

Tesis de Posgrado

Aislamiento y elucidación estructural de Withanolidos de la planta *Acnistus Breviflorus* : Estudios preliminares sobre su biosíntesis

Veleiro, Adriana Silvia

1985

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:

Veleiro, Adriana Silvia. (1985). Aislamiento y elucidación estructural de Withanolidos de la planta *Acnistus Breviflorus* : Estudios preliminares sobre su biosíntesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1892_Veleiro.pdf

Cita tipo Chicago:

Veleiro, Adriana Silvia. "Aislamiento y elucidación estructural de Withanolidos de la planta *Acnistus Breviflorus* : Estudios preliminares sobre su biosíntesis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1892_Veleiro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis 1892

ej. 2

AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL

DE WITHANOLIDOS DE LA PLANTA

ACNISTUS BREVIFLORUS.

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE SU BIOSINTESIS.

ADRIANA SILVIA VELEIRO

1985

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE
WITHANOLIDOS DE LA PLANTA *ACNISTUS BREVIFLORUS*.

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE SU BIOSINTESIS.

AUTOR

ADRIANA SILVIA VELEIRO

DIRECTOR DE TESIS

DR. GERARDO BURTON

LUGAR DE TRABAJO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

1985

A mis hijos, mi esposo y mis padres.

Agradezco al Dr Gerardo Burton,
quien más allá de haber sido un
buen maestro, fue en todo momen-
to un excelente compañero.

Agradezco también:

Al CONICET por haberme otorgado las becas de iniciación y perfeccionamiento, durante cuyo transcurso se realizó este trabajo de Tesis.

Al Dr J. Catalán (Universidad Nacional de Tucumán) por el envío de semillas y extractos de hojas frescas de plantas de *Aenistus breviflorus*

Al Profesor Ian Scott por los espectros de RMN protónica realizados a 500 MHz.

Al Dr Eduardo Gros por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

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

Al Lic. J. B. Rodriguez, por la realización de las cromatografías líquido-líquido.

Al Sr J. A. Aznarez por la realización de los espectros de masa.

Al Sr Arabehty por la realización de los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C.

A Claudio Schteingart y Arturo Vitale por sus valiosos consejos.

A la Sra Elena Mac Cormack por el apoyo brindado para realizar la impresión de esta Tesis.

A mis compañeros de laboratorio Alberto Ghini, Mario González, Adriana Brachetcota, Lydia Galagovsky y demás compañeros y amigos que con su constante apoyo hicieron más llevadero este trabajo.

A todo el personal del Dpto de Química Orgánica, profesores, compañeros y no docentes, por su cordialidad y cooperación.

INDICE

<u>CAPITULO I: INTRODUCCION</u>	pág.
Generalidades	1
Propiedades biológicas de los withanólidos	9
Withanólidos en la quimitaxonomía	12
Conclusiones biosintéticas obtenidas a partir de los productos aislados de <i>Withania somnifera</i> .	14
DESCRIPCION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	19
<u>CAPITULO II: WITHANOLIDOS EN ACNISTUS BREVIFLORUS</u>	20
Antecedentes	21
Métodos de aislamiento e identificación de withanólidos	26
<u>Descripción y discusión de los resultados obtenidos</u>	28
Extracción y fraccionamiento del material vegetal.	28
Extracción con metanol en caliente.	28
Extracción con éter etílico en frío.	29
Aplicación de cromatografía líquida de alta resolución a la separación de withanólidos.	29
Separación en columnas de sílicagel	29
Separación en columnas de fase reversa	38
Separación de mezclas complejas de withanólidos	40
Aislamiento de withanólidos por CLAR en fase reversa a partir de extractos prepurificados	46
Análisis cuantitativo de withanólidos en extractos de <i>Acnistus breviflorus</i>	51
Conclusiones	55

<u>CAPITULO III: ESTUDIO ESPECTROSCOPICO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE WITHANOLIDOS DE ACNISTUS BREVIFLORUS:</u>	pág.
	58
Espectrometría de masas	59
Espectrometría de resonancia magnética protónica	63
Análisis de los espectros de RMN- ¹ H a 500 MHz de withaferina A	66
Reinterpretación de espectros de resonancia magnética nuclear de ¹³ C de los withanólidos	72
Sustituyentes en los anillos A y B	72
Sustituyentes en el anillo D y en la cadena lateral	73
Withanólidos con cadenas orientadas en 17 β	73
Withanólidos con cadenas orientadas en 17 α	80
Elucidación estructural de los withanólidos aislados de <i>Acnistus breviflorus</i> .	84
<u>Grupo 1:</u>	
withaferina A <u>8</u> , jaborosalactona A <u>11</u> , jaborosalactona D <u>29</u> , jaborosalactona E <u>32</u> , 2,3-dihidro-3-metoxi-withaferina A <u>33</u>	85
<u>Grupo 2:</u>	
2,3-dihidrowithaferina A <u>35</u>	91
6 α-cloro-5 β-hidroxiwithaferina A <u>37</u>	91
5,6-desoxiwithaferina A <u>40</u>	100
<u>Grupo 3:</u>	
2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A <u>42</u>	102
5α-metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B <u>43</u>	105
5α-etoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B <u>44</u>	110
2,3-dihidrojaborosalactona A <u>45</u>	111

CAPITULO IV: BIOSINTESIS DE WITHANOLIDOS EN *ACNISTUS BREVIFLORUS*.

Antecedentes	116
<u>Descripción y discusión de los resultados obtenidos</u>	123
Condiciones de cultivo de las plantas de <i>Acnistus breviflorus</i> . Aislamiento, separación y análisis cuantitativo de los withanólidos	123
Ensayos de incorporación de precursores	127
Incorporación de R,S-mevalonolactona -2- ¹⁴ C	127
Incorporación de D,L-metionina- ¹⁴ CH ₃	130
Incorporación de acetato de sodio-1- ¹⁴ C	132
Incorporación de jaborosalactona A- ¹⁴ C	132
Reacciones de degradación de withanólidos	136
<u>Aislamiento de los carbonos 25, 26 y 27 como ácido glicérico.</u>	
Degradación de withaferina A	136
Degradación de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A	141
Degradación de withaferina A radioactiva	142
<u>Aislamiento del C-1 como benzofenona y del C-26 como ácido benzoico</u>	143
Degradación de withaferina A	144
Degradación de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A	145
Degradación de withaferina A radioactiva	146
Discusión de los resultados obtenidos en los estudios biosintéticos	146

	pág.
<u>CAPITULO V: PARTE EXPERIMENTAL</u>	154
Instrumentos y métodos empleados	155
Métodos cromatográficos	156
Cromatografía en capa delgada	156
Cromatografía en papel	157
Cromatografía en columna	157
Cromatografía líquida de alta resolución	157
<u>Aislamiento, separación y elucidación estructural</u>	
<u>de withanólidos</u>	160
Material vegetal	161
Extracto etéreo	161
Extractos alcohólicos	162
Purificación de un extracto metanólico	162
Separación de la mezcla <u>33+37</u>	164
Purificación de un extracto etanólico	164
Identificación de los withanólidos aislados. Datos espectros- cópicos	165
withaferina A <u>8</u>	165
jaborosalactona A <u>11</u>	165
jaborosalactona D <u>29</u>	165
jaborosalactona E <u>32</u>	166
2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A <u>33</u>	166
2,3-dihidrowithaferina A <u>34</u>	167
6 α -cloro-5 β -hidroxiowithaferina A <u>37</u>	167

<u>CAPITULO V: (cont.)</u>	pág.
Tratamiento de <u>37</u> con AcOH-AcONa a reflujo	167
5,6-desoxiwithaferina A <u>40</u>	168
Acetilación de 5,6-desoxiwithaferina A	168
2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A <u>42</u>	168
5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B <u>43</u>	169
Obtención de <u>43</u> por tratamiento de jaborosalactona A con metanol-SO ₄ H ₂	169
5 α -etoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B <u>44</u> .	169
Purificación de una fracción cruda de jaborosalactona A <u>11</u> obtenida a partir de un extracto metanólico de <i>Acnistus brevis</i> <i>florus</i>	170
Obtención de 2,3-dihidrojaborosalactona A <u>45</u>	170
Datos espectroscópicos de 2,3-dihidrojaborosalactona A <u>45</u>	170
<u>Biosíntesis de withanólidos en <i>Acnistus brevisflorus</i></u>	171
Material vegetal	172
Ensayos de germinación	172
1. Condiciones generales de germinación y desarrollo	172
2. Prueba del poder germinativo	172
3. Germinación y desarrollo en arena	173
4. Germinación y desarrollo en solución salina	173
5. Conclusiones acerca del poder germinativo y desarrollo	174
Inoculación de precursores marcados	175
Obtención de mevalonolactona-2- ¹⁴ C a partir de N,N'-dibencil- etilendiamonio bis-(3,5)dihidroxi-3-metil pentanoato	175
Administración de precursores simples	175

CAPITULO V: (cont.)

pág.

A hojas vía tallos	175
A plantículas vía raíces en arena	176
A plantículas vía raíces en solución salina	176
Aislamiento de los withanólidos marcados	176
Administración de R,S-mevalonolactona-2- ¹⁴ C a 10 hojas de <i>Acanthopanax breviflorus</i>	177
Administración de jaborosalactona A - ¹⁴ C:	178
Administración vía hojas	178
Administración vía plantículas	179
Secuencia degradativa para la obtención de los carbonos 25, 26 y 27	180
Aplicación a withaferina A <u>8</u>	
a) Obtención de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A <u>33</u>	180
b) Acetilación de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A	181
c) Ozonólisis reductiva del diacetato de 2,3-dihidro- 3-metoxiwithaferina A	181
d) Acetilación de la β-hidroximetilcetona <u>72</u> .	183
e) Aislamiento de los carbonos 25, 26 y 27. Ruptura del ácido glicérico	184
Aislamiento de los carbonos 25, 26 y 27 a partir de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A	185
f) Acetilación y ozonólisis de la 2,3-dihidro-3-etoxija- borosalactona A	185
g) Ruptura del ácido glicérico	185

CAPITULO V: (cont.)

pág.

h) Aplicación de la secuencia degradativa descripta a withaferina A radioactiva	186
Secuencia degradativa para aislar los carbonos 1 y 26	188
Degradación de la 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A	188
i) Reacción de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A con fenil-litio.	188
j) oxidación y aislamiento del C-26 como benzofenona y del carbono 1 como ácido benzoico	
Aislamiento de los carbonos 1 y 26 a partir de withaferina A	190
k) Obtención de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A	190
l) Reacción de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A con fenil-litio	190
m) Oxidación y aislamiento del C-26 como benzofenona y del C-1 como ácido benzoico	190
n) Aplicación de la secuencia degradativa a withaferina A radioactiva	190
Resumen	192
Bibliografía	197

CAPITULO I
INTRODUCCION

GENERALIDADES

Los withanólidos son un grupo de esteroides naturales cons-
 truídos sobre un esqueleto de tipo ergostano. Se caracterizan por
 poseer una cadena lateral de nueve átomos de carbono, con una lac-
 tona de seis miembros formada por los carbonos 22 a 26; esta es-
 tructura básica, representada en la figura 1, se denomina "esque-
 leto withanólido".¹

Deben su nombre a la planta *Withania somnifera* donde fueron
 descubiertos los primeros constituyentes de este grupo.^{2,3} Han si-
 do hallados además en otras plantas del género *Withania*, y tam-
 bién en plantas de los géneros *Acnistus (Dunalia)*, *Jaborosa*, *Ni-*
candra, *Physalis*, *Datura*, *Lycium*, etc, todas ellas pertenecientes
 a la familia de las *Solanáceas* encontrándose principalmente en
 las hojas de los vegetales mencionados.

Existen otros compuestos tales como 22,26- δ -lactoles, 23,26
 y 28,26- γ -lactonas, fisalinas, acnistinas y con anillo D de seis
 miembros aromatizado,⁴⁻⁶ todos ellos biogénicamente relacionados

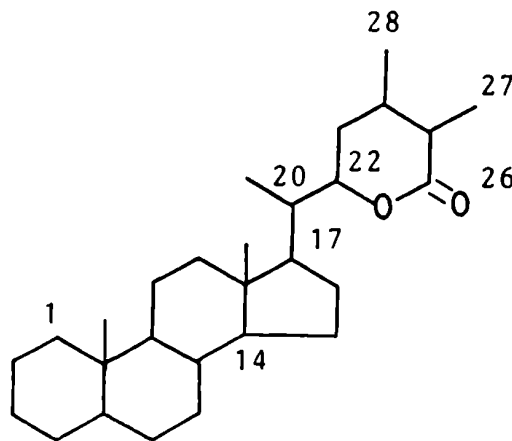


Figura 1: Esqueleto withanólido.

a los withanólidos (Figura 2). Por conveniencia se agrupa también a estos compuestos bajo el nombre genérico de withanólidos, siendo las características comunes de los mismos un esqueleto básico, modificado o no, del tipo ergostano y distintos grados de oxidación en los carbonos 1, 22 y 26.

Las fisalinas fueron aisladas de varias especies de *Physalis* los rasgos estructurales comunes de estos compuestos son la ruptura oxidativa del enlace entre los carbonos 13 y 14 y el cierre de un nuevo anillo de seis miembros por formación de un nuevo enlace entre los carbonos 16 y 24. Se designan como withafisalinas, compuestos que representan estados intermedios en el proceso biosintético de withanólidos a fisalinas, por ejemplo withafisalina C 5.

Los compuestos del tipo Nic 1 (nicandrenona) 6, son los primeros esteroides naturales que poseen un anillo D de seis miembros aromatizado.

Las acnistinas presentan un tipo distinto de cadena lateral, en la cual aparece un ciclopentano por unión de los carbonos 21 y 24, por ejemplo acnistina A 7.

Los withanólidos con esqueleto esteroidal no modificado se pueden subdividir de acuerdo a las siguientes características estructurales:

- a) compuestos no sustituidos en carbono 20. ^{4,5,7-10}
- b) compuestos que poseen un grupo hidroxilo en carbono 20 (20 α). ^{4,5,11-15}
- c) compuestos con la cadena lateral orientada 17 α . ^{4,5,9}

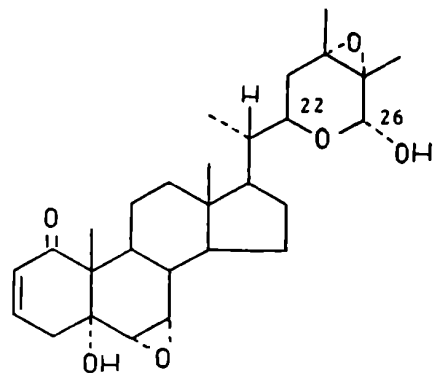
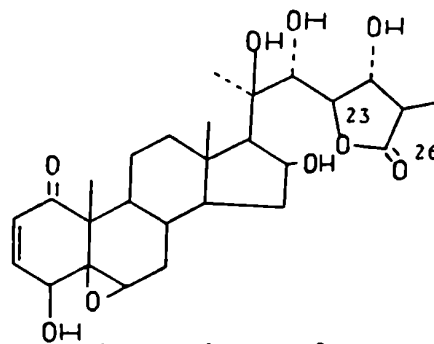
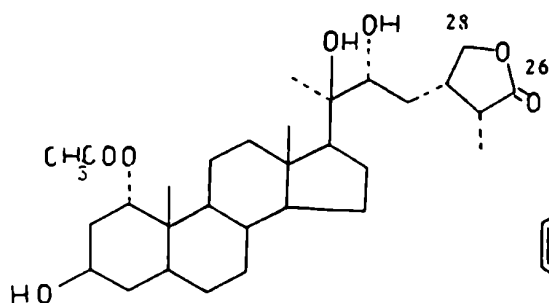
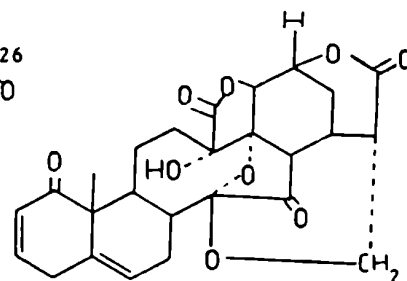
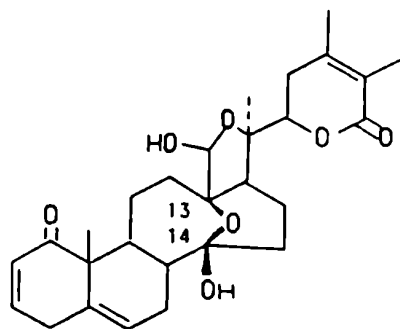
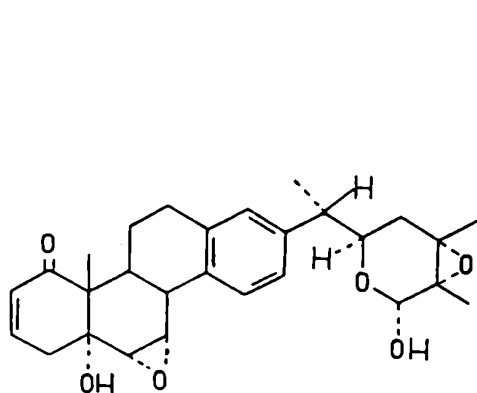
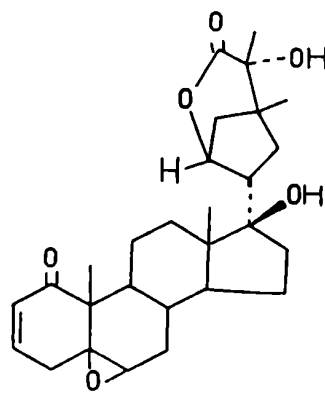
nicalbina A 1ixocarpalactona 2perulactona 3fisalina B 4withafisalina C 5Nic-1 (nicandrenona) 6acnistina A 7

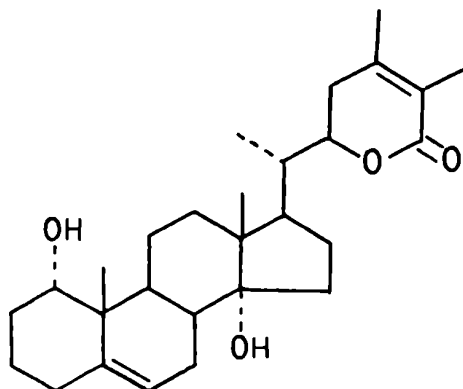
Figura 2: Estructuras de algunos compuestos biogénicamente relacionados a los withanólidos.

Estas subdivisiones son importantes desde el punto de vista biogénético, pues con muy pocas excepciones, las plantas que sintetizan 20-H-withanólidos no producen 20-hidroxi compuestos y viceversa.⁴

Los 17^α-alquil withanólidos son el único grupo de esteroides naturales que poseen una cadena lateral de más de dos carbonos orientada en α .

Los compuestos presentes en estos subgrupos se diferencian por la posición y número de grupos hidroxilo, átomos de cloro y presencia o ausencia de dobles enlaces y/o anillos epóxido. En la figura 3 se presentan ejemplos de estructuras de withanólidos que contienen este tipo de variaciones.

González y colaboradores lograron aislar de *Withania aristata* Pauq. , un glicósido mezclado con el β -D-glucósido del sitosterol, que por hidrólisis ácida y separación cromatográfica permitió aislar al 1^α,14^α-dihidroxi-22R-witha-5,24-dienólido 20.¹⁶ Sin embargo no se llegó a detectar en este trabajo el resto del azúcar, ni se informaron las constantes físicoquímicas del glicósido.



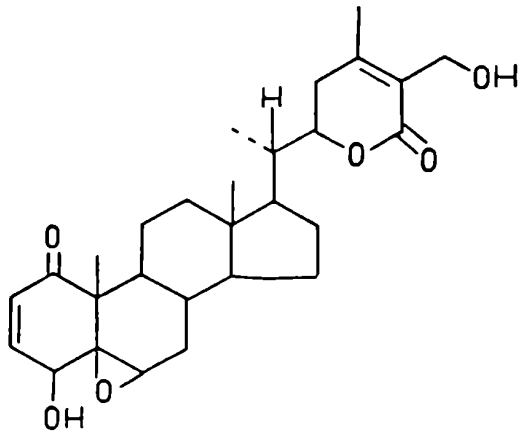
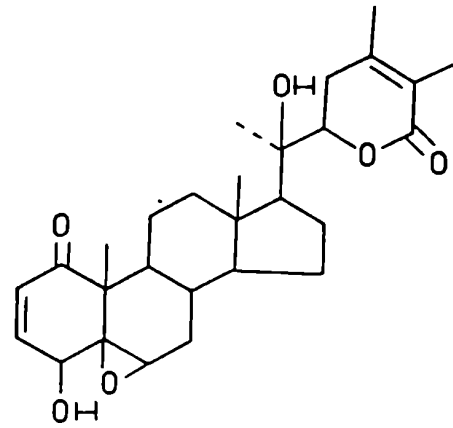
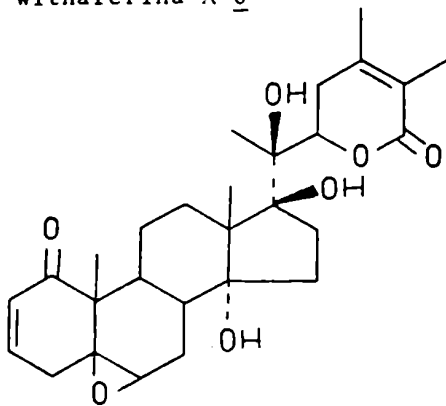
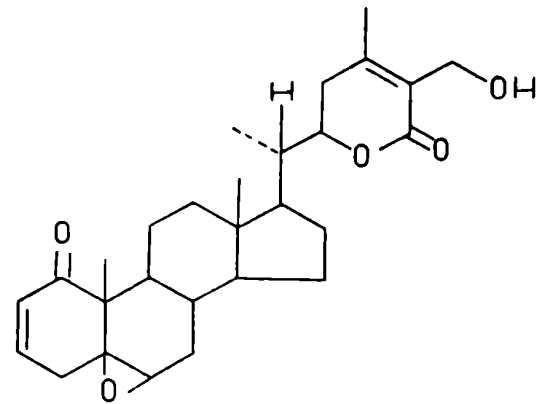
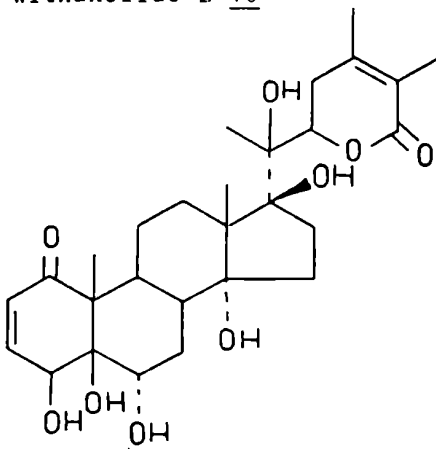
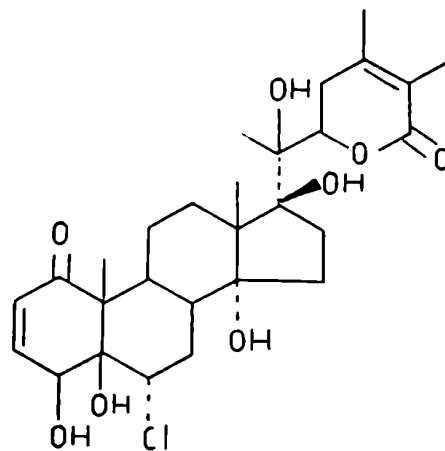
withaferina A 3withanolide D 9withanolide E 10jaborosalactona A 11withaperuvina 12fisalolactona 13

Figura 3: Estructura de algunos withanolidos con esqueleto esteroide no modificado.

