71,7	72,1	68,5	68,9
C-5'	78,5	77,8	71,5	71,8
C-6'	62,9	63,2	62,0	62,0

Tabla 28

Los valores correspondientes al glicósido α libre deberían ser: 98,6; 73,8; 75,6; 72,8; 73,9 y 63,4 para los C-1', 2', 3', 4', 5' y 6' respectivamente. Los correspondientes al derivado peracetilado de dicho glicósido serían: 94,6; 71,5; 70,7; 69,5; 67,7 y 62,3. Como puede observarse la unión glicosídica queda determinada como β , sin ambigüedades.

Debido a que el espectro del glicósido libre (XII) fue realizado en C_5D_5N y a que se carece de datos de los desplazamientos químicos de los carbonos de esteroides en dicho solvente, la comparación con los datos de literatura es más coherente hacerla con los valores del derivado peracetilado XIIa que fue efectuado en Cl_3CD . En la tabla 29 figuran los valores de los desplazamientos químicos de los carbonos que permiten diferenciar los epímeros en C-24 de los 24-etilcolesteroides (sitosterol 89 y clionasterol 90) del compuesto XIIa y los informados en literatura para 89 y 90^{139,140}.

	cita 139		<u>XIIb</u>	cita 140	
	<u>89</u>	<u>90</u>		<u>89</u>	<u>90</u>
C-20	36,17	36,29	36,1	36,0	36,1
C-22	33,95		33,9	33,8	33,6
C-23	26,13	26,43	26,0	26,0	26,3
C-24	45,85	46,07	45,8	45,6	45,8
C-25	29,18	28,98	29,1	29,0	28,8
C-26	19,84	19,07	19,7	19,0	18,9*
C-27	19,07	19,62	18,9	19,7	19,5*
C-28	23,09		23,0	23,0	22,9
C-29	12,32		11,9	11,9	12,2

Tabla 29

* Caben las mismas consideraciones que las realizadas en la pág.107.

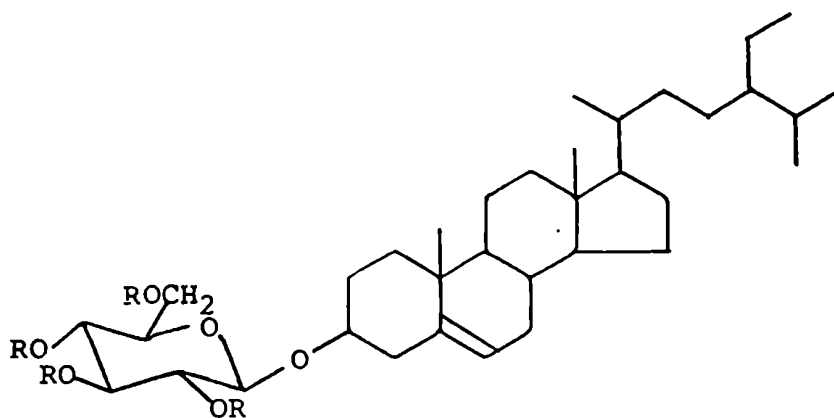
La variación de los desplazamientos químicos de los C-2, C-3 y C-4 de XIIa respecto de sitosterol (89) es debida al efecto de glicosidación. En la tabla 30 se indican los valores $\Delta\delta$ generados por este efecto y los indicados en literatura para el caso de colesterol-3-O- β -D-glucopiranosido acetilado

Como puede observarse, los datos obtenidos son sumamente concordantes.

Del análisis realizado, queda identificado XIIa como sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido peracetilado, siendo el producto natural el compuesto XII, es decir, el no acetilado.

	89^{139}	<u>XIIa</u>		
C-2	31,6	29,6	-2,0	-2,6
C-3	71,7	80,0	+8,3	+8,1
C-4	42,2	38,8	-3,4	-3,7

Tabla 30



XII R = H
XIIa R = Ac

Glicósidos de flavonoides

Canferol-3-O-β-D-glucopiranosil-(1→6)-O-α-L-ranopiranosido XIII

Del percolado metanólico del extracto etanólico se purificó mediante sucesivas cromatografías en columna de sílicagel H y de Sephadex LH-20, un compuesto (XIII) que daba positivo la reacción de Shinoda, característica de flavonoides.

El análisis del espectro UV de este compuesto, realizado en metanol, muestra las dos bandas características de este tipo de compuestos. La banda I se observa a 352 nm y la banda II a 266 nm presentando esta última un hombro a 297 nm.

Los desplazamientos producidos por el agregado de ciertos reactivos, suministra importantísima información respecto de la sustitución de este compuesto²¹⁹.

El agregado de NaOMe produce, por ser una base tan fuerte, la ionización de todos los hidroxilos del núcleo del flavonoi-
de; sin embargo, es de utilidad para determinar la existencia de HO-3 y/o HO-4'. La numeración de los carbonos en esta familia de productos naturales se explicita en la figura 81.

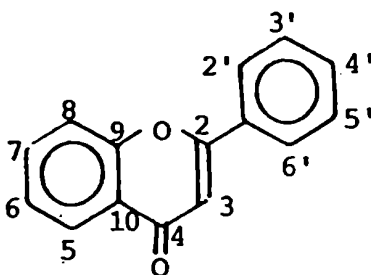


Figura 81

Un corrimiento de 40-65 nm en la banda I es diagnóstico de HO-4' libre o HO-3 libre; aunque en este último caso se produciría una disminución en la intensidad de la señal. Este efecto es observado en el espectro de XIII realizado en esas condiciones, ya que la banda I sufre un desplazamiento batocrómico a 390 nm sin disminución en su intensidad.

También se observa un desplazamiento a mayores longitudes de onda de la banda II que se subdivide nítidamente obteniéndose la banda IIa a 326 nm y la IIb a 275 nm.

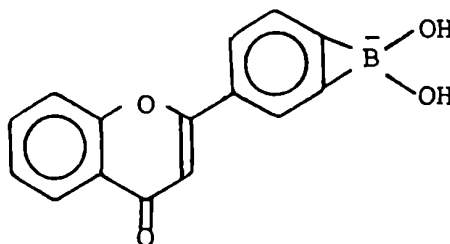
El espectro obtenido no se modificaba con el tiempo lo que indicaba la ausencia de HO-3 y HO-4' simultáneamente libres, ya que este tipo de flavonoles son inestables en NaOMe y la absorción degenera en pocos minutos. La estabilidad observada también permite descartar patrones de sustitución 3,3',4' por ser más lábiles aún que los 3,4'; así como también 5,6,7; 5,7,8 y 3',4',5'.

El uso de una base más débil, como por ejemplo acetato de sodio, da mayor información puesto que sólo ioniza los hidroxilos más acídicos, tales como 3, 7 y 4'.

El espectro del compuesto XIII realizado en presencia de

este reactivo mostró un desplazamiento batocrómico de 7 nm de la banda IIb (273 nm). Considerando que esta banda sólo se ve afectada por la ionización del HO-7, este corrimiento es diagnóstico para esta sustitución. La banda I en el mismo espectro se ubica a 365 nm indicando la existencia de HO-3 y/o HO-4'. Al igual que en el caso de NaOMe las absorciones no se modificaron con el tiempo, lo que lleva a conclusiones análogas respecto del patrón de sustitución.

El espectro de XIII con ácido bórico en presencia de acetato de sodio, no presenta mayores diferencias con el efectuado originalmente en MeOH. De aquí se concluye, que no existen dos hidroxilos en posición orto, ya que en ese medio se formarían probablemente (con excepción de hidroxilos ubicados en 5-6) complejos del tipo:



Otro reactivo de desplazamiento que da información a este respecto y además sobre la sustitución en C-3 o C-5 es el AlCl_3 . Este reactivo forma complejos estables en medio ácido con HO-3 o HO-5 y el C=O de flavonas o flavonoles, y complejos inestables en e se medio con hidroxilos orto (Fig. 82)

El espectro de XIII realizado en presencia de AlCl_3 presenta las siguiente absorciones: banda IIa 390 nm, banda IIb 353 nm, banda Ia 304 nm y banda Ib 274 nm.

Por agregado de HCl_{aq} . (al igual que con acetato de sodio) el espectro no se altera, por lo que se deduce que no existen hidroxilos orto, pero que sí existe/n HO-3 y/o HO-5.

Los datos obtenidos se resumen en la tabla 31.

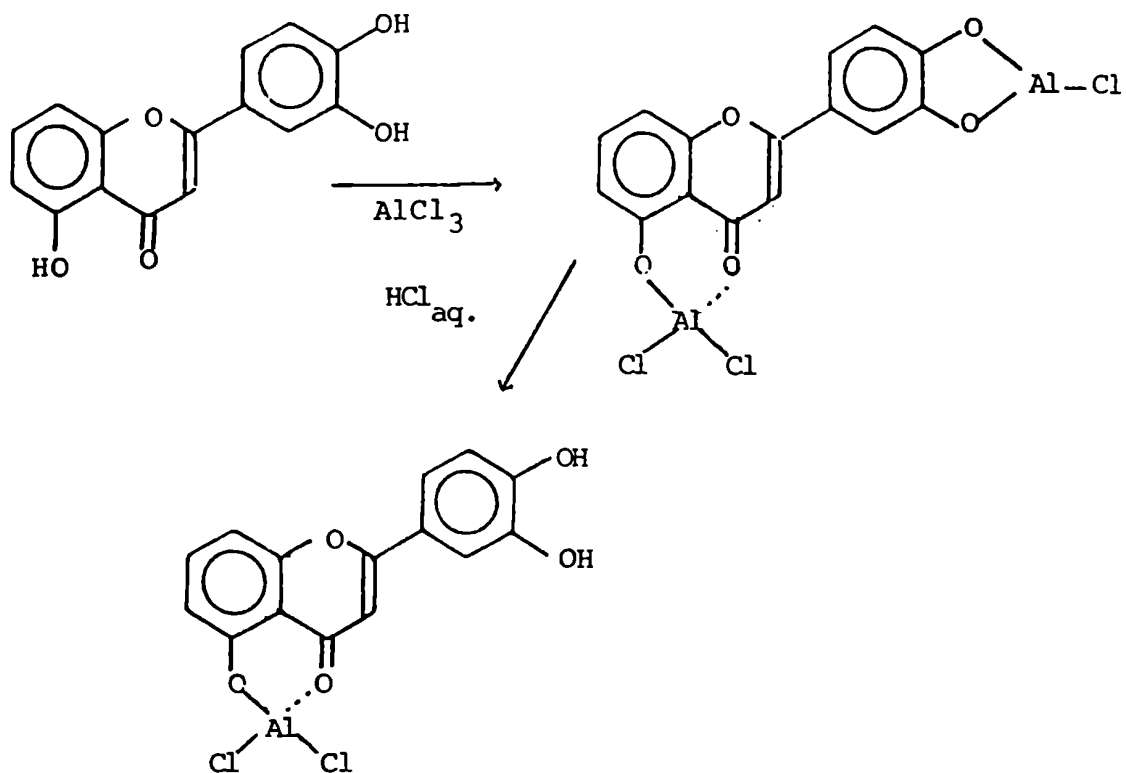


Figura 82

Reactivo	Sustitución indicada
NaOMe	4' (no 3)
NaAcO	7 y 4'
NaAcO/ H_3BO_4	No existen hidroxilos orto
AlCl_3/HCl	5 o 3

Tabla 31.

Por consiguiente, del análisis de los espectros UV de XIII se deduce que los hidroxilos libres se encontrarían en posiciones 5, 7 y 4'.

El análisis del espectro de ^1H -RMN del derivado trimetilsililado del compuesto XIII (XIIIa) confirmó y amplió esta informa-

ción (Fig. 83). Se observan dos dobletes centrados a 6,84 y 7,80 ppm de $J=9$ Hz. Esta partición coincide con la esperada para el anillo B con un sustituyente en 4', es decir, corresponde a una sustitución para. El doblete a campos mayores (6,84 ppm) corresponde a los H-3' y 5' mientras que la segunda señal a los H-2' y 6'.

Se observan también otros dos dobletes a 6,21 y 6,30 ppm de $J=2$ Hz. Esta constante pequeña implica una partición meta en el anillo A, lo que corroboraría la ubicación de hidroxilos libres en C-5 y C-7. Por consiguiente, se adjudicó el doblete a 6,21 ppm al H-6 y el que se encuentra a 6,30 ppm a H-8.

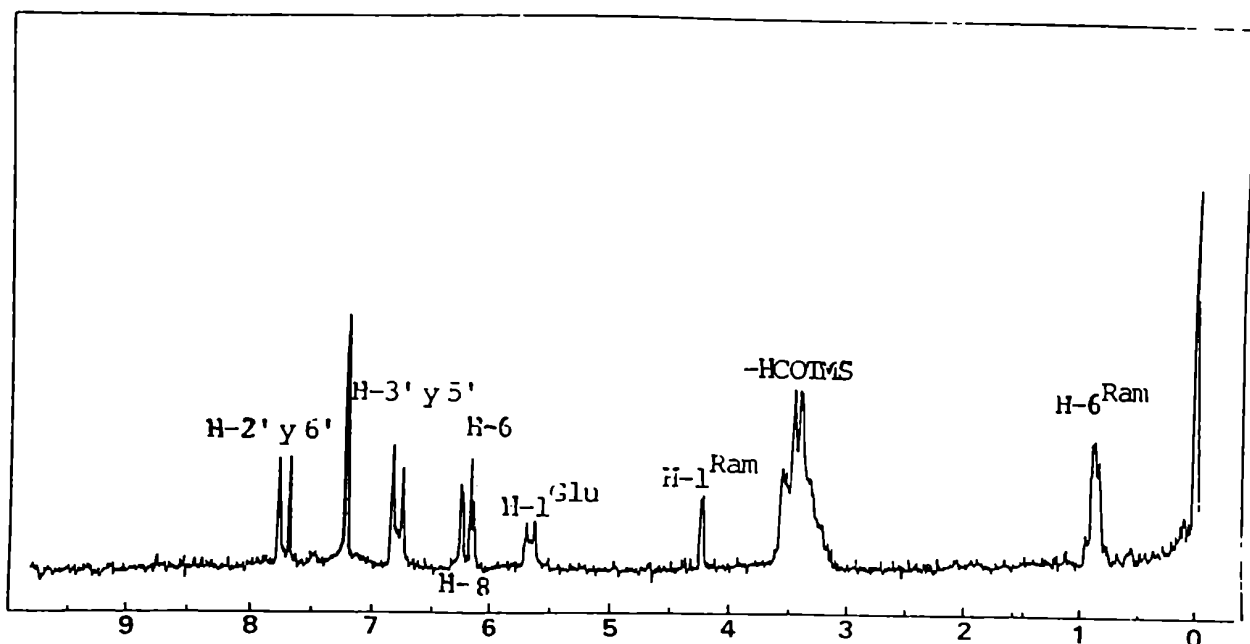


Figura 83

Se observan además señales ajenas al núcleo del flavonoide adjudicables a hidratos de carbono. En la región de los hidrógenos anoméricos se visualizan dos señales: un doblete a 5,72 ppm con $J=7$ Hz y otro a 4,29 ppm con $J=4,5$ Hz. A 3,46 ppm se aprecia un multiplete que integra para diez hidrógenos correspondiente a hidrógenos de azúcar trimetilsililado. Finalmente, a 0,88 ppm se

encuentra un singulete que integra para tres hidrógenos, que podría ser atribuible a un metilo de un desoxiazúcar.

Ante la evidencia de que se trataba de un glicósido se decidió determinar la identidad de los azúcares y de la aglicona mediante hidrólisis ácida del compuesto XIII. Los azúcares resultantes se analizaron como sus alditoles acetilados por CGL con columna ECNSS, identificándolos como glucosa y ramnosa.

La aglicona dio un espectro UV similar al del compuesto XIII salvo que por agregado de NaMeO el espectro degenera en pocos minutos, lo que evidencia la existencia de HO-3 y HO-4'. Por consiguiente la aglicona resultó ser canferol. Esta conclusión se verificó por comparación contra testigo en c.c.d. y por análisis del espectro de masas del derivado trimetilsililado de la aglicona²²⁰ (Fig. 84)

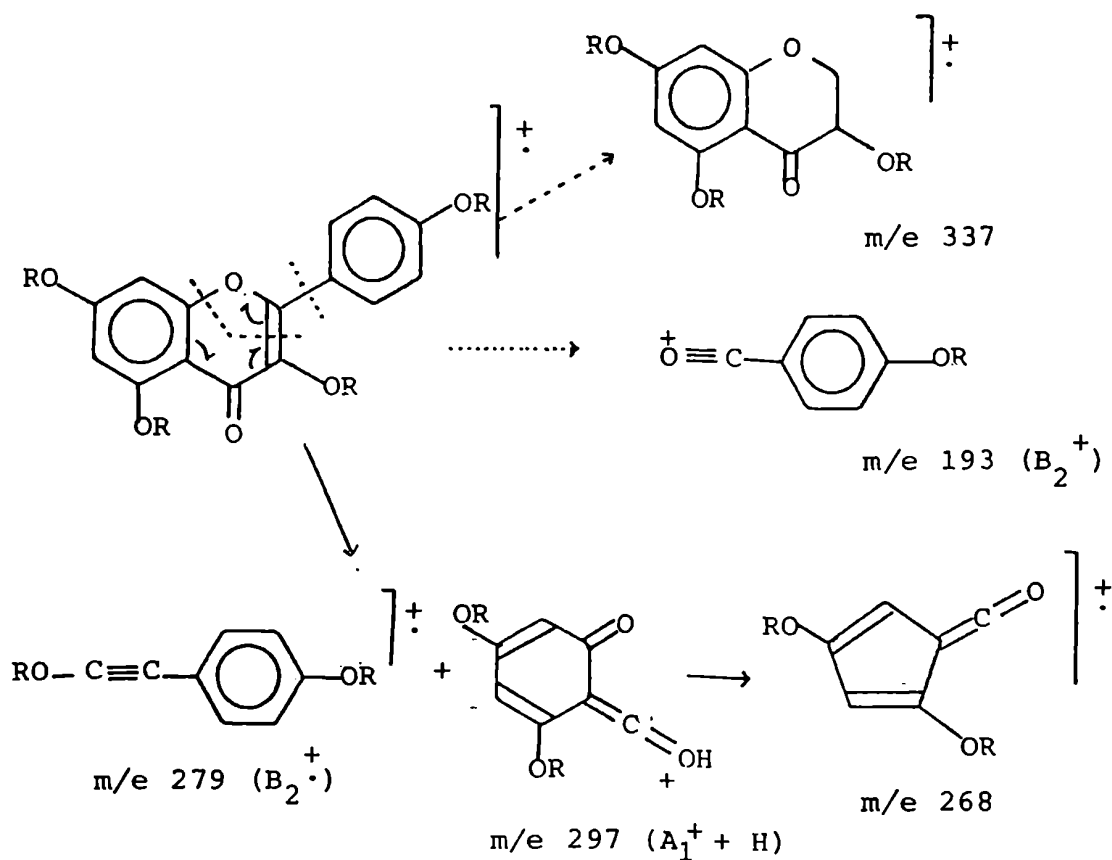


Figura 84

Con estos datos, pudieron entonces ser adjudicados los dobletes observado a 5,72 y 4,29 ppm en el espectro de ^1H -RMN del compuesto XIIIa. El primero con $J=7$ Hz, correspondería al protón anomérico ($\text{H}-1''$) de la glucosa unida a HO-3. Este valor de la constante de acoplamiento ($J_{1'',2''}$) indica una partición axial-axial, es decir, una unión glicosídica β .

El segundo doblete así como también el singulete a 0,88 ppm correspondería al protón anomérico ($\text{H}-1'''$) de la ramnosa que estaría unida a la glucosa. Un valor de $J_{1''',2'''}=1,5$ Hz corresponde a una partición ecuatorial-ecuatorial, lo que implica una unión glicosídica α de este azúcar.

El espectro de masas del compuesto XIIIa (Fig. 85) corroboró las conclusiones mencionadas anteriormente y brindó mayor información acerca de la secuencia y unión de los azúcares²²¹.

Los O-glicósidos de flavonoles trimetilsililados presentan un patrón de fragmentación bastante característico. El ión molecular es de suficiente intensidad como para ser observable en la mayoría de los casos aunque el correspondiente a M-Me puede alcanzar intensidades de hasta el 40%.

La fisión del enlace glicosídico con la aglicona (A) involucra transferencia de hidrógeno o de grupos trimetilsililos (R), generándose así fragmentos del tipo: A+2R, A+H+R, A+R, A+2H, A+H y los correspondientes menos 15 u.m.a..

Los mono- y di-glicósidos unidos a HO-3 muestran un fragmento A+H intenso, que puede llegar a ser el pico base, en cambio, los 7-O-glicósidos presentan A+H-15 muy importante, mientras que el fragmento más intenso que producen los 3,7-O-di- y tri-glicósidos es A+H+R-15.

Las rupturas posteriores que puede sufrir la aglicona, por ejemplo retro Diels-Alder, fueron detalladas anteriormente (Fig. 84).

Como ya se mencionó este método brinda información especialmente útil respecto del o de los azúcares presentes.

Los fragmentos que contienen azúcares están siempre vinculados con pérdida de hidrógeno y presentan en general una inten-

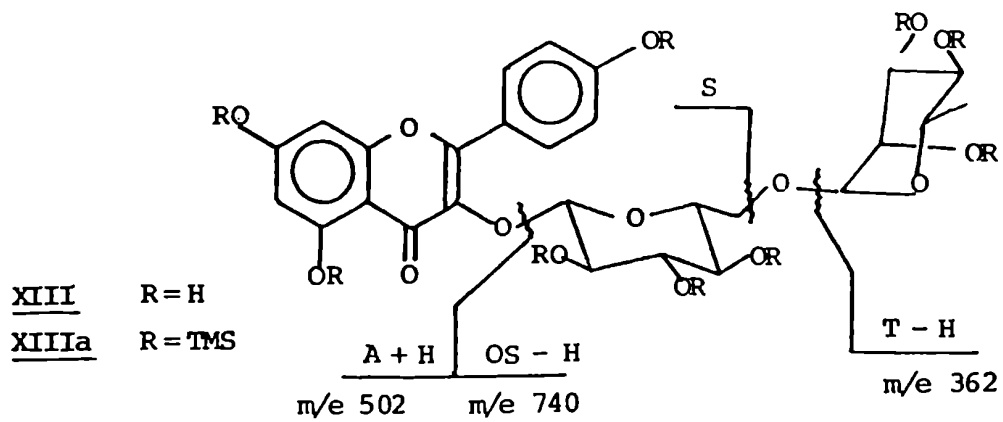
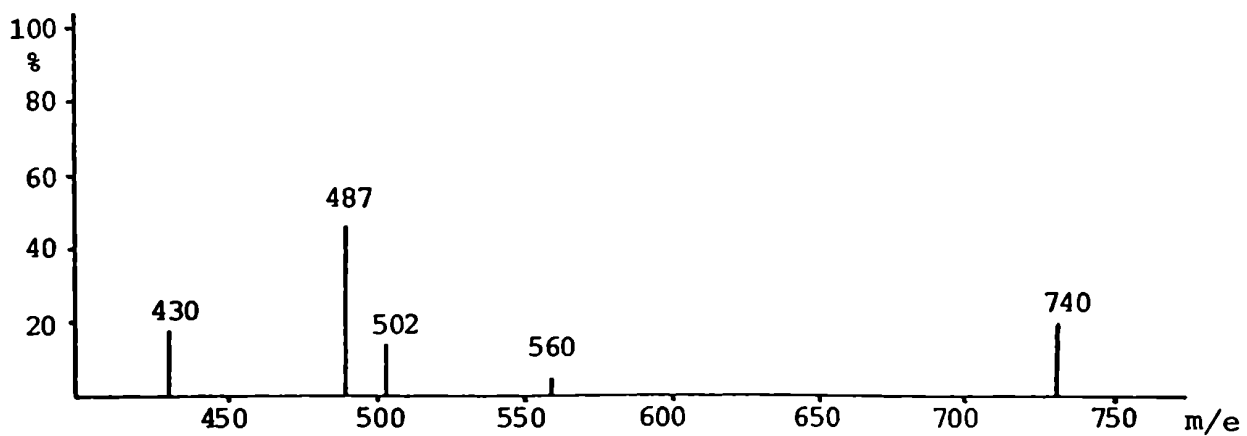
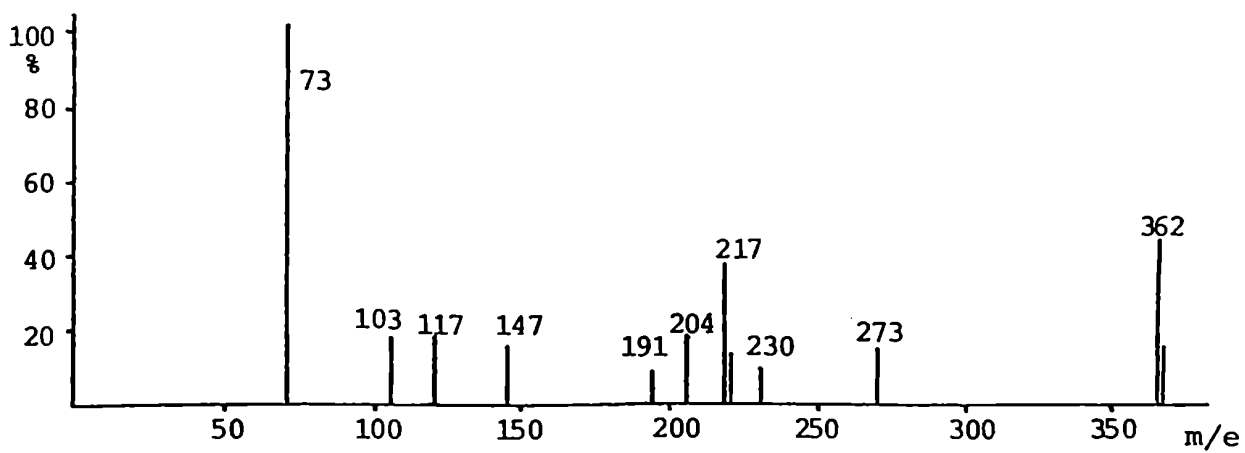


Figura 85

sidad bastante alta. Se observan así señales denominadas T-H (correspondiente al monosacárido terminal) o bien OS-H (si se trata de un biósido) y las correspondientes a pérdidas de trimetilsilanol (ROH) (Fig. 85).

Además es posible deducir la secuencia de los azúcares en un biósido ya que el azúcar terminal siempre produce una señal T-H intensa acompañada por una T-ROH.

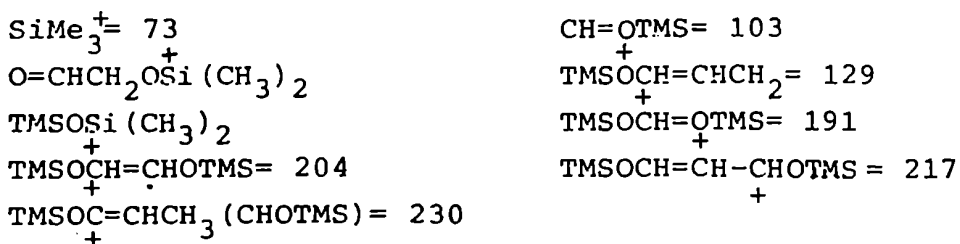
Evidentemente, la ruptura del azúcar terminal puede producir un fragmento en el que la carga permanezca en el resto de la molécula. Estos fragmentos se denominan S y se encuentran generalmente acompañados por S+H, S+R y S+R-15 (Fig. 85).