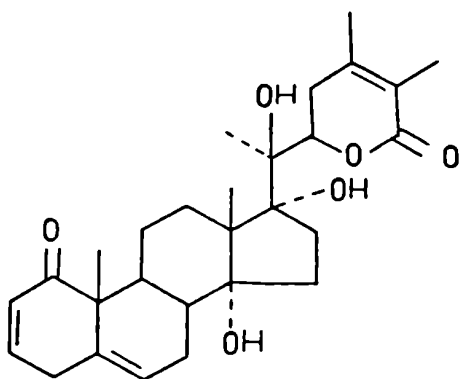
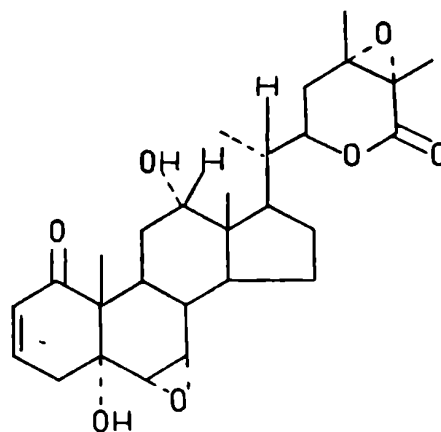
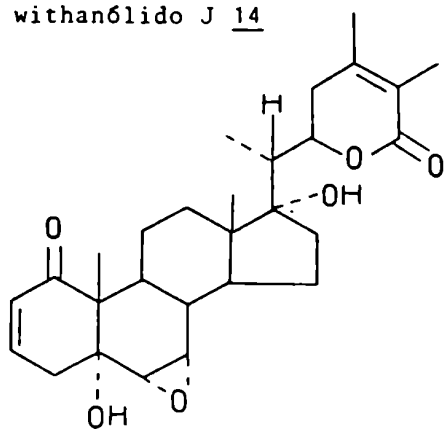
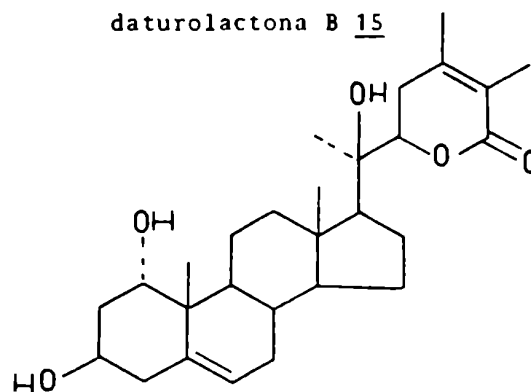
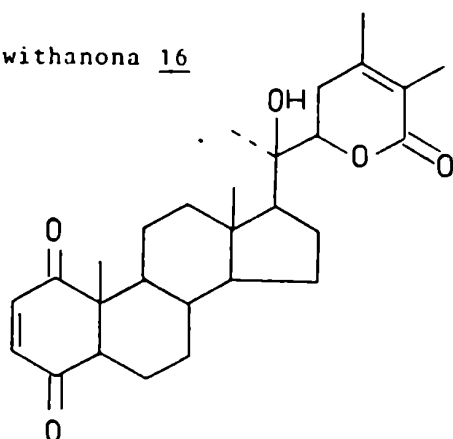
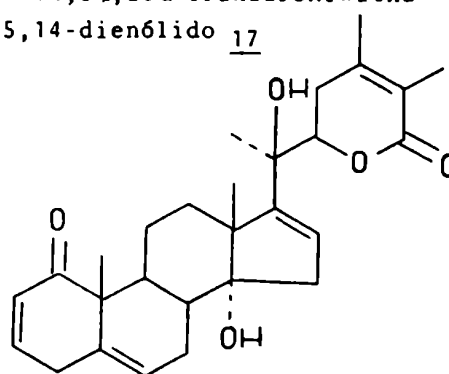
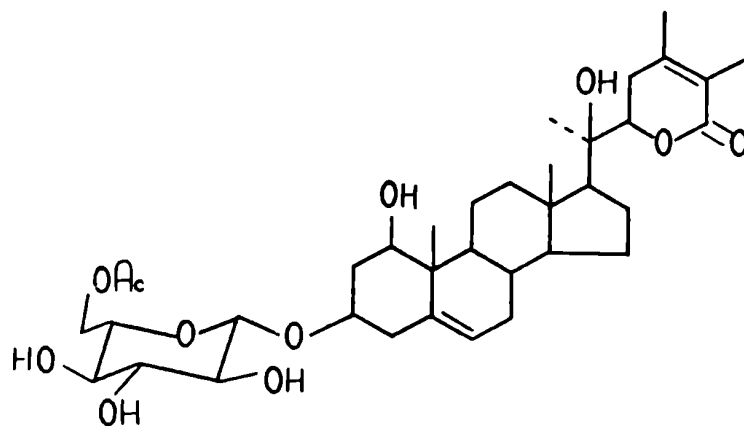
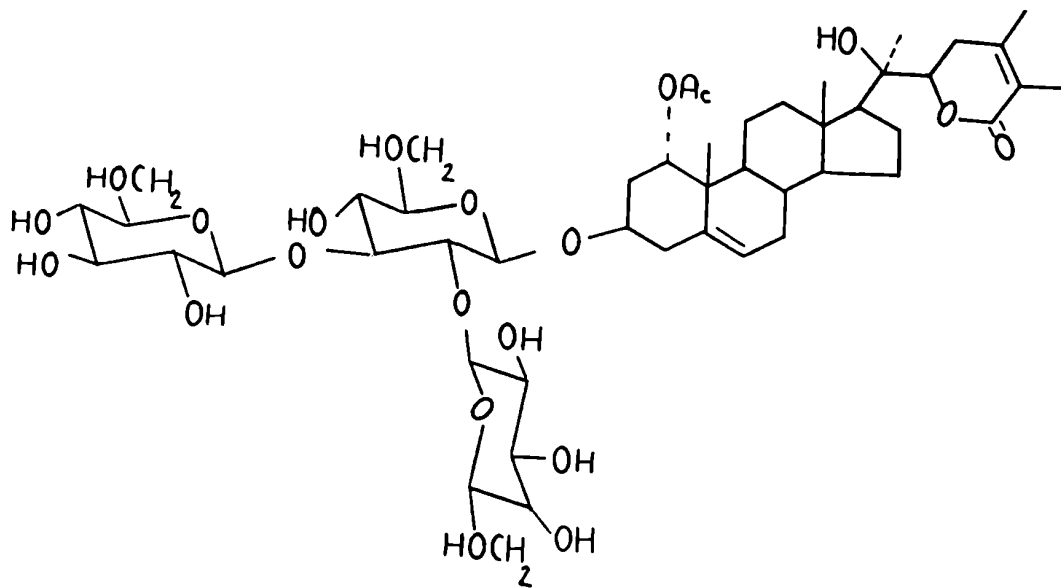
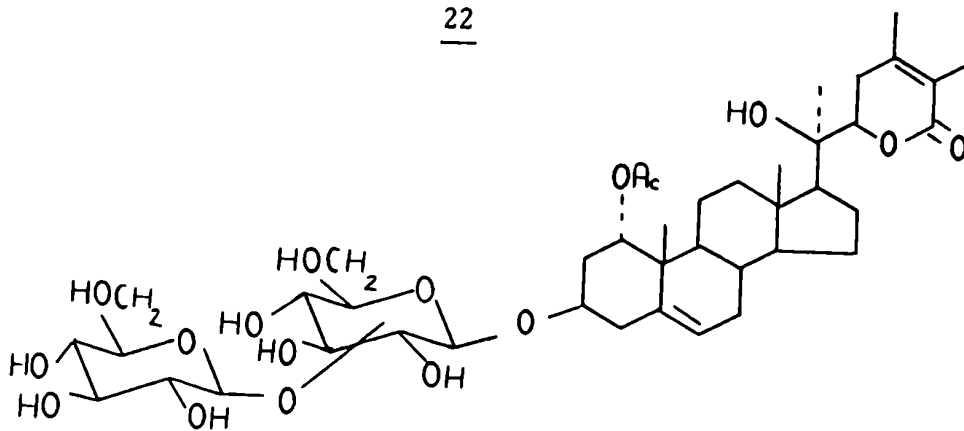
withanolido J 14daturolactona B 15withanona 161 α ,3 β ,20 α -trihidroxiwitha-
5,14-dienólido 1720 α -hidroxi-1,4-dioxo-5 β ,6 β -
epoxi-20R,22R-witha-2,24-
dienólido 18(20R,22R)-14 α ,20 α -dihidroxi-
1-oxowitha-2,5,16,24-tetra-
nólido 19

Figura 3: continuaci3n

21

El primer glicósido totalmente caracterizado perteneciente al grupo de los withanólidos, fue aislado de las fracciones polares del extracto etéreo de hojas de *Physalis peruviana*.¹⁷ El mismo se identificó como 3-O(β -D-glucopiranosido) fisalolactona B 21.

Recientemente se aislaron dos nuevos glicósidos de *Dunalia australis*, también caracterizada como *Acnistus australis* llamados dunawithaninas A y B.¹⁸ Las estructuras de los nuevos compuestos se determinaron a partir de datos físicos y transformaciones químicas como (20R,22R)-3-O(2',3'-di-O-(β -D-glucopiranosil)- β -D-glucopiranosil)-3 β ,20-dihidroxi-1 α -acetoxi-witha-5,24-dienólido 22 y el correspondiente 3-O(β -D-glucopiranosil (1' \rightarrow x)- β -D-glucopiranosil) compuesto 23.

2223

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS WITHANOLIDOS

Durante muchos años se atribuyeron diversas propiedades terapéuticas a las plantas de *Withania somnifera*. Algunas tribus sudafricanas usaron sus raíces y hojas con distintos propósitos medicinales, atrayendo la atención de los pobladores europeos quienes utilizaron la pasta de hojas en el tratamiento de la erisipela. En la India usaron esta planta por sus propiedades sedativas, hipnóticas y antisépticas;⁴ sin embargo la mayoría de los estudios realizados a comienzos de este siglo no confirmaron las propiedades mencionadas.¹⁹

Al aislarse los primeros withanólidos en forma pura y cristalina, se realizó un mejor estudio de los mismos, encontrándose que la withaferina A 8 no sólo presentaba propiedades anticancerígenas²⁰⁻²⁵ sino también una notable actividad bacteriostática²⁶⁻³⁰, ejerciendo además acción inmunosupresora.^{31,32}

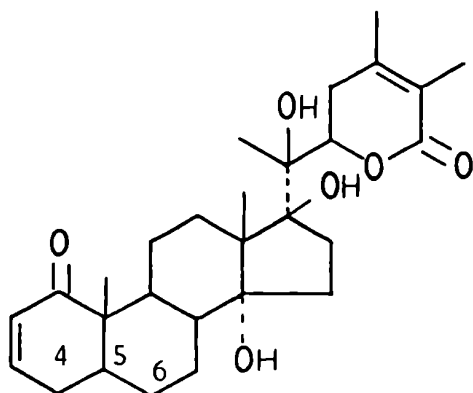
También se encontró que la withaferina A y el withanólido D 9 inhibían la formación de ácido ribonucleico (ARN) en el sarcoma 180 de células cancerosas a una concentración de 40µgr/ml.³³ Por otra parte la withaferina A inhibe la síntesis de proteínas³⁴ y el desarrollo de hongos³⁵ e inversamente, nucleófilos biológicos y algunos microorganismos actúan sobre ella.^{36,37}

La actividad anticancerígena de la withaferina A se ha evaluado en forma más extensa investigando su acción contra el sarcoma 180, el sarcoma negro, el carcinoma ascítico de Erlich y el adenocarcinoma mamario E0771 en ratas.³⁸

Se estudió también la actividad de varios withanólidos fren-

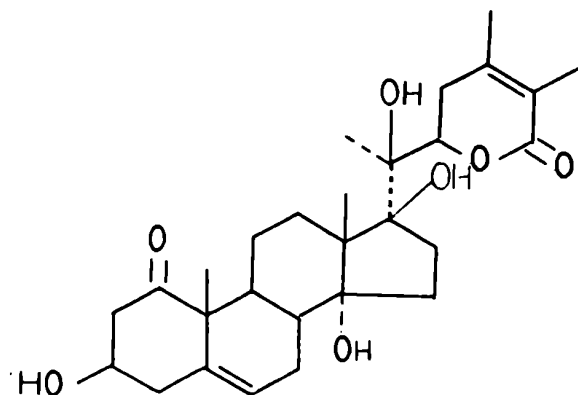
te a las larvas de *Spodoptera littoralis* entre ellos withanólido E 10, 4 β -hidroxiwithanólido E 24 (principales componentes de *Physalis peruviana*), y withanólido S 25.³⁹ Algunos de estos compuestos inhiben la alimentación de las larvas, siendo crítica la sustitución en los carbonos 4, 5 y 6 en la actividad desarrollada. El withanólido E es el que presenta mayor actividad; la adición de un grupo hidroxilo en posición 4 β reduce esta actividad en un factor de 10, mientras que la hidrólisis del 5,6-epóxido a 5,6-diol, sistema presente en withanólido S, conduce a una inactivación total.

Recientemente se comprobó la actividad antiinflamatoria del 3 β -hidroxi-2,3-dihidro-withanólido F 26, el cual fue aislado de frutos de *Withania coagulans*.⁴⁰ En dosis de 10 mgr/kg este compuesto actúa sobre los edemas y granulomas, en condiciones subagudas, causadas por formaldehído inyectado en ratas. Se determinó que su actividad en peso, es 5 veces mayor que la de fenilbu



- 24 4 β -hidroxi - 5 β ,6 β -epoxi
(4 β ,hidroxiwithanólido E)
- 25 5 α ,6 β -dihidroxi
(withanólido S)

tazona y aproximadamente igual a la de la hidrocortisona. Por otra parte se comprobó que este withanólido no afecta el sistema nervioso central.



WITHANOLIDOS EN LA QUIMIOTAXONOMIA

Mediante estudios realizados en la planta *Withania somnifera*, se comprobó que la misma existe como distintas poblaciones morfológicamente indistinguibles unas de otras, que difieren químicamente de acuerdo al tipo de withanólidos que contienen.

Tales poblaciones de plantas se designaron como quimiotipos, identificándose en Israel tres quimiotipos distintos (I-III).

El principal constituyente del quimiotipo I⁴¹ fue withaferina A 8, la cual estaba acompañada por pequeñas cantidades de otros withanólidos. A pesar de la característica general de *Withania somnifera* de introducir grupos hidroxilo en el esqueleto esteroi- dal, no se encontró en el quimiotipo I ningún compuesto con un sustituyente hidroxilo en carbono 20, siendo los principales componentes 4 β -hidroxi-5,6-epoxi withanólidos.

El quimiotipo II contenía sólo 20-hidroxi withanólidos.⁴¹ El principal withanólido constituyente resultó ser el withanólido D 9, el cual se encontraba acompañado de otros withanólidos con grupos hidroxilo adicionales.

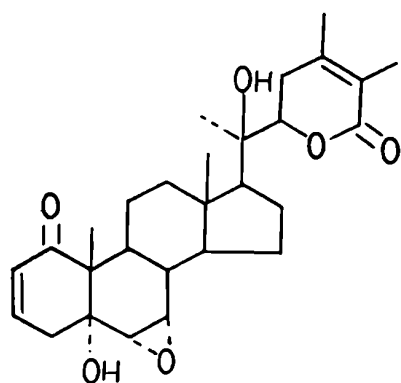
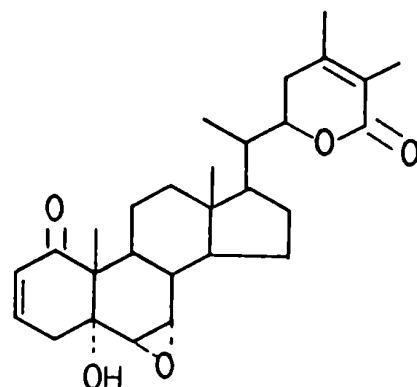
El quimiotipo III⁴² también contenía sólo 20-hidroxi withanólidos, los cuales podían dividirse en dos grupos: a) con cadena lateral orientada en β ; b) con cadena lateral orientada en α . Ninguno de los withanólidos aislados en este quimiotipo poseían hidroxilo en carbono 4. Con excepción del withanólido E 10, el cual poseía el sistema 5 β ,6 β -epoxi, todos los componentes del grupo tenían un doble enlace en esta posición.

Se supuso que la formación de los distintos componentes en

plantas pertenecientes a un mismo género tenía carácter genético lo cual se confirmó realizando cruza recíprocas por polinización entre distintos quimiotipos de *Withania somnifera*⁴. La cruza de los quimiotipos I y III produjo al withanólido D 9, como producto predominante, el cual no se detectó en los quimiotipos padres, mientras que withaferina A 8, el principal componente del quimiotipo I, se encontraba ausente y el withanólido E 10 permanecía presente en la descendencia como una herencia del tipo padre III.

Como observación general se puede decir que las plantas que producen 20-hidroxi withanólidos no producen 20-desoxi withanólidos, siendo una excepción la presencia conjunta de withaferina A y withanólido D en el tipo africano de *Withania somnifera*⁴ y de 17-desoxi-20-hidroxiwithanona 27 junto con 17-desoxiwithanona 28 en *Lycium chinese*.⁴³

Los resultados obtenidos por cruza de distintos quimiotipos señalan la posibilidad de lograr un control genético, pudiendo acumular withanólidos no encontrados en poblaciones naturales, o

2728

transformar componentes menores en mayoritarios. No se ha analizado hasta el momento la presencia de distintos quimiotipos en plantas de otros géneros que contienen withanólidos.

CONCLUSIONES BIOSINTETICAS OBTENIDAS A PARTIR DE PRODUCTOS AISLADOS DE *WITHANIA SOMNIFERA*.

Lavie y colaboradores⁴ propusieron un camino biosintético hipotético a partir del análisis cuali y cuantitativo de los withanólidos obtenidos a partir de cruza por polinización entre distintas especies de *Withania somnifera*. El mismo conduce a la sustitución de los anillos A y B a partir de un fitoesterol precursor, como se indica en la figura 4.

El primer paso sería presumiblemente la hidroxilación en carbono 1, la cual tendría lugar por el lado menos impedido de la molécula. El intermediario 5-en-1 α ,3 β -diol (I), se oxidaría selectivamente a la correspondiente cetona II la cual daría el sistema 2,5-dien-1-ona (III) (encontrado en varios withanólidos) por una β -eliminación. Todos los compuestos que poseen la estructura III son bastante inestables y deben ser reducidos a 2,3-dihidro derivados para prevenir la oxidación. Es notable que el sistema 1-ona saturado ha sido encontrado raramente en esta serie en la naturaleza.

El camino biosintético se ramificaría en este punto hacia varias direcciones: a) hidroxilación en carbono 4

b) epoxidación de carbonos 5 y 6

c) hidroxilación de carbonos 5 y 7

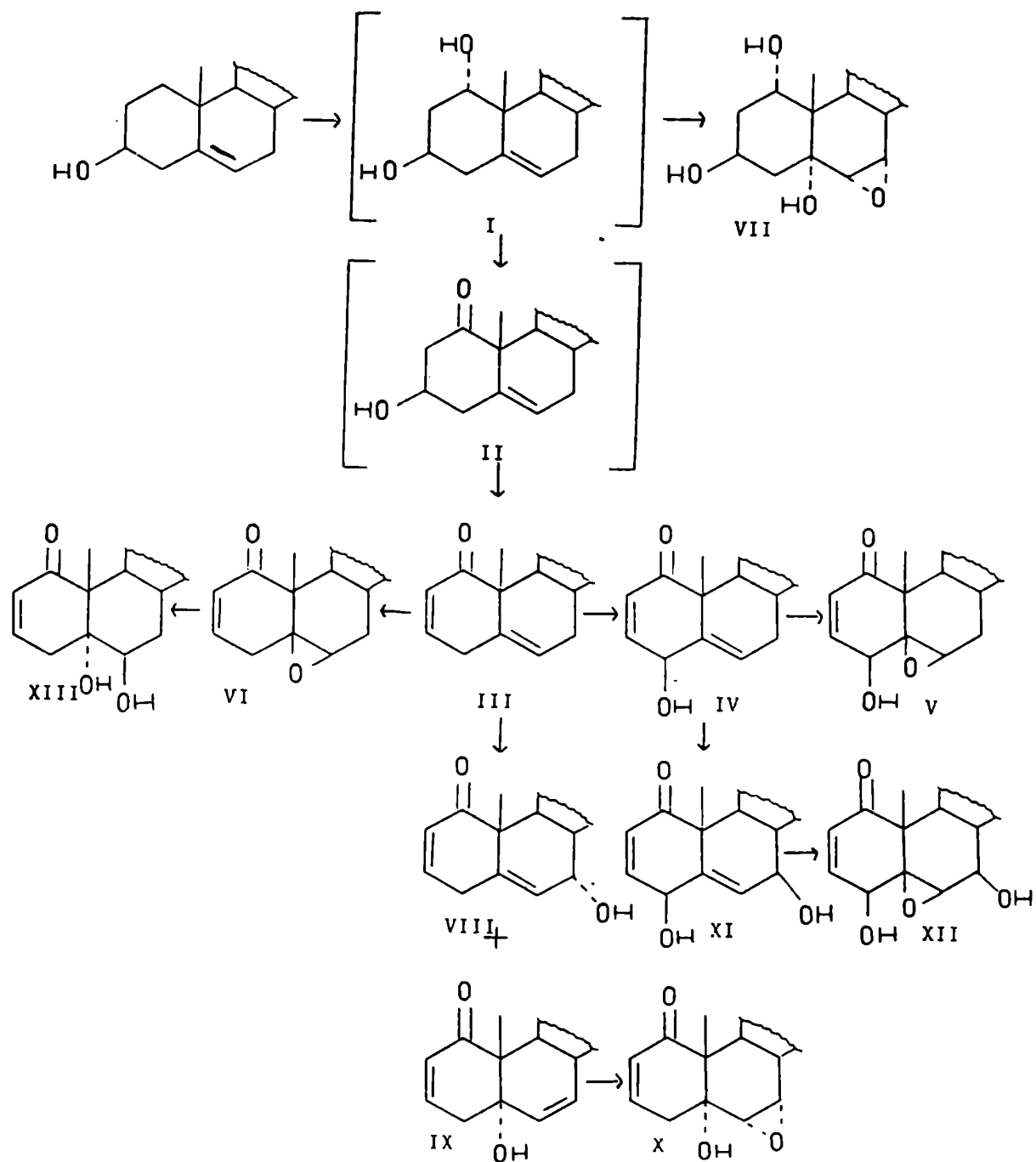
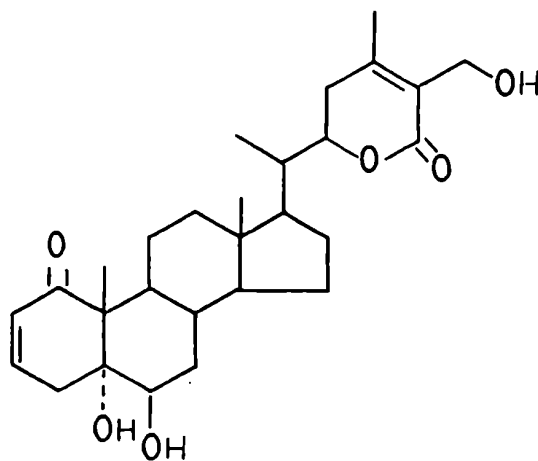


Figura 4: Camino biosintético propuesto por Lavie y colaboradores para la funcionalización de los anillos A y B.⁴

La hidroxilación en carbono 4 conduciría a la estructura 2,5-dien-4 β -ol (IV) la cual se epoxidaría rápidamente dando V. Mientras que la estructura IV se encuentra sólo en componentes minoritarios, V se presenta en alrededor de 16 compuestos, entre ellos withaferina A 8 y withanólido D 9.

La epoxidación de los carbonos 5 y 6 daría lugar al sistema VI, encontrado por ejemplo en jaborosalactona A 11. Por posterior apertura hidrolítica del epóxido se obtendría el sistema XIII presente en jaborosalactona D 29. Las estructuras VIII y IX son raras dentro de la serie de los withanólidos. La epoxidación estereoespecífica de IX daría el sistema 5-hidroxi-6,7-epoxi (X), encontrado en withanólidos de *Withania somnifera* del tipo hindú y de *Nicandra physaloides*.

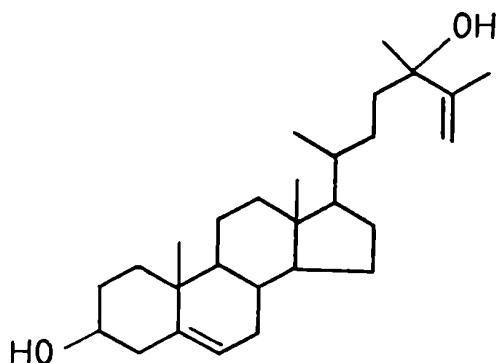
El resto de las estructuras de la figura 4 representan probables intermediarios que darían lugar a la formación de componentes minoritarios postulados como precursores.



Por otra parte Vande Velde y Lavie⁴⁴ aislaron tres compuestos de *Withania coagulans*, Dunal. identificados como β -sitosterol, 3 β -hidroxi-2,3-dihidrowithanólido F 26 y ergosta-5,25-dien-3 β ,24 ξ -diol 30 y consideraron a los dos últimos como posibles precursores de los withanólidos. En base a esta suposición y considerando al 24-metilencolesterol como precursor de withanólidos, propusieron un camino biosintético que daría lugar a la formación de la cadena lateral de estos compuestos (Figura 5). I representa al 24-metilencolesterol; el fitosterol aislado II llevaría a III por hidroxilación en carbono 22, una reacción bien conocida en la biosíntesis de esteroides en la naturaleza. A partir de este punto son posibles dos hipótesis:

- a) ciclación de III para dar IV, el que luego se oxida a V
- b) oxidación del isómero alílico VI para dar VII cuya posterior ciclación conduce a V.

La estructura de un lactol del tipo V se encontró en varios withanólidos⁴⁵⁻⁴⁸ (ver pág. 1); la oxidación del mismo conduce a la lactona VIII, característica en la estructura de los withanólidos.



30

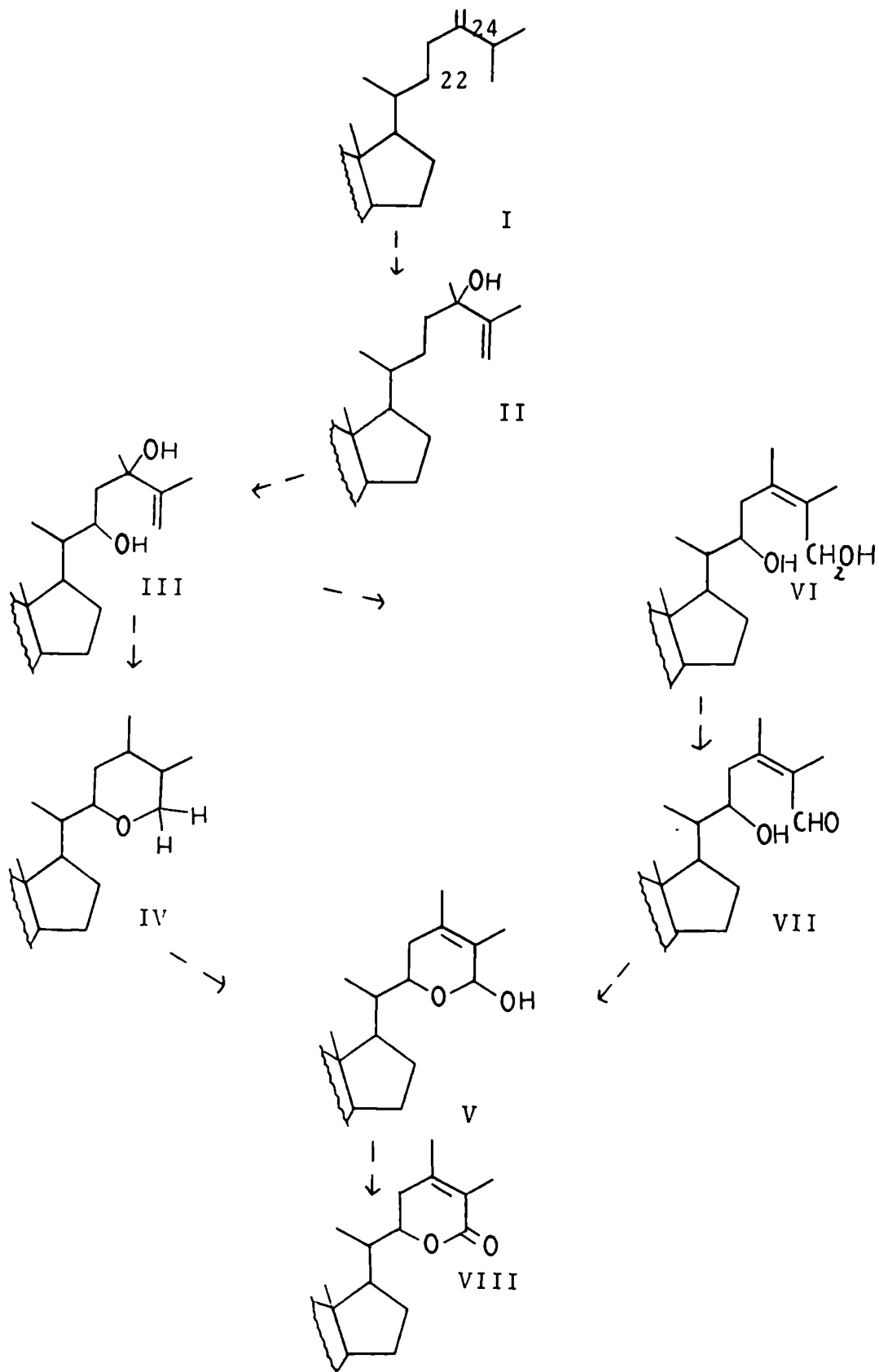


Figura 5 :Posible camino biogénético que conduce a la formación de la cadena lateral de los withanólidos.⁴⁴

DESCRIPCION Y DISCUSION
DE LOS RESULTADOS

CAPITULO II

WITHANOLIDOS EN

ACNISTUS BREVIFLORUS

ANTECEDENTES

La planta *Acnistus breviflorus* (Griseb), también caracterizada como *Dunalia breviflorus*, es oriunda del noroeste de la Argentina.

Se ha publicado una descripción de la planta con el nombre de *Acnistus parviflorus*,⁴⁹ en la cual se hace un análisis cuali y cuantitativo de algunos componentes, determinándose solamente el contenido en alcaloides, azúcares, saponinas, ceras, resinas y grasas.

Juliani y colaboradores⁵⁰ la investigaron con el único objeto de aislar de ella withaferina A 8. Este grupo hizo lo mismo con otras *Acnistus* argentinas, encontrando que el contenido de withaferina A, varía con la época de recolección de las hojas; así, por ejemplo, en *Acnistus breviflorus* (Griseb) (provenientes de Termas de Reyes, Jujuy), el contenido resultó mayor en muestras recolectadas en noviembre que en aquellas obtenidas a fines de febrero.

Posteriormente se realizó un estudio de los extractos de éter de petróleo y éter etílico de hojas de esta planta provenientes de la provincia de Tucumán.^{51,52} Los componentes principales de este último extracto eran withanólidos, pigmentos y resinas. Esta mezcla se purificó por columna cromatográfica de sílicagel aislándose cinco withanólidos de estructura conocida.^{52,53} Los componentes mayoritarios fueron identificados como withaferina A 8^{3,21} y jaborosalactona A 11.⁵⁴ Se aislaron además jaboro-

salactona D 29,⁵⁵ jaborosalactona E 32⁵⁵ y un artefacto formado durante la extracción con metanol en caliente, identificado anteriormente como 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33^{21,56} (Figura 6).

Lavie y colaboradores⁷ realizaron también un estudio del extracto clorofórmico de plantas de *Acnistus breviflorus* cultivadas en Israel, a partir de semillas provenientes de la Argentina. Por cromatografía en columna de sílicagel de dicho extracto se aislaron nueve withanólidos, cuatro de los cuales resultaron compuestos no descriptos hasta ese momento. Los compuestos que se encontraron en mayor cantidad fueron: withaferina A y 2,3-dihidrowithaferina A 34.^{3,56} Otros compuestos conocidos aislados como componentes minoritarios fueron: 24,25-dihidro-27-desoxiwithaferina A 35, 27-desoxiwithaferina A 36¹ y 6 α -cloro-5 β -hidroxithaferina A 37⁹. Los cuatro compuestos nuevos aislados fueron: 2,3,24,25-tetrahidro-27-desoxiwithaferina A 38, 2,3-dihidro-27-desoxiwithaferina A 39, 5,6-desoxiwithaferina A 40 y 2,3-dihidro-5,6-desoxiwithaferina A 41 (Figura 7).

La comparación de los compuestos aislados por Bukovits y los encontrados por Lavie y colaboradores indicaría que el tipo de withanólidos producidos por la planta depende del lugar de crecimiento, si bien no puede descartarse la existencia de distintos quimiotipos dentro del género *Acnistus* que podrían justificar las diferencias encontradas. Es una característica común de los withanólidos aislados en Israel la presencia de un grupo hidroxilo en posición 4 β , mientras que en las plantas provenientes de

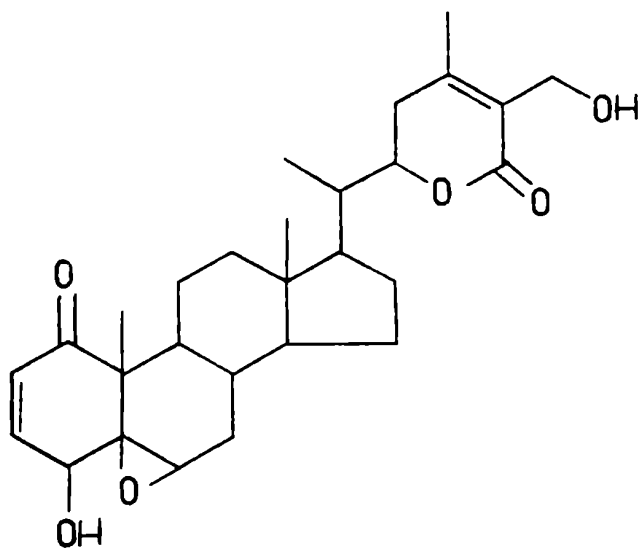
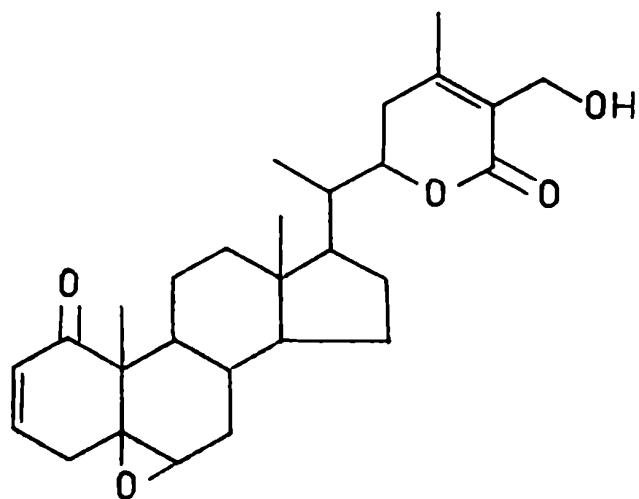
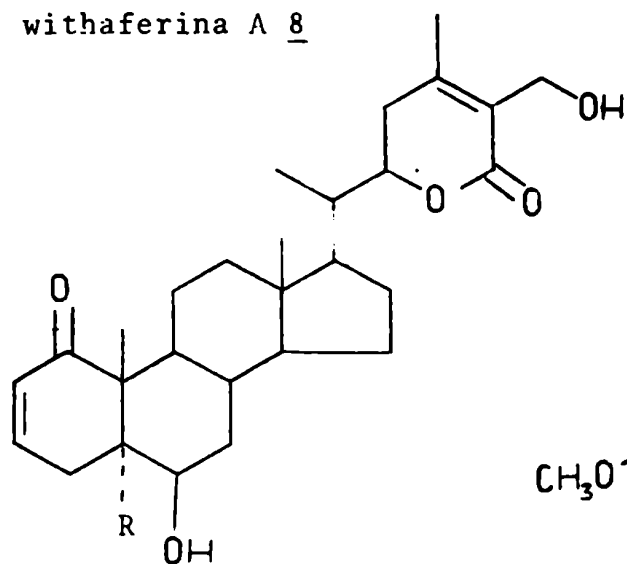
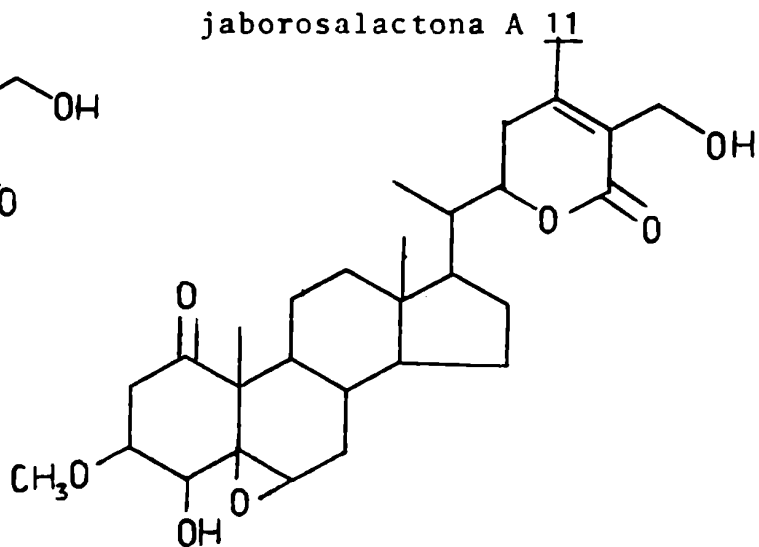
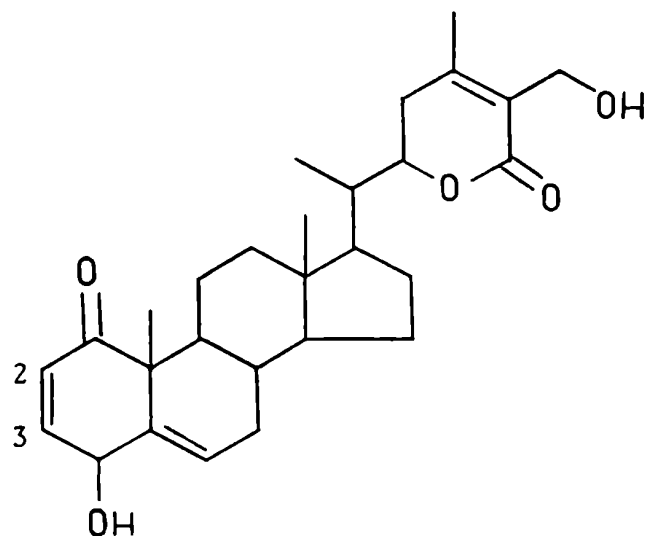
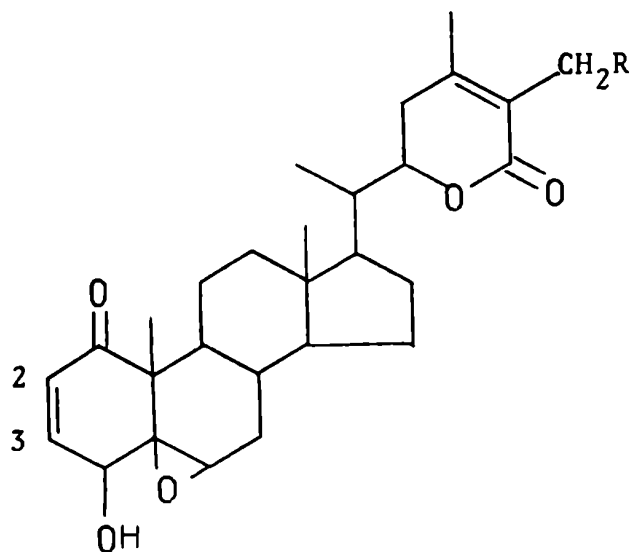
withaferina A 8jaborosalactona A 11R:CH jaborosalactona D 29R:Cl jaborosalactona E 322,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33

Figura 6: withanólidos aislados de *Aenistus breviflorus* cultivados en la Argentina.⁵²



R:OH withaferina A 8

R:OH 2,3-dihidrowithaferina A 34

R:H 27-desoxiwithaferina A 36

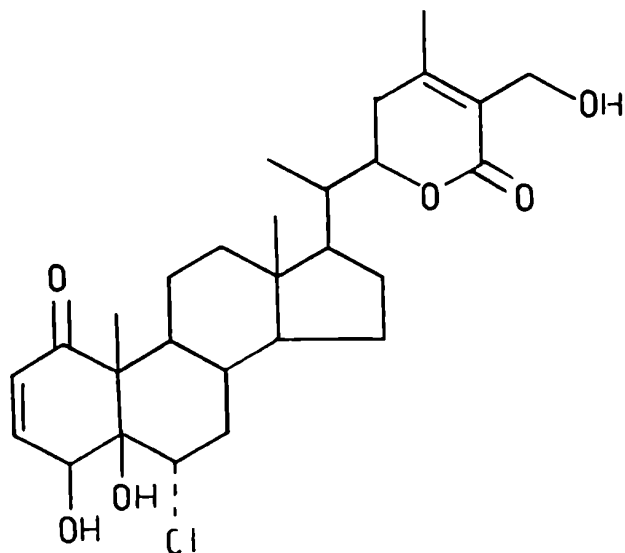
R:H 2,3-dihidro-27-desoxiwitha-
ferina A 39

R:H 2,3,24,25-tetrahidro-27-desoxi-
withaferina A 38

R:H 24,25-dihidro-27-desoxiwithafe-
rina A 35

5,6-desoxiwithaferina A 40

2,3-dihidro-5,6-desoxiwitha-
ferina A 42



6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A 37

Figura 7: withanólidos de *Acnistus breviflorus* cultivados
en Israel.⁷

Tucumán se encuentran varias jaborosalactonas (4-desoxi withanólidos). En ambos casos no se encontraron compuestos hidroxilados en carbonos 17, 20 y/o 14 y la sustitución de los anillos A y B no presentaba demasiadas variaciones, como en el caso de los withanólidos aislados de *Withania somnifera*.

En este trabajo de tesis se continuó el análisis del contenido de withanólidos presentes en plantas de *Acnistus breviflorus* provenientes de la provincia de Tucumán aislando los componentes minoritarios no aislados por Bukovits⁵² y comparando sus estructuras con la de los withanólidos aislados por Lavie⁷ de plantas de este género cultivadas en Israel. Dado que la formación de artefactos por extracción con metanol o etanol en caliente, las similitudes estructurales entre los withanólidos y la presencia de pigmentos en los extractos, resultan en tediosas y complicadas separaciones, se trató de encontrar un método de extracción y separación que permitiera superar estos inconvenientes. Con este fin los withanólidos se aislaron mediante la adaptación de un método descrito para plantas de *Withania somnifera*⁵⁸, que consiste en la extracción directa de las hojas frescas con éter etílico en frío durante 24 horas, y los resultados obtenidos se compararon con los withanólidos aislados por métodos tradicionales. Los extractos obtenidos en ambos casos se fraccionaron por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) luego de ser convenientemente prepurificados.

METODOS DE AISLAMIENTO Y SEPARACION DE WITHANOLIDOS

El aislamiento de withanólidos se realiza usualmente a partir de las hojas secadas al aire, por extracción en caliente con metanol^{3,52} o etanol.²¹ Este tratamiento da lugar a la formación de artefactos (ejemplo: 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33) que complican la posterior separación.

Los withanólidos aislados se separan tradicionalmente por cromatografía en sílicagel^{3,52} o alúmina²¹ como adsorbente y las fracciones recolectadas se purifican por cromatografía en capa delgada (ccd) preparativa o por cristalizaciones sucesivas de las mezclas.⁷ En algunos casos se logran separaciones por oxidación selectiva de los componentes de la mezcla con MnO_2 ,⁷ dado que este reactivo oxida selectivamente los alcoholes alílicos permitiendo separar, por ejemplo, 2,3,24,25-tetrahidrowithaferina A 38 de la 27-desoxiwithaferina A 36. En este caso sólo se oxida el segundo compuesto y los productos son fácilmente separables por ccd preparativa.

Se ha utilizado también la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en la separación de withanólidos (aunque nunca se aplicó la misma al fraccionamiento de extractos con fines preparativos). Gustafson y colaboradores⁵⁹ utilizaron este método para separar withaferina A 8 de varios derivados químicos y microbianos de la misma, encontrando que en las columnas de Corasil I y Porasil A (61 × 0,2 cm DI), la resolución de las mezclas era inferior a la obtenida con μ Porasil (30 × 0,4 cm DI). Usaron mezclas de acetato de etilo y hexano como solventes de

elución y un detector de índice de refracción.

Kirson y colaboradores⁶⁰ separaron por CLAR varios withanólidos que diferían entre sí principalmente por el número y posición de sustituyentes hidroxilo. Usaron Porasil A como relleno de columna y mezclas de hexano e isopropanol como solvente, lo cual les permitió trabajar con un detector uv aproximadamente 1000 veces más sensible que el usado por Gustafson. Para compensar la baja eficiencia del adsorbente usaron una columna de 366 cm de largo y aproximadamente 2 mm de diámetro interno (DI) convenientemente arrollada, llegando a detectar 5 ngr de compuesto, mientras que las cantidades más pequeñas detectadas utilizando un detector de índice de refracción fueron entre 1-9 μ gr. Sin embargo en los cromatogramas obtenidos los withanólidos presentaban tiempos de retención largos (entre 2 y 17 horas) que ocasionaban picos anchos y asimétricos.

También se usó CLAR para separar componentes de *Physalis peruviana* y *Nicandra physaloides* (c) Gaerth var. *albiflora*,⁶¹ mediante una columna de Lichrosorb Si-100, 5 μ m (250x4,6 mm DI). Como eluyente se utilizaron mezclas de isopropanol, cloruro de metileno y acetonitrilo, lográndose buenas separaciones.

Los intentos para separar mezclas de withanólidos usando CLAR en fase reversa, para lo cual se utilizaron columnas de C18 Porasil y fenil Porasil (Waters), no fueron exitosos ya que los autores no lograron retención con metanol y/o agua como solvente de elución.⁵⁹

DESCRIPCION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Extracción y fraccionamiento de material vegetalExtracción con metanol en caliente:⁶²

La planta recolectada en Tucumán en el mes de diciembre, se- cada a la sombra a temperatura ambiente y molida, se extrajo en un soxhlet durante 5 días con metanol. El extracto metanólico se concentró, se le agregó agua (volúmenes iguales) y se extrajo a su vez varias veces con éter de petróleo para desengrasarlo. La solución metanólica-acuosa restante se extrajo exhaustivamente con éter etílico y luego de secar la solución etérea sobre sulfato de sodio anhidro, se evaporó a sequedad obteniéndose un residuo sólido verde oscuro. El residuo fue cromatografiado en columna de sílicagel usando como eluyente mezclas de cloruro de metileno-metanol, con lo que se eluyeron de la columna fracciones que por recromatografía y posteriores recristalizaciones permitieron aislar los cinco withanólidos descritos previamente por Bukovits: withaferina A 8, 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33, jaborosalactona A 11, jaborosalactona D 29 y jaborosalactona E 32.⁵² La identificación de los mismos se completó por aplicación de espectroscopía de resonancia magnética nuclear a estos compuestos (ver pág. 85).

Las fracciones intermedias conteniendo mezclas de compuestos, algunos distintos a los indicados anteriormente, no se pudieron separar por las técnicas tradicionales y fueron fraccionados por CLAR.