En general las señales correspondientes a 3-O-glicósidos (S_1) son más intensas que las de los 7-O-glicósidos (S_2).

Por este método se puede determinar también si la unión interglicosídica es 1-2 o 1-6. Los disacáridos con unión 1-6, como la rutinosa y la robinobiosa, muestran sólo el ión correspondiente a la unidad disacárida OS-H, en cambio los que poseen unión interglicosídica 1-2, como neohesperidosa y soforosa, presentan además del OS-H, los fragmentos OS-ROH (651).

Las señales importantes que aparecen a masas bajas corresponden a fragmentaciones de los azúcares sililados²²² (Fig. 85).

A continuación figuran las asignaciones de los mismos:



Se observan además en el espectro de masas del compuesto XIIIa las señales características de este tipo de glicósidos, consideradas anteriormente. El fragmento m/e 502 está de acuerdo con el esperado para la aglicona (canferol) (A+H), así como también los que aparecen a m/e 560 (A+H+R-15), 487 (A+H-15) y 430 (A-2H-R).

El ión m/e 740 es típico de un disacárido de glucosa y ramnosa (OS-H), indicando el ión m/e 362 que el azúcar terminal es

ramnosa y que la unión glicosídica es 1-6.

Los resultados hasta aquí analizados conducían a identificar al compuesto XIII como canferol-3-O- β -rutinósido.

Esta conclusión se corroboró mediante los datos suministrados por el espectro de ^{13}C -RMN.

Por este método son fácilmente apreciables los efectos de glicosidación que afectan a la aglicona.

Al glicosidarse el HO-7 la señal de C-7 aparece a 1,4 ppm a campos mayores^{223,224}. Además se observan corrimientos significativos a campos menores en los carbonos orto y para (C-6, 8 y 10) siendo el más importante el que ocurre en C-10. Si el azúcar unido a HO-7 es ramnosa la protección en C-7 es mucho mayor (-2,3 ppm), por consiguiente es de alto valor diagnóstico.

En la glicosidación de C-3, 3' o 4' se observa el mismo patrón de corrimientos, aunque en el caso de estar unido el azúcar al HO-3 el efecto orto (sobre C-2) es mayor de lo esperado. Nuevamente, si el azúcar es ramnosa se observa una protección de 1 ppm, mientras que si se trata de otro azúcar es de ≈ 2 ppm.

Como se conocen pocos glicósidos en posiciones 3' y 4' las generalizaciones deben ser cautelosas. En general, se observa el mismo patrón de desplazamientos que para glicósidos en HO-7, siendo la señal del C-para la más afectada aunque también lo son en menor proporción las de los C-orto.

La glicosidación del HO-5 es evidentemente un caso especial ya que como resultado de la misma se rompe la unión hidrógeno entre el HO-5 y el carbonilo de posición 4. Como consecuencia del profundo cambio en la distribución de la densidad electrónica en la molécula se produce una marcada protección de C-2 y 4 y desprotección del C-3.

Algunas de las consideraciones anteriormente discutidas se encuentran ejemplificadas en la tabla 32 .

El análisis de este tipo de espectros provee además información valiosa respecto del sitio de la unión interglicosídica, si el azúcar se encuentra en forma furanósica o piranósica y si su configuración es α o β .

Lugar de glicósido	2	3	4	5	6	7	8	9
7-O-glicósido					+0,7	-1,3	+1,0	+1,7
7-O-ramnósido					+0,7	-2,3	+1,0	+1,7
3-O-glicósido	+9,2	-2,1	+1,6	+0,4				+1,0
3-O-ramnósido	+10,3	-1,0	+1,9	+0,6				+1,1
5-O-glucósido	-2,8	+2,2	-6,0	-2,7	+4,4	-3,0	+3,2	+1,4 +4,3
3'-O-glucósido	-0,5	+0,4						
4'-O-glucósido	+0,1	+1,0						

Tabla 32: Desplazamientos observados en las señales de los carbonos de la aglicona por efecto de la glicosidación.

Lugar de glicósido	1'	2'	3'	4'	5'	6'
3-O-glicósido	-0,8	+1,1	-0,3	+0,7	-0,4	+1,4
3-O-ramnósido	+1,1					
5-O-glucósido	-1,3	-1,2	-0,4	-0,8	-1,0	-1,8
3'-O-glucósido		+1,6	0	+1,4	+0,4	+3,2
4'-O-glucósido	+3,7	+0,4	+2,0	-1,2	+1,4	0

Tabla 33: Desplazamientos observados en las señales de los carbonos del azúcar por efecto de la glicosidación.

Respecto de la unión interglicosídica, es bien conocida la desprotección que sufren las señales de los carbonos hidroxilados que se glicosidan²²⁵, así por ejemplo el C-6 de la glucosa de un rutinósido (ramnosil (1→6) glucósido) de un flavonoide se desplaza a campos menores en 4,5-5,2 ppm, y en un neohesperidósido (ramnosil (1→2) glucósido) el C-2 de la glucosa se desprotege en 2,6 ppm.

En ambos glicósidos, rutinósidos y neohesperidósidos, se observa también una protección de C-5 y C-1, respectivamente.

En el caso de disacáridos de la glucosa, como la sorforosa (glucosil (1→2) glucósido), la desprotección del C-2 es mucho más acentuada que en un neohesperidósido (8 ppm)^{225,226}.

Estas diferencias en los desplazamientos químicos de los carbonos de los azúcares pueden ser consideradas de valor diagnóstico para la elucidación estructural de este tipo de glicósidos.

El espectro de ^{13}C -RMN del compuesto XIIIa mostró las señales que se detallan en la tabla 34. En esa misma tabla se transcriben además, los desplazamientos químicos esperados para la aglicona y los azúcares, así como también, los desplazamientos que se calculan a partir de estos datos.

	<u>XIIIa</u>	canferol	Me- β -D-glucopiranosido	Me- α -L-ramnopiranosido	
2	155,8 a	146,8			+9,0
3	132,6	135,6			-3,0
4	176,6	175,9			+0,7
5	160,5	160,7			-0,2
6	98,2	98,2			0
7	163,5	163,9			-0,4
8	93,1	93,5			-0,4
9	156,1 a	156,2			-0,1
10	103,3	103,1			+0,2
1'	120,2	121,7			-1,5
2'	130,2	129,5			+0,7
3'	114,6 b	115,4			-0,8
4'	159,1	159,2			-0,1
5'	114,4 b	115,4			-1,0
6'	130,2	129,5			+0,7
1G	100,7		103,4		-2,7
2G	73,6		73,4		+0,2
3G	75,7 c		75,2		+0,5
4G	69,3		70,0		-0,7
5G	75,2 c		75,2		0
6G	66,7		61,4		+5,3
1R	100,1			101,9	-1,8
2R	69,8 d			71,0	-1,2
3R	70,0 d			71,3	-1,3
4R	71,3			73,1	-1,8
5R	67,7			69,4	-1,7
6R	17,2			17,7	-0,5

Tabla 34

a,b,c,d Estos valores pueden ser intercambiados

Como se desprende de su análisis (Tabla 34) los desplazamientos observados coinciden con los informados²²⁴ previamente y con los

esperados para canferol-3-O- β -rutinósido.

La desprotección observada (9 ppm) en el C-2 está totalmente de acuerdo con la esperada para un flavonoide glicosidado en C-3. Este hecho está remarcado por la simultánea protección del C-3 (3 ppm).

Respecto de los azúcares, se observa que las señales del espectro de XIIIa coinciden con las esperadas para Me- β -D-glucopiranosido y para Me- α -L-ramnopiranosido. El corrimiento de -2,7 ppm registrado para C-1 de la glucosa, es debido a la presencia de la aglicona (Me \rightarrow canferol) y el desplazamiento de +5,3 ppm de C-6'' indica claramente que dicho carbono interviene en la unión con la ramnosa, es decir, que se trata de un rutinósido (ramnopiranosil (1 \rightarrow 6) glucopiranosido).

Por último se utilizó un método degradativo químico para verificar la existencia del disacárido rutinosa.

Si bien el clivaje selectivo de la unión glicosídica entre un oligosacárido y una aglicona puede efectuarse por enzimas, hidrólisis parcial o cetólisis y reducción o hidrogenación, existen además otros métodos útiles como ozonólisis, que no afecta las uniones entre las unidades de monosacáridos, y ácido bromhídrico en ác. acético glacial para glicósidos acetilados²²⁸.

Otro procedimiento alternativo²²⁹ a partir del glicósido peracetilado, utiliza diclorometil- o dibromometil-metiléter en presencia de $ZnCl_2$. Mediante esta técnica, que es útil tanto para glicósidos aromáticos como alifáticos, se obtiene el correspondiente haluro del azúcar acetilado. Este haluro se transforma en el respectivo derivado peracetilado por calentamiento en presencia de acetato de plata y anhídrido acético²³⁰.

Las reacciones producidas en el caso del compuesto XIII peracetilado son las que se esquematizan en la figura 86.

Se realizaron reacciones paralelas a partir de rutina (quer cetina-3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- α -L-ramnopiranosido 65), comparándose los disacáridos acetilados resultantes por c.c.d.. Este método permitió confirmar la identidad del azúcar glicosidante como rutinosa.

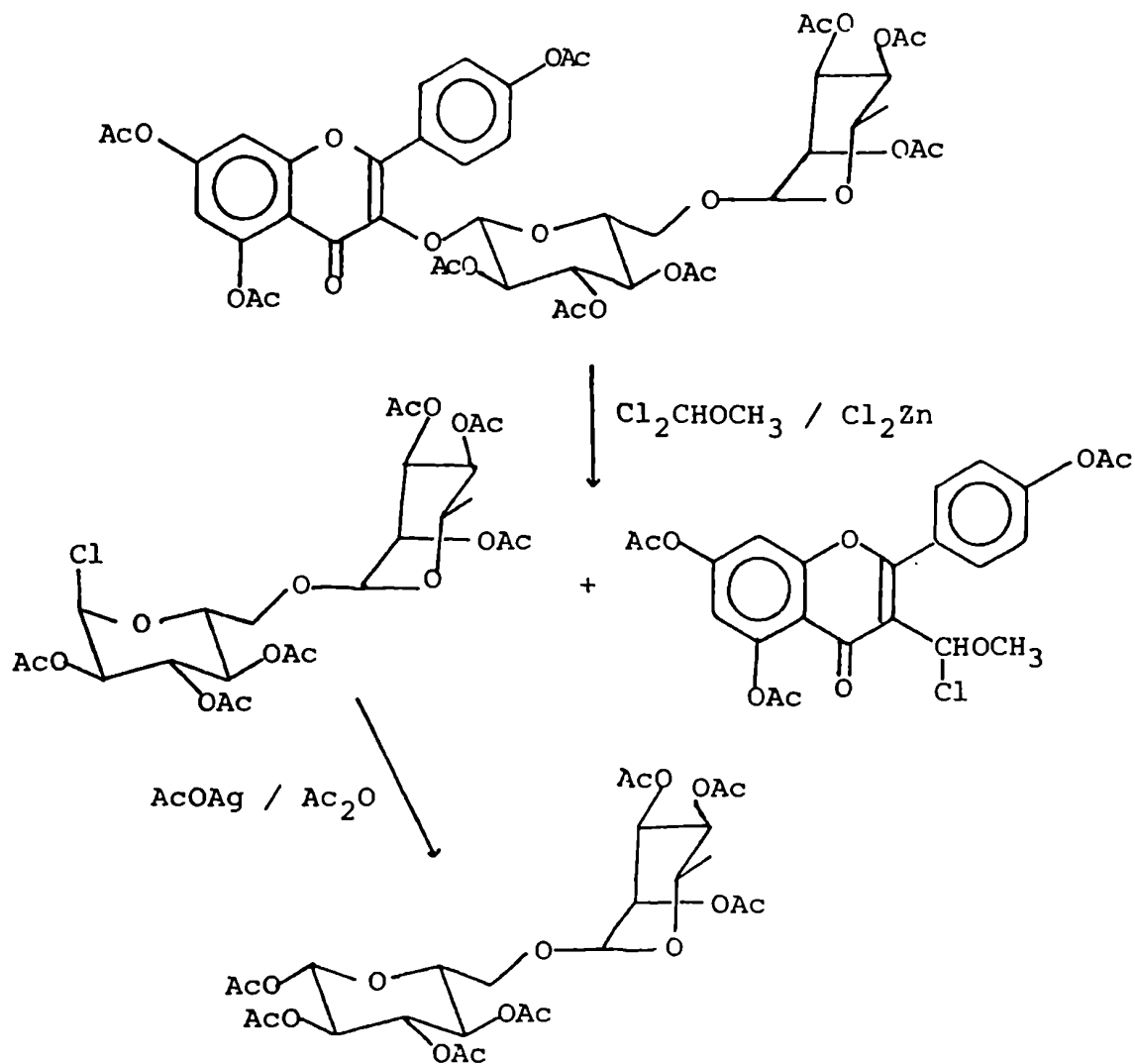


Figura 86

- Todos estos resultados permitieron identificar al compuesto XIII como canferol-3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- α -L-ramnopirano \bar{s} ido (canferol-3-O- β -rutinósido).

Canferol-3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- α -L-ramnopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido XIV

Este compuesto fue aislado también del extracto etanólico siguiendo el mismo patrón separativo que para el glicósido XIII, es decir, sucesivas cromatografías en columnas de sílicagel H y de Sephadex LH-20. Por dar positiva la reacción de Shinoda y tener menor R_f que XIII en el mismo sistema de solventes, se supuso que también se trataba de un glicósido, y como el efecto de polaridad de la aglicona difícilmente produciría esa variación, se pensó que probablemente este compuesto presentaría por lo menos una unidad de monosacárido más.

Por consiguiente, se realizó la hidrólisis ácida de este componente en las condiciones descritas en la parte experimental. Así se concluyó que la aglicona era canferol, identificada por datos espectroscópicos y cromatográficos. Respecto de los monosacáridos se determinó la existencia de ramnosa y glucosa en una relación 2:1, ambas determinaciones se realizaron por CGL de los respectivos alditoles acetilados.

Se llevó a cabo también el análisis de los espectros UV utilizando los reactivos de desplazamiento antes citados²¹⁹.

El espectro en metanol de XIV mostró absorciones a 347 nm (banda I) y a 266 nm (banda II) con dos pequeños hombros a 303 y 323 nm.

Por el agregado de NaOCH_3 la banda I se desdobra en dos picos a 323 y 390 nm, y la banda II se desplaza a 274 nm. Estas señales están de acuerdo con las esperadas para canferol. El espectro con este reactivo no se modificó con el tiempo lo que indicó que en esta molécula no coexisten libres HO-3 y HO-4'. Como el corrimiento de la banda I se produce sin disminución de su intensidad puede postularse que el hidroxilo libre sea el de posición 4'.

Más información suministró el espectro realizado en presencia de acetato de sodio, ya que la banda II no se vio afectada por el agregado de dicho reactivo. Como un corrimiento en esta zo

na del espectro es diagnóstico de un HO-7 libre, se concluye que esta posición en XIV debe estar glicosidada.

Tanto el pequeño desplazamiento de la banda I, como la estabilidad de las absorciones observadas conducen a las mismas conclusiones obtenidas al analizar el espectro con NaOMe.

El espectro con acetato de sodio y ácido bórico resultó coincidente con el obtenido sólo con metanol, por lo que se llegó a la conclusión que no existen dos hidroxilos orto en la aglicona, como era de esperar en el caso de canferol.

Se verificaron además, absorciones a 274, 305, 354 y 400 nm al realizar el espectro en $AlCl_3$. Estos desplazamientos indican la existencia de HO-3 o HO-5 libres, pero por lo analizado hasta ahora, es de esperar que el HO-5 sea el libre. Se descarta la posibilidad de dos hidroxilos en posición orto debido a la estabilidad en medio ácido de los complejos formados.

Estos resultados están en concordancia con los esperados para canferol con HO-3 y HO-7 glicosidados.

El espectro de masas del derivado trimetilsililado XIVa (Fig. 87) resultó nuevamente de mucha utilidad para determinar el tipo de unión y secuencia de los azúcares presentes²²¹.

Las señales de masas más altas se obtuvieron mediante un aumento considerable de la temperatura del espectrómetro (280°C). Se pudieron visualizar así fragmentos de m/e 1030 adjudicable posiblemente a S_3-2R , m/e 864 y m/e 792 correspondientes a S_1+R y S_1+H respectivamente. Estas dos últimas señales indicaban claramente que una ramnosa se encontraba unida directamente al ciclo del flavonoide, mientras que el pico a 740 (OS-H) mostraba la presencia de un disacárido de glucosa y ramnosa. Por encontrarse como única señal de azúcar terminal la correspondiente a una ramnosa ($T_{1/2}$: 363) se deduce que el azúcar del disacárido unido al ciclo debe ser glucosa. Además, la ausencia de un pico a m/e 651 permitiría concluir que el biósido en cuestión sería un rutinósido.

Las señales presentes a m/e 559, 502, 487, 430 y 415 corresponden a la aglicona canferol.

Por ser las HO-3 y 7 los únicos que se encuentran glico-

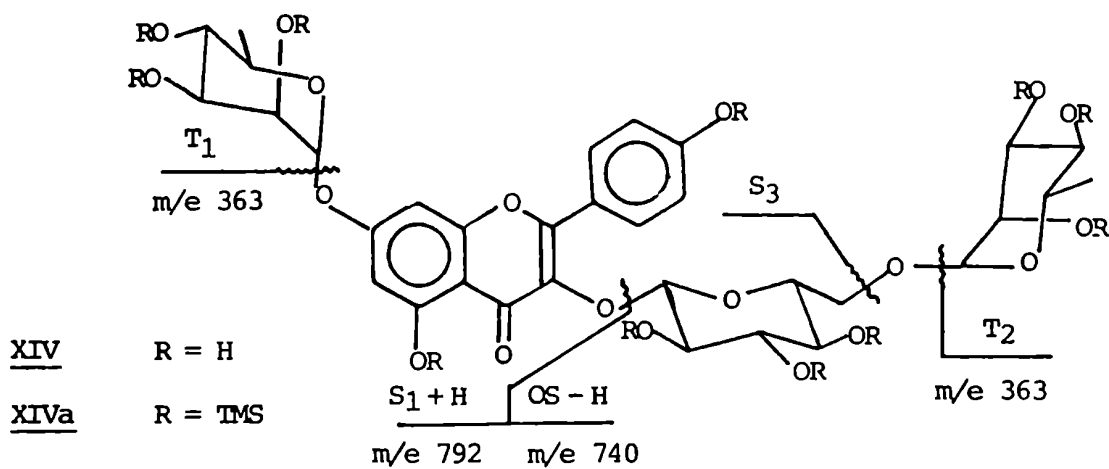
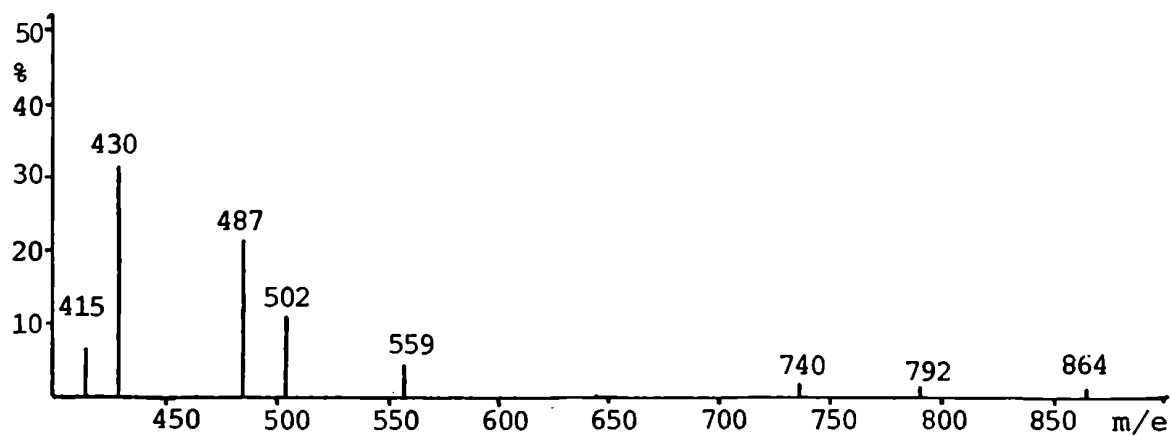
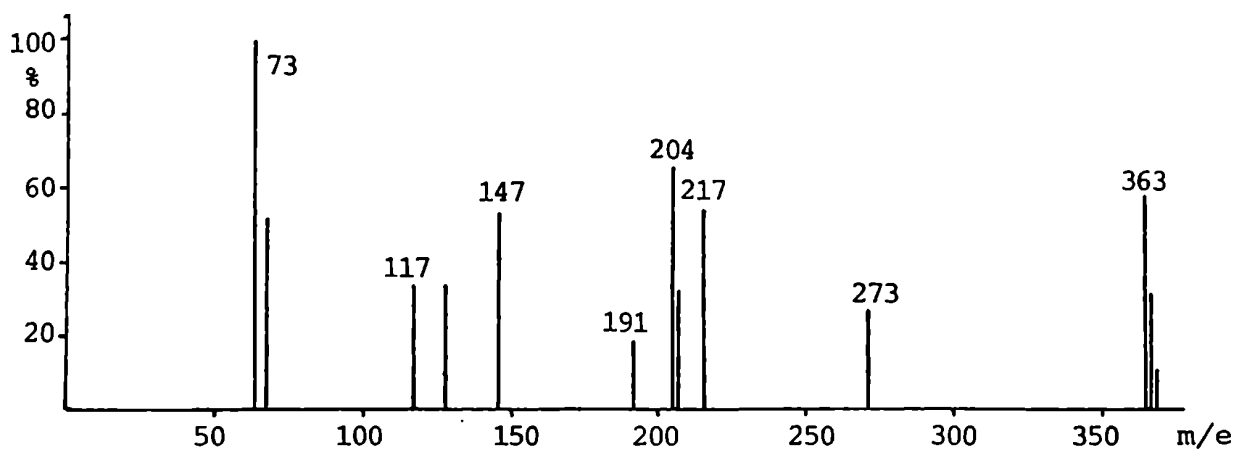


Figura 87

sidades y al atribuir las señales a m/e 864 y 792 a S_1 (ya que los 3-O-glicósidos (S_1) dan señales más intensas que los 7-O-glicósidos (S_2)), se concluye que la posición 7 se halla glicosidada con una ramnosa. Consiguientemente, sólo puede ubicarse al rutinósido en posición 3. La señal S_3 observada corroboraría estas hipótesis.

Por último los picos a masas bajas corresponden a fragmentaciones de los azúcares trimetilsililados.

Todos estos datos conducirían a canferol-3-O-rutinósido-7-O-ramnósido como posible estructura del glicósido XIV.

Para verificar la estructura del disacárido se realizó la degradación con diclorometil metiléter y $ZnCl_2$ del compuesto XIV acetilado²²⁸⁻²³⁰.

Luego de obtener el derivado peracetilado del disacárido por tratamiento del producto de reacción con acetato de plata en anhídrido acético y de cromatografiarlo contra el testigo obtenido por igual tratamiento de rutina (65), se determinó la identidad del mismo como rutinosa.

Del análisis del espectro de 1H -RMN del derivado trimetilsililado del compuesto XIV (XIVa) se obtuvieron conclusiones sobre las uniones glicosídicas, siendo las señales obtenidas concordantes con las esperadas²³¹ (Fig. 88)

Los dobletes característicos de la partición para del anillo B del canferol se observaron a 7,87 y 6,89 ppm con $J=8$ Hz, correspondiendo a H-2' y 6', y a H-3' y 5' respectivamente.

Los H-6 y 8 del anillo A aparecen a 6,15 y 6,45 ppm respectivamente, evidenciándose la partición meta existente entre ambos por su constante de acoplamiento de 2 Hz.

Se observaron además, tres señales correspondientes a hidrógenos anoméricos; la que se encuentra a campos menores (5,59 ppm) como un doblete de $J=6,5$ Hz es atribuible al de la glucosa, la que aparece a 4,95 ppm (doblete de $J=1,5$ Hz) al de la ramnosa de C-7, mientras que la que se observa a campos mayores (4,38 ppm) como un doblete de $J=2$ Hz al de la ramnosa de la rutinosa. Las señales correspondientes a los metilos de ambas unidades de ramnosa (la de C-7 y la de rutinosa) aparecen a 1,05 ppm (multiplete) y

1,25 (singulete) respectivamente. Los restantes hidrógenos de los hidratos de carbono aparecen como un multiplete centrado a 3,67 ppm.

Las constantes de acoplamiento de los hidrógenos anoméricos indican la configuración del C-1 de los azúcares. El valor de J para glucosa implica un acoplamiento axial-axial, es decir, el correspondiente a una unión glicosídica β , mientras que los medidos para las ramnosas indican un acoplamiento ecuatorial-ecuatorial, lo que representa para estos azúcares uniones glicosídicas α .

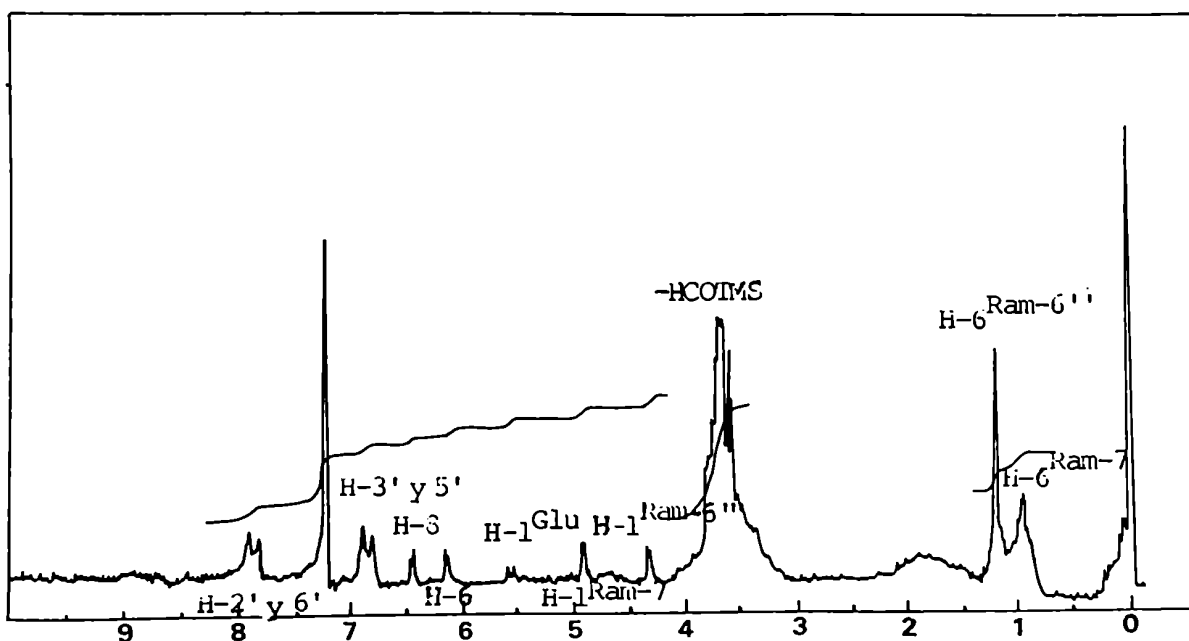


Figura 88

El espectro de ^{13}C -RMN del mismo compuesto (XIVa) muestra las señales que se transcriben en la tabla 35, donde además se incluyen los desplazamientos observados respecto de las señales esperadas para la aglicona y los azúcares constitutivos de dicho glicósido.