Extracción con éter etílico en frío

Se utilizaron hojas recolectadas de cuatro plantas diferentes provenientes de la zona de "Horco Molle" a 2 km de la ciudad de Tucumán. Las hojas recién cortadas se colocaron en éter etílico en un lapso no mayor de 4 minutos, dejándolas a temperatura ambiente en lugar fresco una semana. Luego de separar la fase acuosa se hizo una extracción igual a la anterior y los extractos reunidos de ambas extracciones se concentraron, se llevaron a sequedad, se prepurificaron usando columnas de sílicagel H eluidas bajo presión con aire comprimido y se fraccionaron por CLAR.

Aplicación de cromatografía líquida de alta resolución a la separación de withanólidos

Se realizaron estudios usando columnas de sílicagel y de fase reversa. En el primer caso se lograron condiciones para la separación y análisis cuantitativo que fueron utilizadas con éxito en los estudios biosintéticos que se describen más adelante.

El uso de CLAR en fase reversa permitió separar mezclas complejas de withanólidos constituidas por productos naturales más artefactos que no se habían podido resolver usando columnas de sílicagel tradicionales.

Separación en columnas de sílicagel

Las separaciones se llevaron a cabo usando una columna Li-

Chrosorb Si-100 (250 × 4,6 mm DI, Hewlett Packard). El eluyente fue elegido en base a los resultados obtenidos en cromatografía en capa delgada de sílicagel de alta resolución con patrones de withaferina A 8, jaborosalactona A 11 y jaborosalactona D 29. Las placas cromatográficas se desarrollaron con mezclas de acetato de etilo-hexano, acetato de etilo-ciclohexano, isopropanol-hexano e isopropanol-ciclohexano en distintas proporciones. Los mejores resultados se obtuvieron con mezclas de isopropanol-hexano (1:9) y con acetato de etilo.

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos con los distintos sistemas probados. En todos los casos se utilizaron soluciones de los tres patrones mencionados anteriormente. El uso de isopropanol-hexano (1:9) como eluyente (línea 1) presentó el inconveniente de la baja solubilidad de los withanólidos en dicha mezcla. En consecuencia las muestras analizadas fueron disueltas en diclorometano-metanol (9:1). Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios debido a los tiempos de retención elevados (6 a 8 horas) y a las perturbaciones introducidas en los cromatogramas por el solvente de inyección. Se decidió por lo tanto cambiar el eluyente por otro que permitiera ser utilizado para disolver las muestras analizadas.

El uso de acetato de etilo como solvente de elución (línea 2) presentó la ventaja de disolver sin dificultad 1 mgr de withanólidos en 1 ml de solvente. Sin embargo fue necesario utilizar un detector de índice de refracción, pues el acetato de etilo absorbe a 225 nm, observándose una disminución de la sensibilidad, en la figura 8 se representan los cromatogramas obtenidos utilizando este sistema.

Tabla 1:

Sistema de elución	Volumen de inyección ^a	Tipo de detector**	Flujo (ml/min)	Tiempo de retención (min)		
				JLA 11	WA 8	JLD 29
1 isopropanol:hexano (1:9)	50µl#	uv (225:430)	1,0	6 a 8 horas		
2 acetato de etilo	50µl##	Ind. de refracción	1,0	4,63	6,43	7,67
3 acetato de etilo	10µl##	uv (335:430)	1,0	4,87	7,17	8,90
4 acetato de etilo-hexano-isopropanol (30:3:2)	10µl##	uv (335:430)	1,0	4,09	5,33	6,11
5 acetato de etilo-hexano-isopropanol (30:3:2)	10µl##	uv (335:430)	0,7	5,86	7,66	8,64
6 acetato de etilo-hexano-isopropanol (30:3:2)	10µl###	uv (260:430)	0,4	10,56	13,93	16,01

^aconcentración 1 mg/ml; ** (1^oobs.; 1^oref); # sv de inyección Cl₂Cl₂-MeOH (9:1); ##sv de inyección AcOEt

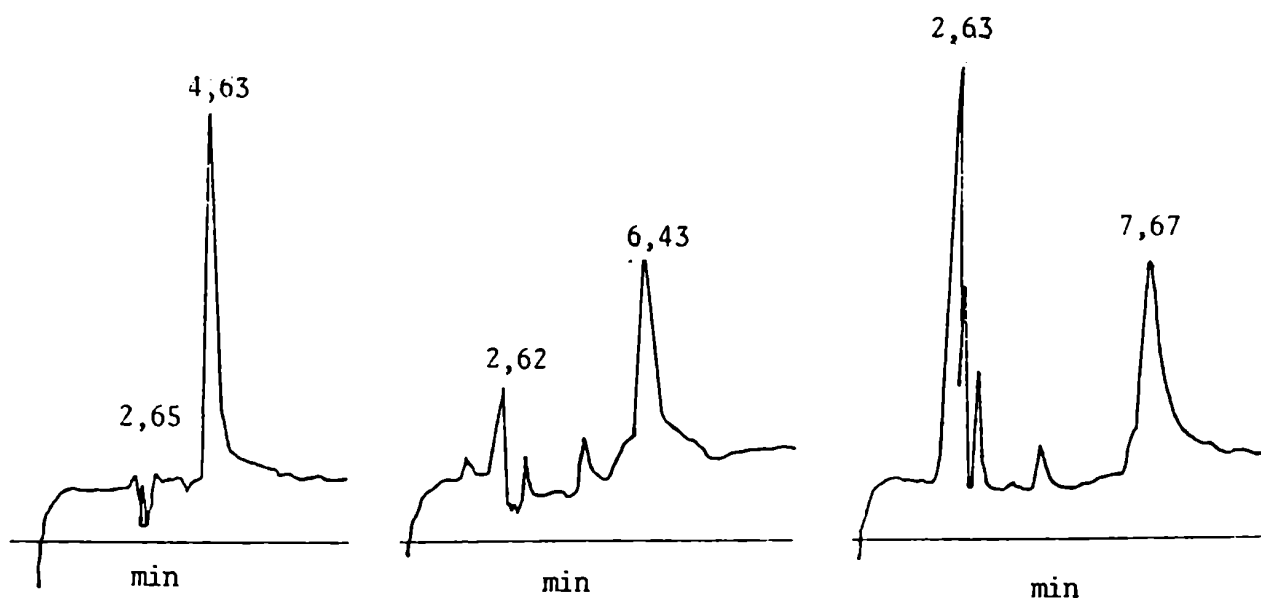


Figura 8: Cromatogramas obtenidos en las condiciones indicadas en la línea 2 (tabla 1) de los compuestos 8, 11 y 29. Las masas y los tiempos de retención fueron: 11 (50 μ gr, 4,63 min) 8 (50 μ gr, 6,43 min), 29 (50 μ gr, 7,67 min).

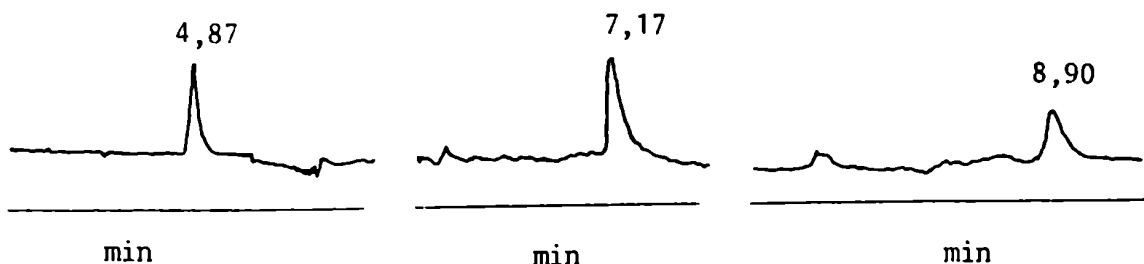


Figura 9: Cromatogramas obtenidos según las condiciones indicadas en la línea 3 (tabla 1) de los compuestos 8, 11 y 29. Las masas y los tiempos de retención fueron: 11 (10 μ gr, 4,87 min) 8 (10 μ gr, 7,17 min), 29 (10 μ gr, 8,90 min).

Posteriormente se logró aumentar la sensibilidad usando un detector uv en una zona en la cual no interfería el acetato de etilo; para esto se eligió una longitud de onda de 335 nm (línea 3) correspondiente al máximo secundario de los withanólidos (ejemplo: withaferina A 8 : 214 nm (ϵ 17300), 335 nm (ϵ 165)). En la figura 9 se representan los cromatogramas obtenidos usando este sistema. Si bien sería de esperar el mismo tiempo de retención para cada uno de los patrones que en el caso anterior, se observa en los tres casos un aumento del mismo (líneas 2 y 3), lo cual podría deberse a la menor masa inyectada en el último caso.

Los sistemas anteriores daban lugar a picos asimétricos principalmente para los componentes más polares (withaferina A y jaborosalactona D 29) que afectaban la resolución y sensibilidad. Este problema se pudo resolver agregando al acetato de etilo un solvente hidrofílico de poder eluyente similar, determinándose por ccd que la mezcla hexano-isopropanol (3:2) cumplía con este requisito. Utilizando entonces una mezcla ternaria acetato de etilo- hexano-isopropanol(30:3:2) como eluyente (línea 4) se obtuvieron los cromatogramas indicados en la figura 10.

Si bien este método era sensible y originaba picos agudos aún para los componentes más polares, los tiempos de retención variaban dentro de un rango demasiado pequeño. Debido a esto se decidió disminuir el flujo para mejorar la resolución (línea 5).

En la figura 11 se representa el cromatograma obtenido al aplicar este sistema a una mezcla de los tres patrones indicados.

Con el propósito de determinar la longitud de onda a la cual los withanólidos presentaban mayor absorbancia, pero sin inter-

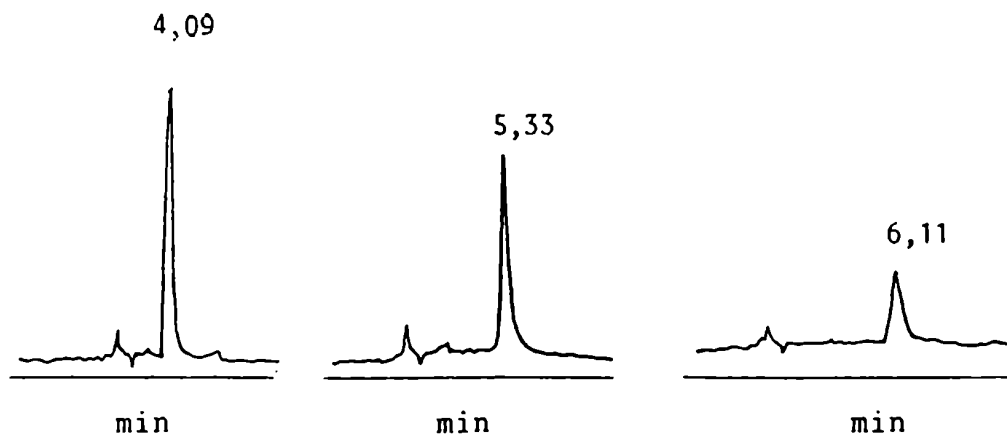


Figura 10: Cromatogramas obtenidos según las condiciones indicadas en la línea 4 (tabla 1) de los compuestos 8, 11 y 29. Las masas y los tiempos de retención fueron 11 (10 μ gr, 4,09 min), 8 (10 μ gr, 5,33 min), 29 (10 μ gr, 6,11 min).

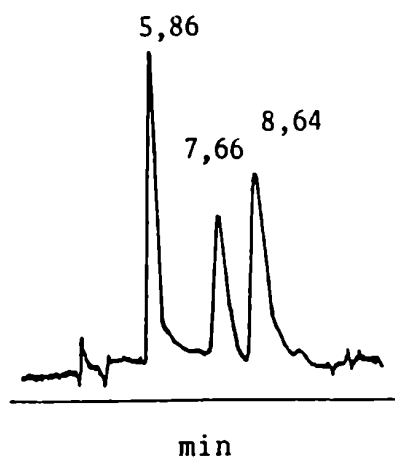


Figura 11: Cromatograma de una mezcla artificial de 8, 11 y 29, en las condiciones indicadas en la línea 5 (tabla 1). Las masas y los tiempos de retención fueron: 11 (3,3 μ gr, 5,86 min), 8 (3,3 μ gr, 7,66 min), 29 (3,3 μ gr, 8,64 min).

ferencia del solvente, se realizó un barrido de 190 a 560 nm de cada uno de los picos de una muestra artificial. En la figura 12 se muestra el resultado obtenido en el caso de la jaborosalactona A 11, el cual es similar a los obtenidos para jaborosalactona D 29 y withaferina A 8. En base a estos resultados y dado que la mezcla utilizada como eluyente era transparente desde 256 nm, se decidió utilizar el detector uv operando a 260 nm.

Finalmente se trató de mejorar la resolución por medio de una nueva disminución del flujo (línea 6). En estas condiciones se pudo resolver dentro de los 20 minutos luego de inyectar, una mezcla artificial de cuatro withanólidos aislados de *Acnistus breviflorus* por extracción en caliente según el método empleado por Bukovits,⁶² (figura 13).

En base a los resultados mencionados anteriormente se analizó el contenido de withanólidos en el extracto crudo de una hoja de *Acnistus breviflorus* proveniente de una planta de tres meses de edad. La extracción se realizó con éter etílico en frío durante 24 horas y el extracto fue prepurificado a través de una columna corta de sílicagel 60 (Merck). Los pigmentos menos polares y los withanólidos se recobraron por elución con acetato de etilo. Este tratamiento eliminó los pigmentos altamente polares que quedarían retenidos en la sílica y podrían interferir luego de realizar varias corridas sucesivas. Finalmente el extracto filtrado se evaporó, se redisolvió en acetato de etilo (1 ml por hoja) y se analizó por CLAR. En la figura 14 se representa el cromatograma obtenido utilizando la misma columna que para trabajos analíticos descripta anteriormente. Esta admitió 100 a 150 µgr de mezcla de withanólidos



Figura 12: Barrido de 190 a 560 nm del pico correspondiente a 11.
Como referencia se utilizó el mismo solvente de elución.

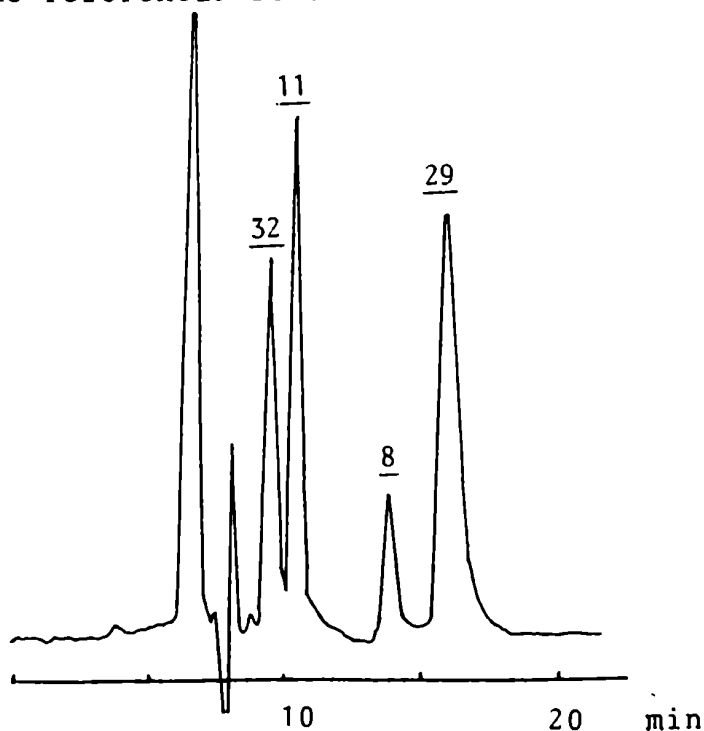


Figura 13: Cromatograma obtenido según las condiciones indicadas en la línea 6 (tabla1) de los compuestos 8, 11, 29 y 32. Las masas y los tiempos de retención fueron: 32 (2 μ gr, 9,60 min), 11 (2 μ gr, 10,56 min), 8 (1 μ gr, 13,93 min), 29 3 μ gr, 16,01 min).

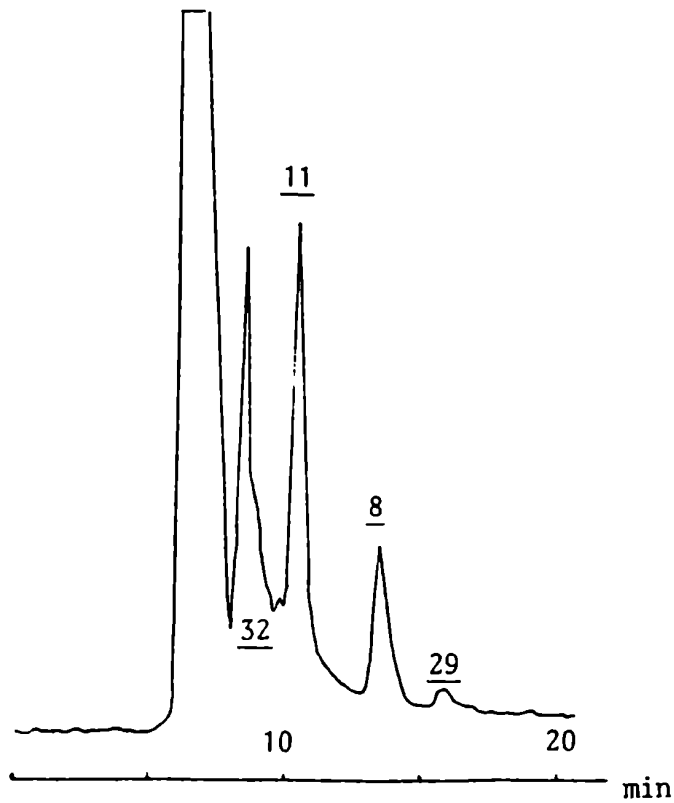


Figura 14: Separación de withanólidos presentes en el extracto crudo de una hoja de *Acnistus breviflorus* .(Masa aproximada de withanólidos: 1,5 mgr; volumen inyectado: 100 μ l).



Figura 15: Análisis de las fracciones recogidas en una única corrida (1/10 del extracto original) a partir del extracto crudo de una hoja de *Acnistus breviflorus* .(volumen inyectado: 1/20 de cada fracción).

sin que se afectara la resolución, pudiéndose por lo tanto separar los withanólidos presentes en una hoja en 10 corridas sucesivas (tiempo total: 200 minutos; volumen eluido : 80 ml). Como se puede ver en la figura 14, se obtuvieron picos agudos y simétricos aún en el caso del withanólido más polar (jaborosalactona D 29) por lo que las fracciones recolectadas en cada corrida fueron iguales o menores que 1 ml. Las fracciones recogidas en una única corrida (1/10 del extracto original) se recromatografiaron inyectando 1:20 de la fracción dando lugar a los cromatogramas representados en la figura 15, verificándose de este modo la separación de los withanólidos lograda.

Separación en columnas de fase reversa

El uso de CLAR en fase reversa en la separación de withanólidos se intentó anteriormente sólo una vez.⁵⁹ En este caso los autores informaron que no se observaba retención usando metanol o metanol-agua como solvente de elución. Sin embargo debido al progreso en el desarrollo de columnas en fase reversa para CLAR, por ejemplo la disponibilidad de sílica de 5 y 10 μm para columnas con alto porcentaje de grupos no polares unidos (ejemplo: octadecilsilano, ODS) y de placas cromatográficas de alta resolución en fase reversa, se decidió reinvestigar este sistema de separación en withanólidos. Con este fin se estudió el comportamiento de cinco withanólidos ya aislados de *Acnistus breviflorus* (ver pág 21) en placas cromatográficas de alta resolución en fase reversa. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Comportamiento cromatográfico de los withanólidos en CLAR analítica y en placas en fase reversa.

<u>withanólidos</u>	Rf*	Tr (min)**
jaborosalactona A <u>11</u>	0,14	13,12
jaborosalactona E <u>32</u>	0,20	9,47
2,3-dihidro-3-metoxi- withaferina A <u>33</u>	0,28	4,78
withaferina A <u>8</u>	0,34	4,48
jaborosalactona D <u>29</u>	0,40	3,27

* HPTLC RP-18, metanol-agua (70:30)

**Columna R-Sil 18 HL 10 μ m (250 \times 3,6 mm), metanol-agua (65:35)

2ml/min

Tr: tiempo de retención

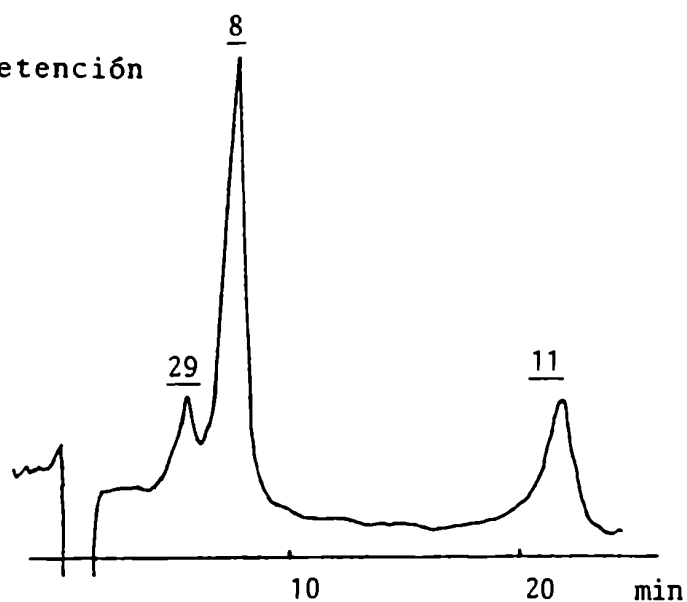


Figura 16: Separación de una mezcla de patrones (8, 11 y 29).

En base a esos resultados se intentaron separaciones en columnas de fase reversa para lo cual se utilizó el método propuesto por Hunter⁶⁰ (detector uv a 225 nm) como sistema de detección. Se utilizó una columna de 250× 3,6 mm, rellena con fase R Sil 18 HL 10 μm, la cual contiene un alto porcentaje de grupos ODS. Utilizando el sistema metanol-agua (65:35) como eluyente se lograron buenos tiempos de retención aún para los componentes más polares como se indica en la tabla 2.

La separación de withanólidos en fase reversa se extendió a escala preparativa usando columnas de 500×10 mm rellenas con el material antes mencionado. En la figura 16 se puede ver el cromatograma obtenido al separar una mezcla artificial de withaferina A 8, jaborosalactona A 11 y jaborosalactona D 29 aislados de *Acnistus breviflorus*. Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente se utilizó la CLAR en fase reversa en la separación de mezclas complejas formadas por artefactos provenientes de la extracción con metanol o etanol en caliente, y withanólidos naturales. También se aplicó este método en el aislamiento de withanólidos a partir de extractos parcialmente purificados.

Separación de mezclas complejas de withanólidos

Las fracciones intermedias provenientes del fraccionamiento de los extractos metanólicos o etanólicos en sílicagel, los cuales según se indicó anteriormente (ver pág 25) contenían mezclas complejas que no podían resolverse eficientemente por los métodos tradicionales, fueron separadas en sus componentes por

CLAR en fase reversa, utilizando la columna anteriormente mencionada para trabajos preparativos. Los compuestos aislados fueron identificados convenientemente por espectroscopía de resonancia magnética de ^1H , ^{13}C y espectrometría de masas como se detalla en el capítulo 3.

Las figuras 17a y b muestran la separación de los componentes de fracciones de extractos etanólico y metanólico respectivamente utilizando como eluyente una mezcla metanol-agua (70:30). Como se indica en la figura 17b uno de los picos separados del extracto metanólico resultó ser una mezcla de dos compuestos, IX y X. Estos fueron posteriormente separados usando una columna de mayor resolución (Altex Ultrasphere ODS 5 μm , 250 \times 10 mm) como se ve en la figura 18.