Como puede observarse, la protección de C-3 (3,3 ppm) indica que esa posición está glicosidada y que el azúcar correspondiente no es ramnosa. Se observa además, el pronunciado efecto or-

to esperado, que en este caso es de +9,2 ppm, así como también corrimientos en C-1', 2' y 6' con magnitudes acordes a las informadas²²⁴.

	<u>XIVa</u>	canferol	Me-β-D-glucopiranosido	Me-α-L-ramnopiranosido	
2	156,0 a	146,8			+9,2
3	132,3	135,6			-3,3
4	176,9	175,9			+1,0
5	160,6 b	160,7			+0,3
6	98,5 c	98,2			+0,3
7	160,9 b	163,9			-3,0
8	93,6	93,5			+0,1
9	156,5 a	156,2			+0,3
10	103,8	103,1			+0,7
1'	120,7	121,7			-1,0
2'	130,5 d	129,5			+1,0
3'	114,9 e	115,4			-0,5
4'	159,4	159,2			+0,2
5'	114,7 e	115,4			-0,7
6'	130,7 d	129,5			+1,2
1 _G	100,6 f		103,4		-2,8
2 _G	73,6		73,4		+0,2
3 _G	76,7		75,2		+1,5
4 _G	70,4 g		70,0		+0,4
5 _G	75,4		75,2		+0,2
6 _G	68,0		61,4		+6,6
1 _R	100,5 f			101,9	-1,4
2 _R	70,4 g			71,0	-0,6
3 _R	70,8 g			71,3	-0,5
4 _R	72,2 h			73,1	-0,9
5 _R	70,1 g			69,4	+0,7
6 _R	17,2			17,7	-0,5
1 _{R-7}	98,4 c			101,9	-3,5
2 _{R-7}	70,0 g			71,0	-1,0
3 _{R-7}	70,7 g			71,3	-0,6
4 _{R-7}	71,7 h			73,1	-1,4
5 _{R-7}	69,9 g			69,4	+0,5
6 _{R-7}	17,2			17,7	-0,5

a,b,c,d,e,f,g,h Estos valores pueden ser intercambiados.

Tabla 35

La protección del C-7 (3 ppm) indica que el HO-7 también se encuentra glicosidado y la magnitud de la misma, que el azúcar en cuestión es ramnosa. El efecto para sobre C-10 que produce esta glicosidación es de aproximadamente +0,7 ppm.

También se puede deducir a partir de este espectro que la unión glicosídica de la glucosa unida a C-3 es β y que se encuentra en forma piranósica.

El valor de las señales de los C-1^G y C-6^G difieren respecto de los de Me- β -O-D-glucopiranosido ya que en el caso del carbono anomérico se produce un desplazamiento (-2,8 ppm) debido a la presencia de la aglicona (Me \rightarrow canferol) y en el caso de C-6 indica el lugar de unión de la ramnosa ($\Delta\delta=+6,4$ ppm)²²⁵. Es decir que el disacárido unido a C-3 es rutinosa.

De las señales correspondientes a las dos ramnosas, las únicas que evidentemente pueden asignarse específicamente son las de los C-1. Es de esperar que la señal que aparezca más desplazada a campos mayores (98,4 ppm) corresponda al C-1 de la ramnosa unida directamente al flavonoide, es decir, a C-7. La restante, que se observa a 100,5 ppm se debe adjudicar por ende a C-1 de la ramnosa de rutinosa.

Como conclusión, la complementación de todos los datos aquí discutidos condujeron a identificar al compuesto XIV como canferol-3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido (canferol-3-O- β -rutinósido-7-O- α -L-ramnopiranosido).

Protoalcaloides

Colina XV

Como resultado de la marcha separativa para el estudio de compuestos alcaloidales en el extracto etanólico, se obtuvo un precipitado a pH=12 con el agregado de una solución saturada de sal de Reinecke ($\text{Cr}(\text{SCN})_4(\text{NH}_3)_2\text{NH}_4$)²³². El precipitado se disolvió en acetona y se cromatografió por resina de intercambio aniónico (forma HO^-), usando como solvente de elución metanol.

Finalmente, se purificó mediante cromatografía en columna de alúmina eluyendo con Cl_3CH : MeOH: AcOH, 10: 1: 0,1, obteniénd

dose así el compuesto XV en forma de acetato.

El espectro ^1H -RMN de este protoalcaloide (Fig. 89) evidenciaba la presencia de dos singuletes, uno a 1,97 ppm que integraba para tres hidrógenos y otro a 3,13 ppm que integraba para nueve hidrógenos. El primero puede asignarse al metilo del acetato mientras que el último a tres metilos unidos a un nitrógeno cuaternario.

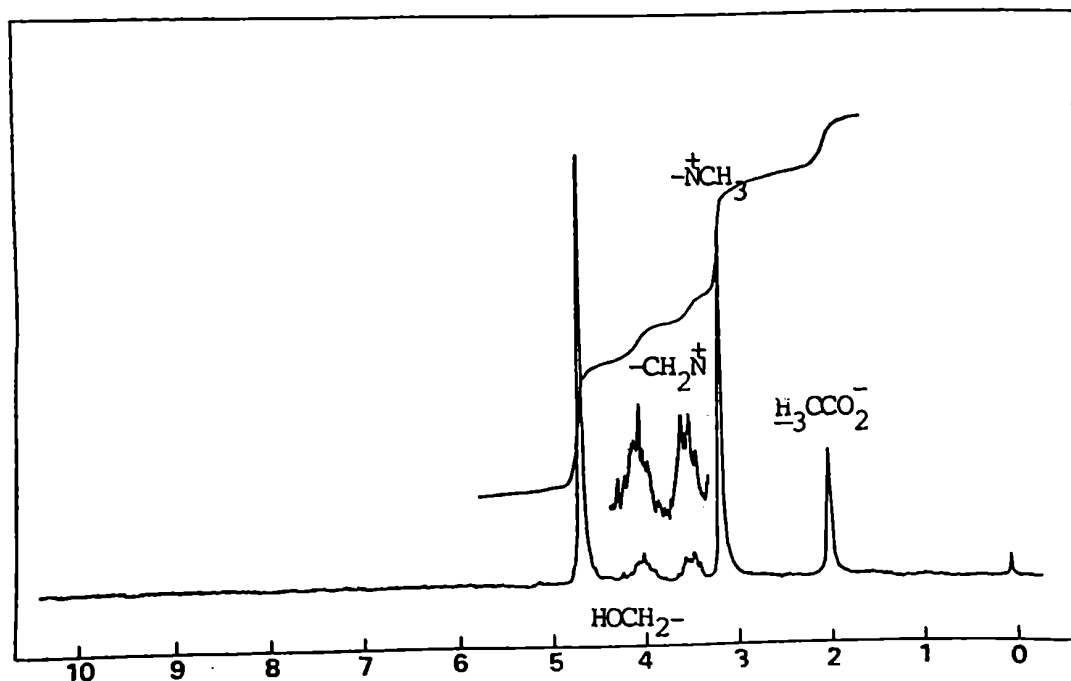


Figura 89

Se observan además, dos multipletes a 3,50 y 3,98 ppm, integrando ambas señales para dos hidrógenos. El que aparece a campos mayores se atribuyó a un metileno unido al nitrógeno cuaternario, mientras que el segundo correspondía a un metileno con un sustituyente oxigenado. Mediante estos datos pudo determinarse la identidad de este compuesto como acetato de colina, siendo coincidente el espectro obtenido al informado en literatura²³³.

Para verificar este resultado se realizó el picrato de XV y de un testigo de colina. El punto de fusión de ambos picratos fueron coincidentes entre sí y la determinación del punto de

fusión mezcla no mostró depresión.

N-metil ácido nicotínico XVI

A la solución resultante de la precipitación del reinkato del compuesto XV (colina) se la llevó a pH=1 y se le agregó nuevamente una solución saturada de la sal de Reinecke, obteniéndose un precipitado que fue tratado como en el caso anterior. El solvente de elución de la columna de alúmina fue en este caso $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{MeOH}:\text{AcOH}$, 10: 2,5: 0,2. De esta forma se obtuvo el compuesto XVI en forma de acetato.

Su espectro de ^1H -RMN (Fig. 90) mostró también dos singuletes: a 1,98 ppm, que integraba para tres hidrógenos correspondiente al metilo de un acetato, y a 4,36 ppm, que también integraba para tres hidrógenos adjudicable a un metilo unido a un nitrógeno cuaternario.

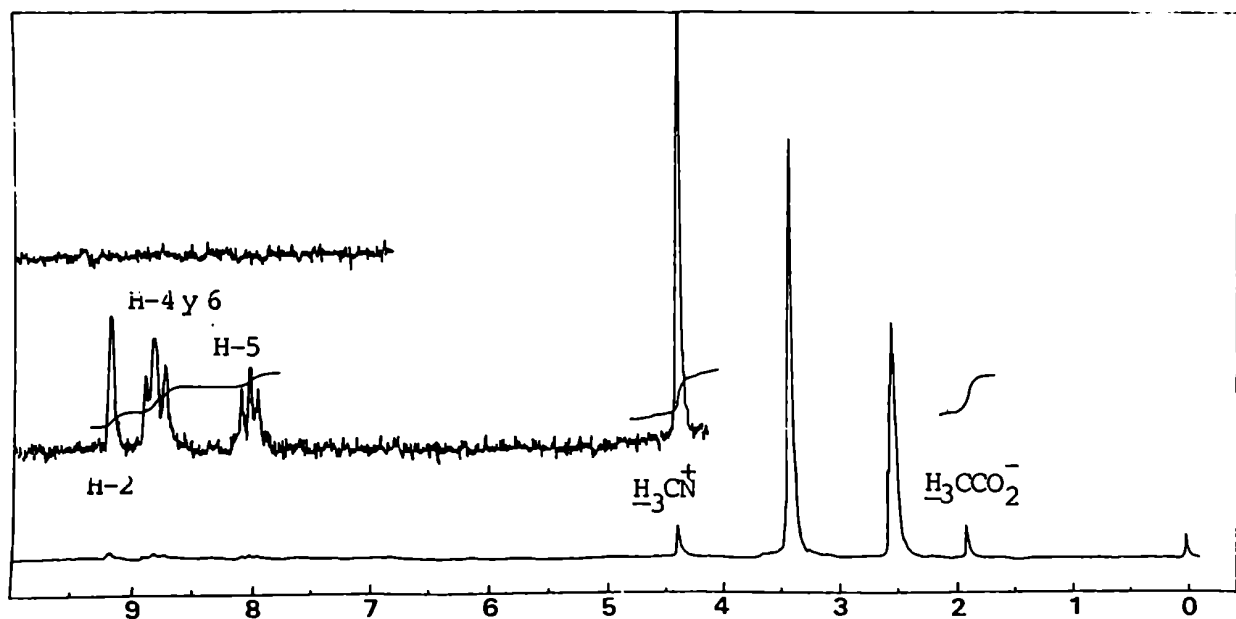


Figura 90

Las restantes tres señales, que integraban en total para cuatro hidrógenos, aparecían a 8,02; 8,82 y 9,20 ppm y fueron asignadas a una piridina sustituida. La señal a 8,02 ppm, que integraba para un hidrógeno, era un doble doblete cuyas constantes de acoplamiento (7 y 6 Hz) indicaban una doble partición orto. Por ser la única señal con estas características se dedujo que el sustituyente del anillo piridínico estaría en C-3 y por consiguiente, la señal analizada correspondería al H-5, siendo $J_{4,5}=7$ Hz y $J_{5,6}=6$ Hz. La adjudicación de estas constantes se basa en la distinta sustitución de los C-4 y 6. Por ser el sustituyente de C-6 mucho más electronegativo (el nitrógeno de la piridina), a $J_{5,6}$ le corresponde el menor valor.

El singulete ancho, que integraba para un hidrógeno, observado a 9,20 ppm es adjudicable entonces al H-2 ya que es el más desprotegido y el que no presenta ninguna partición orto.

Finalmente, el multiplete a 8,82 ppm, que integraba para dos hidrógenos, correspondería a las señales superpuestas de los H-4 y 6.

El espectro observado era análogo al existente en literatura para el cloruro de 3-carboxi-1-metil-piridonio²³⁴.

El espectro de ^{13}C -RMN del compuesto XVI mostró las señales características de un acetato. El carbono carbonílico del mismo aparece a 180,4 ppm y su metilo a 23,5 ppm. También en la zona correspondiente a los carbonilos se visualizaba una señal a 175,7 ppm, siendo este valor semejante al del carbonilo del ácido benzoico.

Visiblemente separada se observaba una señal a 49,2 ppm atribuible a un carbono alquílico (metilo) unido a un nitrógeno cuaternario.

Por último, se apreciaban cinco señales entre 125 y 150 ppm, coincidentes con las esperadas para el catión piridonio sustituido²³⁵.

El carbono más desprotegido es el C-3 que se observa a 137,6 ppm, debido a la sustitución con un carboxilo. Este sustituyente provoca además, el corrimiento del carbono para (C-6), que

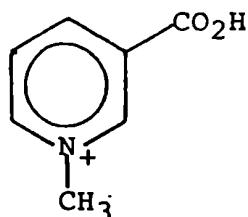
se observa a 146,8 ppm.

La adjudicación de las demás señales, así como también los valores comparativos para el catión piridonio, se detallan en la tabla 36.

	<u>XVI</u>	catión piridonio
C-2	145,5	142,5
C-3	137,6	129,0
C-4	147,9	148,4
C-5	128,4	129,0
C-6	146,8	142,5
$\text{H}_3\text{C}-\text{CO}_2^-$	23,5	
$\text{H}_3\text{C}-\text{CO}_2^-$	180,4	
$\text{PY}^+-\text{CO}_2\text{H}$	175,7	

Tabla 36

Estos resultados permitieron identificar al compuesto XVI (en forma acetato) como acetato de 3-carboxi-1-metil-piridonio (acetato de N-metil ácido nicotínico o acetato de trigonelina).



XVI

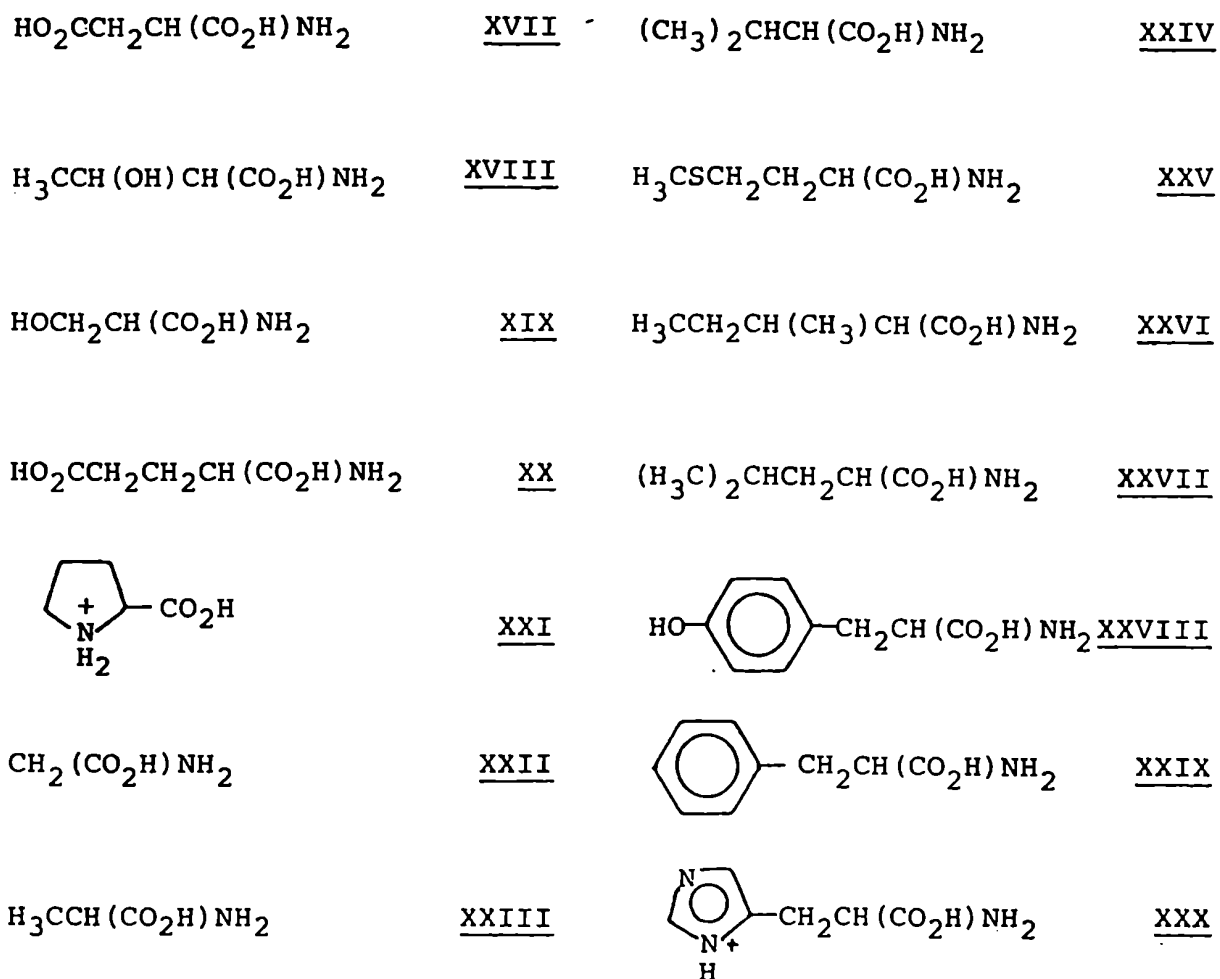
Aminoácidos

Parte del percolado acuoso del extracto etanólico, obtenido como se indica en la parte experimental, se trató con una resina de intercambio catiónico AG50W-X8 (forma H^+).

Se eluyó primeramente con agua para obtener una fracción constituida por los componentes neutros y luego con una solución de NH_4OH 4 N. Se obtuvo así, una segunda fracción formada por los aminoácidos libres y los alcaloides cuaternarios.

Se evaporó el solvente y se cromatografió el residuo en un analizador automático de aminoácidos, como se indica en la parte experimental (pág. 207).

Se caracterizaron de esta forma los siguientes componentes: ácido aspártico (XVII), treonina (XVIII), serina (XIX), ácido glutámico (XX), prolina (XXI), glicina (XXII), alanina (XXIII), valina (XXIV), metionina (XXV), isoleucina (XXVI), leucina (XXVII), tirosina (XXVIII), fenilalanina (XXIX) e histidina (XXX)



Análisis del extracto etanólico de flores

El extracto etanólico de las flores de *Bauhinia candicans* Benth. se obtuvo por molienda de las mismas con etanol en licuadora y posterior evaporación del solvente.

D-inositol-3-metiléter XXXI

Al intentar redissolver este extracto etanólico de flores en etanol, se formó un insoluble que fue separado por filtración y fue posteriormente recristalizado de etanol, obteniéndose así el compuesto XXXI.

Por los valores de R_f obtenidos en varios sistemas de solventes, este componente mostró tener una polaridad semejante a la de un monosacárido.

El espectro de ^1H -RMN del derivado acetilado de XXXI (XXXIa) indicó la existencia de cinco metilos de acetilos que aparecían a 1,93; 2,00; 2,07 y 2,14 ppm, integrando esta última señal para seis hidrógenos (Fig. 91)

Se observaba además otro singulete a 3,40 ppm que integraba para tres hidrógenos y que fue asignado a un $-\text{OCH}_3$.

A 3,60 ppm aparecía en triplete de $J = 9$ Hz, que integraba para un hidrógeno, concordante con un H- α de un metiléter.

Por último, un multiplete a 5,22 ppm, que integraba para cinco hidrógenos, evidenciaba la existencia de cinco hidroxilos secundarios acetilables.

Estos datos condujeron a suponer que el compuesto XXXI era un hexitol cíclico que tendría uno de sus hidroxilos metilados. La constante de acoplamiento de 9 Hz del triplete a 3,60 ppm indica una relación axial-axial del hidrógeno que genera dicha señal con dos hidrógenos equivalentes. Esto permitiría suponer que se trataría de un metiléter de inositol.

La comparación cromatográfica del compuesto XXXIa contra testigos igualmente derivatizados, utilizando CGL (ECNSS; 180 °C,

isotérmica), determinó la identidad del compuesto XXXI como D-inositol-3-metiléter.

Para verificar este resultado se determinó el punto de fusión de XXXI y el de un testigo de D-inositol-3-metiléter, resultando ambos iguales. Además, se realizó el punto de fusión mezcla no observándose depresión.

Todos estos resultados condujeron a identificar al compuesto XXXI como D-inositol-3-metiléter (pinitol).

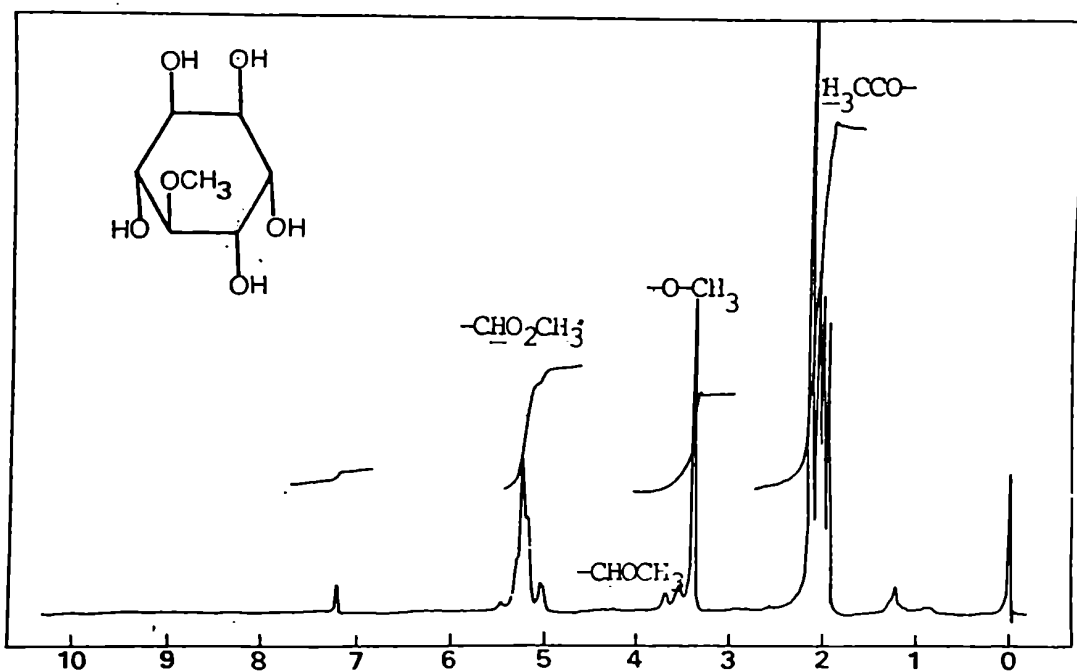


Figura 91

Canferol-3-O-β-rutinósido XIII y canferol-3-O-β-rutinósido-7-O-α-ramnósido XIV

En este extracto se determinó además la existencia de los compuestos XIII y XIV.

Para poder realizar esta determinación por comparación cromatográfica con los respectivos compuestos obtenidos del extrac

to etanólico de hojas, ya que se apreciaban similitudes con éstos, se debió primeramente aislar y purificar dichos componentes.

Esto debió realizarse debido a la complejidad del extracto y a la variabilidad de los R_f de los glicósidos de flavonoides con la concentración y pureza. En la tabla 37 figuran los resultados de esta comparación en c.c.d. indicándose en cada caso la fase estacionaria y el solvente de desarrollo utilizados.

Fase estacionaria	Fase móvil	R_f XIII	R_f XIV
Poliamida	MeOH/H ₂ O 4:1	0,35	0,70
Poliamida	Acetona/H ₂ O 1:1	0,25	0,48
Poliamida	Isopropanol/H ₂ O 3:2	0,60	0,85
Celulosa	BuOH/AcOH/H ₂ O 4:1:5	0,87	0,70
Sílicagel	AcOEt/EtOH 9:1	0,52	0,31

Tabla 37

Para ratificar los resultados cromatográficos se realizaron además, los correspondientes espectros UV, masas y ¹H-RMN.

Los respectivos datos y análisis figuran en la discusión del análisis estructural de estos compuestos aislados a partir de hojas de la misma especie vegetal (capítulo IV, pág. 133-153).

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS COMPONENTES DE BAUHINIA VARIEGATA Y BAUHINIA FORFICATA

Debido a la carencia de estudios químicos de la especie *Bauhinia forficata* y a que se habían analizado principalmente los flavonoides presentes en *Bauhinia variegata*, resultó de interés comparar los componentes aislados a partir de *Bauhinia candicans* con los presentes en las dos primeras especies.

Para llevar a cabo este propósito se realizó un fraccionamiento cromatográfico de los correspondientes extractos, tal co-

mo se detalla en la parte experimental (capítulo V, pág. 187 y 190).

Hidrocarburos

El estudio de las correspondientes fracciones que contenían los hidrocarburos se realizó por CGL (OV-17, 3%; 1,8 m de longitud; 220°C, isotérmica), por comparación con los obtenidos a partir de *Bauhinia candicans* (Tablas 38 y 39).

	C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂
Tr	1,35	1,65	2,06	2,64	3,43	4,57	6,11	8,33	11,34	15,95	21,51	25,71	34,82
ln T _R	0,30	0,50	0,72	0,97	1,23	1,52	1,81	2,12	2,43	2,77	3,07	3,25	3,55
%	0,38	0,15	0,16	0,45	0,29	1,64	1,33	3,60	1,34	9,31	0,80	77,51	2,28

Tabla 38

	C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃
T _R	1,32	1,59	2,01	2,57	3,33	4,41	5,91	7,93	10,79	15,01	20,21	27,89	37,35	51,01
ln T _R	0,28	0,46	0,70	0,94	1,20	1,48	1,77	2,07	2,38	2,76	3,01	3,32	3,62	3,93
%	0,92	0,05	0,56	0,12	0,30	3,00	9,57	3,90	1,97	53,63	2,76	15,53	2,06	5,51

Tabla 39

Tab. 38 y 39: Valores de los tiempos de retención, sus logaritmos y porcentajes correspondientes a los hidrocarburos de cadena lineal presentes en *B. variegata* y *forficata*, respectivamente.

Además de graficar ln T_R en función del número de átomos de carbonos, se calcularon los respectivos parámetros por cuadrados mínimos. Estos resultados se detallan a continuación:

	<i>B. variegata</i>	<i>B. forficata</i>
ordenada al origen	-5,86	-5,64
pendiente	0,30	0,29
coeficiente de correlación	0,995	0,998

Al comparar los resultados obtenidos puede apreciarse que *B. variegata* tiene como único hidrocarburo mayoritario al de cadena lineal de treinta y un átomos de carbono (77%), mientras que en *B. forficata* el más abundante es el de veintinueve átomos de carbono (53%), siguiéndole en importancia el de treinta y un átomos de carbono (15%). Ninguno de estos resultados concuerda con los obtenidos para *B. candicans* ya que en este caso el hidrocarburo mayoritario es el C₃₁ (57%) y el segundo cuantitativamente importante es el C₂₉ (20%).