Los compuestos II, X y VIII, fueron respectivamente identificados como withaferina A 8, 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33 y jaborosalactona D 29, todos ellos encontrados previamente por Bukovits⁵² en plantas de *Acnistus breviflorus* provenientes de la provincia de Tucumán.

El compuesto I se identificó como 2,3-dihidrowithaferina 34 descrito previamente por Kupchan y colaboradores²¹ y aislado por Lavie y colaboradores⁷ de plantas de *Acnistus breviflorus* cultivadas en Israel.

El compuesto IX resultó ser 6 α -cloro-5 β -hidroxioxiwithaferina A 37, aislado por primera vez por Trujillo¹⁵ de plantas de *Withania frutescens* y posteriormente por Lavie y colaboradores de *Acnistus breviflorus* cultivadas en Israel.⁷

El compuesto V se identificó como 5,6-desoxiwithaferina A 40

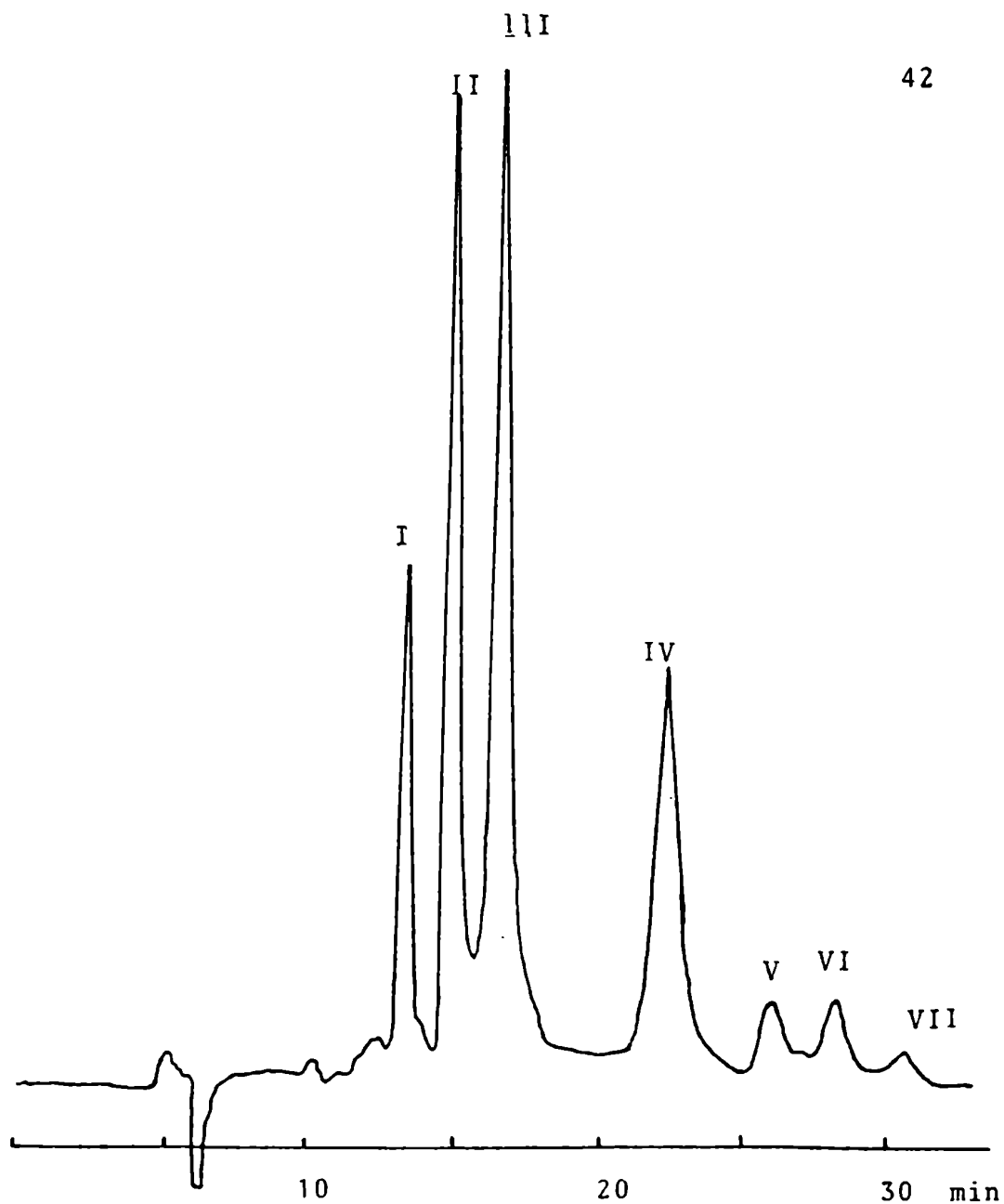


Figura 17 a: Separación por CLAR preparativa de una fracción parcialmente purificada (10mgr) a partir de un extracto etanólico de la planta.

Columna: Alltech R-Sil 18 HL 10 μ m (500 \times 10mm)

Eluyente: metanol-agua (70:30) Flujo: 4ml/min.

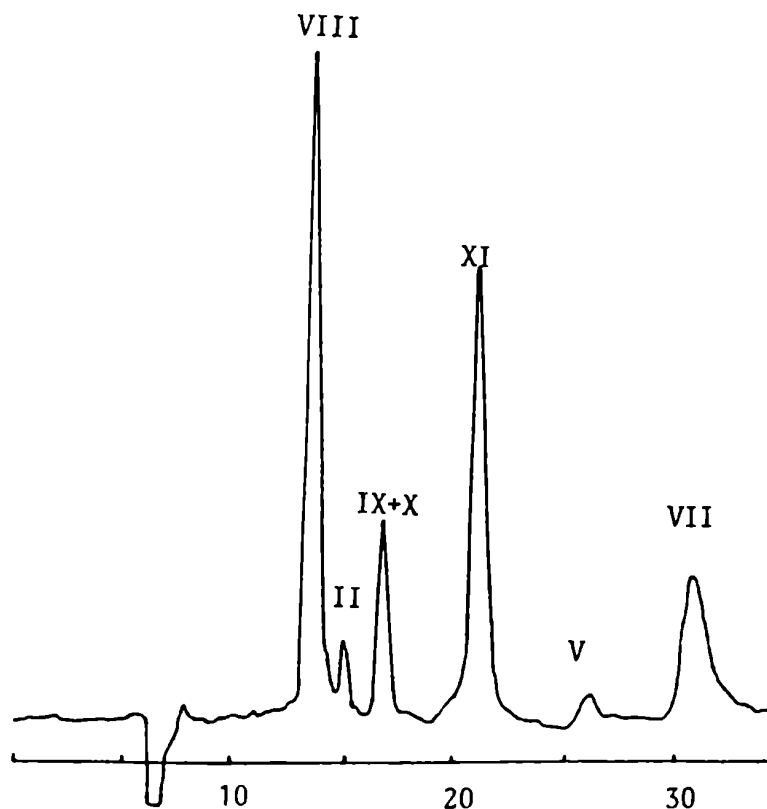


Figura 17-b: Separación por CLAR preparativa de una fracción parcialmente purificada (10mgr) a partir de un extracto metabólico de la planta.

Columna: Alltech R Sil 18 HL 10 μ m (500 \times 10mm)

Eluyente: metanol-agua (70:30). Flujo: 4ml/min.

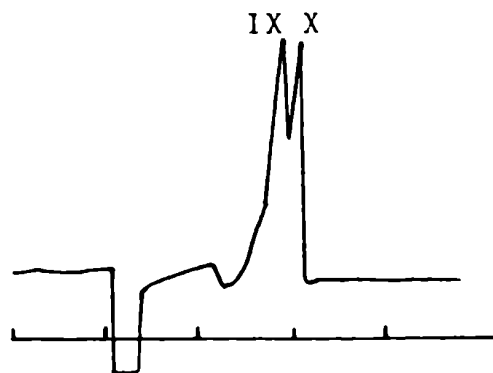


Figura 18: Separación por CLAR preparativa de una mezcla de los compuestos 33 y 37 (5 mgr).

Columna: Altex Ultrasphere ODS 5 μ m (250 \times 10 mm)

Eluyente: metanol-agua (70:30) Flujo: 4ml/min

aislada anteriormente por Lavie y colaboradores⁷ de plantas de *Acnistus breviflorus* (Israel).

Los otros tres compuestos resultaron ser artefactos formados durante la extracción de hojas de *Acnistus breviflorus* con solvente en caliente.

El compuesto IV se identificó como 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A 42 el cual se formaría a partir de jaborosalactona A 11 durante la extracción con etanol en caliente, de manera análoga a la formación de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33 a partir de withaferina A 8.

Los compuestos XI y VI se identificaron respectivamente como 5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 43 y 5 α -etoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 44, los cuales se formarían a partir de jaborosalactona A por alcoholólisis del epóxido. En la tabla 3 se describe el comportamiento cromatográfico de algunos de estos withanólidos en placas cromatográficas de alta resolución en fase reversa y en columna de fase reversa analítica. Comparando con los valores detallados en la tabla 2 es interesante mencionar la inversión en retención entre CLAR analítica y ccd fase reversa de alta resolución. En el primer caso la 2,3-dihidro-3 β -metoxiwithaferina A 33 es más retenida que la 5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 43, mientras que esta situación es inversa en el último caso.

Por otro lado a pesar que los tiempos de retención obtenidos en las separaciones analíticas y preparativas son concordantes la 6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A 37 se superpone en el primer caso con withaferina A en vez de superponerse con 2,3-dihidro-3 β -metoxiwithaferina A .

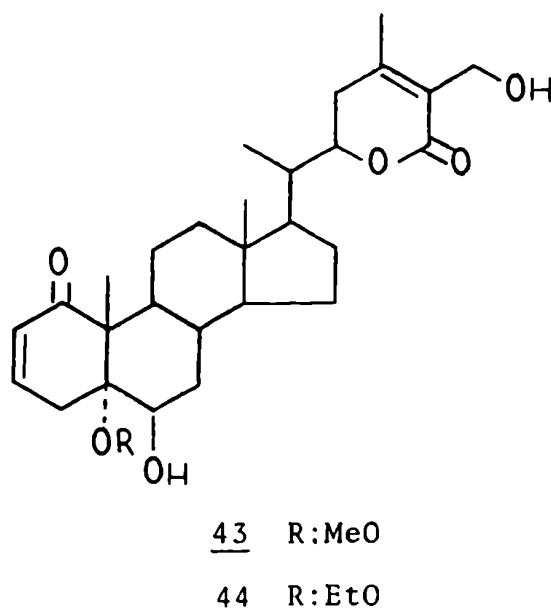
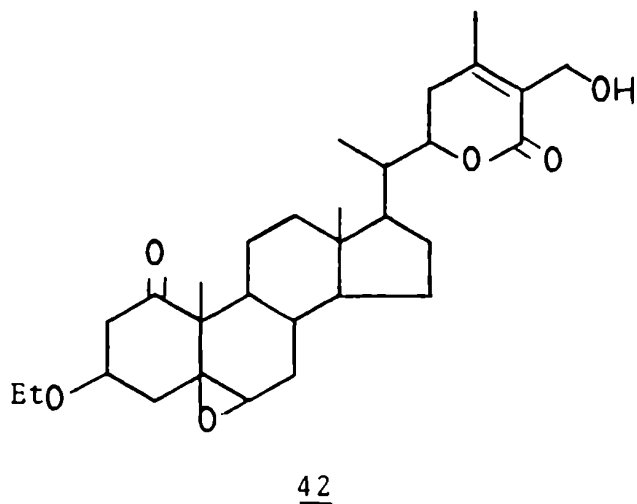


Tabla 3: Comportamiento cromatográfico de los withanólidos en CLAR analítica y en placa en fase reversa.

withanólido	Rf*	Tr (min)**
5 α -etoxi-4,5-dihidro-jaborosalactona B <u>44</u>	0,25	-
5 α -metoxi-4,5-dihidro-jaborosalactona B <u>43</u>	0,31	6,13
6 α -cloro-5 β -hidroxi-withaferina A <u>37</u>	0,34	4,48

*HPTLC RP-18, metanol-agua (70:30)

**Columna R-Sil 18 HL 10 μ m (250 \times 3,6 mm), metanol-agua (65:35)

2ml/min

Aislamiento de withanólidos por CLAR en fase reversa a partir de extractos prepurificados.

Los extractos crudos, así como los parcialmente purificados aún pueden contener pigmentos con tiempos de retención grandes bajo las condiciones descriptas anteriormente. Estos pigmentos al ser retenidos afectarían la columna luego de varias separaciones sucesivas. Al ser analizados por ccd de alta resolución en fase reversa, se determinó que estos pigmentos tenían un Rf mayor de 0,5 cuando se utilizaba metanol como solvente de desarrollo; en consecuencia los pigmentos acumulados se eliminaron lavando la columna con este solvente una vez cada 5 a 7 inyecciones del extracto hasta obtención de un eluido incoloro. En el caso de muestras altamente coloreadas se utilizó un método alternativo que consistió en hacer un pasaje previo de la muestra usando la misma columna y metanol-agua (80:20) como solvente de elución. Bajo estas condiciones los withanólidos elufan casi con el volumen muerto, pudiéndose separar de los pigmentos que poseían mayor tiempo de retención.

En base a estos métodos se analizó una fracción altamente coloreada obtenida a partir de un extracto metanólico prepurificado por columna de sílicagel según técnicas tradicionales. La fracción fue analizada por placa de sílicagel en fase reversa y por CLAR analítica en columna, determinándose que contenía fundamentalmente jaborosalactona A 11 y un componente minoritario de Tr y Rf muy similar a los de jaborosalactona A (Tabla 4). Se purificó primero usando metanol-agua (80:20) como solvente de elución

Tabla 4: Comportamiento cromatográfico de los withanólidos en CLAR analítica y en placa en fase reversa.

<u>withanólido</u>	Rf*	Tr (min)**
jaborosalactona A <u>11</u>	0,14	13,12
2,3-dihidrojaborosa- lactona A <u>45</u>	0,18	11,47

*HPTLC RP-18, metanol-agua (70:30)

** Columna R Sil-18 HL10 μ m (250 \times 3,6 mm), metanol-agua (65:35), 2ml/min

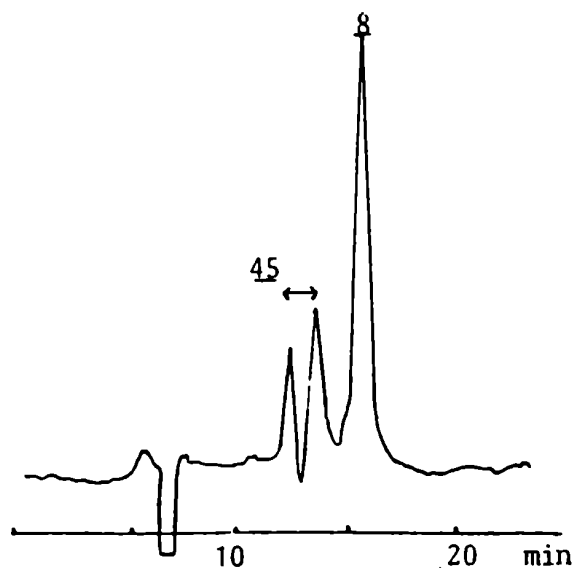


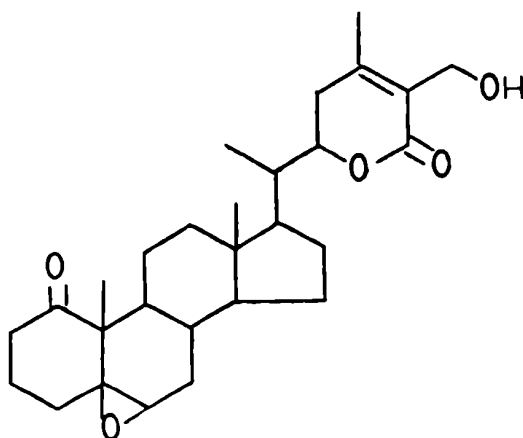
Figura 19: Separación por CLAR de una fracción cruda de 11 previamente purificada.

Columna: Alltech R-Sil 18 HL 10 μ m (500 \times 10mm).

Eluyente: metanol-agua (70:30). Flujo: 4ml/min

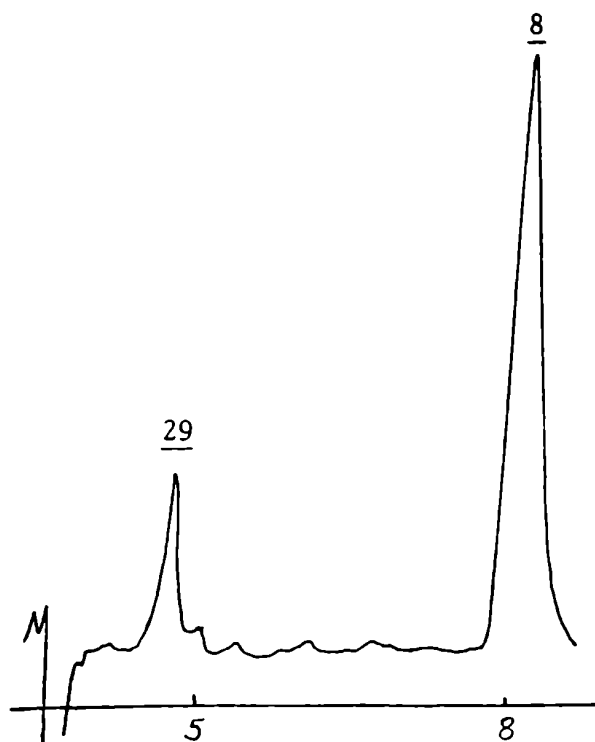
quitándole de esta manera la mayor parte de los colorantes; posteriormente se trató utilizando una mezcla metanol-agua (70:30) como solvente de elución y se aislaron de ella dos componentes como se indica en la figura 19. El principal componente se identificó como jaborosalactona A 11, mientras que el otro componente, de tiempo de retención ligeramente menor, se identificó como 2,3-dihidrojaborosalactona A 45, withanólido no encontrado anteriormente en la naturaleza. Este sería el primer withanólido aislado con anillo A reducido, dentro de la serie de las jaborosalactonas.

También fueron analizadas otras fracciones obtenidas a partir de extractos etéreos de *Acnistus breviflorus*, prepurificados por columnas de sílicagel H. De ellas se aislaron fácilmente los withanólidos mayoritarios (jaborosalactona A, jaborosalactona D 29 y withaferina A 8) utilizando una mezcla de metanol-agua (70:30) como solvente de elución y lavando periódicamente la columna con metanol.

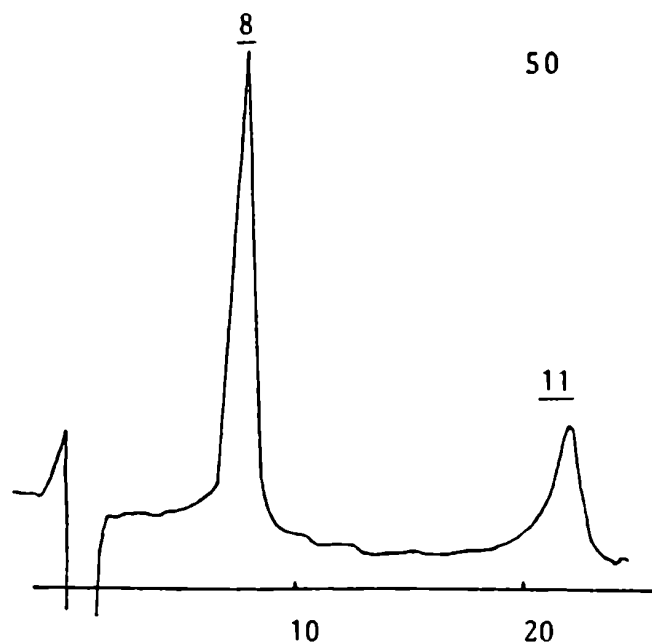


45

En las figuras 20 a y b se representan los cromatogramas obtenidos al analizar dos fracciones que contenían como componentes principales mezclas de withaferina A 8 y jaborosalactona A 11 y de withaferina A y jaborosalactona D 29. De esta manera se obtuvieron cantidades apreciables de withanólidos puros en un tiempo relativamente corto, que fueron utilizados como sustratos de las reacciones de degradación detalladas más adelante.



(a)



(b)

Figura 20: Separación de los principales constituyentes presentes en fracciones obtenidas por prepurificación a través de columnas de sílica H de un extracto etéreo de *Acnistus breviflorus*.

Columna: R-Sil 18 HL 10 μm (500 \times 10 mm).

Eluyente metanol-agua (70:30) y metanol cada 5 a 7 inyecciones. Flujo: 4 ml/min

a) masa total 10 mgr: 8 (Tr: 8,4 min), 29 (Tr: 4,8 min)

b) masa total: 10 mgr: 8 (Tr: 8,4 min), 11 (Tr: 22 min)

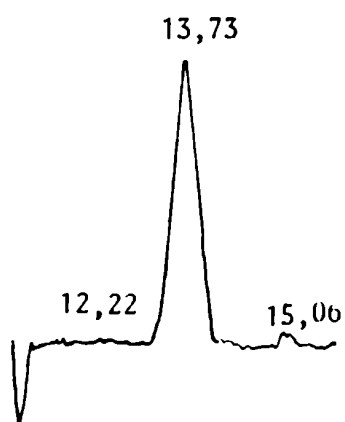
Análisis cuantitativo de withanólidos en extractos de *Acnistus brevisflorus*

En una primera etapa el análisis cuantitativo de withanólidos extraídos de *Acnistus brevisflorus* se realizó utilizando la cromatografía en capa delgada. Cuando se sembraron en una placa cromatográfica de sílicagel G de 250 μm , 10, 20, 25, 50 y 75 μgr de withaferina A 8 y se desarrolló la misma con acetato de etilobenceno (1:4), la forma e intensidad de las manchas utilizando como reveladores vapores de yodo o ácido sulfúrico 50% permitió una adecuada determinación cuantitativa. El ácido sulfúrico 50% resultó ser más sensible para distinguir en el rango 10-50 μgr , mientras que para valores mayores resultó conveniente usar vapores de yodo. Los withanólidos en extractos fueron separados por ccd preparativa y se recuperaron de la sílica por elución continua con acetato de etilo en frío; las fracciones eluidas se concentraron y recromatografiaron junto a una serie de patrones conteniendo 10-25-50-75 y 100 μgr de withaferina A. La recuperación de withanólidos fue aproximadamente de 90-100 % para 100 μgr , siendo apenas menor para masas menores (cuando los withanólidos se eluyeron con cloruro de metileno-metanol 30% a reflujo, el porcentaje de withanólidos recuperado fue mucho menor). Este método de cuantificación fue adoptado también para jaborosalactona A 11 y jaborosalactona D 29, y utilizado para determinar el contenido de withanólidos en las distintas etapas de crecimiento de las plantículas de *Acnistus brevisflorus* como se detalla más adelante.

En una etapa posterior el análisis cuantitativo se realizó por CLAR por el método del estándar externo. El mismo se basa en la comparación de las áreas absolutas de los picos correspondientes a los compuestos de interés en muestras incógnitas, con las áreas obtenidas al analizar muestras que contienen concentraciones conocidas de dichos compuestos.

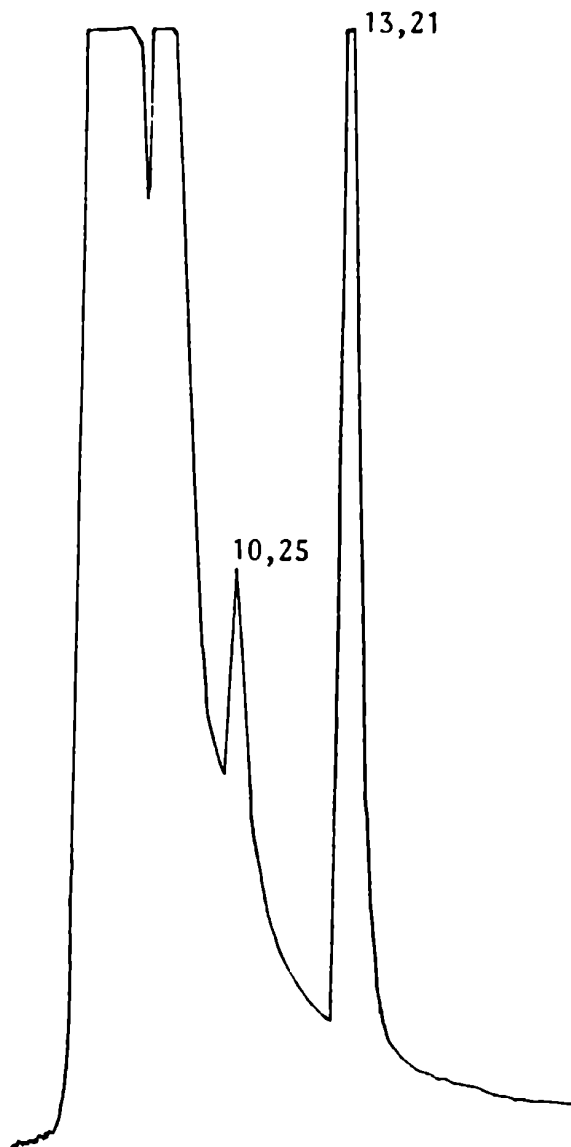
El método demostró linealidad en el rango de concentraciones correspondientes a 10 μgr y 100 μgr para cada uno de los withanólidos analizados. En la figura 21 se representa el cromatograma obtenido con una solución de withaferina A 8. En este caso correspondían 10040 unidades de área (u.a.) por μgr de withaferina A. En forma similar se calcularon valores de 9320 u.a./ μgr para jaborosalactona A 11 y 9182 u.a./ μgr para jaborosalactona D 29. Teniendo en cuenta estos valores se analizó el contenido de withanólidos en varios extractos de hojas para poder calcular actividades específicas en los ensayos realizados con precursores marcados, como se detalla en el capítulo 4.

En la figura 22 se representan los valores obtenidos para un extracto de una hoja proveniente de una planta de 17 meses de edad. Se determinó que la hoja contenía 1,36 mgr de withaferina A y 212 μgr de jaborosalactona A, no detectándose en la misma jaborosalactona D. En forma similar se analizó el contenido de withanólidos en plantículas de *Acnistus breviflorus* y se comprobó además por medio de análisis comparativos, que el método del estándar externo reproducía los resultados obtenidos por comparación cromatográfica en sílicagel.



Tr	Area (u.a.)	Area%
12,22	6	0,100
13,73	100400	96,47
15,06	88	1,46

Figura 21: Cromatograma obtenido al analizar 10 μ gr de witha-
ferina A 8 por el método del estandar externo.
u.a.=unidades de área, Tr =tiempo de retención.
Condiciones: tabla 1 (línea 6).



withanólido	Tr (min)	Area(u.a.)	masa inyec- tada (μgr)	masa total (μgr)
jaborosalactona A <u>11</u>	10,25	98840	10,6	212
withaferina A <u>8</u>	13,21	683640	68,0	1360

Figura 22: Separación por CLAR del extracto de una hoja de *Acnistus breviflorus* (edad de la planta: 17 meses).

Columna: LiChrosorb Si 100 (250×4,6 mm DI)

Eluyente: acetato de etilo-hexano-isopropanol (30:3:2)

Flujo: 0,4 ml/min. Vol.inyectado: 1/20 del extracto original

CONCLUSIONES

La extracción de withanólidos con éter etílico en frío, pre-purificación de los extractos por columnas de sílicagel H y purificación final de las mezclas por CLAR, constituyó un método rápido y eficiente para la obtención de withanólidos mayoritarios sin formación de artefactos que dificulten la separación. La aplicación de CLAR en la purificación de withanólidos permitió además separar componentes minoritarios que no pudieron aislarse por técnicas cromatográficas tradicionales.

Aunque todos los withanólidos aislados por Lavie y colaboradores de *Acnistus breviflorus* (ver pág. 22) tienen un sustituyente hidroxilo en posición 4 β , en plantas de este género oriundas de nuestro país es importante la presencia de jaborosalactonas, principalmente de jaborosalactona A 11, lo cual estaría indicando que las diferencias en las condiciones climáticas pueden afectar sensiblemente a la ocurrencia de ciertos pasos biosintéticos (por ejemplo, hidroxilación del carbono 4).

Por otro lado la presencia conjunta de withaferina A 8 y jaborosalactona A en la misma planta contradice la hipótesis de Lavie según la cual las plantas que producen 4-hidroxi withanólidos no producen esta clase de compuestos sin sustituyente hidroxilo en carbono 4.⁴

Parece ser una reacción predominante en estas plantas la reducción de dobles enlaces. La presencia de una lactona saturada como el caso de 24,25-dihidro-27-desoxiwithaferina A 35 y de 2,3-24,25-tetrahidro-27-desoxiwithaferina A 38 aislados por Lavie y

colaboradores⁷ de plantas de *Acnistus brevisflorus* cultivadas en Israel, es una característica poco común entre los withanólidos y hasta ahora se había encontrado únicamente en *Withania somnifera* del tipo africano.¹ Es interesante notar que durante la hibridización de esta planta con el quimiotipo II (Israel) esta reducción adquiere carácter dominante⁸, lo cual indica que una apropiada combinación genética puede llevar a una carácter dominante como el encontrado naturalmente en *Acnistus brevisflorus*.

El aislamiento de la dihidrojaborosalactona A 45, la cual no fue aislada por Tscheschev colaboradores⁵⁴ de plantas de *Jaborosa integrifolia*, en las cuales se encontró por primera vez jaborosalactona A 11, es otra prueba de la importancia de las reacciones de reducción en *Acnistus brevisflorus*.

En ningún caso se encontraron en estas plantas withanólidos hidroxilados en las posiciones 14, 17 o 20.

ESTUDIO ESPECTROSCOPICO
Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL
DE WITHANOLIDOS DE
ACNISTUS BREVIFLORUS

La elucidación de la estructura de los withanólidos requiere un extenso trabajo químico y de interpretación de espectros. La espectrometría de RMN- ^1H y de masas han jugado un papel importante en la determinación de la estructura de los mismos en los últimos años. Sin embargo no es siempre posible establecer sin ambigüedades el esquema de sustitución en el esqueleto de los withanólidos teniendo en cuenta sólo este tipo de datos espectrales.

Aunque se han publicado datos de RMN- ^{13}C de varios esteroides durante la década pasada,⁶³ la aplicación de este tipo de espectroscopía en la determinación de la estructura de los withanólidos ha sido largamente ignorada y sólo recientemente aparecieron dos trabajos con la asignación de las señales de espectros de RMN- ^{13}C de varios withanólidos.^{64,65} En uno de ellos Gottlieb y colaboradores,⁶⁵ estudiaron el efecto que causaba la introducción de distintos sustituyentes sobre los carbonos del esqueleto withanólido. Sin embargo estos autores basaron su discusión en un concepto erróneo del efecto γ . Debido a esto se realizó un nuevo análisis de dichos efectos basado en la reinterpretación de efecto γ realizada por Beierbeck y colaboradores.⁶⁶

Inicialmente se hará referencia a las propiedades espectroscópicas de los withanólidos, se darán las características generales de los espectros de masas, de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C y se detallarán en particular los valores obtenidos para la withaferina A 8. Dichos datos serán utilizados luego en la elucidación estructural de los withanólidos aislados de *Acnistus breviflorus*.

ESPECTROMETRIA DE MASAS

La fragmentación del esqueleto carbonado puede ser considerada en dos partes: a) la del anillo D y la cadena lateral por un lado, b) la del anillo B por el otro.

En el primer tipo están agrupadas las rupturas 1, 2, 3 y 4 (Figura 23), correspondientes a la pérdida del anillo lactónico (ruptura 1), de la cadena lateral (ruptura 2), de la cadena lateral más dos carbonos del anillo D (ruptura 3) y de la cadena lateral más tres carbonos del anillo D (ruptura 4).⁶⁷

En general las tres últimas fragmentaciones que pueden involucrar transferencias de hidrógeno o reordenamientos, son de poca importancia; el pico más prominente es el debido a la ruptura del enlace entre los carbonos 20 y 22 dando lugar en la withaferina A 8 al ión a ($m/e=141$).²¹ En el caso que exista un hidroxilo en carbono 27, por ejemplo en withaferina A, se produce una ruptura del ión a, dando un ión $m/e=123$ por pérdida de agua. A su vez este pierde monóxido de carbono dando un ión de $m/e=95$, pudiendo ocurrir otra pérdida de monóxido de carbono que resulta en la formación del ión $m/e=67$ (Figura 24).

La fisión del anillo B puede ser considerada como promovida por un reordenamiento de Mc Lafferty.⁵⁴ En el caso de la withaferina A se origina el ión M' representado en la figura 25. Producido este reordenamiento caben luego tres posibilidades: a) la fisión 6 con reordenamiento del epóxido produce el ión c, el que puede ulteriormente perder acetileno para dar el ión e; b) la pérdida del fragmento c con una transferencia de hidróge-

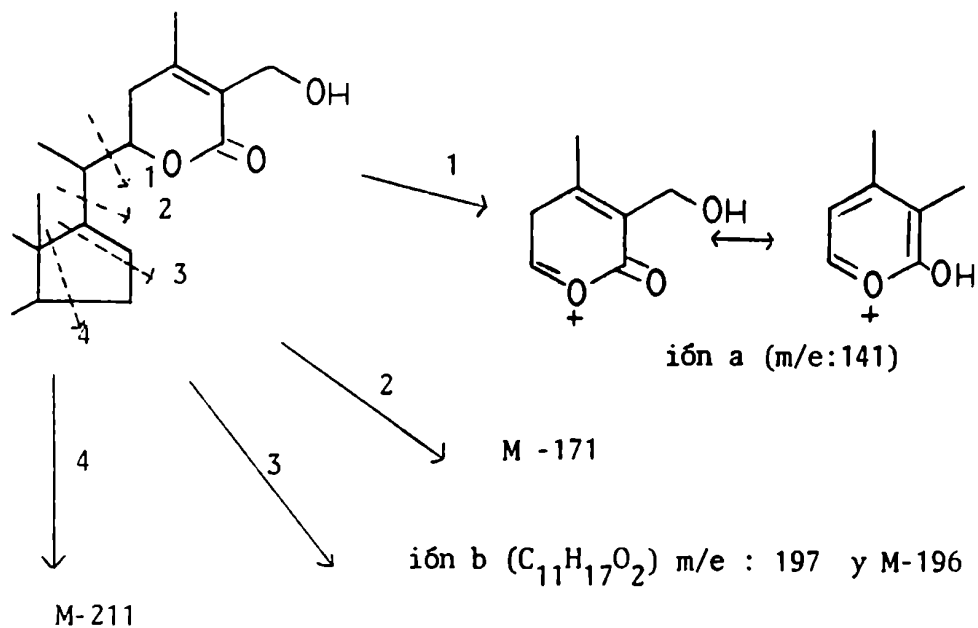


Figura 23: Ruptura de la cadena lateral y del anillo D

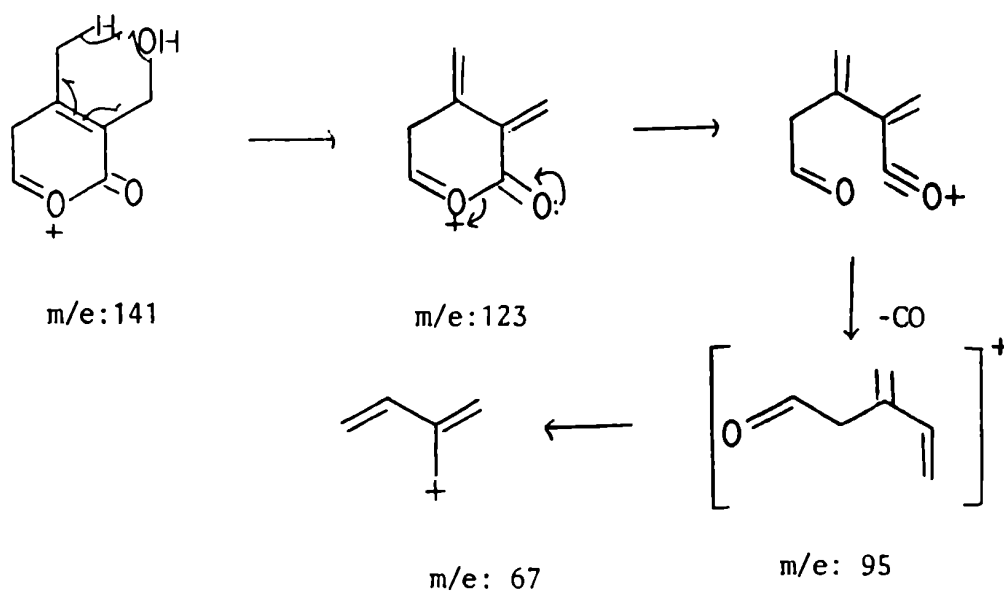


Figura 24: Ulteriores fragmentaciones del anillo lactónico de los withanólidos.

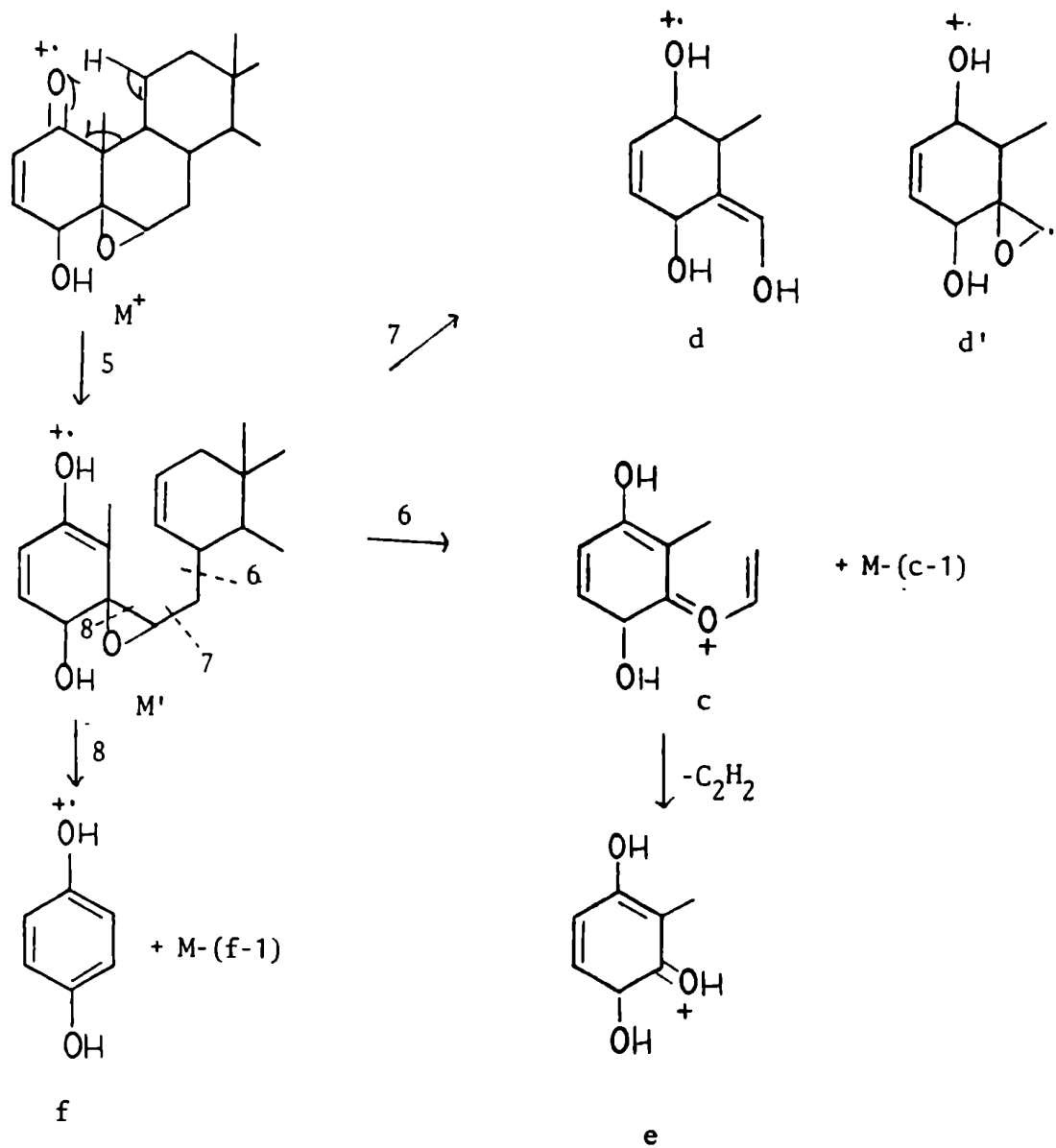


Figura 25: Reordenamientos y fragmentaciones comunes en 5 β ,6 β -epoxiwithanolidos.

nos puede ser asignada al ión de $m/e = 285$; c) la doble fisión 8 responsable del ión f y del ión de $m/e = 331$, (después de una transferencia de hidrógeno).

La ausencia del epóxido modifica el esquema de fisión del anillo B, como ocurre en el caso de la jaborosalactona D 29. Así es predominante la ruptura entre los carbonos 5 y 7 dando el ión g de $m/e = 125$, como se indica en la figura 26.

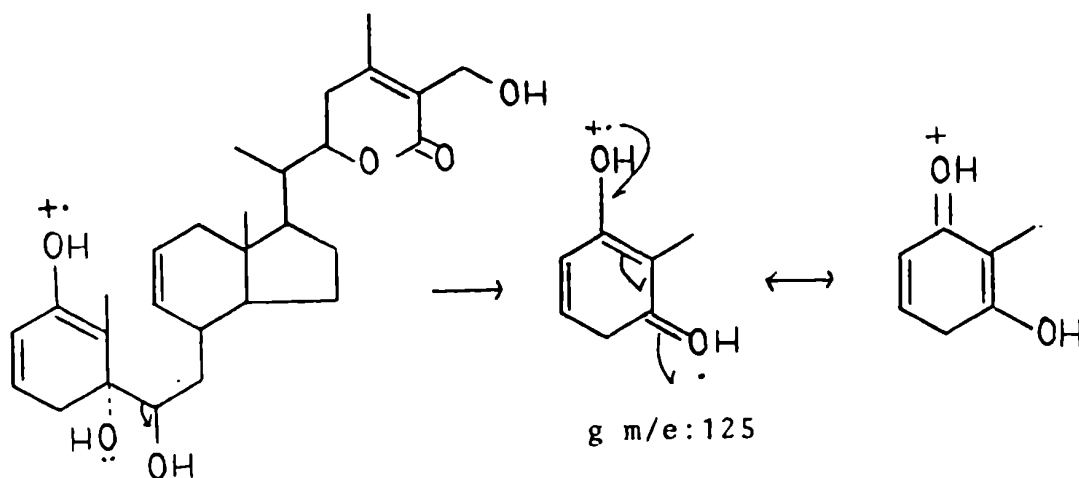


Figura 26: Fisión del anillo B en ausencia de epóxido.

ESPECTROMETRIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA

La enona del anillo A en la withaferina A 8 y derivados se presenta como un sistema AMX a campos bajos: H_A a δ 6,95 ppm como cuarteto (1H, $J_{AM}=10,0\text{Hz}$, $J_{AX}=6,0\text{Hz}$); H_M a δ 6,22 ppm como un doblete (1H, $J_{AM}=10,0\text{Hz}$) y H_X a δ 3,75 ppm como un doblete (1H, $J_{AX}=6,0\text{Hz}$). Figura 27-a.

En la jaborosalactona A 11 y derivados en los que se encuentra ausente el hidroxilo de carbono 4, el esquema de partición de la enona del anillo A (figura 27-b) es diferente: el hidrógeno del carbono 4 con orientación β que reemplaza al hidroxilo de withaferina A con idéntica orientación, se dispone en un ángulo de casi 90° con el hidrógeno de carbono 2, por lo que entre ambos existe acoplamiento alílico máximo y la señal del protón del carbono 2 se transforma en doble doblete. El hidrógeno de carbono 4 con orientación α se encuentra tanto en la withaferina A como en la jaborosalactona A casi en el mismo plano que el hidrógeno de carbono 2, por lo que no hay partición alílica entre ambos. Obviamente el protón de carbono 3 en la jaborosalactona A aparece como un doble doblete por acoplamiento con el hidrógeno de carbono 2 y los protones no equivalentes del carbono 4.

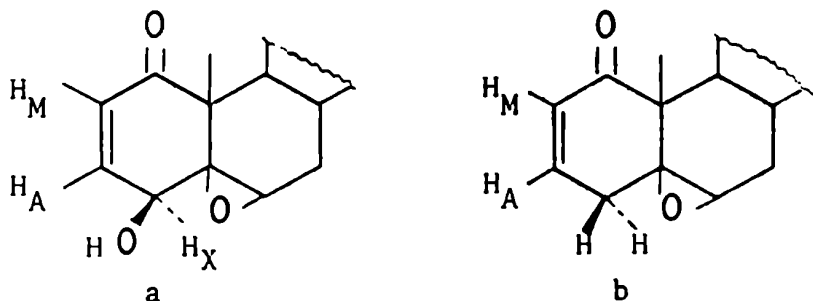


Figura 27: Anillos A y B en: a) withaferina A 8; b) jaborosalactona A 11

En el espectro de withaferina A 8 aparece una señal bastante ancha a δ 3,20 ppm que integra para un protón, la cual es debida al hidrógeno 6 desplazado a campos bajos por la presencia de un epóxido en la molécula entre los carbonos 5 y 6.

La señal del metileno del carbono 27, aparece, como en el resto de los withanólidos, como un singulete ancho a δ 2,05 ppm. El metilo de carbono 21 se presenta en withaferina A y derivados como un doblete a δ 1,05 ppm ($J=7,0\text{Hz}$).

El protón de carbono 22 da lugar a una señal característica para todos los withanólidos ; sobre su forma y posición influyen evidentemente los sustituyentes en los carbonos 20, 17 y 23. Los compuestos que no tienen hidroxilo en carbono 20 tienen idéntica multiplicidad de señales a δ 4,22-4,40 ppm en forma de doble triplete ($J_{22,23}=12\text{Hz}$, $J_{22,20-22,23}=3-3,5\text{Hz}$), producida por el acoplamiento de los hidrógenos de carbonos 23 y 20.

Los estudios de los desplazamientos inducidos por solvente en la señal del metilo 19 entre CCl_3D y $\text{C}_6\text{D}_6\text{-CCl}_3\text{D}(1:1)$ en derivados de withaferina A condujeron en todos los casos a la conclusión de que el anillo A se encuentra en conformación tipo bote²¹, en el cual el grupo hidroxilo de carbono 4 está en posición axial y el grupo carbonilo en carbono 1 se dirige por encima del anillo cerca del metilo. Estas conclusiones fueron confirmadas independientemente por el análisis cristalográfico (utilizando difracción de rayos X) del 4 β -acetato-27-p-bromo benzoato de withaferina A, el cual mostró al anillo A en una conformación tipo bote, al anillo B en una conformación de semisilla distorsionada, al anillo C en forma de silla y al anillo D ligeramente desviado de la forma

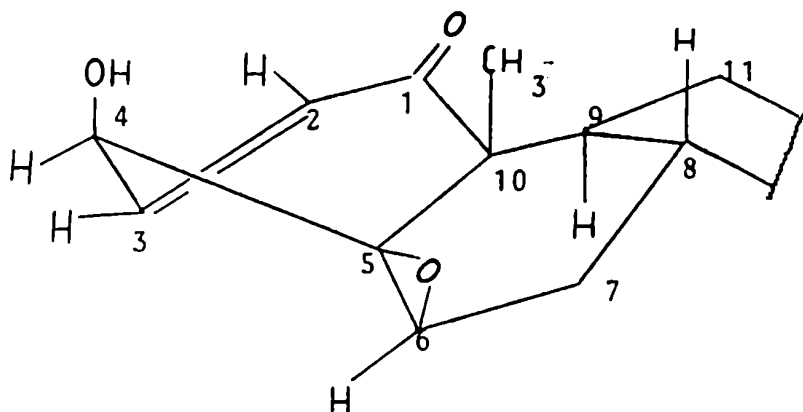


Figura 28: Conformación de los anillos A y B en withaferina A 8.

sobre con el carbono 13 fuera del plano.