Triacantanol I

La presencia de triacantanol se determinó en ambos extracto por comparación cromatográfica por CGL con el testigo aislado de *B. candicans*.

Las condiciones utilizadas fueron: columna OV-17, 3%; 250°C, isotérmica. T_r: 10,43 min.

En las tres especies analizadas, este alcohol lineal de treinta átomos de carbono resultó ser un componente mayoritario de los respectivos extractos de éter de petróleo.

Esteroides

Esta familia de productos fue analizada por CGL con columna capilar SP-2100, 15 m de longitud, 0,2 mm de diámetro; T₁: 200°C, T₂: 280°C, velocidad de calentamiento: 10 °/min.

Los cromatogramas obtenidos en cada caso se muestran en la figuras 92 (*B. variegata*) y 93 (*B. forficata*).

La identificación de los respectivos componentes se realizó por CGL-EM con columna SE-30, 3% con programación de temperaturas: T₁= 200°C, T₂= 290 °C, v= 10°/min.

En la fracción correspondiente a *B. variegata* se identificaron: estigmasta-3,5-dieno(III), campesterol (IV), estigmasterol

(V), sitosterol (VI), estigmast-4-en-3-ona (VII) y estigmasta-4,6-dien-3-ona (VIII).

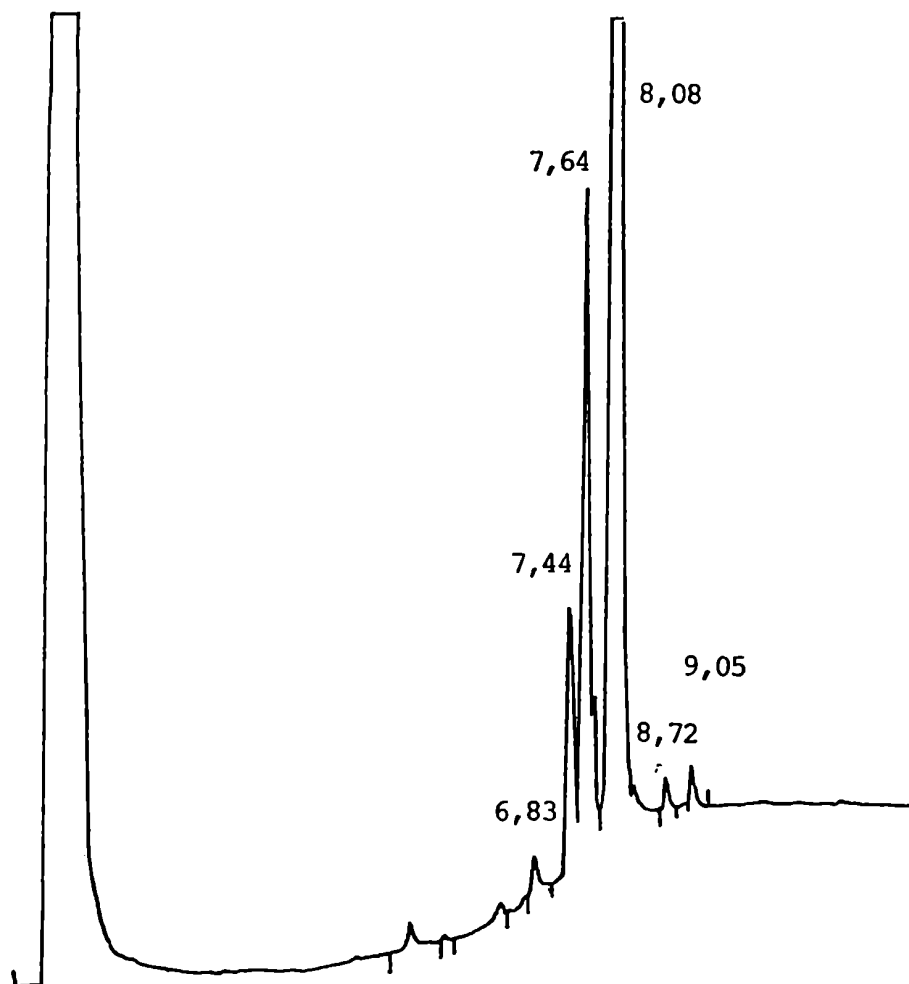


Figura 92

En *B. forficata* los esteroides identificados fueron: colesterol (XXXII=93), brasicasterol (XXXIII=99), campesterol (IV), estigmasterol (V), sitosterol (VI) y estigmast-4-en-3-ona (VII).

La discusión de las rupturas correspondientes a estos compuestos se encuentra en las páginas 72-98,

Las fragmentaciones de colesterol XXXII y brasicasterol XXXIII pueden incluirse con las generalizadas para los Δ^5 -esteroides en la pág. 78-82 (Fig. 94 y 95).

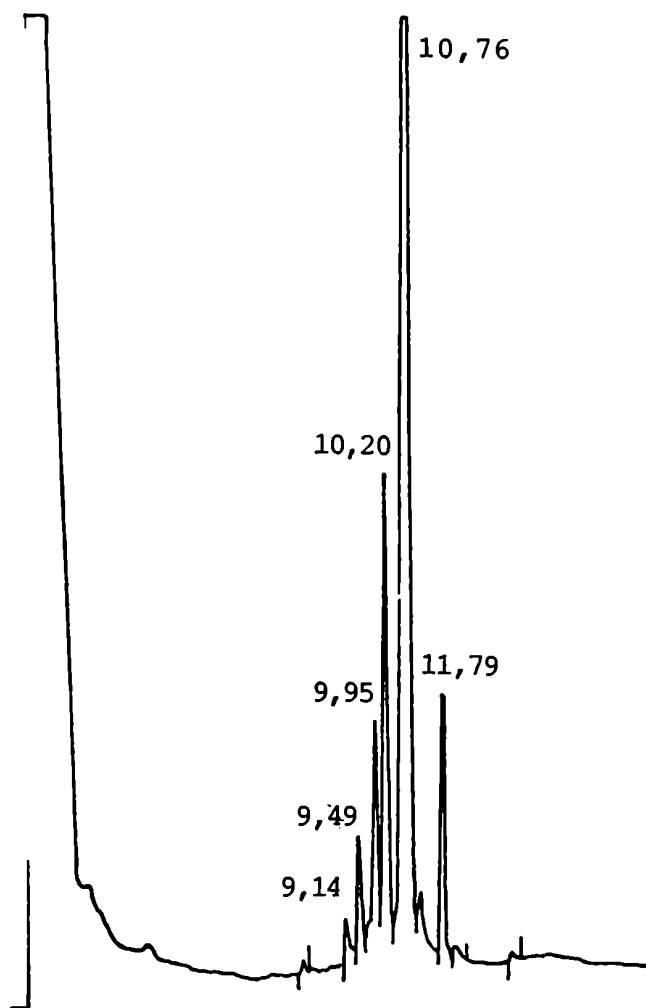
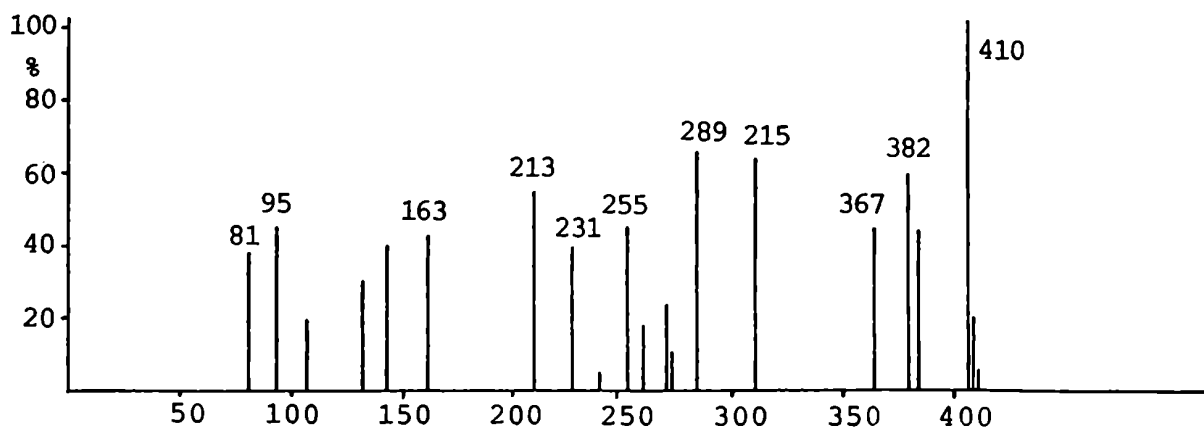


Figura 93

Figura 94: Espectro de masas de colesterol XXXII.

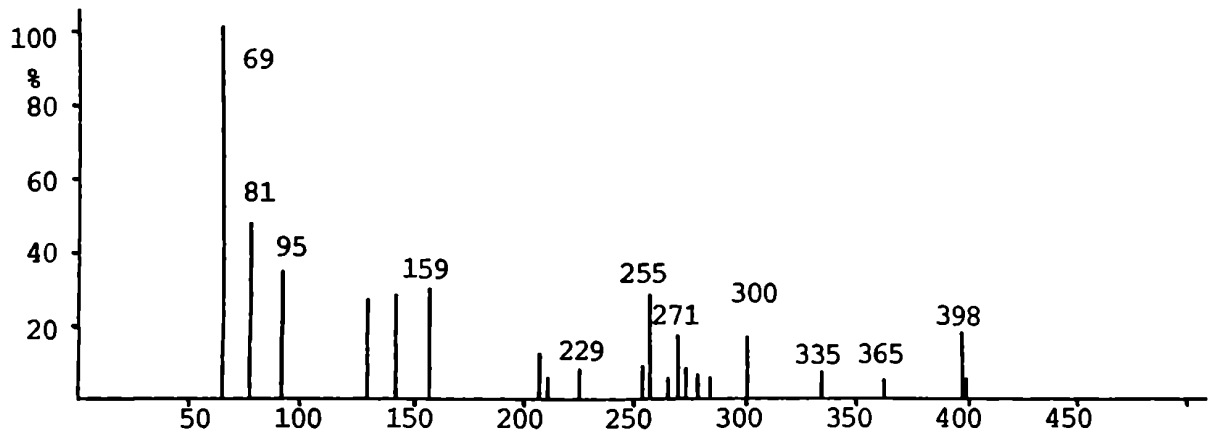
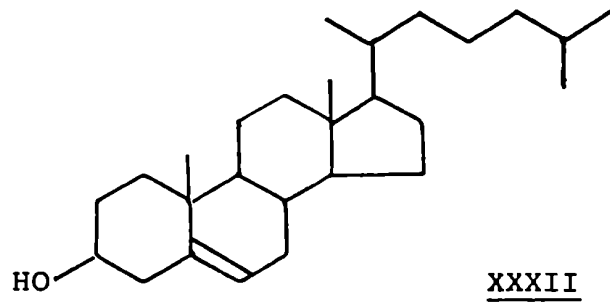
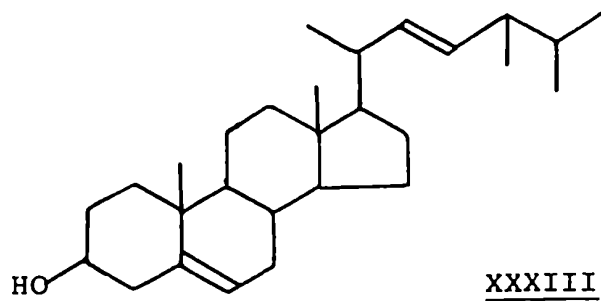


Figura 95: Espectro de masas de brasicasterol XXXIII



Comparando los resultados obtenidos puede apreciarse que *B. forficata* difiere en su composición de esteroides respecto de las otras dos especies estudiadas, ya que ésta carece de hidrocarburos y dienonas esteroidales presentes en las otras dos y posee, contrapuestamente, los esteroides colesterol (XXXII) y brasicasterol (XXXIII), ausentes en *B. variegata* y *B. candicans*.

Glicósidos de esteroides

Mediante sendas cromatografías en columna de sílicagel H usando mezclas de $\text{Cl}_3\text{CH}-\text{AcOEt}$ 50% hasta llegar a AcOEt puro como eluyentes, se aislaron las subfracciones que tenían igual R_f que la mezcla de los glicósidos de esteroides X, XI y XII

La comparación de dichas fracciones con la análoga aislada de *B. candicans* se llevó a cabo por c.c.d. de sílicagel. Para ello se metiló cada una de las correspondientes alícuotas directamente en placa. Esto se realizó co-sembrando las alícuotas con gotas de diazometano en éter etílico.

Utilizando como solvente de desarrollo $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{AcOEt}$ 6:4 se determinó la presencia en ambas especies vegetales de sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido (X), sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranosido (XI) y sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido (XII)

Protoalcaloides y aminoácidos

En los respectivos percolados acuosos de los extractos metanólicos de hojas y ramas de *B. variegata* y *B. forficata* se identificaron los alcaloides cuaternarios colina (XV) y trigonelina (XVI) por comparación contra los testigos aislados de *B. candicans*, en placa de celulosa usando como solvente de desarrollo $\text{BuOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ 4:1:5, resultando los R_f respectivos 0,32 y 0,24.

En estos mismos percolados se observó la presencia de los siguientes ácidos y aminoácidos libres: ácido aspártico(XVII)

treonina (XVIII), serina (XIX), ácido glutámico (XX), prolina (XXI) glicina (XXII), alanina (XXIII), valina (XXIV), metionina (XXV), isoleucina (XXVI), leucina (XXVII), tirosina (XXVIII), fenilalanina (XXIX) e histidina (XXX).

La determinación de estos componentes se realizó por comparación con los análogos aislados de *B. candidans*.

Componentes de *B. variegata* identificados en trabajos previos

En la parte aérea de *B. variegata* se encuentran presentes los siguientes flavonoides que ya habían sido descritos anteriormente: canferol-3-O-ramnogluco β sido; canferol-3-O- β -galactósido (66); 5,7-dimetoxiflavona-4'-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosido (68) y 5,7-dihydroxiflavanona-4'-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosido (69)^{40,42,43}.

Se había informado previamente también la presencia de sitosterol (89=VI) y lupeol (67)⁴².

Tabla comparativa de los compuestos de las tres especies

En la tabla 40 se presenta un análisis comparativo de los compuestos identificados en los extractos de *B. candidans*, *B. variegata* y *B. forficata*. Como puede apreciarse existe una gran similitud en la composición química de estas tres especies, radicando la principal diferencia en sus hidrocarburos y esteroides.

	<i>B. candidans</i>	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>
C ₂₉ ^H ₆₀	++	+++++	+
C ₃₁ ^H ₆₄	+++	+	+++++
estigmasta-1,3,5-dieno (<u>II</u>)	+	-	-
estigmasta-3,5-dieno (<u>III</u>)	+	-	+
colesterol (<u>XXXII</u>)	-	+	-
brasicasterol (<u>XXXIII</u>)	-	++	

Continuación de la tabla 40

	<i>B. candidans</i>	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>
campesterol (<u>IV</u>)	++	++	++
estigmasterol (<u>V</u>)	+++	+++	+++
sitosterol (<u>VI</u>)	++++	++++	++++
estigmast-4-en-3-ona (<u>VII</u>)	++	++	+
estigmasta-4,6-dien- -3-ona (<u>VIII</u>)	+	-	+
estigmasta-3,5-dien- -7-ona (<u>IX</u>)	+		-
sitosterol-3-O- β -D- -xilopiranosido (<u>X</u>)	+	+	+
sitosterol-3-O- α -D- -riburonofuranosido (<u>XI</u>)	+	+	+
sitosterol-3-O- β -D- -glucopiranosido(<u>XII</u>)	+++	+++	+++
triacontanol (<u>I</u>)	++++	++++	++++
colina (<u>XV</u>)	+++	+++	+++
trigonelina (<u>XVI</u>)	+++	+++	+++

Tabla 40

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BAUHINIA CANDICANS

Aunque se obtuvieron de plantas superiores muy pocos antibióticos sin uso terapéutico, la dificultad en encontrar drogas de origen sintético clínicamente útiles, el angosto espectro de actividad, los grados variables de toxicidad y la resistencia mostrada por algunas bacterias a estas drogas, justifican la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos naturales.

Resulta interesante el estudio de las plantas superiores ya que sus metabolitos secundarios pueden ser una fuente importante de estos compuestos.

Parecen ser los responsables de este tipo de actividad diferentes clases de metabolitos, como alcaloides^{236,237}, witanó-lidos²³⁸, saponinas esteroidales²³⁹, terpenoides^{240,241}, lactonas sesquiterpénicas²⁴², cumarinas²⁴³ y flavonoides C-bencilados²⁴⁴.

Para determinar la actividad antibacteriana se ensayaron los extractos de éter de petróleo y etanólico de *Bauhinia candicans* frente a distintas bacterias Gram positivas y Gram negativas, aerobias o anaerobias y algunas levaduras y hongos, mediante métodos usuales en medio sólido²⁴⁵.

Estos extractos no mostraron actividad frente a las bacterias Gram negativas probadas (*Salmonella newport*, *Salmonella oranienburg*, *Escherichia coli B* y *Pseudomonas aeruginosa*).

Las concentraciones más bajas que resultaron ser activas fueron las de 500 y 250 ug/ml del extracto éter de petróleo, estas diluciones actuaron contra *Mycobacterium phlei* y *Aspergillus niger* respectivamente.

Salvo las inhibiciones producidas por el extracto de éter de petróleo sobre *Streptococcus faecalis* y *Mycobacterium phlei*, los dos extractos ensayados mostraron actividad ante los mismos microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*), resultando siempre las concentraciones inhibitorias mínimas menores para el extracto de éter de petróleo.

Ambos extractos mostraron ser bacteriostáticos, pero el

extracto etanólico de *Bauhinia candicans* evidenció actividad fungicida a altas concentraciones.

Se continúan los estudios con el objeto de determinar los compuestos responsables de las actividades descriptas.

ACTIVIDAD HIPOGLUCEMICA E HIPOCOLESTEREMICA DE BAUHINIA CANDICANS

Debido a que la infusión de hojas de *Bauhinia candicans* es ampliamente usada con fines medicinales por su actividad antidiabética, resultó interesante realizar un nuevo estudio farmacológico y vincular esta actividad con los resultados obtenidos en esta Tesis, ya que en la literatura no existía estudio químico alguno de dicha especie y los únicos ensayos farmacológicos efectuados eran contradictorios.

Este experimento fue realizado con perro pancreatectomizado. La carencia de páncreas, y por ende de insulina, produce disminución en la entrada de glucosa en las células musculares. Además, esta carencia provoca una disminución concomitante de la cantidad de glucógeno formado a partir de glucosa tanto en células hepáticas como musculares, aumentando la gluconeogénesis a partir de proteínas. Todas estas alteraciones metabólicas tienen como consecuencia un aumento considerable de glucosa en sangre.

En el tejido graso, la falta de insulina disminuye la síntesis de triglicéridos debido a la falta de glicerofosfato. Además, por inhibir la insulina la lipólisis se produce hiperlipemia, especialmente aumento de la concentración de ácidos grasos en sangre. Como éstos no pueden ser consumidos en el ciclo del ácido cítrico, se llega a un aumento de cuerpos cetónicos (ác. acetoacético, ác. β -hidroxibutírico, acetona).

Además, ante carencia de insulina se produce mayor formación de colesterol.

Es así entonces que la ausencia de páncreas genera hiperglicemia seguida por glucosuria y acidosis que evoluciona posterior

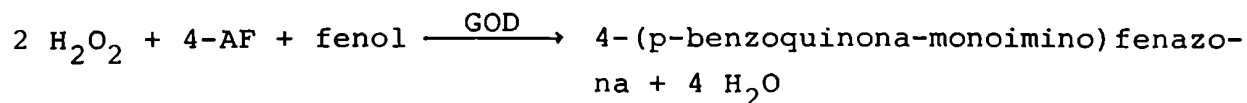
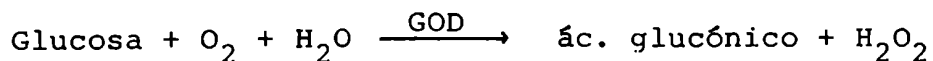
mente hacia el coma y, finalmente, produce la muerte^{157,246}.

Luego de realizarse la pancreatectomía y para no alcanzar los últimos grados de este cuadro clínico, se administró una dosis de mantenimiento de insulina durante cinco días. Al cabo de dicho lapso, se efectuó una perfusión del extracto acuoso de *Bauhinia candicans*, extrayéndose sangre a la hora, dos horas y cinco horas.

La pancreatectomía, perfusión y extracción de las muestras de sangre fueron realizadas en laboratorios del IBYME por el Dr. del Castillo.

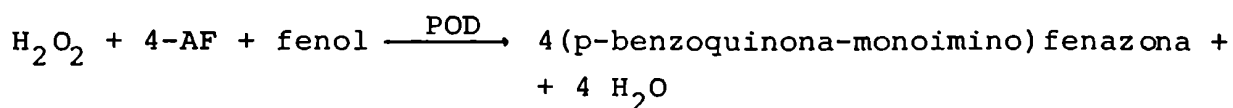
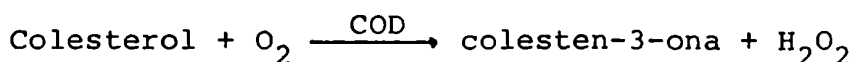
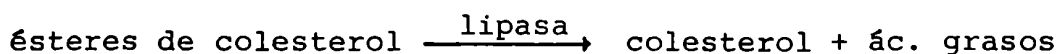
Los análisis de glucosa y colesterol en plasma se llevaron a cabo en nuestro laboratorio utilizando métodos enzimáticos.

En el caso de la glucosa se usó la técnica de la glucosa-oxidasa (GOD) ya que ésta produce la oxidación enzimática de la glucosa a ácido glucónico y agua oxigenada. Esta última en presencia de peroxidasa (POD) produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona (4-AF) dando lugar a la formación de un cromógeno rojo-cereza con un máximo de absorción a 505 nm, según el siguiente esquema:



La determinación debe realizarse en suero o plasma ya que los hematíes y leucocitos son los responsables de la destrucción enzimática de la glucosa sanguínea (glucólisis). Esta destrucción es proporcional a la temperatura a la que se conserve la sangre, siendo máxima a 37 °C. Por lo tanto debe centrifugarse dentro de las dos horas de la extracción hasta obtener un sobrenadante límpido. Si bien ningún componente normal o patológico del plasma puede afectar esta determinación, sí lo pueden hacer contaminaciones con reductores u oxidantes o inhibidores enzimáticos como detergentes, metales pesados y cianuros.

La determinación de colesterol se realizó mediante su oxidación por la colesterol-oxidasa (COD), previa hidrólisis enzimática de los ésteres con una lipasa de origen fungístico. Al igual que en la determinación de glucosa, el H_2O_2 generada forma en presencia de la peroxidasa (POD) y de 4-aminofenazona (4-AF), la quinonimina roja como se detalla a continuación:



En estos análisis debe utilizarse suero o plasma heparinizado pues los anticoagulantes comunes interfieren. Además, las contaminaciones mencionadas para el método de la GOD producen aquí las mismas alteraciones.

Los valores promedio obtenidos en estos ensayos son:

Horas después de la perfusión	glucosa g/l	colesterol g/l
1	4,63	1,81
2	3,40	1,55
5	4,10	1,51

Estos resultados indicarían que la actividad hipoglucémica tendría un máximo alrededor de las dos horas de realizada la perfusión, mientras que la actividad hipocolesterolémica es más prolongada, perdurando aún a las cinco horas de suministrado el extracto.

De los compuestos identificados en el extracto acuoso de *Bauhinia candicans*, que es obtenido en forma análoga a la infusión usada medicinalmente, el alcaloide cuaternario trigonelina (XVI) es el que evidentemente es responsable de la actividad farmacológica observada. Este compuesto es el componente mayoritario de dicho extracto encontrándose acompañado de ácidos y aminoácidos libres

(ác. aspártico (XVII), ác. glutámico (XX), treonina (XVIII), serina (XIX), prolina (XXI), glicina (XXII), alanina (XXIII), valina (XXIV), metionina (XXV), isoleucina (XXVI), leucina (XXVII), tirosina (XXVIII), fenilalanina (XXIX) e histidina (XXX)); colina (XV) y trazas de sustancias neutras de alta polaridad.

La trigonelina recibió, desde hace ya tiempo, bastante atención debido a su importancia biológica. Se observó que contrarresta el efecto hiperglicémico de la cortisona cuando se administran concomitantemente, aunque no es efectiva si se suministra dos horas después²⁴⁷.

Se ensayó el efecto de este compuesto en pacientes diabéticos hospitalizados y se observó una hipoglicemia suave en el 50% de los casos, después de suministrar 500 mg oralmente.

Se estudió, además, la acción que ejerce sobre la glicólisis, ya que se demostró que es uno de los principales derivados del ácido nicotínico que aumenta la respiración en los tejidos²⁴⁸⁻²⁵⁰.

Trigonelina ejerce también una marcada acción en el metabolismo del colesterol. Se estudió el efecto del ácido nicotínico y compuestos relacionados (entre ellos la trigonelina) sobre la incorporación de ác. mevalónico en colesterol, observándose que tanto ésta como el ác. nicotínico actúan entre el acetato y mevalonato²⁵¹.

252

En 1962 se determinó su acción antiaterosclerótica ya que en gallinas que adquirían espontáneamente esta enfermedad por causa de la edad, la administración de trigonelina producía una gran disminución en las lesiones aórticas y en el contenido de colesterol.

Se encontró también que la trigonelina reduce el colesterol total y libre presente en plasma sanguíneo de ratas²⁵³. Además se demostró que es un agente hipolipidémico afectando in vivo la movilización de los ácidos grasos libres²⁵⁴.

Finalmente, cuando se estudiaba la fracción soluble en agua de *Mappia foetida*²⁵⁵, se observó actividad anticancerígena, resultando ser el alcaloide activo la trigonelina.

CAPITULO V
PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

Métodos empleados

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

Los poderes rotatorios (α_D) fueron medidos en un polarímetro digital Perkin Elmer, modelo 141, en tubos de un dm de longitud, a temperatura ambiente, con los solventes y concentraciones que se indican en cada caso.

Los espectros de absorción infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer 137-B Infracord y en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 710-B. Las determinaciones se hicieron en suspensiones de nujol o en pastillas de KBr.

Los espectros de absorción ultravioleta (UV) fueron determinados en soluciones de metanol en un espectrofotómetro Beckman DK-2A. En los espectros UV de flavonoides se utilizaron como reactivos de desplazamiento: metóxido de sodio (NaMeO), cloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 5% en metanol; ácido clorhídrico acuoso (HCl) 1:1; acetato de sodio (NaAcO) sólido y ácido bórico (H_3BO_3) sólido.