La señal del metilo está obviamente influenciada por los sustituyentes que se encuentran en los anillos A y B (figura 28); en la withaferina A 8 se presenta a δ 1,42 ppm, mientras que la señal debida al metilo 18 se presenta como un singulete a δ 0,72 ppm.

Análisis de los espectros de RMN-¹H a 500 MHz de withaferina A 8

Si bien el espectro de RMN-¹H de la withaferina A ha sido descrito y asignado por otros autores,²¹ resultó de interés el análisis de dicho espectro obtenido a campos elevados (11,75 tesla, frecuencia de resonancia de ¹H:500MHz), (figura 29), así como el del espectro bidimensional J-¹H-¹H (2DJ) (figura 30).

Este último tipo de espectros tiene la ventaja de originar multipletes asimétricos en los casos en que están involucrados acoplamiento fuertes; además en los espectros bidimensionales es razonable analizar las constantes de acoplamiento por inspección directa del espectro aún cuando $\Delta\nu/J=3$.⁶⁸

La mayoría de los desplazamientos químicos observados en la figura 29 coinciden con los valores de literatura, salvo la señal correspondiente al H-C-2 a δ 6,21 ppm (δ 6,18 ppm lit.) y la debida al CH₃-21 a δ 1,02 ppm (δ 0.98 ppm lit.). Aparece un multiplete a δ 4,5 ppm el cual se encuentra amplificado en el margen superior de la figura 29; este multiplete engloba las señales correspondientes a los H-C-22 (δ 4,45 ppm (dt) $J_{20,22}=3\text{Hz}$, $J_{22,23\alpha}=12\text{Hz}$) y la señal correspondiente a los H-C-27. La presencia de cuatro líneas para este metileno se puede explicar por la formación de un puente de hidrógeno intramolecular en la cadena lateral. La formación de un ciclo de seis miembros elimina la equivalencia entre los protones de dicho metileno originándose un sistema AB el cual se hace evidente debido al campo elevado al que fue obtenido el espectro (figura 31).

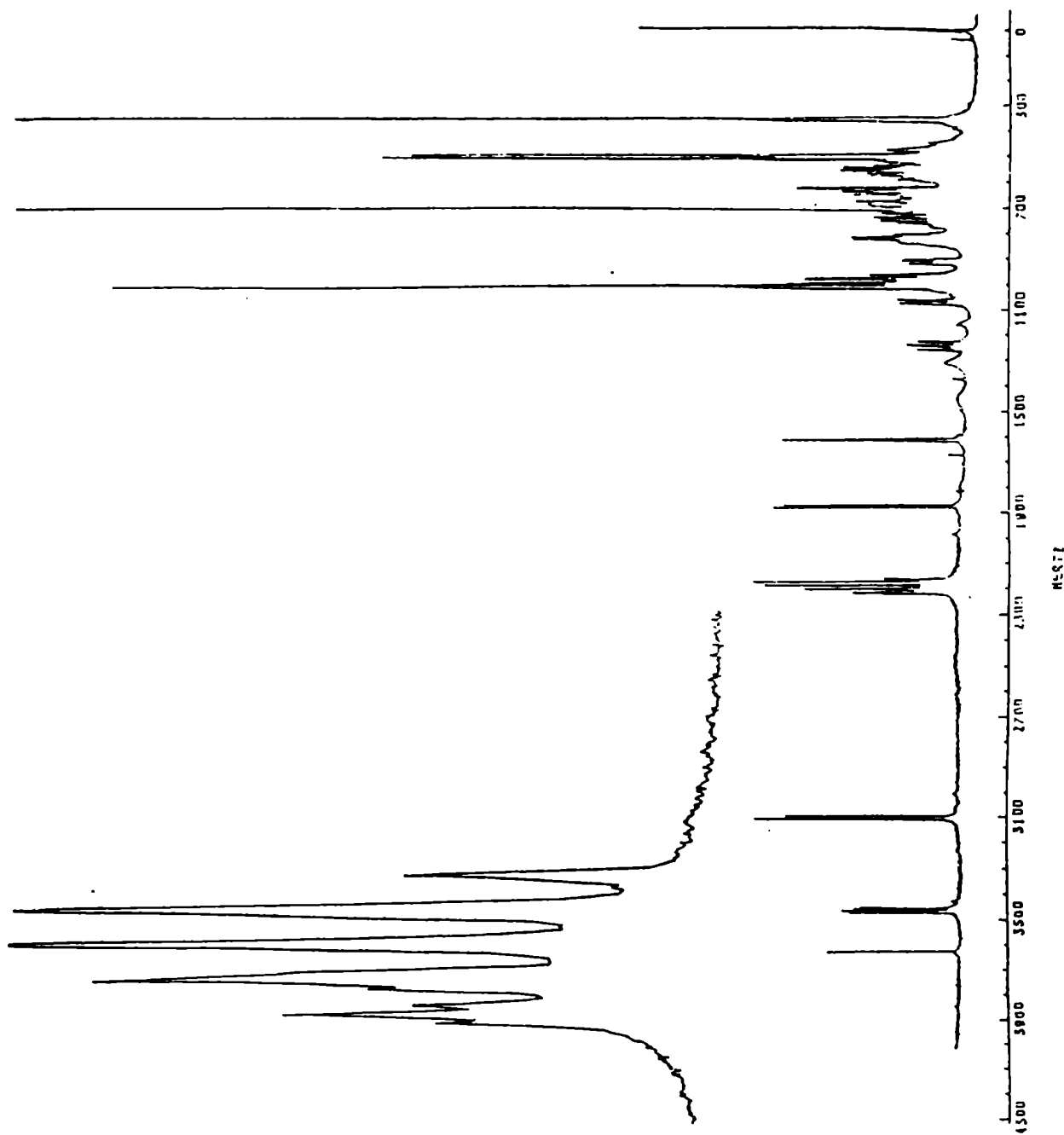


Figura 29: Espectro RMN- ^1H de withaferina A 8 a 500 MHz.

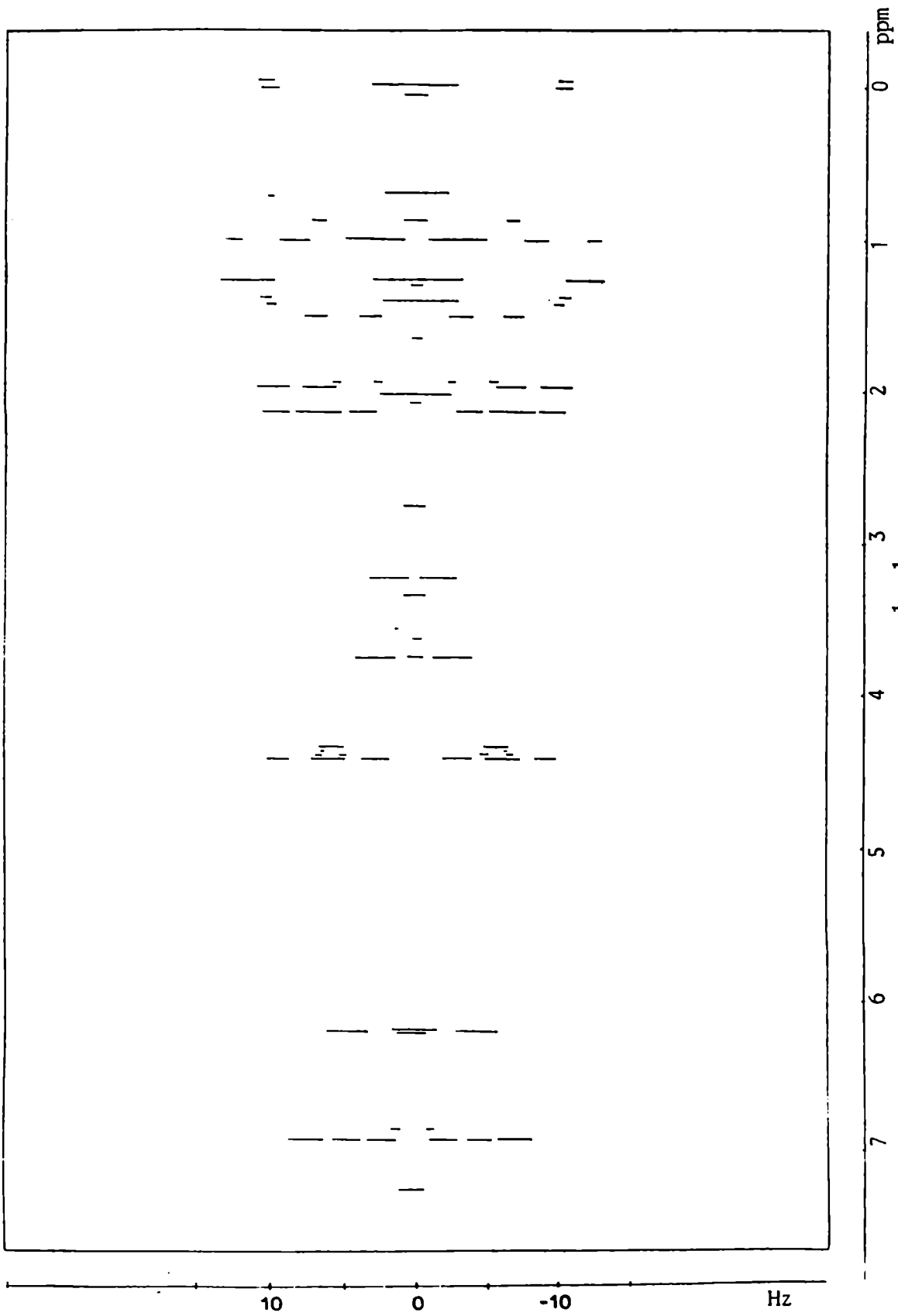


Figura 30: Espectro bidimensional J-¹H-¹H (2DJ) de withaferina A 8 a 500 MHz.

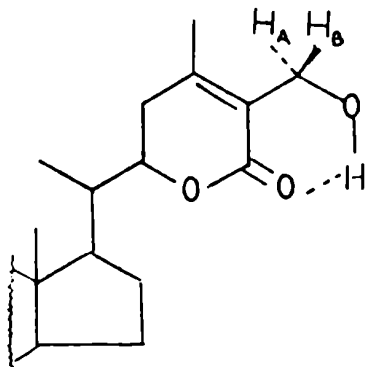


Figura 31: Formación de un puente de hidrógeno intramolecular en la cadena lateral de withaferina A 8

En el espectro 2DJ (figura 30) este metileno aparece como un doblete centrado a δ 4,37 ppm no observándose las líneas exteriores del doblete AB por falta de intensidad.

Es importante además que si bien el H-C-6 se ha descrito hasta ahora como "banda ancha" para withaferina A 8²¹ y aparece como un singulete ancho en la figura 29, en el espectro 2DJ se ve claramente que el H-C-6 origina un doblete. Si se tiene en cuenta que las señales debidas a los metilenos de esteroides dan origen a muchos multipletes débilmente acoplados, dado que el Δ entre hidrógenos axiales y ecuatoriales es de aproximadamente de primer orden (0,4 ppm)⁶⁹, el H-C-6 y el par H-C-7 pueden admitir un análisis de primer orden. (Figura 32)

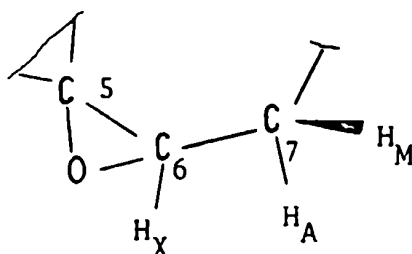


Figura 32: Porción AMX del sistema complejo del withanólido, correspondiente al H-C-6 y el par H-C-7.

El hecho de que el H-C-6 se acople sólo con uno de los hidrógenos del par H-C-7 está indicando, según las ecuaciones de Williamson y Johnson⁷⁰, que el ángulo que forma con el otro hidrógeno es aproximadamente de 80-90°. Esto haría que la molécula adoptara una conformación en la cual los carbonos 5, 6, 7 y 10 se encuentran casi sobre un mismo plano, semejante a la conformación adoptada por los withanólidos Δ 5,6. El valor $J_{6,7} = 4\text{Hz}$ observado en el espectro 2DJ correspondería según las ecuaciones anteriormente mencionadas a un ángulo de casi 50°, el cual es mayor que el permitido para el sistema. Esto podría explicarse debido a que las ecuaciones de Williamson y Johnson, no se pueden aplicar directamente al sistema presente en withaferina A 8 (figura 32). Según Karplus⁷¹ la presencia de un átomo electronegativo unido a uno de los enlaces considerados modifica la relación entre ángulos diedros y constantes de acoplamiento. Se observa que al aumentar la electronegatividad del sustituyente disminuye la constante de acopla-

miento entre un par de hidrógenos que forman un mismo ángulo. Por lo tanto el valor $J_{6,7\beta}=4\text{Hz}$ podría corresponder a un ángulo cercano a 30° que estaría de acuerdo con el observado utilizando modelos de Dreiding de withaferina A. No se encontró en literatura una ecuación que relacionara las constantes de acoplamiento J_{AX} para un sistema como el esquematizado en la figura 32.

En base a lo dicho anteriormente se debería esperar la presencia de un doble triplete correspondiente al H-C-7 β . Dado que dicho hidrógeno resuena en 1-dihidrotosterona a $\delta 2,08 \text{ ppm}^{72}$ se asignó al H-C-7 β de withaferina A el doble triplete que aparece a $\delta 2,15 \text{ ppm}$ en el espectro de la figura 29. En el espectro 2DJ (figura 30) se observa claramente esta señal con un $J_{7\alpha,7\beta}=13\text{Hz}$, $J_{6,7\beta}=4\text{Hz}$ y $J_{7\beta,8}=4\text{Hz}$.

En la figura 29 se observa además un doble doblete correspondiente al H-C-23 β con $J_{22,23\beta}=12\text{Hz}$ y $J_{23\alpha,23\beta}=12,5-13,5 \text{ Hz}$. Este multiplete no aparece en el espectro 2DJ (figura 30). El H-C-23 α debería originar un doble doblete con $J_{22,23\alpha}=3\text{Hz}$ y $J_{23\alpha,23\beta}=13\text{Hz}$, por lo tanto podría corresponder a este hidrógeno el doble doblete que aparece en la figura 29 a $\delta 1,83 \text{ ppm}$. Esta señal se observa en el espectro 2 DJ mostrando acoplamientos que concuerdan con los valores esperados.

La multiplicidad observada para el resto de los hidrógenos en las figuras 29 y 30 se corresponden en todos los casos.

Reinterpretación de los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C de los withanólidos

Como se mencionó al comienzo de este capítulo se realizó una reinterpretación de los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C de los withanólidos basada en el concepto de efecto γ enunciado por Beierbeck.⁶⁶

Los efectos de pequeñas modificaciones estructurales en los espectros de RMN- ^{13}C de esteroides están restringidos en general, a los átomos vecinos al lugar donde se llevó a cabo la modificación. En consecuencia es posible dividir el análisis de los desplazamientos químicos originados por los withanólidos en dos partes casi independientes: de los anillos A y B y del anillo D y cadena lateral.

Sustituyentes en los anillos A y B

Esta región de la molécula se encuentra altamente funcionalizada en los withanólidos, y por lo tanto es, en general, difícil de separar las contribuciones de cada uno de los sustituyentes. Los desplazamientos pueden servir sin embargo como una excelente "huella digital" de un sistema oxigenado particular. Como se mencionó anteriormente al analizar los espectros de resonancia magnética protónica de withaferina A 8 a 500 MHz (ver pág.69) es de esperar que la influencia de un epóxido 5 β ,6 β en los desplazamientos químicos del anillo B sea similar a la originada por un doble enlace en esta posición.

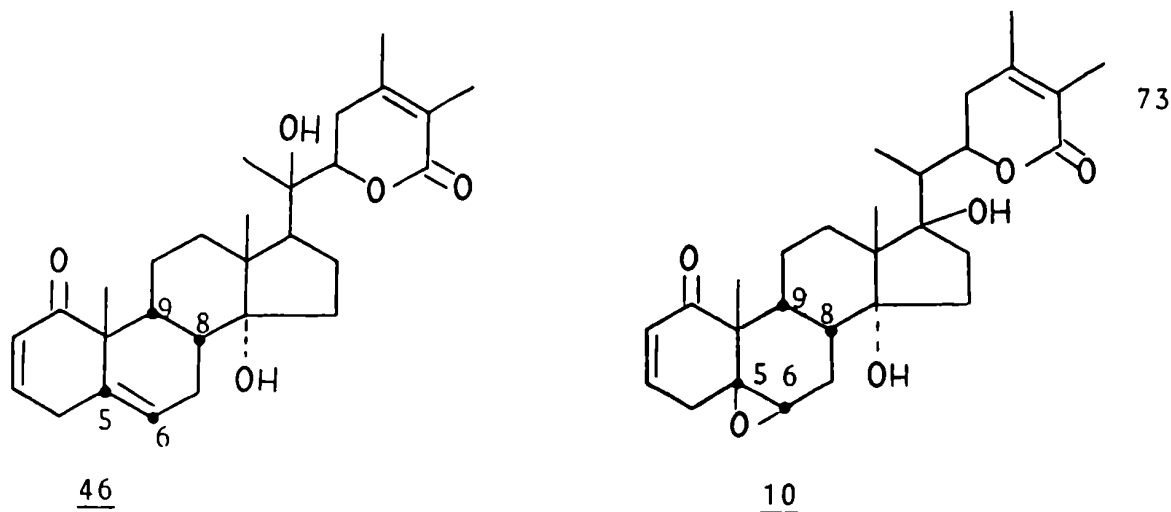


Figura 33: Comparación de algunos desplazamientos químicos correspondientes a carbonos del withanólido G 46 y withanólido E 10.⁶⁵

Así en el withanólido G 46, con doble enlace en posición 5,6, los carbonos 8 y 9 resuenan a δ 35,2 ppm y δ 36,3 ppm respectivamente. La introducción de un éposito 5 β ,6 β en el withanólido E 10 cambia muy poco estas resonancias: δ 36,1 ppm y δ 36,9 ppm para los carbonos 8 y 9 respectivamente.⁶⁵ (Figura 33)

Sustituyentes en el anillo D y en la cadena lateral

Esta parte de la molécula se analiza mejor considerando los efectos de las hidroxilaciones (sustitución de hidrógeno por un grupo hidroxilo) en distintas posiciones. Se describirán por separado los compuestos con cadenas laterales orientadas en β y orientadas en α .

Withanólidos con cadenas orientadas 17 β

27-OH: La hidroxilación de esta posición periférica afecta poco al

resto de la molécula salvo la parte de la lactona α, β insaturada. En particular los carbonos sp^2 están desprotegidos por aproximadamente 4 ppm cada uno observándose un efecto similar al presente en el sistema ciclohexeno-ciclohexenol.⁷³ La acetilación de este alcohol alilíco primario polariza el doble enlace protegiendo al carbono 25 y desprotegiendo al carbono 24 por aproximadamente 3,5 ppm cada uno, un efecto ya descrito para sistemas simples.⁷⁴

En la tabla 5 se comparan los desplazamientos químicos descriptos para estos carbonos en el withanólido E 10, withaferina A 8 y diacetato de withaferina A 47.⁶⁵

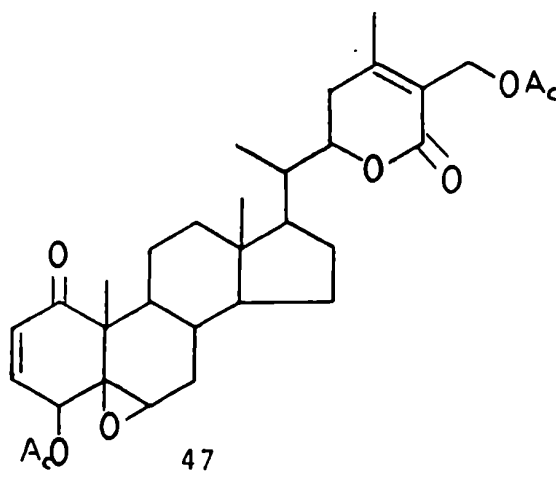


Tabla 5 :Desplazamientos químicos correspondientes a los carbonos 24 y 25 de los compuestos 10, 8 y 47.

Carbono	withanólido E <u>10</u>	withaferina A <u>8</u>	diacetato de withaferina A <u>47</u>
24	151,1 ppm	153,5 ppm	157,0 ppm
25	121,4 ppm	125,6 ppm	121,9 ppm

14-OH: Este grupo hidroxilo es axial a los hidrógenos unidos a los carbonos 7 y 17. por lo tanto la introducción del mismo elimina la interacción 1,3 diaxial entre dichos hidrógenos y el H-C-14. Debido a la eliminación de este efecto los carbonos anteriormente mencionados están protegidos por 5-8 ppm.

El C-16 no se ve afectado debido a que no existe una interacción diaxial entre H-C-14 y H-C-16. En la figura 34 se indican los desplazamientos químicos de los carbonos de interés para los compuestos 48 y 49.

En el caso de compuestos 17α -OH la introducción de un hidroxilo en C-14 no modifica la señal de C-17 debido a que en este caso no hay eliminación de efecto γ ; un ejemplo del mismo se da en la figura 35 en la cual se comparan los carbonos de interés entre los compuestos 50 y 51.⁶⁵

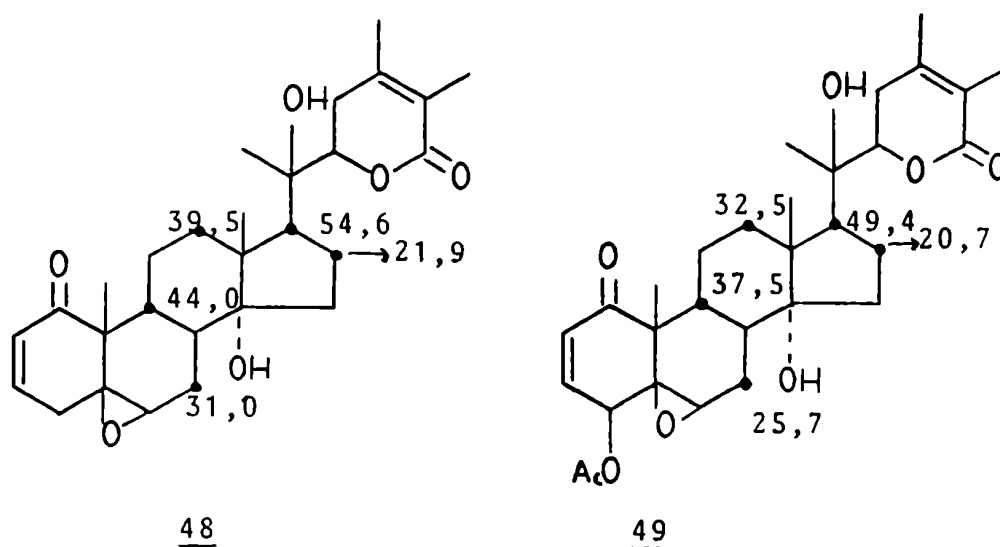


Figura 34: Comparación de algunos desplazamientos químicos correspondientes al par de compuestos 48 y 49.