Los espectros de masas (EM) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masas Varian Mat CH-7A con inserción directa. Las cromatografías gas-líquido combinadas con espectrometría de masas (CGL-EM) se realizaron en un cromatógrafo Varian 1400 acoplado a un espectrómetro de masas Varian Mat CH-7A con procesador de datos (computadora Varian Mat Spectra System 166 con teletipo Tektronix 4010-1 e impresor Tektronix 4631) o en un equipo Hewlett-Packard 5995A.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (1H -RMN) se efectuaron a 60 MHz con un espectrómetro Varian A-60, a 100 MHz en un espectrómetro Varian XL-100 y en un Bruker 90 según se indica en cada caso. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C -RMN) se efectuaron a 25,2 MHz en un espectrómetro Varian XL-100 y a 20,15 MHz en un Varian FT-80.

El solvente en que fueron hechos los espectros se indica en cada caso; en todas las determinaciones se utilizó tetrametil silano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se indican en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Las abreviaturas usadas en la descripción de estos espectros son: s, singulete; d, doblete; t, triplete; c, cuarteto; q, quinteto; sx, sexteto; o, octeto; m, multiplete.

Todos los solventes empleados fueron purificados por destilación y evaporados a presión reducida a temperaturas menores de 50°C. Todas las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volumen (V/V).

Métodos cromatográficos

A) Cromatografía en capa delgada (c.c.d.)

Se utilizó siempre la técnica ascendente. Se usaron placas preparadas con sílicagel G (Merck), espesor 250 μm con indicador fluorescente a 254 nm; cromatoplasmas de sílicagel G (Merck), celulosa F (Merck), alúmina F-254 (Merck) y poliamida; además se emplearon placas Merck de alta eficiencia para c.c.d. (HPTLC) de sílicagel y celulosa.

Los reveladores utilizados fueron: H_2SO_4 -HOAc, 1:1; FeCl_3 al 2% en etanol; solución acuosa saturada de AgNO_3 al 1% en acetona e HONa al 2% en EtOH/ H_2O , 1:1 y reactivo de Dragendorff según Thies, Reuther, modificación de Vagujfalvi²⁵⁶.

B) Cromatografía en columna

Se emplearon los siguientes rellenos para las columnas cromatográficas: sílicagel grado 923, malla 200-300 (Davidson Chemical); sílicagel H (Merck) para cromatografías a mediana presión;

alúmina neutra (Woelm); Sephadex LH-20 (Sigma); resina de intercambio Amberlite IRA-400 (OH^-) (Sigma); resina de intercambio catiónico AG50W-X8 (50-100 mesh) (H^+) (Bio-Rad).

En las cromatografías líquidas a mediana presión el solvente de desarrollo fue impulsado por una bomba Prominent-Electronic 1001 SCJ provista de un amortiguador de pulsos, o se lograba mediante aire comprimido la presión requerida.

C) Cromatografía gas-líquido

Se realizaron en cromatógrafos Hewlett-Packard 5830-A o 5840-A, ambos con detector de ionización de llama (FID), usando nitrógeno como gas portador.

Las fases de las columnas tenían como soporte Chromosorb W-AW-DMCS, malla 60-80, excepto la fase ECNSS-M, cuyo soporte era Chromosorb Q.

Las condiciones y columnas empleadas se indican en cada caso.

D) Cromatografía de intercambio para análisis de aminoácidos

Los aminogramas fueron realizados en un analizador de aminoácidos Beckman 120-B. El flujo de las soluciones buffer utilizadas fue de $66 \frac{2}{3}$ ml/h y el del reactivo revelador (ninhidrina) $33 \frac{1}{3}$ ml/h. La temperatura a la que fueron realizados los aminogramas fue de 55°C .

La secuencia de buffers empleados fue: solución de citrato de sodio 0,20 N, pH=3,28; solución de citrato de sodio 0,20 N pH=4,25; solución de citrato de sodio 0,35 N pH 5,28

Reacciones generales

A) Acetilación

Todas las acetilaciones se realizaron con anhídrido acético en piridina (1:0,8) a temperatura ambiente durante doce horas o a 110 °C durante una hora.

Los respectivos derivados acetilados se aislaron por evaporación a presión reducida de la mezcla de reacción o volcando la mezcla acetilante sobre hielo-ácido clorhídrico y filtrando el derivado o extrayéndolo con cloroformo.

B) Metilación

Las metilaciones de ácidos carboxílicos se concretaron mediante el agregado de diazometano en éter anhidro a las muestras metilables disueltas en solventes adecuados. Al cabo de doce horas de reacción a temperatura ambiente se aislaron los derivados metilados por evaporación de la mezcla de reacción.

C) Trimetilsililación

Las muestras a sililar se disolvieron en piridina y se agregaron volúmenes iguales de hexametildisilazano (HMDS) y trimetilclorosilano (TMCS). La reacción procedió durante cinco minutos, se evaporó a sequedad la mezcla de reacción y se tomó el residuo con cloroformo anhidro, filtrando o centrifugando las sales formadas.

D) Preparación de alditoles acetilados

La identificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis se realizó mediante análisis por CGL de sus alditoles acetilados²⁵⁷.

El material a estudiar se disolvió en agua y se redujo con NaBH_4 a temperatura ambiente durante doce horas. Transcurrido ese tiempo se evaporó el solvente a presión reducida y se eliminó

el exceso de borohidruro mediante sucesivas evaporaciones con meta
nol. Los alditoles que se obtuvieron por este método fueron aceti
lados como se describió anteriormente.

Material vegetal

Se utilizaron las siguientes especies del género *Bauhinia*:

- A) *Bauhinia candicans* : hojas, ramas y flores. Ejemplar de herbario SI 27581. Recolectada en Capital Federal (Av. Alcorta y Sarmiento) en el mes de noviembre. Este material fue identificado por el Prof. Emilio Ulibarri del Instituto de Botánica Darwinion, Buenos Aires.
- B) *Bauhinia variegata* : hojas y ramas. Recolectadas en el Jardín Botánico de la Ciudad de Buenos Aires.
- C) *Bauhinia forficata* : hojas y ramas. Recolectada en la Estrada da Vista Chinesa, Alto da Boa, Río de Janeiro, Brasil. Identificación: Curadora Dra. María C. Vianna, Herbario "Alberto Castellanos" F.E. E.M.A..

Tratamiento del material vegetal

Se secaron y molieron por separado hojas y ramas de *B. candicans*, de las otras dos especies se secaron y molieron las hojas y ramas juntas.

El secado del material vegetal se realizó en una estufa con circulación de aire termostatzado a 45 °C; y el molido con un molino Wiley, modelo ED-5, con malla de 2 mm.

El material vegetal así tratado se extrajo en forma con
tinua con éter de petróleo (60-70°C). Al residuo obtenido luego de evaporar el solvente se lo llama extracto de éter de petróleo.

Seguidamente, se secó el material vegetal y se re-extrajo con etanol y análogamente el residuo obtenido por concentración se denomina extracto etanólico.

Las flores frescas de *B. candicans* fueron extraídas con e
tanol en licuadora.

ESTUDIO QUIMICO DE BAUHINIA CANDICANS

Se recolectaron 2,5 kg de hojas frescas que luego de ser tratadas como se detalló anteriormente generaron 1,4 kg de material vegetal seco y molido (% de humedad= 43%).

Se extrajo con éter de petróleo y al concentrar dicho extracto se obtuvo un precipitado, que fue separado por filtración: Precipitado de éter de petróleo (14,5 g; 1,02%).

Por evaporación del filtrado se obtuvo el Extracto éter de petróleo (42 g; 2,97%, estos últimos porcentajes se expresan respecto de planta seca).

De la extracción con etanol se obtuvo luego de evaporar el Extracto etanólico (223,6 g; 15,81%).

Se molieron, además, 340 g de flores frescas (con cáliz) en una licuadora junto con 1 litro de etanol. Esta operación se repitió tres veces obteniéndose, luego de evaporar el solvente de extracción, 32 g de Extracto etanólico de flores.

Estudio del Precipitado de éter de petróleo

Se cromatografiaron 10 g de dicho precipitado en una columna de silicagel Davidson (500 g) usando como solventes de elución éter de petróleo, gradientes de éter de petróleo- Cl_3CH , Cl_3CH y gradientes de Cl_3CH -EtOH.

Se obtuvieron cuatro fracciones mayoritarias: fracción 1, 4,1 g; fracción 2, 3,2 g; fracción 3, 1,5 g y fracción 4, 0,4 g.

La fracción 1 estaba constituida por ceras que no se estudiaron.

La fracción 2 fue sometida a cromatografía en columna seca de silicagel Davidson usando como solventes de elución Cl_2CH_2 -éter de petróleo, 4:6; 6:4 y 8:2, obteniéndose así un compuesto puro, recristalizable del solvente mezcla Cl_3CH -acetona. Este compuesto fue analizado por CGL, CGL-EM, ^1H -RMN e IR resultando ser el

alcohol lineal triacontanol (I). Se detectó también por CGL en esta fracción la presencia de los alcoholes lineales $C_{26}H_{54}O$ a $C_{31}H_{64}O$.

De la fracción 3 luego de cromatografiarla a mediana presión en una columna Lobar tamaño B usando como solventes de elución Cl_3CH y gradientes de Cl_3CH -MeOH, se obtuvo una subfracción que dio positiva la reacción de Liebermann-Burchardt y que fue recristalizada de metanol. El precipitado obtenido se analizó por CGL contra testigos y CGL-EM, identificándose así la presencia de estigmasta-1,3,5-trieno (II), estigmasta-3,5-dieno (III), campesterol (IV), estigmasterol (V), sitosterol (VI), estigmast-4-en-3-ona (VII), estigmasta-4,6-dien-3-ona (VIII) y estigmasta-3,5-dien-7-ona (IX).

La fracción 4 de consistencia resinosa y oscura, no fue estudiada.

Estudio del Extracto de éter de petróleo

Se cromatografiaron 20 g del extracto de éter de petróleo en una columna de silicagel H (300 g) siendo los solventes de elución empleados éter de petróleo, Cl_3CH , Cl_3CH -EtOH 20% y 50%.

Se obtuvieron así siete fracciones mayoritarias

Fracción	masa (g)	componentes
1	0,8	hidrocarburos
2	7,3	ceras
3	2,1	triacontanol (<u>I</u>)
4	2,3	ceras
5	1,6	esteroides
6	0,8	glicósidos de esteroides
7	3,7	residuo oscuro

La fracción 1 contenía hidrocarburos que fueron analizados por CGL contra testigos y por CGL-EM, siendo identificados co-

mo hidrocarburos lineales de $C_{21}H_{44}$ a $C_{33}H_{68}$.

La fracción 2 estaba constituida por ceras que no se identificaron.

Por comparación cromatográfica de la fracción 3 con el compuesto I se determinó que ésta estaba constituida casi exclusivamente por triacontanol.

La fracción 4 también era rica en ceras y no fue analizada.

De la fracción 5 se aislaron mediante cromatografía en columna de silicagel H, eluyendo con Cl_3CH , una fracción de características esteroideas que por análisis por CGL y CGL-EM resultó estar constituida por los esteroides: estigmasta-1,3,5-trieno (II), estigmasta-3,5-dieno (III), campesterol (IV), estigmasterol (V), sitosterol (VI), estigmast-4-en-3-ona (VII), estigmasta-4,6-dien-3-ona (VIII) y estigmasta-3,5-dien-7-ona (IX).

La fracción 6 fue cromatografiada en columna de silicagel H, siendo los sistemas de elución Cl_3CH -AcOEt 50% y luego gradientes de polaridad creciente hasta AcOEt puro. Se obtuvo así una fracción de características esteroideas que al metilarse en placa con diazometano se resolvía en tres manchas, correspondiendo una de ellas a un compuesto no metilable.

La fracción 6, entonces, se metiló con diazometano durante una noche, y el producto así obtenido se cromatografió en columna de silicagel H y se eluyó con Cl_3CH -AcOEt 20% y luego AcOEt.

Una de las subfracciones obtenidas tenía una masa muy pequeña por lo que no pudo ser analizada. Las otras dos sustancias resultantes (X y XIa) fueron purificadas por acetilación y por cromatografía en sendas columnas de silicagel H, empleando como solventes de elución Cl_3CH -AcOEt 2%, obteniéndose así Xb y XIb puros. (Xb= sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido peracetilado y XIb= sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranosido metilado y acetilado, Xb=14 mg, XIb=8 mg).

La fracción 7 no fue estudiada.

Estudio del Extracto etanólico

Se tomaron 100 g del extracto etanólico y se disolvieron en una mezcla de $\text{Cl}_3\text{CH}-\text{H}_2\text{O}$. A esta mezcla se le agregaron 120 g de poliamida para columna y se evaporaron los solventes.

La pastilla así resultante se sometió a percolaciones sucesivas con Cl_3CH , H_2O y MeOH .

Luego de evaporar los respectivos solventes se obtuvieron 21,3 g de residuo clorofórmico, 63,7 g de residuo acuoso y 8,2 g de residuo metanólico.

Estudio del percolado clorofórmico

Se cromatografiaron 10 g del extracto clorofórmico en columna de silicagel H usando como solventes de elución gradientes de $\text{Cl}_3\text{CH}-\text{MeOH}$.

El análisis de las fracciones así obtenidas revela la presencia de los glicósidos esteroidales X y XI así como también la presencia de una fracción más polar y mucho más abundante (1,86 g) casi insoluble en la mayoría de los solventes (soluble en piridina) que presentaba también características esteroidales (Liebermann-Burchardt positivo).

Se cromatografió esta fracción en columna de silicagel H usando como eluyentes $\text{AcOEt}-\text{MeOH}$ 7% y finalmente se recrystalizó de AcOEt , obteniéndose sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido (XII).

Estudio del percolado metanólico

Dos gramos del residuo metanólico se sometieron a cromatografía en columna de silicagel H, eluyendo con $\text{AcOEt}-\text{EtOH}$ 10% , 20% , 50% y finalmente con EtOH . De esta forma se obtuvieron cuatro fracciones. La primera cuya masa era de 0,63 g no fue estudiada.

La segunda de 0,21 g dio Shinoda positivo y fue purificada por cromatografía en columna de silicagel H (solvente de elu

ción AcOEt-EtOH 10%), resultando una fracción mayoritaria que fue repurificada en columna de Sephadex LH-20 (20 x 300 mm) eluyendo con MeOH. Se obtuvo así un sólido amarillo (94 mg) que fue caracterizado como canferol-3-O- β -rutinósido (XIII)

La fracción 3 (0,55 g) también fue cromatografiada en columna de silicagel H eluyéndose con AcOEt-EtOH 20% su componente mayoritario, el cual fue purificado en columna de Sephadex LH-20 con MeOH. Se obtuvieron así 270 mg de un compuesto XIV puro que fue identificado como canferol-3-O- β -rutinósido-7-O- α -ramnopiranosido.

La última fracción cuya masa era de 0,38 g resultó ser una mezcla compleja que no fue estudiada.

Estudio del percolado acuoso

Se sembraron 80 mg de percolado acuoso en una columna de 1 x 30 cm de resina de intercambio catiónico AG50W X8 (malla 50-100) forma H⁺.

Se eluyeron primero las sustancias neutras con 80 ml de agua y luego con 20 a 30 ml de NH₄OH 4 N los aminoácidos (17 mg; ninhidrina positivo). Esta última fracción se llevó a sequedad y se evaporó sucesivas veces de MeOH hasta que se obtuvo un producto cristalino que fue cromatografiado en un analizador automático de aminoácidos, pudiéndose caracterizar así los siguientes compuestos: ácido aspártico (XVII), treonina (XVIII), serina (XIX), ácido glutámico (XX), prolina (XXI), glicina (XXII), alanina (XXIII), valina (XXIV), metionina (XXV), isoleucina (XXVI), leucina (XXVII), tirosina (XXVIII), fenilalanina (XXIX) e histidina (XXX).

Marcha separativa para el estudio de compuestos alcaloidales

Se suspendieron aproximadamente 50 g de extracto etanólico en 1 litro de solución de HCl 0,1 N y se separó el insoluble obtenido.

La solución resultante se extrajo con AcOEt y posteriormente con Cl_3CH , desechándose los extractos orgánicos. La fase acuosa ácida remanente ($\text{pH}=3$), se llevó a $\text{pH}=5$ con $\text{NH}_4\text{OH}_{(c)}$ y se extrajo con Cl_3CH hasta reacción de Dragendorff negativa; se repitió la misma operación a $\text{pH}=7, 9$ y 12 . A $\text{pH}=12$ se llegó mediante el agregado de K_2CO_3 .

De esta manera, se obtuvieron sendos residuos clorofórmicos cuyas masas fueron a $\text{pH}=5$, $0,220$ g; a $\text{pH}=7$, $0,105$ g; a $\text{pH}=9$, $0,087$ g y a $\text{pH}=12$, $0,131$ g. Todas estas fracciones, debido a su escasa masa, labilidad y complejidad no fueron analizadas.

De la solución acuosa a $\text{pH}=12$ se precipitaron los alcaloides cuaternarios como las correspondientes sales de Reinecke, mediante el agregado de una solución saturada de este complejo $(\text{Cr}(\text{SCN})_4(\text{NH}_3)_2)\text{NH}_4$. Luego de filtrar, se disolvió el precipitado en acetona, se volvió a separar el insoluble que fue desechado y se evaporó la solución resultante, recuperándose $1,30$ g de reineckato. Esta sal fue tratada con resina de intercambio aniónico Amberlite IRA-400 (OH^-), sembrando en acetona y eluyendo con etanol. Se obtuvieron así, luego de eliminar el solvente de la fracción en estudio, $0,234$ g de alcaloide libre, el cual tenía como característica ser muy higroscópico.

Este compuesto se purificó por columna de alúmina, sembrando en pastilla y eluyendo con $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{MeOH}:\text{AcOH}$, $10:1:0,1$. Se aislaron $0,263$ g del compuesto XV que fue identificado como colina. El aumento observado en la masa se debe a la formación del correspondiente acetato.

La solución acuosa a $\text{pH}=12$ resultante luego de separar el reineckato arriba analizado, fue acidificada con $\text{HCl}_{(c)}$ a $\text{pH}=8$ y luego a $\text{pH}=5$ no detectándose en ninguno de los dos casos precipitado al agregar la solución saturada de sal de Reinecke. En cambio a $\text{pH}=1$ se observó la formación de un insoluble que fue tratado análogamente al compuesto XV. El solvente de elución en la columna de alúmina fue en este caso $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{MeOH}:\text{AcOH}$, $10:2,5:0,2$; aislándose $0,215$ g de acetato de trigonelina (XVI).

Estudio del Extracto etanólico de flores

Al tratar de redissolver en etanol 15 g del extracto etanólico de flores, se formó un insoluble que fue separado por filtración. El precipitado resultante (3,2 g) se recristalizó de etanol y fue identificado como D-inositol-3-metiléter (XXXI).

Al evaporar la solución obtenida luego de separar el precipitado, se obtuvo un residuo que fue cromatografiado en columna de silicagel H (siembra en pastilla), eluyendo con gradientes de C_6H_6 -EtOH y finalmente con gradientes de EtOH- H_2O .

Este proceso condujo a cuatro fracciones, las cuales aún contenían aproximadamente un 10 % del compuesto XXXI. La primera de éstas pesaba 0,80 g y no fue analizada.

En la segunda fracción, de 2,39 g, se detectó la presencia del compuesto XIII (canferol-3-O- β -rutinósido), previa purificación en columna de sílicagel H (eluida con AcOEt-EtOH 10%) y en columna de Sephadex LH-20 con MeOH.

La fracción 3 resultó ser la mayoritaria (4,21 g). Se la recromatografió también en columna de silicagel H empleando como solvente de elución Cl_3CH -EtOH 33%, y la subfracción que dio Shinoda positivo fue sometida a cromatografía en columna de Sephadex LH-20 en MeOH. Se detectó de esta forma al compuesto XIV (canferol-3-O- β -rutinósido-7-O- α -L-ramnósido).

El resto de los componentes de esta fracción, así como también los de la fracción 4 (1,57 g), eran mezclas complejas de productos muy polares.

ESTUDIO QUIMICO DE BAUHINIA VARIEGATA

Se extrajeron 40 g de hojas y ramas, secas y molidas, de esta especie vegetal sucesivamente con éter de petróleo, cloroformo y metanol.

Estas extracciones rindieron, luego de evaporar el correspondiente solvente, 1,6 g de extracto de éter de petróleo; 5,0 g de extracto clorofórmico y 2,3 g de extracto metanólico.

Estudio del Extracto de éter de petróleo

Por cromatografía en columna de silicagel H de este extracto, eluyendo con éter de petróleo y Cl_3CH , se obtuvieron cinco fracciones.

Fracción	masa (g)	composición
1	0,075	hidrocarburos
2	0,581	ceras
3	0,163	triacontanol
4	0,148	esteroides
5	0,450	residuo

Hidrocarburos

Los hidrocarburos de la fracción 1 fueron analizados por CGL, utilizando una columna OV-17, 3%; 1,8 m de longitud; 220°C, isotérmica. Estos datos fueron comparados con los obtenidos para *B. candicans*, obteniéndose los siguientes resultados:

T_R (fórmula, %) min.: 1,35 ($\text{C}_{20}\text{H}_{42}$, 0,38); 1,65 ($\text{C}_{21}\text{H}_{44}$, 0,15); 2,06 ($\text{C}_{22}\text{H}_{46}$, 0,16); 2,64 ($\text{C}_{23}\text{H}_{48}$, 0,45); 3,43 ($\text{C}_{24}\text{H}_{50}$, 0,29); 4,57 ($\text{C}_{25}\text{H}_{52}$, 1,64); 6,11 ($\text{C}_{26}\text{H}_{54}$, 1,33); 8,33 ($\text{C}_{27}\text{H}_{56}$, 3,60); 11,34 ($\text{C}_{28}\text{H}_{58}$, 1,34); 15,95 ($\text{C}_{29}\text{H}_{60}$,

53,63); 21,51 ($C_{30}H_{62}$, 0,80); 25,71 ($C_{31}H_{64}$, 77,51);
34,82 ($C_{32}H_{66}$, 2,28).

Triacontanol I

La fracción 3 dio triacantanol (I) como principal componente, cuya identidad fue comprobada mediante comparación cromatográfica contra testigo obtenido de la especie *B. candidans*.

C.c.d. (sílicagel; Cl_3CH -EP, 3:2) $R_f = 0,45$ (mancha rosada)
CGL (OV-17,3%, 1,8 m de long.; temperatura 240°C, isot.)
 $t_R = 13,05$.

Esteroides

La fracción 4 fue analizada por columna capilar SP-2100; 15 m de longitud, 0,2 mm de diámetro, empleando un gradiente de temperaturas de 200°C a 280°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La identificación de sus componentes se realizó por CGL-EM con columna SE-30, 3% con programación de temperatura de 200°C a 290°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

Se determinó así la existencia de:

T_R (compuesto, %) min.: 6,83 (estigmasta-3,5-dieno III, 2,40);
7,44 (campesterol IV; 9,06); 7,64 (estigmasterol V; 13,15)
8,08 (sitosterol VI; 56,24); 8,72 (estigmast-4-en-3-ona
VII; 3,69); 9,05 (estigmasta-4,6-dien-3-ona VIII; 2,81).

Estudio del Extracto clorofórmico

El extracto clorofórmico se subfraccionó mediante cromatografía en columna de sílicagel H usando como eluyentes: Cl_3CH , AcOEt, AcOEt-MeOH.

Se identificaron además de los esteroides ya mencionados, los glicósidos esteroidales: sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido X, sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranósido XI y sitosterol-3-O- β -

-D-glucopiranosido XII. Estas conclusiones fueron sacadas en base a comparación cromatográfica con los respectivos testigos aislados de *B. candidans*.

Estudio del Extracto metanólico

El residuo metanólico se fijó sobre poliamida para columna para obtener así una pastilla que fue tratada análogamente al caso del estudio de *B. candidans*.

Se analizó el percolado acuoso obteniéndose como componentes orgánicos mayoritarios los alcaloides cuaternarios colina XV y trigonelina XVI. La identificación se efectuó por comparación cromatográfica contra los respectivos testigos aislados de *B. candidans*.

Siguiendo el procedimiento indicado en la página 184, y por comparación cromatográfica contra testigos fueron identificados los siguientes compuestos: ác. aspártico (XVII), treonina (XVIII), serina (XIX), ác. glutámico (XX), prolina (XXI), glicina (XXII), alanina (XXIII), valina (XXIV), metionina (XXV), isoleucina (XXVI), leucina (XXVII), tirosina (XXVIII), fenilalanina (XXIX) e histidina (XXX).

ESTUDIO QUIMICO DE BAUHINIA FORFICATA

Las hojas frescas recibidas desde Río de Janeiro (aparentemente con conservador), se lavaron y secaron en estufa y luego de la molienda rindieron 120 g de material vegetal.

Este se extrajo con cloroformo obteniéndose 17,3 g de residuo clorofórmico y el resto vegetal se extrajo con metanol resultando al evaporar el solvente un residuo cuya masa era de 5,1 g.

Estudio del Extracto clorofórmico

Mediante columna de silicagel H se subdividió este residuo, usando como solventes de elución: éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo con gradientes de metanol.

Se obtuvieron mediante este proceso las siguientes fracciones:

Fracción	masa (g)	composición
1	0,72	hidrocarburos
2	6,57	ceras
3	3,46	triacontanol <u>I</u>
4	0,98	esteroides
5	1,85	no analizada
6	.0,57	glicósidos de esteroides <u>X</u> y <u>XI</u>
7	0,93	sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido <u>XII</u>
8	2,81	residuo oscuro

Hidrocarburos

Los hidrocarburos de la primera fracción fueron analizados por CGL con columna OV-17, 3% 1,8 m de longitud; 220°C, isotérmica; se determinó así, utilizando como testigos los hidrocarburos identificados de *B. candicans*, la presencia de los siguientes:

T_r (fórmula, %) min.: 1,32 ($C_{20}H_{42}$; 0,92); 1,59 ($C_{21}H_{44}$; 0,05);
 2,01 ($C_{22}H_{46}$; 0,56); 2,57 ($C_{23}H_{48}$; 0,12); 3,33 ($C_{24}H_{50}$;
 0,30); 4,41 ($C_{25}H_{52}$; 3,00); 5,91 ($C_{26}H_{54}$; 9,57); 7,93
 ($C_{27}H_{56}$; 3,90); 10,79 ($C_{28}H_{58}$; 1,97); 15,01 ($C_{29}H_{60}$;
 53,63); 20,21 ($C_{30}H_{62}$; 2,76); 27,89 ($C_{31}H_{64}$; 15,53);
 37,35 ($C_{32}H_{66}$; 2,06); 51,01 ($C_{33}H_{68}$; 5,51).

Triacantanol I

El triacantanol (I), que resultó ser el componente mayoritario de la fracción 3, fue caracterizado por comparación cromatográfica con el testigo aislado de *B. candidans*.

Las características cromatográficas de este compuesto se detallaron en la página 194 .

Esteroides

La fracción 4 dio positivo el test de Liebermann-Burchardt. Su análisis por CGL utilizando columna capilar SP-2100 de 15 m de longitud y 0,2 mm de diámetro (200→280 °C; 10 °C/min) indicó la presencia de:

T_r (compuesto, %) min.: 9,14 (colesterol; 0,78); 9,49 (brasicasterol; 2,27); 9,95 (campesterol; 5,38); 10,20 (estigmasterol; 8,85); 10,76 (sitosterol; 76,20); 11,79 (estigmast-4-en-3-ona; 3,43).

La identificación de estos compuestos se hizo por CGL-EM usando columna SE-30, 3%; de 200- 290°C, con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

Colesterol XXXII m/e (%): 412 (M+2; 4,3); 411 (M+1; 18,7); 410 (M; 100); 385 (M-15; 42,8); 382 (M-18; 58,3); 367 (M-18-15; 43,1); 315 (M-18-67; 62,2); 289 (M-18-93; 63,8); 274 (M-18-108; 10,6); 273 (M-cadena lateral; 21,3); 261 (M-18-21; 15,7); 255 (M-18-cadena lateral; 43,6); 246 (M-

-cadena lateral-27; 4,9); 231 (M-cadena lateral-42; 39,5); 213 (M-cadena lateral-42-28; 53,2); 163 (41,1); 145 (39,7); 135 (29,2); 109 (19,7); 95 (43,1); 81 (37,7).

Brasicasterol XXXIII m/e (%): 399 (M+1; 5,1); 398 (M; 16,9); 365 (M-18-15; 4,7); 337 (M-43-18; 5,1); 300 (M-98; 13,1); 285 (M-15-98; 4,4); 281 (M-18-99; 4,7); 273 (M-cadena lateral; 6,1); 271 (M-cadena lateral-2H; 17,1); 267 (M-15-18-98; 5,3); 255 (M-cadena lateral-18; 27,3); 253 (M-cadena lateral-2H-18; 7,1); 229 (M-cadena lateral-27-17; 6,5); 213 (M-cadena lateral-42-18; 13,4); 211 (M-cadena lateral-42-2H-18; 5,6); 207 (12,8); 159 (29,3); 145 (27,8); 133 (26,2); 95 (34,5); 81 (46,3); 69 (100).

Glicósidos de esteroides

De la fracción 6, previa metilación y posterior comparación cromatográfica con los respectivos testigos aislados de *B. candidans*, se detectó la presencia de los glicósidos de esteroides: sitosterol-3-O-β-D-xilopiranosido (X) y sitosterol-3-O-α-D-riburonofuranosido (XI).

La fracción 7, que presentaba la característica insolubilidad en la mayoría de los solventes comúnmente utilizados, del compuesto XII, fue comparada por c.c.d. con el testigo de sitosterol-3-O-β-D-glupiranosido (XII) aislado de *B. candidans*, resultando los R_f de ambos componentes iguales.

Estudio del Extracto metanólico

El Extracto metanólico se fijó sobre poliamida para columna, obteniéndose así una pastilla que fue procesada como se indica en el estudio análogo realizado para *B. candidans*.

El análisis del percolado acuoso mostró que los componentes orgánicos mayoritarios eran, al igual que en las otras dos especies, colina (XV) y trigonelina (XVI). Se llegó a esta conclusión por comparación cromatográfica con los testigos aislados de *B. candicans*.

Por cromatografía de intercambio iónico (resina AG50W X8, forma H^+) de una alícuota del Extracto metanólico, se obtuvieron dos fracciones: una constituida por los componentes neutros del mismo y otra, eluida con NH_4OH 4 N formada por las sustancias iónicas (ver pág. 184). Por comparación cromatográfica de esta última fracción contra testigos se determinó la presencia de los siguientes compuestos: ác. aspártico (XVII), treonina (XVIII), serina (XIX), ác. glutámico (XX), prolina (XXI), glicina (XXII), alanina (XXIII), valina (XXIV), metionina (XXV), isoleucina (XXVI), leucina (XXVII), tirosina (XXVIII), fenilalanina (XXIX) e histidina (XXX).

DATOS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE BAUHINIA CANDICANS

Compuestos identificados en el estudio del Precipitado de éter de petróleo

Triacantanol I

pf: 85-86°C (Cl₃CH-acetona) (Lit.: 85°C)²⁵⁸

c.c.d.: (silicagel; Cl₃CH-EP, 3:2; Revelador: H₂SO₄(c)) R_f=0,45
mancha rosada.

IR (cm⁻¹): 3200 (banda ancha, tens. O-H); 2800 (estir. C-H); 1070
y 1460 (def. O-H y estir. C-O); 720 y 730 (def. -(CH₂)_n-)

¹H-RMN (60 MHz, Cl₃CD) ppm: 0,85 (3H, s, Me-); 1,28 (58H, s,
-(CH₂)_n-); 3,62 (2H, m, -CH₂-OH).

CGL-EM: columna OV-17 3%; 1,8 m; temp. programada: 200- 290°C; 10°C/
min.

EM m/e (%): 420 (M-18; 2,8); 392 (M-18-28; 1,8); 209 (M-18-29-13x
14; 2,2); 195 (3,0); 181 (4,0); 167 (5,3); 153 (7,5);
139 (11,3); 125 (22,0); 111 (39,8); 97 (70,4); 83 (75,2);
69 (59,4); 57 (100); 43 (68,0).

Alcoholes lineales

CGL: columna OV-17 3%; 1,8 m; 240°C, isotérmica. Mediante compa-
ración contra testigos se obtuvieron los siguientes resultados:

T_r (fórmula, %) min.: 5,15 (C₂₆H₅₄O; 1,56); 6,54 (C₂₇H₅₆O; 0,30);
8,07 (C₂₈H₅₈O; 6,59); 10,29 (C₂₉H₆₀O; 3,37); 12,91
(C₃₀H₆₂O; 87,91); 26,05 (C₃₁H₆₄O; 0,27).

Esteroides

c.c.d.: (silicagel; Cl_3CH -acetona, 95:5; $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{c})$) $R_f=0,4$ (mancha rosada).

CGL: columna capilar SP-2100; 15 m de longitud y 0,2 mm de diámetro; temp. programada: 200→280°C; 8°C/min. Comparación con testigos.

T_r (compuesto, %) min: 7,71 (estigmasta-1,3,5-trieno II; 0,42); 7,97 (estigmasta-3,5-dieno; 0,78); 8,76 (campesterol IV; 2,88); 9,02 (estigmasterol V; 10,62); 9,63 (sitosterol VI; 80,64); 9,91 (estigmast-4-en-3-ona VII; 2,68); 10,31 (estigmasta-4,6-dien-3-ona VIII; 0,73); 10,55 (estigmasta-3,5-dien-7-ona IX; 0,31).

CGL-EM: columna OV-17 3%; 1,8 m de longitud y 2 mm de diám.; temp. programada, 200→290°C, 6°C/min.

Estigmasta-1,3,5-trieno II EM m/e (%): 395 (M+1; 23,8); 394 (M; 74,5); 379 (M-15; 6,7); 275 (M-119; 31,4); 253 (M-cadena lateral; 14,4); 211 (M-cadena lateral-42; 8,3); 158 ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}$; 32,9); 143 (158-15; 53,2); 135 (anillos C y D retro D.A.-cadena lateral; 100); 119 (C_9H_{11} ; 42,1); 95 (anillo D; 43,2); 93 (135-42; 26,3); 81 (74,2).

Estigmasta-3,5-dieno III EM m/e (%): 398 (M+2; 3,0); 397 (M+1; 11,9); 396 (M; 39,0); 381 (M-15; 11,9); 288 (M-108; 11,3); 275 (M-121; 28,1); 255 (M-cadena lateral; 14,1); 213 (M-cadena lateral-42; 12,0); 145 (anillos A y B; 45,4); 135 (anillos C y D - cadena lateral; 87,8); 121 (C_9H_{13} ; 48,6); 95 (anillo D; 38,5); 93 (135-42; 33,4); 81 (100).

Campesterol IV EM m/e (%): 401 (M+1; 21,1); 400 (M; 69,4); 385 (M-15; 34,9); 382 (M-18; 45,1); 367 (M-15-18; 12,8); 315 (M-18-67; 57,5); 289 (M-93-18; 54,2); 274 (M-18-108; 12,7); 273 (M-cadena lateral; 35,6); 261 (M-18-121; 15,5); 255 (M-18-cadena lateral; 52,0); 231 (M-42-cadena lateral; 38,9); 229 (M-27-17-cadena lateral; 22,7); 213 (M-42-18-cadena lateral; 68,4); 178 (22,0); 163 (55,7);

145 (85,1); 135 (66,2); 121 (55,4); 95 (94,3); 81 (93,4);
57 (100).

Estigmasterol V EM m/e (%): 413 (M+1; 13,5); 412 (M; 42,8); 397 (M-15; 5,6); 394 (M-18; 7,2); 379 (M-18-15; 8,8); 369 (M-43; 11,5); 351 (369-18; 22,6); 300 (M-18-94; 25,2); 299 (M-15-98; 9,2); 281 (M-15-18-98; 6,2); 273 (M-cadena lateral; 13,2); 271 (M-cadena lateral-2; 34,4); 255 (M-cadena lateral-18; 53,1); 253 (M-cadena lateral-18-2; 10,5); 231 (M-cadena lateral -42; 9,7); 213 (M-cadena lateral-42-18; 24,3); 163 (17,6); 145 (39,7); 133 (45,2); 109 (30,5); 107 (34,9); 95 (43,0); 83 (100); 81 (63,8); 69 (63,2).

Sitosterol VI EM m/e (%): 416 (M+2; 7,2); 415 (M+1; 29,8); 414 (M; 100); 399 (M-15; 37,5); 396 (M-18; 51,2); 381 (M-15-18; 36,5); 330 (M-18-67+1; 44,2); 303 (M-18-93; 56,7); 275 (M-18-121; 12,0); 273 (M-cadena lateral; 28,2); 255 (M-cadena lateral-18; 34,0); 246 (M-cadena lateral-27; 6,2); 231 (M-cadena lateral-42; 28,3); 213 (M-cadena lateral-42-18; 41,2); 145 (43,8); 135 (30,9); 95 (48,0); 81 (41,2).

Estigmast-4-en-3-ona VII EM m/e (%): 413 (M+1; 10,4); 412 (M; 28,4); 397 (M-15; 9,7); 370 (M-42; 11,9); 355 (M-42-15; 4,6); 327 (M-85; 6,4); 289 (M-123; 19,5); 288 (M-124; 16,0); 271 (M-cadena lateral; 10,3); 244 (M-cadena lateral-27; 4,0); 229 (M-cadena lateral-42; 37,7); 161 (13,5); 147 (25,2); 135 (23,8); 124 (anillo A; 100); 95 (28,4); 57 (28,3).

Estigmasta-4,6-dien-3-ona VIII EM m/e (%): 412 (M+2; 15,8); 411 (M+1; 27,3); 410 (M; 83,7); 395 (M-15; 18,1); 368 (M-42; 7,2); 366 (M-44; 6,4); 315 (M-95; 14,1); 289 (M-121; 9,6); 275 (M-135; 43,1); 269 (M-cadena lateral; 46,9); 241 (M-cadena lateral-28; 8,3); 227 (M-cadena lateral-42; 19,7); 174 (anillos A y B +14; 70,1); 160 (anillos

A y B; 59,0); 136 (C₉H₁₂); 100); 121 (136-15; 35,5); 95 (anillo A; 84,6).

Estigmasta-3,5-dien-7-ona IX EM m/e (%): 412 (M+2; 2,0); 411 (M+1; 11,9); 410 (M; 33,4); 395 (M-15; 4,6); 269 (M-cadena lateral; 14,6); 227 (M-cadena lateral-42; 4,2); 187 (M-cadena lateral-82; 21,2); 174 (M-cadena lateral-95; 100); 161 (M-cadena lateral-108; 24,9); 159 (174-15; 22,7); 134 (9,5); 95 (15,2); 81 (25,8); 57 (30,5); 43 (30,9).

Compuestos identificados en el Extracto de éter de petróleo

Hidrocarburos

c.c.d.: (silicagel; EP; Rev: I₂) R_f=1 (mancha violeta)

CGL: columna OV-17 3%; 1,8 m de longitud; 220°C, isotérmica.

T_r (fórmula; %) min: 1,04 (C₂₁H₄₄; 0,06); 1,33 (C₂₂H₄₆; 0,05); 1,73 (C₂₃H₄₈; 0,16); 2,24 (C₂₄H₅₀; 0,11); 2,94 (C₂₅H₅₂; 0,72); 3,90 (C₂₆H₅₄; 0,43); 5,21 (C₂₇H₅₆; 3,03); 6,94 (C₂₈H₅₈; 1,80); 9,30 (C₂₉H₆₀; 20,70); 12,57 (C₃₀H₆₂; 0,33); 17,03 (C₃₁H₆₄; 57,61); 22,75 (C₃₂H₆₆; 2,16); 30,71 (C₃₃H₆₈; 12,03).

Sitosterol-3-O-β-D-xilopiranosido X

[α]_D²⁵ = -15,75° (c: 0,34; Cl₃CH)

IR (cm⁻¹): 2850 (estir. C-H), 1740 (estir. C=O), 1460 (def. C-H), 1380 (def. C-H), 1260-1250 (estir. C-O), 1180 (estir. C-O), 1050 ancha (estir. C-C).

EM m/e (%): 414 (Aq; 3,6); 398 (11,2); 397 (22,4); 396 (Ag-18; 37,0); 381 (Ag-18-15; 4,9); 275 (Ag-139; 2,2); 273 (Ag-cadena

lateral; 4,3); 213 (273-42-18; 19,6); 199 (A_1 -60; 5,2); 145 ($(CH_3-CO)_3O^+$; 6,8); 139 (A_2 ; 5,7); 128 (B_2 ; 7,9); 107 (18,3); 103 ($(CH_3CO)_2OH^+$; 4,1); 95 (8,2); 81 (22,5); 57 (7,2); 43 (100).

Ag= aglicona

1H -RMN (100 MHz, Cl_3CD) ppm: 0,68 (3H, s, Me-18); 0,83 (6H, d, $J=7$ Hz, Me-26 y 27); 0,84 (3H, t, $J=6,7$ Hz, Me-29); 0,92 (3H, d, $J=3$ Hz, Me-21); 0,99 (3H, s, Me-19); 1,98 (3H, s, H_3CCO); 2,00 (3H, s, H_3CCO); 2,03 (3H, s, H_3CCO); 3,3,48 (1H, m, H-3); 3,71 (1H, m, H-5'_{axial}); 4,19 (1H, m, H-5'_{ecuat}); 4,56 (1H, d, $J_{1',2'}=8$ Hz, H-1'); 4,8-5,3 (1H, m, H-4'); 4,94 (1H, t, $J_{1',2'}=J_{2',3'}=8$ Hz, H-2'); 5,12 (1H, t, $J_{2',3'}=J_{3',4'}=8$ Hz, H-3'); 5,35 (1H, m, H-6).

^{13}C -RMN (20,15 MHz, Cl_3CD) ppm: 173,19 (CH_3OCO); 170,1 (CH_3OCO); 169,1 (CH_3OCO); 140,2 (C-5); 121,9 (C-6); 99,5 (C-1'); 79,9 (C-3); 71,6^a (C-3'); 71,4^a (C-2'); 68,6 (C-4'); 61,9 (C-5'); 56,6 (C-14); 55,9 (C-17); 50,0 (C-9); 45,7 (C-24); 42,2 (C-13); 39,6 (C-12); 38,7 (C-4); 37,0 (C-1); 36,6 (C-10); 36,0 (C-20); 34,0 (C-22); 31,7 (C-7 y 8); 29,5 (C-2); 29,2 (C-25); 28,1 (C-16); 26,0 (C-23); 24,2 (C-15); 22,0 (C-28); 20,9 (C-11); 20,4 (CH_3CO_2); 19,6 (C-26); 19,2 (C-19); 18,9 (C-27); 18,6 (C-21); 11,8 (C-29); 11,7 (C-18)

^a Estos valores pueden intercambiarse.

Hidrólisis de sitosterol-3-O-β-D-xilopiranosido paracetilado Xb

Una suspensión de 5 mg de Xb en 2 ml de HCl 6 % en MeOH, fue calentada hasta disolución. Luego de agregar gotas de agua hasta ligera turbidez, se calentó esta mezcla en tubo cerrado a 75°C durante 2 horas.

Transcurrido dicho tiempo se neutralizó el ácido con $NaHCO_3$, se eliminó el metanol y el residuo obtenido se extrajo con Cl_3CH-H_2O , 1:1.

El extracto clorofórmico se analizó por CGL (columna capilar SP-2100; temp. programada, 200→280; 10°C/min), confirmando-se por este método la identidad de la aglicona que resultó ser sitosterol.

El extracto acuoso se trató, como se detalló en la parte de reacciones generales, para obtener los correspondientes alditoles acetilados, que se analizaron por CGL (columna ECNSS 3%, 180 °C, isotérmica). Por comparación contra testigos se determinó la existencia de xilitol acetilado.

Ester metílico de sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranósido peracetilado XIb

$$[\alpha]_D^{25} = -18,26^\circ \quad (c: 0,23; Cl_3CH)$$

IR (cm⁻¹): 2900 (estir. C-H); 1740 (estir. C=O); 1460 (def. C-H); 1370 (def. C-H); 1220-1240 (estir. C-O); 1050 (estir. C-C).

¹H-RMN (100 MHz, Cl₃CD) ppm: 0,68 (3H, s, Me-18); 0,82 (6H, d, J=7 Hz, Me-26 y 27); 0,84 (3H, t, J=6,5 Hz, Me-29); 0,92 (3H, d, J=3 Hz, Me-21); 1,00 (3H, s, Me-19); 2,09 (3H, s, MeCO); 2,10 (3H, s, MeCO); 3,39 (3H, s, COOMe); 3,50 (1H, m, H-3); 4,16 (1H, d, J_{3',4'}=5 Hz, H-4'); 4,50 (1H, d, J_{1',2'}=7,5 Hz, H-1'); 4,97 (1H, dd, J_{3',4'}=5 Hz, J_{2',3'}=10 Hz, H-3'); 5,05 (1H, dd, J_{2',3'}=10 Hz, J_{1',2'}=7,5 Hz, H-2'); 5,36 (1H, m, H-6).

¹³C-RMN (20,15 MHz, Cl₃CD): 173,2; 169,2 y 169,1 (-CO₂R); 140,4 (C-5); 121,8 (C-6); 99,8 (C-1'); 81,1 (C-4'); 79,8 (C-3); 71,9^a (C-2'); 69,0^a (C-3'); 56,7 (C-14); 56,0 (C-17); 50,1 (C-9); 45,7 (C-24); 42,2 (C-13); 39,7 (C-12 y 4); 37,1 (C-1); 36,6 (C-10); 36,0 (C-20); 33,8 (C-22); 31,8 (C-7 y 8); 29,1 (C-25); 28,2 (C-16 y 2); 26,0 (C-23); 24,1 (C-15); 23,0 (C-28); 21,0 (C-11); 20,8 y 20,7 (H₃C-CO); 19,7 (C-26); 19,2 (C-19); 18,9 (C-27); 18,7

(C-21); 11,9 (C-29); 11,7 (C-18).

^a Estos valores pueden ser intercambiados.

Reducción e hidrólisis del éster metílico de sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranósido acetilado XIb

Se disolvieron 7 mg de XIb en 1,5 ml de THF anhidro y se agregó H_4AlLi en exceso. Se dejó a reflujo durante una noche, al cabo de ese tiempo se destruyó el exceso de hidruro con acetato de etilo, luego con etanol y finalmente con una solución ácida diluida.

Se eliminaron a presión reducida los solventes orgánicos y el residuo se extrajo con Cl_3CH-H_2O .

El extracto clorofórmico se hidrolizó como se detalló para el compuesto Xb (pág. 198) y en forma análoga a ese caso se trató el hidrolizado para obtener la correspondiente aglicona y el alditol acetilado.

La aglicona fue analizada por CGL (columna capilar SP-2100; temp. programada, 200 \rightarrow 280°C; 10°C/min.), concluyéndose por comparación con testigos que ésta era sitosterol ($T_r=8,1$ min.).

El alditol acetilado se cromatografió por CGL (columna ECNSS; 180°C, isotérmica), determinándose su identidad como ribitol acetilado ($T_r=6,89$ min.).

Compuestos identificados en el estudio del percolado clorofórmico del Extracto etanólico

Sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido XII

IR (cm^{-1}): 3300 (estir. H-O), 2850 (estir. C-H), 1630 (estir. C=C), 1460 (def. C-H), 1380 (def. H-O), 1170 (estir. C-O), 1080 y 1025 (estir. C-O y C-C), 810 (flex. C-H).

^{13}C -RMN (25,2 MHz, piridina d-5) ppm: 140,8 (C-5); 121,9 (C-6); 102,6 (C-1'); 78,6^a (C-3); 78,5^a (C-5'); 78,1^a (C-3'); 75,3 (C-2'); 71,7 (C-4'); 62,9 (C-6'); 56,9 (C-14); 56,3 (C-17); 50,4 (C-9); 46,1 (C-24); 42,6 (C-13); 40,0 (C-12); 39,4 (C-4); 37,6 (C-1); 37,0 (C-10); 36,5 (C-20); 34,3 (C-22); 32,2 (C-7 y 8); 30,3 (C-2); 29,6 (C-25); 28,6 (C-16); 26,5 (C-23); 24,6 (C-15); 23,5 (C-28); 21,4 (C-11); 20,1 (C-26); 19,5 (C-19); 19,3 (C-27); 19,1 (C-21); 12,3 (C-29); 12,1 (C-18).

^a Estos valores pueden ser intercambiados.

Sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido peracetilado XIIa

EM m/e (%): 414 (Ag; 0,64); 399 (Ag-15; 2,35); 396 (Ag-18; 100); 381 (Ag-18-15; 4,60); 331 (A₁; 14,42); 289 (A₁-42; 2,21); 275 (Ag-139; 6,57); 273 (Ag-cadena lateral; 1,36); 271 (A₁-60; 3,53); 255 (273-18; 9,47); 243 (B₁+1; 4,06); 229 (273-18-27 y 271-42; 5,05); 213 (273-42-18; 3,85); 211 (A₂; 5,39); 200 (B₂; 3,32); 169 (A₃; 24,36); 157 (C₁; 6,35); 145 ((H₃CCO)₃O⁺; 13,84); 140 (B₃; 3,2); 115 (C₂; 6,92); 109 (A₄; 31,63); 103 ((H₃CCO)₂OH⁺; 4,35); 98 (B₄ 7,59); 73 (C₃; 4,85); 43 (15,65).

^1H -RMN (100 MHz, Cl₃CD) ppm: 0,67 (3H, s, Me-18); 0,83 (6H, d, J=7,2 Hz; Me-26 y 27); 0,85 (3H, t, J=7,2, Me-29); 0,90 (3H, d, J=4,5 Hz, Me-21); 0,99 (3H, s, Me-19); 2,00; 2,01; 2,04 y 2,07 (12 H, s, 4 MeCO); 3,50 (1H, m, H-3); 3,64 (1H, m, H-5'); 4,14 (1H, dd, J_{6',6''}=12,5 Hz, J_{5',6'}=0,85 Hz, H-6'); 4,27 (1H, dd, J_{5',6''}=3,7 Hz, J_{6',6''}=12,5 Hz, H-6''); 4,58 (1H, d, J_{1',2'}=8 Hz, H-1'); 4,96 (1H, t, J_{1',2'}=J_{2',3'}=8 Hz, H-2'); 5,06^a (1H, t, J_{2',3'}=J_{3',4'}=8 Hz, H-3'); 5,14^a (1H, t, J_{3',4'}=J_{4',5'}=8 Hz, H-4'); 5,35 (1H, m, H-6).

^{13}C -RMN (20,15 MHz, Cl₃CD) ppm: 172,3; 170,6; 170,3 y 169,3 (CO₂CH₃); 140,3 (C-5); 122,1 (C-6); 99,5 (C-1); 80,8

(C-3); 72,9 (C-3'); 71,6^a (C-2'); 71,5^a (C-5'); 68,5 (C-4'); 62,0 (C-6'); 56,7 (C-14); 56,0 (C-17); 50,1 (C-9); 45,8 (C-24); 42,2 (C-13); 39,7 (C-12); 38,8 (C-4); 37,1 (C-1); 36,6 (C-10); 36,1 (C-20); 33,9 (C-22); 31,8 (C-7 y 8); 29,6 (C-2); 29,1 (C-25); 28,1 (C-16); 26,0 (C-23); 24,2 (C-15); 23,0 (C-28); 21,0 (C-11); 20,6 y 20,5 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO}}$); 19,7 (C-26); 19,3 (C-19); 18,9 (C-27); 18,7 (C-21); 11,9 (C-29); 11,8 (C-18).

Compuestos identificados en el estudio del percolado metanólico del Extracto etanólico

Canferol-3-O- β -rutinósido XIII

UV $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 352 297 (h) y 266. AlCl_3 : 390, 353, 304 y 274. AlCl_3/HCl : 390, 352, 303 y 275. NaMeO : 390, 326 y 275 (no descompone). NaAcO : 365, 303 y 266 (no descompone). $\text{NaAcO}/\text{H}_3\text{BO}_3$: 352, 303 y 266.

EM (derivado trimetilsililado) m/e (%): 740 (TMS rutinosa-HOTMS, (OS-H); 18,01); 560 (canferol+TMS-Me (A+H+R-15); 1,45); 502 (canferol, (A+H); 11,0); 487 (canferol-Me, (A+H-Me); 42,63); 430 (canferol-2H-TMS, (A-2H-R); 16,6); 362 (TMS ramnosa-HOTMS, (T-H ; 41,70); 273 (TMS ramnosa-HOTMS-TMSO, (T_1 -TMSOH); 13,10); 230 ($\text{TMSOC}(\text{CHCH}_3)\text{CHOTMS}^+$; 7,6); 217 ($\text{TMSOCH}=\text{CH}^+\text{CHOTMS}$; 33,66); 204 (TMSOCHCHOTMS^+ ; 18,4); 191 ($\text{TMSOCH}=\text{O}^+\text{TMS}$; 6,9); 147 (TMSOCHCHCH_2^+ ; 16,2); 117 ($\text{O}=\text{CHCH}_2\text{O}^+\text{Si}(\text{CH}_3)_2$; 14,9); 103 ($\text{CH}_2=\text{O}^+\text{TMS}$; 14,3); 73 (TMS^+ ; 100).

$^1\text{H-RMN}$ (derivado trimetilsililado, 100 MHz, Cl_3CD) ppm: 0,88 (3H, d ancho, H-6^{Ram}); 3,46 (10H, m, $\underline{\text{HCOTMS}}$); 4,29 (1H, d, $\text{J}=1,5$ Hz, H-1^{Ram}); 5,72 (1H, d, $\text{J}=7$ Hz, H-1^{Glu}); 6,21 (1H, d, $\text{J}=2$ Hz, H-6); 6,30 (1H, d, $\text{J}=2$ Hz, H-8); 6,84

(2H, d, J=9 Hz, H-3 y 5); 7,80 (2H, d, J=9 Hz, H-2' y 6').

^{13}C -RMN (derivado trimetilsililado, 25,2 MHz, DMSO- d_6) ppm: 17,22 (C-6^{Ram}); 66,69 (C-6^{Glu}); 67,66 (C-5^{Ram}); 69,35 (C-4^{Glu}); 69,77^a C-2^{Ram}; 70,01^a (C-3^{Ram}); 71,27 (C-4^{Ram}); 73,65 (C-2^{Glu}); 75,18^b (C-5^{Glu}); 75,76^b (C-3^{Glu}); 93,15 (C-8); 98,17 (C-6); 100,15 (C-1^{Ram}); 100,73 (C-1^{Glu}); 103,32 (C-10); 114,44 (C-5'); 114,63 (C-3'); 120,23 (C-1'); 130,19 (C-2' y 6'); 132,56 (C-3); 155,79^c (C-2); 156,15^c (C-9); 159,74 (C-4'); 160,49 (C-5); 163,54 (C-7); 176,61 (C-4).

Ram= ramnosa; Glu= glucosa. ^{a,b,c} Estos valores pueden ser inter cambiados.

Degradación del glicósido XIII para identificar su disacárido

Se trabajó paralelamente con 2 mg de rutina (65) y 2 mg de XIII. Se acetilaron con anhídrido acético/piridina a temperatura ambiente. Se aislaron los productos de acetilación, siendo el de rutinosa blanco cristalino y el de XIII amarillo aceitoso.

Se hicieron reaccionar ambos compuestos acetilados con 0,16 ml de Cl_3H , 0,04 ml de diclorometil-metiléter y 0,008 g de ZnCl_2 ^{228,229} (recién fundido y molido). La reacción se llevó a cabo en tubo cerrado con agitación magnética en baño termostatzado de agua a 75°C durante 2 horas.

Una vez transcurrido este lapso se evaporó al vacío, se tomó con Cl_3CH , se extrajo con agua y se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro.

El residuo obtenido luego de evaporar el Cl_3CH fue tratado con 2 mg de AgAcO , 0,2 ml de $(\text{AcO})_2\text{O}$ y calentado durante 2 horas a baño María, con el fin de transformar la α -Cl-rutinosa acetilada en hepta-O-acetil- β -rutinosa²³⁰.

Se volcó sobre agua y se dejó hasta el día siguiente, se le agregó Cl_3CH y se filtraron juntas las dos fases. Se separó la fase orgánica, se lavó con agua y se secó con Na_2SO_4 .

Luego de concentrar la solución clorofórmica se la cromatografió en columna de Sephadex LH-20 para terminar de separar el azúcar acetilado del resto de sales y de aglicona.

Se compararon por c.c.d. de silicagel los productos obtenidos a partir de estos dos glicósidos usando como solvente de desarrollo benceno/AcOEt 70% y benceno/MeOH 96%, obteniéndose en ambos casos coincidencia en los R_f de las dos sustancias comparadas. $R_f = 0,4$ (benceno/AcOEt 70%).

Hidrólisis ácida del glicósido XIII

Se suspendieron 6 mg de XIII en 1 ml de HCl acuoso 6% y se agregaron gotas de MeOH hasta disolución. La solución resultante se calentó a reflujo durante 45 minutos; luego se neutralizó hasta débil acidez y se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo y agua, se lavó, se secó y se evaporó el solvente de la fase orgánica, obteniéndose la aglicona correspondiente.

En la fase acuosa se encontraban los azúcares que fueron tratados como se detalló en la página 178 (reacciones generales) para obtener los correspondientes alditoles acetilados. Estos fueron analizados por CGL (columna ECNSS; 180°C, isotérmica) detectándose porcentajes idénticos de ramnitol acetilado y sorbitol acetilado.

La aglicona se comparó contra testigos por c.c.d. (silicagel; Cl_3CH -MeOH, 97:3) resultando su R_f coincidente con el de canferol ($R_f = 0,40$; revelador: H_2SO_4 , color amarillo).

EM (canferol trimetilsililado) m/e (%): 502 (M; 1,20); 413 (M-72-TMSOH; 2,07); 325 (M-72-2 TMSOH+H; 3,57); 297 (A_1 +H; 3,82); 282 (A_1 +H-15; 1,63); 279 (B_1 ; 5,31); 268 (A_1 +H-29; 5,02); 265 (M-72-165; 8,27); 254 (268-28; 4,75); 237 (265-28; 2,40); 73 (100).

Canferol-3-O- β -rutinósido-7-O- α -L-ramnompiranósido XIV

UV $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 347, 323 (h), 303 (h) y 266, NaMeO: 390, 323 y 274. AlCl_3 : 400, 354, 305 y 274. AlCl_3+HCl : 344, 301 (h) y 273. NaAcO: 350, 305 (h) y 267. $\text{NaAcO}+\text{H}_3\text{BO}_3$: 347, 310 (h) y 266.

EM (derivado trimetilsililado) m/e (%): 864 (S_1+TMS ; 0,60); 792 (S_1+H ; 0,95); 740 (OS-H; 1,83); 559 (A+2 TMS-15; 3,40); 502 (A+TMS; 11,24); 487 (A+TMS-15; 21,23); 430 (A+2 H; 30,77); 415 (A+2 H-15; 6,32); 363 ($\text{T}_{1/2}$; 57,64); 273 ($\text{T}_{1/2}-\text{TMSOH}$; 24,31); 217 ($\text{TMSOCH}=\text{CH}^+\text{HOTMS}$; 53,34); 204 (TMSOCHCHOTMS ; 63,35); 191 ($\text{TMSOCH}=\text{O}^+\text{TMS}$; 18,3); 147 ($\text{TMSO}^+\text{Si}(\text{CH}_3)_2$; 50,52); 129 (TMSOCHCHCH_2^+ ; 32,11); 117 ($\text{O}-\text{CHCH}_2\text{O}^+\text{Si}(\text{CH}_3)_2$; 31,93); 73 (100).

^1H -RMN (derivado trimetilsililado, 100 MHz, Cl_3CD) ppm: 1,05^a (3H, m ancho, H-6^{Ram-7}); 1,25^a (3H, s, H-6^{Ram-6''}); 3,67 (14H, m, HCOTMS); 4,38 (1H, d, $J=2$ Hz, H-1^{Ram-6''}); 4,95 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-1^{Ram-7}); 5,59 (1H, d, $J=6,5$ Hz, H-1^{Glu}); 6,15 (1H, d, $J=2$ Hz, H-6); 6,45 (1H, d, $J=2$ Hz, H-8); 6,89 (2H, d (deformado), $J=8$ Hz, H-3' y 5'); 7,87 (2H, d, $J=8$ Hz, H-2' y 6').

^a Estos valores pueden ser intercambiados.

Glu= glucosa, Ram-6''= ramnosa de rutinosa, Ram-7= ramnosa de C-7.

^{13}C -RMN (derivado trimetilsililado, 25,2 MHz, DMSO-d_6) ppm: 17,2 (C-6^{Ram-7} y C-6^{Ram-6''}); 68,0 (C-6^{Glu}); 69,9^a (C-5^{Ram-7}); 70,0^a (C-2^{Ram-7}); 70,1^a (C-5^{Ram-6''}); 70,4^a (C-2^{Ram-6''} y C-4^{Glu}); 70,7^a (C-3^{Ram-7}); 70,8^a (C-3^{Ram-6''}); 71,7 (C-4^{Ram-7}); 72,2 (C-4^{Ram-6''}); 73,6 (C-2^{Glu}); 75,4 (C-5^{Glu}); 76,7 (C-3^{Glu}); 93,6 (C-8); 98,4 (C-1^{Ram-7}); 98,5 (C-6); 100,5^b (C-1^{Ram-6''}); 100,6^b (C-1^{Glu}); 103,8 (C-10); 114,7^c (C-5'); 114,9^c (C-3'); 120,7 (C-1'); 130,5^d (C-2'); 130,7^d (C-6'); 132,3 (C-3); 156,0^e (C-2); 156,5^e (C-9); 159,4 (C-4'); 160,6^f (C-5); 160,9^f (C-7); 176,9 (C-4).

a,b,c,d,e,f. Estos valores pueden ser intercambiados.

Degradación del glicósido XIV para identificar su disacárido

Se procedió en forma análoga a lo descrito en la página 203. Pudiéndose concluir por comparación cromatográfica que el disacárido escindido era rutinosa.

Hidrólisis ácida del glicósido XIV

Se agregaron gotas de metanol hasta disolver completamente los 7 mg de XIV que fueron previamente suspendidos en 1 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico (6%). La hidrólisis se llevó a cabo a reflujo durante 50 minutos.

Se neutralizó la mezcla de reacción hasta débil acidez, se concentró a presión reducida y se extrajo con acetato de etil-agua.

Procediéndose en forma similar que con el compuesto XIII se detectó en la fase orgánica la aglicona, que resultó ser canferol, por comparación cromatográfica y por coincidencia con los datos obtenidos a partir del espectro de masas del derivado trimetil sililado.

De la fase acuosa se derivatizaron los azúcares transformándolos en los correspondientes alditoles acetilados, resultando de su análisis por CGL (columna ECNSS; 180°C, isotérmica) que la composición de esta mezcla era aproximadamente 66% de ramnosa y 33% de glucosa.

Compuestos identificados en la marcha separativa de alcaloides del Extracto etanólico

Colina XV

pf (picrato): 250-251°C (EtOH); picrato testigo: 250-251°C

¹H-RMN (acetato, 60 MHz, DMSO-d₆) ppm: 1,97 (3H, s, H₃CCO₂⁻); 3,13 (9H, s, H₃CN⁺); 3,50 (2H, m, CH₂N⁺); 3,98 (2H, m, HOCH₂)

Trigonelina XVI

UV $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{MeOH}} = 264 \text{ nm}$

$^1\text{H-RMN}$ (acetato, 100 MHz, DMSO-d_6) ppm: 1,88 (3H, s, H_3CCO_2^-); 4,36 (3H, s, H_3CN^+); 8,02 (1H, dd, $J_{4,5}=7 \text{ Hz}$, $J_{5,6}=6 \text{ Hz}$, H-5); 8,82 (2H, m, H-4 y 6); 9,20 (1H, s ancho, H-2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (acetato; 25,2 MHz, D_2O) ppm: 23,5 (H_3CCO_2^-); 49,2 (H_3CN^+); 128,4 (C-5); 137,6 (C-3); 145,5 (C-2); 146,8 (C-6); 147,9 (C-4); 175,7 (PyCO_2H); 180,4 (H_3CCO_2^-)

Compuestos identificados en el estudio del percolado acuoso del Extracto etanólico

La fracción de este percolado eluida con NH_4OH 4 N de una columna de resina de intercambio catiónico AG 50 W X8 (forma H^+), fue analizada en un analizador automático de aminoácidos Beckman 120-B, empleando la secuencia de buffers que se detallan a continuación:

- solución de citrato de sodio 0,20 N, pH= 3,28
- solución de citrato de sodio 0,20 N, pH= 4,25
- solución de citrato de sodio 0,35 N, pH= 5,28.

El flujo de las soluciones buffer utilizadas fue de 66 2/3 ml/h y el de reactivo revelador (ninhidrina) 33 1/3 ml/h.

Los resultados indicados en el aminograma fueron comparados con los de una corrida de testigos en iguales condiciones, determinándose así la existencia de: ác. aspártico (XVII), treonina (XVIII), serina (XIX), ác. glutámico (XX), prolina (XXI), glicina (XXII), alanina (XXIII), valina (XXIV), metionina (XXV), isoleucina (XXVI), leucina (XXVII), tirosina (XXVIII), fenilalanina (XXIX) e histidina (XXX).

Compuestos identificados en el estudio del Extracto etanólico de flores de *Bauhinia candicans*

D-inositol-3-metiléter XXXI

pf: 185-186°C (EtOH) (Lit. pf: 186-188°C (EtOH 0 MeOH))

$[\alpha]_D^{25} = +62,5 \pm 0,6$ (H₂O) (Lit. $[\alpha]_D^{25} = +65,5$ (H₂O))

¹H-RMN (derivado acetilado, 60 MHz, Cl₃CD) ppm: 1,93 (3H, s), 2,00 (3H, s), 2,07 (3H, s) y 2,14 (6H, s) metilos de acetilos; 3,40 (3H, s, OCH₃); 3,60 (1H, t, J=9 Hz, H_COMe); 5,22 (5H, m, H_CO₂CMe).

El estudio por CGL (columna ECNSS, 180°C, isotérmica) de dicho compuesto acetilado demostró su total pureza. El tiempo de retención del derivado acetilado fue de 14,1 min, resultando coincidente con el obtenido para un testigo de D-inositol-3-metiléter igualmente derivatizado.

Canferol-3-O-rutinósido XIII y canferol-3-O-rutinósido-7-O-α-L-ramnopiranosido XIV

Los datos correspondientes a los compuestos XIII y XIV se encuentran en las pág. 202-204 y 205-206 respectivamente.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BAUHINIA CANDICANS

Los extractos de éter de petróleo y etanólico de *B. candidans* se diluyeron con DMSO para obtener concentraciones de los medios de prueba de 4000, 2000, 1000, 500, 250 y 125 ug/ml. (Se demostró que el DMSO no causaba inhibición del crecimiento bacteriano, realizando ensayos sólo con este solvente)

Las bacterias fueron mantenidas sobre ágar de triptona de soya, crecidas en un caldo de triptona de soya durante 18 horas y diluidas finalmente, 1:2000, en salina (excepto para *Mycobacterium phlei* que se diluyó 1:100). La inoculación de estos medios se realizó dentro de los treinta minutos de ajustar estos inóculos. Las bacterias fueron sembradas radialmente sobre el ágar mezclado con diferentes concentraciones de los extractos. Se examinó el crecimiento de bacterias después de incubar 24 horas a 37°C. Se consideró que un extracto era activo cuando inhibía el crecimiento completamente. Además, se hicieron blancos en ágar de triptona de soya sembrados pero sin extractos vegetales.

Los inóculos de hongos y levaduras se prepararon a partir de cultivos de 48 horas de envejecimiento en ágar Sabouraud (*Candida albicans*) y ágar de dextrosa de papa (*Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*). Las suspensiones se prepararon en salina estéril con Tween 80 (0,025 %). Este último se agregó para obtener una buena dispersión de los organismos probados. La suspensión de hongos fue ajustada a una transmitancia de 85,95% medida a 530 nm.

Los tubos que contenían 5 ml del medio semisólido mezclado con diluciones diferentes de los extractos de *B. candidans* se inocularon en la superficie con 0,05 ml de las suspensiones de hongos y levaduras. La incubación se realizó a 30°C hasta que el crecimiento en el tubo control diera positivo.

En la tabla que se muestra a continuación se resumen los resultados obtenidos:

Microorganismo	Extracto EP(CIM)	Extracto etanólico(CIM)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2000	4000
<i>Streptococcus faecalis</i>	4000	-
<i>Salmonella newport</i>	-	-
<i>Salmonella oranienburg</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>		-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Mycobacterium zñlei</i>	500-1000	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1000	2000
<i>Candida albicans</i>	1000-2000	2000
<i>Aspergillus niger</i>	250	4000

Las actividades se expresan como concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) (ug/ml)

Este trabajo fue realizado por la Lic. Alicia S. Loren-
ti bajo la dirección del Dr. Alberto Viale en la Cátedra de Micro-
biología e Inmunología del Departamento de Química Biológica de la
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.B.A.).

ACTIVIDAD HIPOGLUCEMICA E HIPOCOLESTEROLEMICA DE BAUHINIA CANDICANS

El estudio de estas actividades se llevó a cabo mediante perfusión de extracto acuoso de *B. candicans* en perro pancreatectomizado.

Tanto la pancreatectomía como la perfusión fueron realizadas por el Dr. del Castillo en los laboratorios del IBYME.

Luego de efectuada la extracción del páncreas se administró al animal en experimentación una dosis de mantenimiento de insulina para evitar su muerte.

Pasados los cinco días luego de haberse realizado la pancreatectomía, se efectuó la perfusión y a continuación se tomaron muestras de sangre a la hora, dos horas y cinco horas.

La concentración de glucosa en suero fue medida mediante un método enzimático

Los reactivos utilizados fueron:

Standard: 4 ml de solución estabilizada de glucosa, concentración: 1 g/l.

GOD/POD: solución estabilizada de glucosa oxidasa (≥ 1000 U/ml) y peroxidasa (≥ 120 U/ml).

Reactivo 4-AF: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en buffer TRIS 0,92 mol/l.

Reactivo fenol: solución de fenol 55 mmol/l.

Concentraciones finales en el reactivo usado: [GOD] ≥ 3000 U/l; [POD] ≥ 400 U/l; [4-AF]: 1,25 mM; [fenol]: 2,75 mM
pH= 7.

Se combinan las cantidades indicadas en la tabla 41 para obtener el blanco (B), standard (S) e incógnitas (I) y se incuban en sendos tubos de fotocolorímetro en baño de agua a 37°C durante 10 min. A continuación, se lee en un espectrofotómetro a 505 nm, llevando a cero con el blanco; el color es estable durante 60 minutos.

Para obtener la concentración de glucosa debe realizar-

se el siguiente cálculo:

$$\text{glucosa (g/l)} = I \times f \qquad f = \frac{1,00 \text{ g/l}}{S}$$

Standard	B	S	I
Standard	-	20 μ l	-
Muestra	-	-	20 μ l
Reactivo usado	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Tabla 41

Los resultados promedio obtenidos son:

Horas	Glucosa (g/l)
1	4,63
2	3,40
5	4,10

La determinación de la concentración de colesterol en plasma se realizó también mediante un método enzimático.

Los reactivos utilizados fueron:

Standard: 4 ml de solución de colesterol 2 g/l en vehículo acuoso.

Enzimas: suspensión estabilizada conteniendo: lipasa fungística ≥ 300 U/ml; colesterol oxidasa (COD) ≥ 3 U/ml; peroxidasa (POD) ≥ 20 U/ml.

Reactivo 4-AF: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en vehículo tamponado.

Reactivo fenol: solución de fenol 55 mmol/l.

Concentraciones finales en el reactivo usado: [lipasa] ≥ 6000 U/l; [COD] ≥ 60 U/l; [POD] ≥ 400 U/l; [fenol] = 2,75 mmol/l; [4-AF] = 1,25 mmol/l; pH = 7,2

A continuación se detallan las cantidades en que deben combinarse estos reactivos y la muestra para obtener el blanco (B), standard (S) e incógnitas (I):

	B	S	I
Standard	-	20 μ l	-
Muestra	-	-	20 μ l
Reactivo usado	2 ml	2 ml	2 ml

Las soluciones así obtenidas se incuban 15 minutos en baño de agua a 37°C y se leen en un espectrofotómetro a 505 nm; el color es estable durante 2 horas.

El cálculo que debe realizarse para obtener la concentración de colesterol en g/l es el siguiente:

$$\text{colesterol (g/l)} = I \times f \quad f = \frac{2,00 \text{ g/l}}{S}$$

Los resultados promedios obtenidos mediante este método son:

Horas	colesterol (g/l)
1	1,81
2	1,55
5	1,51

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los componentes orgánicos de *Bauhinia candicans* Benth. (Familia: *Leguminosae*).

Esta planta argentina es ampliamente conocida en la medicina popular ya que se le atribuyen propiedades antidiabéticas.

En la presente tesis se desarrollan los siguientes temas:

1°) Introducción a la familia *Leguminosae* teniendo en cuenta los aspectos botánicos y fitoquímicos de ésta describiéndose, particularmente, el género *Bauhinia*.

2°) Análisis de los espectros de masas de los 3-cetoesteroides mono- y di-insaturados, remarcando las fragmentaciones diagnóstico que permiten determinar la ubicación de la/s insaturación/es.

Se analizan, además, en forma genérica los espectros de masas, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN que son de utilidad para la elucidación estructural de los glicósidos de esteroides.

Lo desarrollado en el punto 2° contribuye al esclarecimiento de los temas principales tratados en la discusión de los resultados obtenidos en esta tesis.

3°) Acción hipoglucemiante; se realiza una breve introducción sobre las causas y consecuencias de la diabetes, así como también sobre los medios disponibles para contrarrestar sus efectos. Se incluye, también, una corta reseña histórica sobre productos naturales hipoglucemiantes.

4°) Discusión de los resultados obtenidos en esta tesis, comprendiendo la identificación de los componentes de los extractos de éter de petróleo y etanólico de la especie vegetal antes mencionada.

Se indican las técnicas separativas utilizadas en las etapas de aislamiento y purificación, analizándose en cada caso los espectros UV, IR, EM, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN y/o los métodos químicos que condujeron a la determinación estructural de:

a) triacontanol I

- b) alcoholes lineales de $C_{26}H_{54}O$ a $C_{31}H_{64}O$
- c) estigmasta-1,3,5-trieno II
- d) estigmasta-3,5-dieno III
- e) campesterol IV
- f) estigmasterol V
- g) sitosterol VI
- h) estigmast-4-en-3-ona VII
- i) estigmasta-4,6-dien-3-ona VIII
- j) estigmasta-3,5-dien-7-ona IX
- k) hidrocarburos lineales de $C_{21}H_{44}$ a $C_{33}H_{68}$
- l) sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido X
- m) sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranosido XI
- n) sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido XII
- ñ) canferol-3-O- β -rutinosido XIII
- o) canferol-3-O- β -rutinosido-7-O- α -L-ramnopiranosido XIV
- p) colina XV
- q) trigonelina XVI
- r) los aminoácidos: ácido aspártico XVII, treonina XVIII, serina XIX, ácido glutámico XX, prolina XXI, glicina XXII, alanina XXIII, valina XXIV, metionina XXV, isoleucina XXVI, leucina XXVII, tirosina XXVIII, fenilalanina XXIX e histidina XXX.

Los glicósidos de esteroides X y XI no habían sido descritos previamente, y del cetosteroides VIII se conocen sólo dos informes previos a este trabajo. Se realizó, además, el estudio conformacional del azúcar del glicósido Xb (X acetilado).

En el extracto etanólico de flores de *Bauhinia candicans*, además de los glicósidos de flavonoides XIII y XIV, se identificó a:

- s) D-inositol-3-metiléter XXXI.

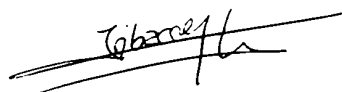
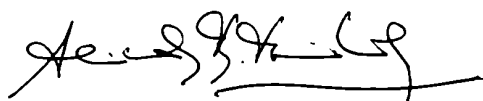
Se realizó, también, un estudio químico comparativo entre las especies *B. candicans*, *B. variegata* y *B. forficata*, observándose gran similitud entre las mismas. Además, de los compuestos mencionados anteriormente, este estudio químico permitió caracterizar a:

- t) colesterol XXXII
- u) brasicasterol XXXIII

Por último se describen los ensayos realizados para de-

terminar la acción antimicrobiana de los extractos de éter de petróleo y etanólico de *B. candidans*. Se analiza además, la actividad hipoglucémica e hipocolesterolémica del extracto acuoso, cuyo componente trigonelina (XVI) demostró ser responsable de estos efectos.

5°) Parte experimental del trabajo realizado, que incluye los datos numéricos de los espectros de cada uno de los componentes identificados.



Parte de este trabajo generó las siguientes publicaciones:

- Antimicrobial activity of some argentine higher plants.
A. S. Lorenti, A. A. Viale, C. A. Buschi, M. D. González, C. D. Schteingart y A. M. Iribarren
Fitoterapia (Milán) 52, 81 (1981).
- Components of *Bauhinia candicans*.
A. M. Iribarren y A. B. Pomilio
J. Nat. Prod. 46, 752 (1983).
- Sitosterol-3-O- β -D-xilopyranoside from *Bauhinia candicans*.
A. M. Iribarren y A. B. Pomilio
Phytochemistry 23, 2087 (1984).
- Sitosterol-3-O- α -D-riburonofuranoside from *Bauhinia candicans*.
A. M. Iribarren y A. B. Pomilio
Phytochemistry, en prensa (1984).
- Ester metílico de sitosterol-3-O- α -di-O-acetil-D-riburonofuranósido. Análisis conformacional de su azúcar.
A. M. Iribarren y A. B. Pomilio
An. Asoc. Quim. Argent. 72 (6) (1984).

BIBLIOGRAFIA

- 1) "Advances in Legume Systematics"; editado por R. M. Polhill y P. H. Haven (1981).
- 2) A. Burkart; "Las leguminosas argentinas", Ed. Acme (1943).
- 3) W. J. Griffin, J. H. Phippard, C. C. J. Culvenor, J. W. Loder y R. Nearn; *Phytochemistry* 10, 2793 (1971).
- 4) J. W. Loder y R. H. Nearn; *Aust. J. Chem.* 28, 651 (1975).
- 5) J. C. Oguakwa y A. Cronlund; *Lloydia* 35, 248 (1976).
- 6) M. J. Falkiner, A. F. Faux, J. W. Loder y R. H. Nearn; *Aust. J. Chem.* 28, 645 (1975).
- 7) J. Friedrich-Fiechtl y G. Spiteller; *Chem. Ber.* 104, 3535 (1971).
- 8) J. W. Loder, C. C. J. Culvenor, R. H. Nearn, G. B. Russell y D. W. Stanton; *Tetrahedron Letters*, 5069 (1972).
- 9) T. A. Smith; *Phytochemistry* 16, 171 (1977).
- 10) J. J. Willaman y H. L. Li; *Lloydia* 33, 286 (1970).
- 11) C. Poupat, A. Ahond y T. Sevenet; *Phytochemistry* 15, 2019 (1976).
- 12) T. A. Wheaton e I. Stewart; *Lloydia* 33, 244 (1970).
- 13) T. A. Smith; *Phytochemistry* 16, 9 (1977).
- 14) N. B. Mulchandani y S. A. Hassarajani; *Planta Med.* 32, 357 (1977).
- 15) F. Khuong-Huu, X. Monseur, G. Ratle, G. Lukacs y R. Goutarel; *Tetrahedron Letters*, 1757 (1973).
- 16) S. Ghosal, P. K. Banerjee y S. K. Banerjee; *Phytochemistry* 9, 429 (1971).
- 17) S. S. Martin, J. H. Langenheim y E. Zavarin; *Phytochemistry* 11, 3049 (1972).
- 18) S. S. Martin, J. H. Langenheim y E. Zavarin; *Biochem. Syst.* 1, 35 (1973); *C. A.* 78:145205
- 19) J. H. Langenheim, W. H. Stubblebine y C. E. Foster; *Biochem. Syst. Ecol.* 7, 21 (1979); *C. A.* 90:148476.
- 20) A. Cunningham, S. S. Martin y J. H. Langenheim; *Phytochemistry* 13, 294 (1974).
- 21) A. J. Marsioli, H. Leito Filho y J. Campello; *Phytochemistry* 14, 1882 (1975).
- 22) S. S. Martin y J. H. Langenheim; *Phytochemistry* 13, 523 (1974).
- 23) M. Ferrari, U. M. Pagnoni, F. Pelizzoni, V. Lukes y G. Ferrari; *Phytochemistry* 10, 905 (1971).

- 24) J. Haeuser, S. F. Hall, A. C. Oehlschlager y G. Ourisson; *Tetrahedron* 26, 1461 (1970).
- 25) D. E. U. Ekong y J. I. Okogun; *Chem. Comm.*, 72 (1967).
- 26) T. A. Ali-Zade, E. S. Kondratenko y N. K. Abubakirov; *Chem. Nat. Comp.* 6, 500 (1973).
- 27) D. H. R. Barton y C. J. W. Brooks; *J. Chem. Soc.*, 257 (1951).
- 28) R. Ramachandran y B. C. Joshi; *Curr. Sci.* 36, 574 (1967); *C. A.* 68:10188.
- 29) K. P. Tiwari y M. Masood; *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika* 21, 177 (1978); *C. A.* 90:183171.
- 30) H. P. Bhartiya y P. C. Gupta; *Phytochemistry* 20, 2051 (1980).
- 31) H. P. Bhartiya, P. Dubey, S. B. Katiyar y P. C. Gupta; *Phytochemistry* 18, 689 (1979).
- 32) D. Murkherjee y M. M. Laboraya; *Experientia* 33, 304 (1977).
- 33) D. Murkherjee y M. M. Laboraya; *J. Indian Bot. Soc.* 58, 75 (1979); *C. A.* 92:160661.
- 34) D. Murdherjee y M. M. Laboraya; *Plant Biochem. J.* 7, 120 (1980); *C. A.* 95:129568.
- 35) R. Pant y P. L. Bishnoi; *Curr. Sci.* 43, 213 (1974); *C. A.* 81:35562.
- 36) K. P. Tiwari y M. Masood; *Proc. Natt. Acad. Sci. India, Sect. A*, 48, 183 (1978); *C. A.* 91:207390
- 37) S. Duret y R. R. Paris; *Plant. Med. Phytother.* 11, 213 (1977). *C. A.* 88:148934.
- 38) D. Prakash y P. S. Misra; *Fitoterapia* 6, 257 (1983).
- 39) N. A. M. Saleh y M. S. Ishak; *Phytochemistry* 15, 835 (1976).
- 40) W. Rahman y S. J. Begum; *Naturwissenschaften* 53, 385 (1966).
- 41) D. Mukherjee y M. M. Laboraya; *J. Indian Bot. Soc.* 54, 207 (1975); *C. A.* 86:13941.
- 42) A. K. Gupta, T. J. Vidyapati y J. S. Chauhan; *Planta Med.* 38, 174 (1980); *C. A.* 92:211813.
- 43) A. K. Gupta, T. J. Vidyapati y J. S. Chauhan; *Indian J. Chem., sect. B*, 18B, 85 (1979); *C. A.* 91:137128.
- 44) S. Sankara Subramanian y A. G. R. Nair; *Indian J. Chem.* 1, 450 (1963); *C. A.* 60:4459.

- 45) L. Ramachandra Row y N. Viswanadham; Proc. Indian Acad. Sci. 39A, 240 (1954); C. A. 48:12237.
- 46) K. M. Dzhemudhadze y T. S. Mgaloblishvili; Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 8, 207 (1972); C. A. 77:2810.
- 47) Chinese Academy of Forestry, Research Institute of Chemical Processing and Utilization of Forest Products; Linchan Huaxue Yu Gongye 1, 39 (1981); C. A. 96:17278.
- 48) C. C. Chen, Y. P. Chen, H. Y. Hsu y Y. L. Chen; Chem. Pharm. Bull. Tokyo 32, 166 (1984); C. C. 27 (13) 1984.
- 49) D. Saggese; "Yerbas Medicinales Argentinas", 10° Ed. pag. 104 (1959).
- 50) C. Juliani; Rev. Sudamericana Endocrinol. Inmunol. Quimioterap. 14, 326 (1931).
- 51) F. N. Gallo; Rev. Soc. Argentina Biol. 17, 128 (1941).
- 52) K. N. Singh y V. Chandra; J. Indian Med. Assoc. 68, 201 (1977); C. A. 87:199646.
- 53) E. Mandrile y R. Nico; Rev. Farm. (Buenos Aires) 106, 263 (1964).
- 54) P. K. Lee, D. P. Carewand y J. Rosazza; Lloydia 35, 150 (1972).
- 55) J. W. Rowe; Phytochemistry 4, 1 (1965).
- 56) D. Lavie e I. A. Kaye; J. Chem. Soc., 5001 (1963).
- 57) N. Weber; Phytochemistry 16, 1849 (1977).
- 58) R. J. Weston; Aust. J. Chem. 13, 522 (1974).
- 59) S. J. Stohs y H. Rosemerg; Lloydia 38, 181 (1975).
- 60) T. Suga y S. Kondo; Phytochemistry 13, 522 (1974).
- 61) D. J. Slatkin, J. E. Knapp, P. L. Schiff, C. E. Turner y L. Mole; Phytochemistry 14, 580 (1975).
- 62) E. G. Gros, P. Cattaneo y S. N. Nolasco; Rev. Latinoamer. Quim. 14, 72 (1983).
- 63) W. D. Raverty, R. H. Thomson y T. J. King; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1204 (1977).
- 64) S. Popov, R. M. K. Carlson, A. Wegmann y C. Djerassi; Steroids 28, 699 (1976).
- 65) Y. M. Sheikh y C. Djerassi; Tetrahedron 30, 4095 (1974).
- 66) A. Kanazawa y M. Yoshioka; Proc. Int. Seaweed Symp. 7th (1971); C. A. 82:152275.

- 67) P. S. Subramanian y A. J. Lakshmanan; *Indian J. Chem., Sect. B*, 19B, 331 (1980); C. A. 93:201006.
- 68) M. D. Higgs y D. J. Faulkner; *Steroids* 30, 379 (1977).
- 69) S. F. Kingston, B Gregory y A. G. Fallis; *Tetrahedron Letters*, 4261 (1977).
- 70) F. J. Brown y C. Djerassi; *J. Org. Chem.* 46, 954 (1981).
- 71) H. Schildknecht y D. Hotz; *Angew. Chem.* 79, 902 (1967).
- 72) H. Schildknecht, R. Siewerdt y U. Maschwitz; *Justus Liebigs Ann. Chem.* 703, 182 (1967).
- 73) A. H. Conner, B. A. Nagasampagi y S. W. Rowe; *Phytochemistry* 19, 1121 (1980).
- 74) R. H. Shapiro, J. M. Wikon'y C. Djerassi; *Steroids* 1, 1 (1963).
- 75) L. Petersen; *Anal. Chem.* 34, 1781 (1962).
- 76) A. Butenandt, L. Karlson-Poschmann, G. Failer, L. Schiedt y E. Bickert; *Ann.* 575, 123 (1952).
- 77) R. H. Shapiro y C. Djerassi; *J. Am. Chem. Soc.* 86, 2825 (1964).
- 78) F. J. Brown y C. Djerassi; *J. Am. Chem. Soc.* 102, 807 (1980).
- 79) W. Eichenberger; "Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants", Ed. Springer, Berlín, 169 (1977).
- 80) G. Adler y Z. Kasprzyk; *Phytochemistry* 14, 627 (1975).
- 81) C. Grunwald; *Plant Physiol.* 48, 653 (1971).
- 82) F. B. Power; *J. Chem. Soc.* 103, 399 (1913).
- 83) A. M. Iribarren y A. B. Pomilio; *J. Nat. Prod.* 46, 752 (1983).
- 84) J. Köstens y G. Willuhn; *Planta Med.* 24, 278 (1973).
- 85) A. M. Osman, M. El-Garby Younes y A. Mokhtar; *Phytochemistry* 14, 829 (1975).
- 86) C. Thompson, R. C. Henson, R. C. Gueldner y P. A. Hedin; *Lipids* 5, 283 (1970).
- 87) W. Eichenberger y W. Menke; *Z. Naturforsch.* 21b, 859 (1966).
- 88) A. M. Iribarren y A. B. Pomilio; *Phytochemistry* 23, 2087 (1984).
- 89) I. Khanna, R. Seshadri y T. R. Seshadri; *Phytochemistry* 13, 199 (1974).
- 90) M. Ohnishi y Y. Fujino; *Agric. Biol. Chem.* 42, 2423 (1978)
- 91) A. M. Iribarren y A. B. Pomilio; *Phytochemistry*, en prensa, (1984).

- 92) T. W. Esders y R. S. Light; *J. Biol. Chem.* 247, 7494 (1972).
- 93) A. López y J. Burgos; *Phytochemistry* 15, 971 (1976).
- 94) R. Aneja y P. C. Harries; *Chem. Phys. Lipids* 12, 351 (1971).
- 95) M. Lepage; *J. Lipid Res.* 5, 587 (1964).
- 96) A. D. Elbein y W. T. Forsee; *Lipids* 10, 427 (1975).
- 97) C. T. Hou, Y. Umemura, M. Nakamura y S. Funahashi; *J. Biochem.* 62, 389 (1967).
- 98) P. B. Bush y C. Grunwald; *Plant Physiol.* 53, 131 (1974).
- 99) W. T. Forsee, R. A. Laine y A. D. Elbein; *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 248 (1974).
- 100) N. Lavintman y C. E. Cardini; *Biochem. Biophys. Acta* 201, 508 (1970).
- 101) Z. A. Wojciechowsky; *Biochem. Soc. Transact.*, 603rd Meeting Liverpool, 11, 1982 (1983).
- 102) D. C. Collins, D. G. Williamson y D. S. Layne; *J. Biol. Chem.* 245, 873 (1970).
- 103) A. M. Attallah, R. T. Aexel, R. B. Ramsay, S. Threlkeld y H. J. Nicholas; *Phytochemistry* 14, 1927 (1975).
- 104) P. B. Bush y C. Grunwald; *Plant Physiol.* 50, 69 (1972).
- 105) E. Heftmann; *Lipids* 6, 128 (1971).
- 106) R. Tschesche y H. Hulpke; *Z. Naturforsch.* 21b, 494 (1966).
- 107) F. J. Evans; *Planta* 116, 99 (1974); C. A. 81:47464.
- 108) K. Biemann, D. C. De Jongh y H. K. Schnoes; *J. Am. Chem. Soc.* 85, 1763 (1963).
- 109) D. C. de Jongh y K. Biemann; *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2289 (1963).
- 110) G. Slomp y F. A. Mac Kellar; *J. Am. Chem. Soc.* 84, 204 (1962).
- 111) T. Iida, T. Tamura, T. Wainai, K. Mashimo y T. Matsumoto; *Chem. Phys. Lipids* 19, 169 (1977).
- 112) M. J. Thompson, S. R. Dutky, G. W. Patterson y F. L. Gooden; *Phytochemistry* 11, 1781 (1972).
- 113) T. A. Wittstruck, J. K. Sliwowski y E. Caspi; *J. Chem. Soc., Perkin I*, 1403 (1977).
- 114) D. H. R. Barton, D. M. Harrison y D. A. Widdowson; *Chem. Commun.* 17 (1968).

- 115) I. Rubinstein y L. J. Goad; *Phytochemistry* 13, 485 (1974).
- 116) E. Caspi, J. P. Moreau y P. J. Ramm; *J. Am. Chem. Soc.* 96, 8107 (1974).
- 117) E. Caspi, J. Sliwowski y C. S. Robichand; *J. Am. Chem. Soc.* 97, 3820 (1975).
- 118) J. K. Sliwowski y E. Caspi; *J. C. S. Chem. Comm.*, 196 (1976).
- 119) A. F. Cockerill, G. L. O. Davies, R. C. Harden y D. M. Rackham; *Chem. Rev.* 73, 553 (1973).
- 120) T. Iida, M. Kikuchi, T. Tamura y T. Matsumoto; *Chem. Phys. Lipids* 20, 157 (1977).
- 121) T. Iida, M. Kikuchi, T. Tamura y T. Matsumoto; *J. Lipid Res.* 20, 279 (1979).
- 122) T. Iida, T. Tamura y T. Matsumoto; *J. Lipid Res.* 21, 326 (1980).
- 123) L. J. Mulheirn; *Tetrahedron Letters*, 3175 (1973).
- 124) I. Rubinstein, L. J. Goad, A. D. H. Clague y L. J. Mulheirn; *Phytochemistry* 15, 195 (1976).
- 125) W. R. Nes, K. Krevitz y S. Behzadan; *Lipids* 11, 118 (1976).
- 126) J. H. Adler, M. Young y W. R. Nes; *Lipids* 12, 364 (1977).
- 127) W. R. Nes, K. Krevitz, J. Joseph, W. D. Nes, B. Harris, G. F. Gibbons y G. W. Patterson; *Lipids* 12, 511 (1977).
- 128) W. Sucrow, M. Slopianka y H. W. Kircher; *Phytochemistry* 15, 1533 (1976).
- 129) N. Theobald y C. Djerassi; *Tetrahedron Letters*, 4369 (1978).
- 130) W. Kokke, W. H. Fenical, C. S. Park y C. Djerassi; *Tetrahedron Letters*, 4373 (1978).
- 131) N. Theobald, R. J. Wells y C. Djerassi; *J. Am. Chem. Soc.*; 100, 7677 (1978).
- 132) A. Streitweiser y T. R. Thomson; *J. Am. Chem. Soc.* 77, 3921 (1955).
- 133) G. B. Elyakov y A. K. Dzizenko; *Carbohyd. Res.* 27, 249 (1973).
- 134) P. L. Durette y D. Horton; *Carbohyd. Res.* 18, 403 (1971).
- 135) H. J. Reich, M. Jautelat, M. T. Messe, F. J. Weigert y J. O. Roberts; *J. Am. Chem. Soc.* 91, 7445 (1969).
- 136) H. Eggert y C. Djerassi; *J. Org. Chem.* 38, 3788 (1973).

- 137) J. W. Apsimon, H. Beierbeck y J. K. Saunders; *Can. J. Chem.* 51, 3874 (1973).
- 138) G. Popják, J. Edmond, F. A. L. Anet y N. R. Easton; *J. Am. Chem. Soc.* 99, 931 (1977).
- 139) J. L. C. Wright, A. G. Mc. Innes, S. Shimuzu, E. G. Smith, J. A. Walter, D. Idler y W. Khalil; *Can J. Chem.* 56, 1898 (1978).
- 140) N. Koizumi, Y. Fujimoto, T. Takeshita y N. Ikekawa; *Chem. Pharm. Bull.* 27, 38 (1979).
- 141) S. Seo, Y. Tomita y K. Tori; *J. Chem. Commun.*, 319 (1978).
- 142) L. P. Lindeman y J. Q. Adams; *Anal. Chem.* 43, 1245 (1971).
- 143) D. M. Grant y E. G. Paul; *J. Am. Chem. Soc.* 86, 2984 (1964).
- 144) Y. Tanaka, H. Frank, H. F. Deluca, N. Koizumi y N. Ikekawa; *Biochem.* 14, 3293 (1975).
- 145) Y. Tanaka, H. F. Deluca, N. Ikekawa, M. Morisaki y N. Koizumi; *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 620 (1975).
- 146) F. Khuong-Huu, M. Sangare, V. M. Chari, A. Bekaert, M. Devys, M. Barbier y G. Lukacs; *Tetrahedron Letters*, 1787 (1975).
- 147) Y. Letourneux, Q. Khuong-Huu, M. Gut y G. Lukacs; *J. Org. Chem.* 40, 1674 (1975).
- 148) E. Breitmaier y W. Voelter; *Chimia* 26, 136 (1972); *C. A.* 77:34802.
- 149) K. Bock y Ch. Pedersen; *Acta Chem. Scand.*, B29, 258 (1975).
- 150) P. A. J. Gorin y M. Mazurek; *Can. J. Chem.* 53, 1212 (1975).
- 151) R. K. Beerthuis y J. H. Recourt; *Nature* 186, 372 (1960).
- 152) G. W. Patterson; *Anal. Chem.* 43, 1165 (1971).
- 153) H. T. Slover y R. H. Thompson Jr.; *Lipids* 15, 69 (1980).
- 154) R. H. Thompson Jr., G. Patterson y M. J. Thompson; *Lipids* 16, 694 (1981).
- 155) J. R. Maxwell, A. S. Mackenzie y J. K. Volkman; *Nature* 286, 694 (1980).
- 156) D. J. Luzbetak, S. J. Torrance, J. J. Hoffmann y J. R. Cole; *Lloydia* 42, 315 (1979).
- 157) E. A. Haunz; "Diabetes mellitus in adults", "Current Therapy", 365 (1973).

- 158) S. A. Levinson y R. P. Mac Fate, "Diagnóstico clínico de Laboratorio", Ed. El Ateneo (1962).
- 159) R. F. Weiss; "Lehrbuch der Phytoterapie", Stuttgart, pág. 302 (1960).
- 160) U. C. Dubach y A. Bückert; "Recent hipoglycemic sulfonylureas" Huber, Bern (1971).
- 161) M. Litter; "Compendio de farmacología", pág. 348 (1972).
- 162) E. Steinegger y R. Hänsel; "Lehrbuch der Pharmakognosie", Springer Verlag, Berlin Heidelberg N°4 (1972).
- 163) H. Maske; "Orale wirksame Antidiabetica", in: Handb. exper. Pharmakol. 29, Springer; Berlín (1971).
- 164) G. Tanred; Bull. Soc. Chim. 35, 404 (1924).
- 165) J. B. Collip; J. Biol. Chem. 42, 297 (1921).
- 166) J. B. Collip; J. Biol. Chem. 45, 39 (1923).
- 167) J. B. Collip; J. Biol. Chem. 46, 513 (1923).
- 168) R. R. Paris y M. Bastien; Ann. Pharm. Franc. 18, 205 (1960); C. A. 55:2905.
- 169) G. Barger y F. White; Biochem. J. 17, 827 (1923); C. A. 18:968.
- 170) A. A. Horvath; J. Pharmacol. Exp. Ther. 38, 303 (1930); C. A. 24:5803.
- 171) G. Orestano; Arch. Farmacol. Sper. 70, 113 (1940); C. A. 35:1511.
- 172) S. Shani, A. Goldschmied, B. Joseph, Z. Ahronson y F. G. Sulman; Arch. Int. Pharmacodyn. 210, 27 (1974).
- 173) P. Hugh Jones; The Lancet 269, 891 (1955).
- 174) C. H. Hasall y K. Reyle; Biochem. J. 60, 334 (1955).
- 175) A. Johl y W. Stöll; Helv. Chim. Acta 42, 156 (1959).
- 176) U. Renner; A. Johl y W. Stöll; Helv. Chim. Acta 41, 589 (1958).
- 177) D. Carew y T. Chim; Nature 190, 1108 (1961).
- 178) H. D. Brahmachari y K. T. Augusti; J. Pharm. Pharmacol. 13, 128 (1961).
- 179) P. C. Singhal, R. K. Gupta, J. B. Singh y L. D. Joshi; Indian J. Med. Res. 76, 119 (1982); C. C. 26 (15) 1983.
- 180) K. N. Singh y V. Chandra; J. Indian Med. Assoc. 68, 201 (1977); C. A. 87:199646.

- 181) G. Reuter, *Phytochemistry* 1, 63 (1962).
- 182) B. A. Knights; *J. Gas Chromatog.* 5, 273 (1967).
- 183) N. S. Wulfsem, V. I. Zaretakii, V. G. Zaikin, G. M. Segal, I. V. Torgev y T. P. Fradkina; *Tetrahedron Letters*, 3015 (1964).
- 184) H. Budzikiewicz y W. Ockels; *Tetrahedron* 32, 143 (1976).
- 185) H. Budzidiewicz, C. Djerassi y C. H. Williams; "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry"; Vol. 2: Steroids, Terpenoids, Sugars and Miscellaneous Classes, Holden-Day, San Francisco (1964).
- 186) C. Djerassi; *Pure and Appl. Chem.* 50, 171 (1978).
- 187) H. Audier, M. Fétizon y W. Vetter; *Bull. Soc. Chim. Fr.* 31, 415 (1964).
- 188) M. Spiteller-Friedmann y G. Spiteller; *Fortschr. Chem. Forsch.* 12, 440 (1969).
- 189) H. Budzikiewicz, C. Djerassi y D. H. Williams; "Mass Spectrometry of Organic Compounds"; Holden-Day, San Francisco, 134 (1967).
- 190) L. G. Partridge, I. Midgley y C. Djerassi; *J. Am. Chem. Soc.* 99, 7686 (1977).
- 191) K. Biemann; "Mass Spectrometry: Organic Chemical Applications"; Mc. Graw Hill, Book Co., Inc., New York; 344 (1962).
- 192) E. J. Corey y R. A. Sneed; *J. Am. Chem. Soc.* 78, 6269 (1956).
- 193) H. Budzikiewicz y C. Djerassi; *J. Am. Chem. Soc.* 84, 1430 (1962).
- 194) P. E. Kolattubudy; *Phytochemistry* 6, 963 (1967).
- 195) M. K. Khalil y D. R. Idler; *Lipids* 15, 69 (1980).
- 196) P. L. Chiu y G. W. Patterson ; *Lipids* 16, 203 (1981).
- 197) H. Beierbeck y J. K. Saunders; *Can. J. Chem.* 54, 2985 (1976).
- 198) D. M. Grant y B. V. Chaney; *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5315 (1967).
- 199) K. Seidman y G. E. Maciel; *J. Am. Chem. Soc.* 99, 659 (1977).
- 200) H. Beierbeck, J. K. Saunders y J. W. Apsimon; *Can. J. Chem.* 55, 2813 (1977).
- 201) S. Seo, Y. Tomita, K. Tori y Y. Yoshimura; *J. Am. Chem. Soc.* 100, 3331 (1978).
- 202) B. L. Kam, J. L. Barascut y J. L. Imbach; *Carbohydr. Res.* 69, 135 (1979).

- 203) E. Petráková y P. Kováč; Carbohyd. Res. 101, 141 (1982).
- 204) W. Klyne; Biochem. J. 47, xli (1950).
- 205) Landolt-Börnstein; "Zahlenwerte und Funktionen", 6ª Auflage, Band II, Teil 8, 5-714.
- 206) T. E. Walker y H. P. C. Hogenkamp; Carbohyd. Res. 32, 413 (1974).
- 207) J. D. Stevens y H. G. Fletcher; J. Org. Chem. 33, 1799 (1968).
- 208) N. Cyr y A. S. Perlin; Can. J. Chem. 57, 2504 (1979).
- 209) L. D. Hall, P. R. Steiner y C. Pedersen; Can. J. Chem. 48, 1155 (1970).
- 210) F. A. Bovey; "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Academic Press, 135 (1969).
- 211) M. Karplus; J. Am. Chem. Soc. 85, 2870 (1963).
- 212) K. L. Williamson; J. Am. Chem. Soc. 85, 516 (1963).
- 213) C. Altona y M. Sundaralingam; J. Am. Chem. Soc. 95, 2333 (1973).
- 214) R. C. Fahey, G. L. Graham y R. L. Piccioni; J. Am. Chem. Soc. 88, 193 (1966).
- 215) H. Björndal, C. A. Helleqvist, B. Lindberg y S. Svensson; Angew. Chem. Int. Ed. 9, 610 (1970).
- 216) R. J. Abraham y K. A. Mc. Lauchlan; Mol. Phys. 5, 513 (1962).
- 217) E. Breitmaier y W. Voelter; "¹³C-RMN Spectroscopy", Verlag Chemie, 228 (1974).
- 218) F. A. Bovey; "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Academic Press, 2ª edición, 105 (1969).
- 219) T. J. Mabry, K. R. Markham y M. B. Thomas; "The systematic Identification of Flavonoids", Springer-Verlag, 41 (1970).
- 220) T. J. Mabry; Rev. Latinoamer. Quím. 6, 105 (1975).
- 221) H. Schels, D. Zinmeister y K. Pflieger; Phytochemistry 16, 1019 (1977).
- 222) D. C. De Jongh, T. Radford, J. D. Hribar, S. Hanessian, M. Bieber, G. Dawson y C. C. Sweeley; J. Am. Chem. Soc. 91, 1728 (1969).
- 223) K. R. Markham y B. Ternai; Tetrahedron 32, 2607 (1976).
- 224) K. R. Markham, B. Ternai, S. Stanley, G. Geiger y T. J. Mabry; Tetrahedron 34, 1389 (1978).
- 225) N. Yamoaka, T. Usui, K. Matsuda, K. Tuzimura, H. Sugiyama y S. Seto; Tetrahedron Letters, 2047 (1971).

- 226) P. Colson, H. J. Sennings y I. C. P. Smith; J. Am. Chem. Soc. 96, 8081 (1974).
- 227) A. S. Shashkov y O. S. Chizhov; Bioorg. Khim. 2, 437 (1976), versión inglesa pág. 312.
- 228) H. Gross e I. Farkas; Chem. Ber. 93, 95 (1960).
- 229) R. Bognár, I. Farkas Szabó, I. Farkas y H. Gross; Carbohydr. Res. 5, 241 (1967).
- 230) G. Zemplén y A. Gerecs; Ber. 67, 2049 (1934).
- 231) H-F. Aly y H. Geiger; Phytochemistry 14, 1613 (1975).
- 232) L. Kum-Tatt; Nature 182, 655 (1958).
- 233) "The Sadtler Standard Spectra", espectro de ^1H -RMN N°6803, Sadtler Research Laboratories Inc., E.E.U.U. (1976).
- 234) "The Sadtler Standard Spectra", espectro de ^1H -RMN N°8809, Sadtler Research Laboratories Inc., E.E.U.U. (1976).
- 235) R. J. Pugmire y D. M. Grant; J. Am. Chem. Soc. 90, 697 (1968).
- 236) W. N. Wu, J. L. Beal, R. P. Leu y R. W. Doskotch; Lloydia 40, 281 (1977).
- 237) O. O. Obediyi y E. A. Sofowora, Planta Med. 36, 204 (1979)
- 238) P. D. Sethi, P. C. Ravindran, K. B. Sharma y S. S. Subramanian; Indian J. Pharm. 36, 122 (1974); C. A. 82:119459.
- 239) B. Wolters, Planta 79, 77 (1968).
- 240) K. Boacye-Yiadam, N. I. Y. Fiagbe y J. S. F. Ayimin; Lloydia 40, 543 (1977).
- 241) G. S. Grover y J. Tirumala Rao; Curr. Sci. India 50, 316 (1981); C. A. 94:77569.
- 242) K. S. Lee, T. Ibuka, R. Y. Wu y T. A. Geissman; Phytochemistry 16, 1177 (1977).
- 243) F. C. Fischer, H. van Doorne, M. I. Lim y A. Baerheim Svendsen; Phytochemistry 15, 1078 (1976).
- 244) C. D. Hufford y W. L. Lasswell; Lloydia 41, 156 (1978).
- 245) A. S. Lorenti, A. A. Viale, C. A. Buschi, M. D. González, C. D. Schteingart, A. M. Iribarren y A. B. Pomilio; Fitoterapia 52, 81 (1981).

- 246) "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxicologie" Ed. W. Forth, D. Heuschler y W. Rummel. B. I. Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich, pág. 290 (1977).
- 247) E. Menczel y Z. Korine; Harokeach Haivri 10, 152 (1964); C. A. 63:3273.
- 248) R. Santararo; Arch. ital. sci. farmacol. 5, 23 (1955); C. A. 50:12145.
- 249) N. Dioguardi y L. Contro; Arch. studio fisiopatol. e clin. ricambio 16, 245 (1952); C. A. 48:2258.
- 250) R. Santararo; Arch. ital. sci. farmacol. 4, 322 (1954); C. A. 50:3645.
- 251) W. Gamble y L. D. Wright; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 107, 160 (1961); C. A. 55:20198.
- 252) G. Weigel, P. Wahl y E. Buddecke; Z. Physiol. Chem. 327, 109 (1962); C. A. 57:3988.
- 253) A. Shigenobu y K. Tabasci; Eiho To Shokuro 28, 125 (1975); C. A. 83:188338.
- 254) L. A. Carlson y N. E. Stjernstrom; Acta Pharm. Suec. 9, 289 (1972); C. A. 78:67618.
- 255) J. S. Agarwal y R. P. Rastagi; Indian J. Chem. 13, 758 (1975).
- 256) E. Thyihák; J. Chromatog. 14, 125 (1964) y "Reactivos de coloración para cromatografía en capa delgada y en papel", E. Merck, Darmstadt (R. F. de Alemania).