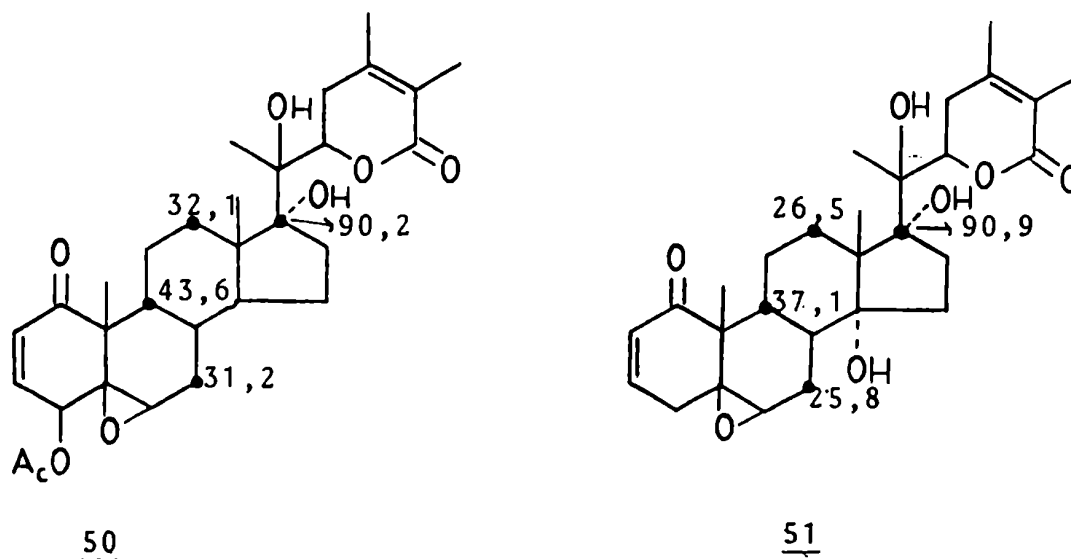


Figura 35: Comparación de algunos desplazamientos químicos correspondientes al par de compuestos 50 y 51.⁶⁵

17 α -OH: La introducción de un grupo hidroxilo en carbono 17 protege los carbonos 12 y 14 pero no al C-15. Estos resultados se pueden explicar debido a una mayor contribución del conformero I representado en la figura 36.

La sustitución de un hidrógeno por un hidroxilo en C-17 causa la desaparición de una interacción 1,3 diaxial entre el H-C-17 y los hidrógenos axiales unidos a C-12 y C-14. En el caso del C-15 no hay eliminación de efecto γ .

En la cadena lateral el C-21 puede adoptar una posición sesgada al hidroxilo 17 y el oxígeno del anillo lactónico como se indica en el conformero I, dando lugar en cada caso a una interacción

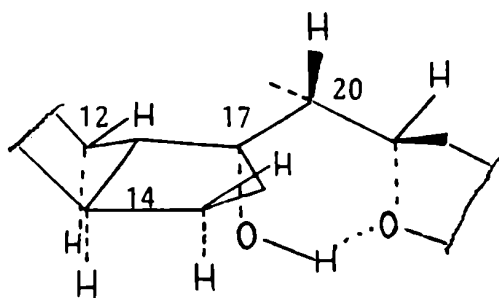
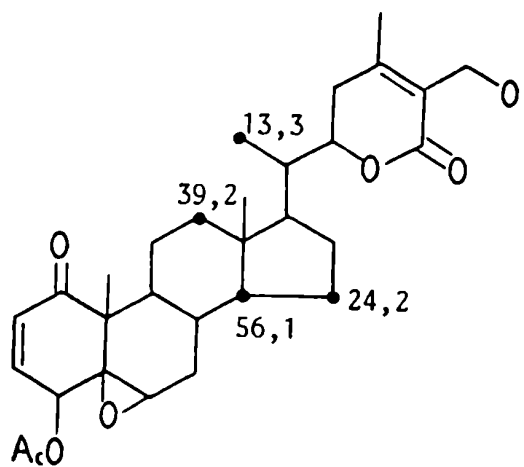


Figura 36: Confórmero I

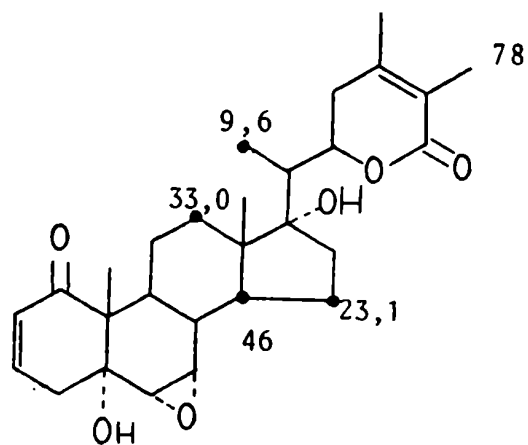
γ la cual se ve favorecida por la formación de un puente de hidrógeno entre el hidroxilo de carbono 17 y el oxígeno del anillo lactónico originándose un anillo de seis miembros (figura 36).

En la figura 37 se comparan los desplazamientos químicos de los carbonos de interés para los compuestos 47 y 16. En este caso el C-21 sufre un cambio de aproximadamente 5 ppm hacia campos más altos, lo cual se puede justificar por una mayor contribución del confórmero I al compuesto 47 en el cual el C-21 no está sesgado al anillo lactónico.

Los efectos causados por la introducción de un grupo hidroxilo en compuestos con funcionalización del tipo 20-OH son muy similares a los encontrados en ausencia de este grupo funcional. Estos resultados indican conformaciones preferenciales similares a la observada en el confórmero I (figura 36) en la vecindad del C-17. En la figura 38 se dan los desplazamientos químicos descriptos para los carbonos mencionados en los compuestos 52 y 53.⁶⁵ En este caso la interacción entre el C-21 y el hidroxilo 17 es muy

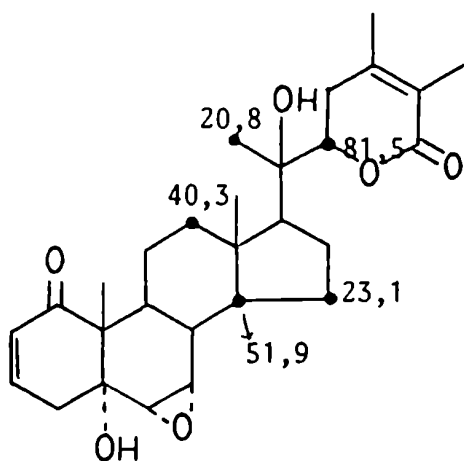


47

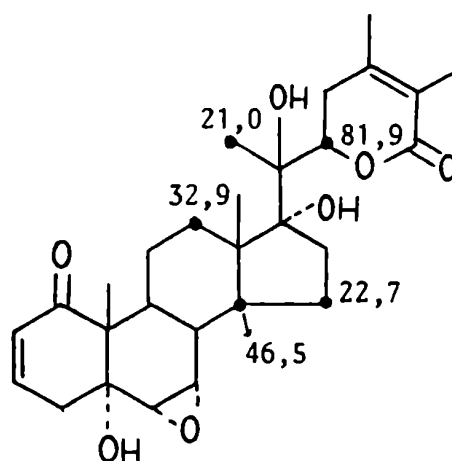


16

Figura 37: Comparación de algunos desplazamientos químicos correspondientes al par de compuestos 47 y 16⁶⁵



52



53

Figura 38: Comparación de algunos desplazamientos químicos correspondientes al par de compuestos 52 y 53.⁶⁵

pequeña y la posición preferencial del C-21 respecto del oxígeno de la cadena lateral no cambia al pasar de 52 a 53.

En el caso de los compuestos con un hidroxilo en posición 14α la introducción de un hidroxilo en C-17 no modifica la señal del C-14, pues no hay en este caso eliminación de efecto γ , si se desplaza en cambio la señal correspondiente al C-12 por eliminación de la interacción 1,3 diaxial entre los hidrógenos H-C-12 y H-C-17. En el par de withanólidos de la figura 39 (54 y 14) se da un ejemplo de compuesto $14\alpha, 17\alpha$ -dihidroxilado.⁶⁵

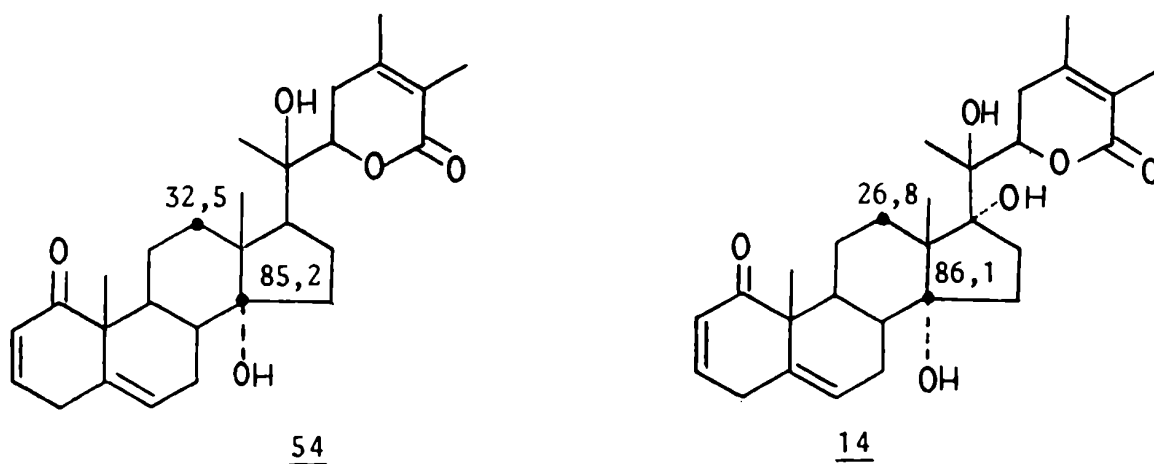


Figura 39: Comparación de algunos desplazamientos químicos correspondientes al par de compuestos 54 y 14.⁶⁵

20-OH: La introducción de un grupo hidroxilo en C-20 causa un cambio de aproximadamente 5 ppm sobre la señal del C-16.⁶⁵ esto indica que existe un rotámero diferencial (confórmero II, figura 40) en el cual el oxígeno del hidroxilo y el hidrógeno H-C-16 están en posición 1,3 diaxial; por otro lado el C-23 no se ve afectado lo cual podría justificarse por un confórmero preferencial II en el cual el C-23 y el hidroxilo están separados adoptando la posición de menor impedimento estérico.

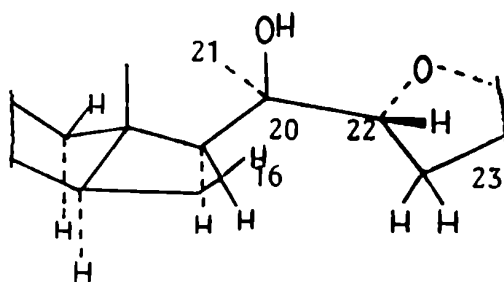


Figura 40: Confórmero II

Withanólidos con cadenas laterales orientadas 17 α

17-OH: Todos los withanólidos y esteroides relacionados que poseen una cadena lateral orientada en α , tienen un grupo 17-OH.⁴

Es por lo tanto útil comparar desplazamientos químicos del par Nic-2 55 y withanona 16.⁶⁵ (Figura 41).

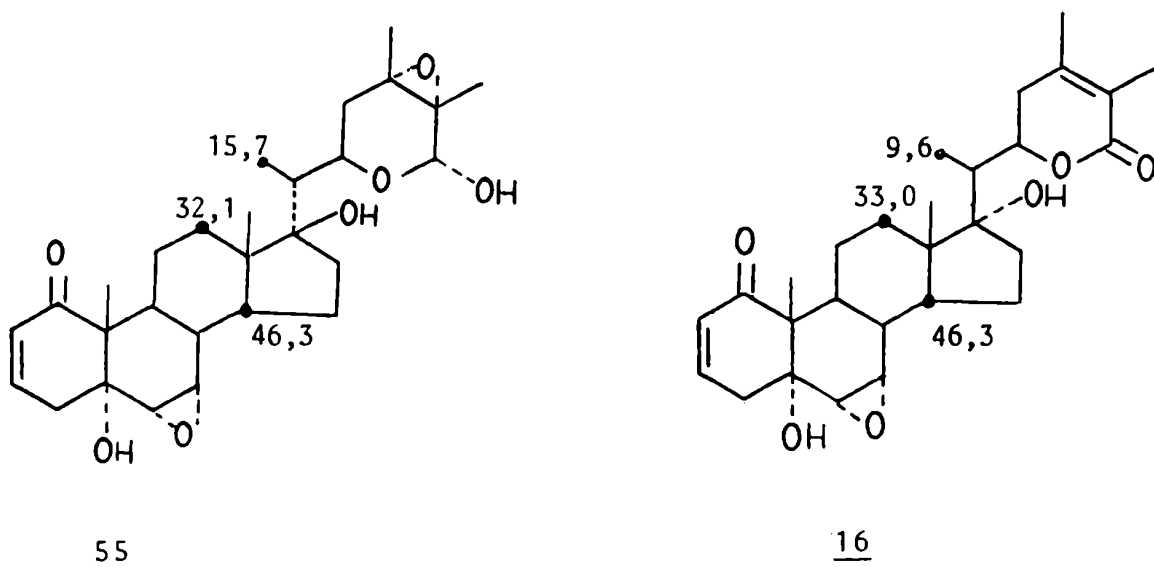


Figura 41: Comparación de algunos desplazamientos químicos correspondientes al par de compuestos 55 y 16.⁶⁵

Excepto en el anillo E, el cual en 55 tiene un epoxilactol en vez de una lactona insaturada, estas dos sustancias difieren sólo en la configuración del C-17. Antes se dijo que el conformero I era la conformación preferencial de 16 (ver figura 36, pág. 77); la similitud de los desplazamientos de C-12 y C-14 para 55 y 16 indican que en el último el C-20 ha reemplazado al grupo 17^{α} -OH en causar efectos sobre estos carbonos, el enlace H-C-20 se ubica con respecto al C-12 y C-14 como se indica en la figura 42 (conformero III). En realidad la mayor diferencia en los desplazamientos químicos de los dos compuestos (excepto el anillo E), se observa en el C-21, el cual está muy desprotegido (6,1 ppm) si la cadena lateral es α . La absorción a campos altos de este carbono se podría justificar por una interacción γ del mismo con el hidroxilo del C-17 y el

oxígeno lactónico. Como se indica en la figura 42 esta conformación está favorecida por la formación de un puente de hidrógeno entre el hidroxilo de C-17 y el oxígeno del anillo lactónico.

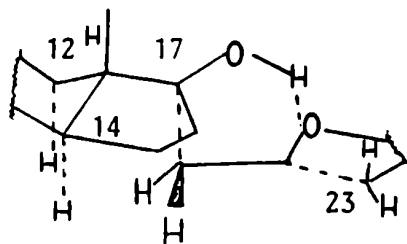


Figura 42: Confórmero III

14-OH: Se esperaría que la introducción de un grupo 14α -OH proteja al C-12 como se vio para la cadena lateral orientada en β . Sin embargo no se ha encontrado en literatura un par de compuestos adecuado para comprobarlo.

20-OH: La introducción de este grupo no causa protección sobre el C-16 como en el caso de las cadenas orientadas en β debido a que en este caso no hay eliminación de efecto γ , como se puede ver en el par de compuestos 56 y 57 indicados en la figura 43.⁶⁵

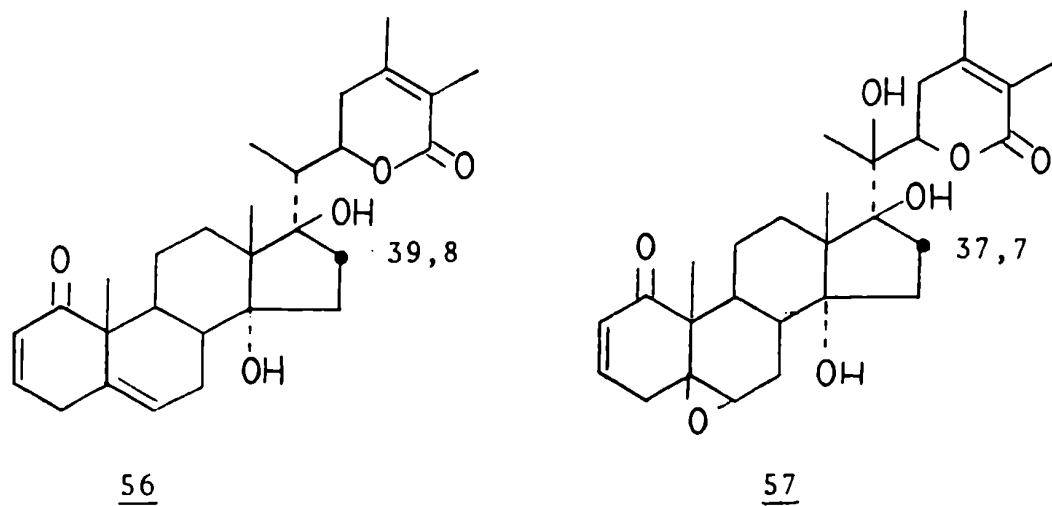


Figura 43: Comparación de los desplazamientos químicos correspondientes al carbono 16 en el par de compuestos 56 y 57.

Elucidación estructural de los withanólidos aislados de *Acnistus breviflorus*.

En la presente sección se hará referencia a la elucidación estructural de los withanólidos aislados, en base a las propiedades espectroscópicas, concretamente a los espectros de resonancia magnética protónica, ^{13}C y de masa de los withanólidos aislados de *Acnistus breviflorus*.

Para una mejor discusión e interrelación entre los diferentes compuestos, los valores de desplazamientos químicos (δ) de las señales más importantes de los espectros de resonancia magnética protónica han sido tabulados y se presentan en las tablas 7 y 10; idéntico criterio se ha adoptado en el caso de los espectros de resonancia magnética ^{13}C , los cuales se resumen en las tablas 6, 8 y 11, y de los espectros de masas en las tablas 9 y 12.

Los withanólidos aislados durante el transcurso de la presente tesis se pueden dividir en tres grupos:

Grupo 1: withanólidos aislados anteriormente por Bukovits de plantas de *Acnistus breviflorus* provenientes de la provincia de Tucumán: withaferina A 8, 2,3-dihidro-3 β -metoxiwithaferina A 33, jaborosalactona A 11, jaborosalactona D 29 y jaborosalactona E 32.

Grupo 2: withanólidos aislados por Lavie y colaboradores de plantas de *Acnistus breviflorus* cultivadas en Israel: 5,6-desoxiwithaferina A 40, 6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A 37 y 2,3-dihidrowithaferina A 34.

Grupo 3: withanólidos que no habían sido encontrados anteriormente: 2,3-dihidro-3 β -etoxijaborosalactona A 42, 5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 43, 5 α -etoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 44 y 2,3-dihidrojaborosalactona A 45.

De este último grupo los tres primeros son artefactos que se forman por extracción con alcoholes (metanol o etanol) en caliente.

Grupo 1: La identificación de estos compuestos se completó determinando los espectros de RMN-¹³C de jaborosalactona A 11, jaborosalactona D 29 y jaborosalactona E 32, los cuales no se encuentran descritos en literatura. Las señales asignadas a cada uno de estos compuestos se indican en la tabla 6, junto al espectro de RMN-¹³C de withaferina A 8.

Dado que los anillos C, D y E en las tres jaborosas son idénticos a los correspondientes anillos en la withaferina A, era de esperar que las señales originadas por estos carbonos fueran similares a las encontradas en withaferina A. Como se puede ver en la tabla 6, esto se comprobó en todos los casos, encontrándose la mayor diferencia entre la resonancia de carbono 17 de withaferina A (δ 51,80 ppm) y la señal correspondiente a este carbono en jaborosalactona E (δ 55,77 ppm).

Para los anillos A y B no hay variaciones importantes entre las señales debidas a los carbonos 7, 8 y 9 de withaferina A y los correspondientes a las tres jaborosas.

En el sistema 1-ona- α , β -insaturado del anillo A, el carbono carbonílico resuena a campos ligeramente más bajos que en withafe-

Tabla 6: Espectros de RMN-¹³C de los compuestos 8, 11, 29 y 32. (25,2 MHz, CDCl₃-TMS)

Desplazamientos químicos expresados en δ.

Carbono	<u>8</u>	<u>11</u>	<u>29</u>	<u>32</u>	Carbono	<u>8</u>	<u>11</u>	<u>29</u>	<u>32</u>
1	202,33	203,32	204,96	203,04	15	24,21	24,21	24,21	24,38
2	132,30	129,12	128,32	128,33	16	27,20	27,23	27,19	27,45
3	142,58	144,22	141,47	142,59	17	51,80	52,00	52,06	55,77
4	69,80	32,96	35,55	37,57	18	11,65	11,75	12,16	12,39
5	63,91	63,23	77,23	81,34	19	17,01	15,00	15,64	16,53
6	61,70	61,97	73,99	74,09	20	38,74	38,75	38,86	39,25
7	29,89	29,88	29,98	30,51	21	13,32	13,29	13,23	13,40
8	31,15	31,14	33,30	33,33	22	78,71	78,67	78,84	79,17
9	44,05	44,66	43,03	43,33	23	29,83	29,88	29,84	30,16
10	47,86	48,39	51,95	53,11	24	153,55	152,99	153,92	155,43
11	21,80	23,59	23,17	23,49	25	125,62	125,50	125,33	125,53
12	39,21	39,61	39,97	40,22	26	167,03	166,76	167,10	167,49
13	42,55	42,59	41,31	42,47	27	57,09	57,18	56,73	56,29
14	56,02	55,85	55,51	56,28	28	20,00	19,99	20,00	20,21

rina A (1-2,5 ppm) en los tres compuestos, mientras que el carbono 2 lo hace a campos más altos (3-4 ppm). Para el carbono 3 no se observa un mismo tipo de desviación de la señal entre las tres jaborosas y la obtenida para withaferina A como para los dos carbonos anteriores; mientras que este carbono resuena en jaborosalactona A a campos más bajos (2 ppm), en jaborosalactona D lo hace a campos más altos (1 ppm) y en jaborosalactona E tiene un valor similar al de withaferina A.

Las diferencias principales con respecto a withaferina A son las señales debidas a los carbonos 4,5 y 6. La señal de carbono 4 pasa de δ 69,80 ppm en withaferina A, con un hidroxilo en posición 4 β , a δ 32,96 ppm, 35,50 ppm y 37,57 ppm en jaborosalactona A, jaborosalactona D y jaborosalactona E respectivamente, dando cuenta en los tres casos, de la ausencia de hidroxilo en esta posición. En jaborosalactona A, la cual presenta un sistema 5,6-epóxido, las señales correspondientes a estos carbonos son similares a los de withaferina A. En las otras dos jaborosas, estas señales se desplazan a campos más bajos. Aparecen a δ 77,23 ppm y 73,99 ppm en jaborosalactona D, lo que está de acuerdo con la presencia de sustituyentes hidroxilo en estas posiciones, en jaborosalactona E la señal de carbono 5 se desplaza a δ 81,34 ppm debido a la presencia de un átomo de cloro en esta posición, mientras que el carbono 6, con un sustituyente hidroxilo, resuena a campos similares al de carbono 6 de jaborosalactona D.

La falta de sustituyente hidroxilo afecta también la señal correspondiente al carbono 10 la cual se mueve a campos más bajos en las tres jaborosas y al CH_3 -19 que aparece en estos com-

puestos más protegido que en withaferina A 8.

La identificación de withaferina A 8 se completó mediante el análisis de los espectros de RMN- ^1H I vs frecuencia y 2DJ (figuras 29 y 30 respectivamente) realizados a 500 MHz, los cuales fueron descritos anteriormente (ver pág. 66). Además se realizó el análisis de los espectros de ^{13}C obtenidos por la técnica de ecos de spin con desacople alternado (APT: determinación de ^1H vecinos)⁷⁵ de withaferina A y de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33 (figuras 44 y 45 respectivamente), los cuales permiten distinguir los carbonos unidos a un número par de hidrógenos, de los unidos a números impares.

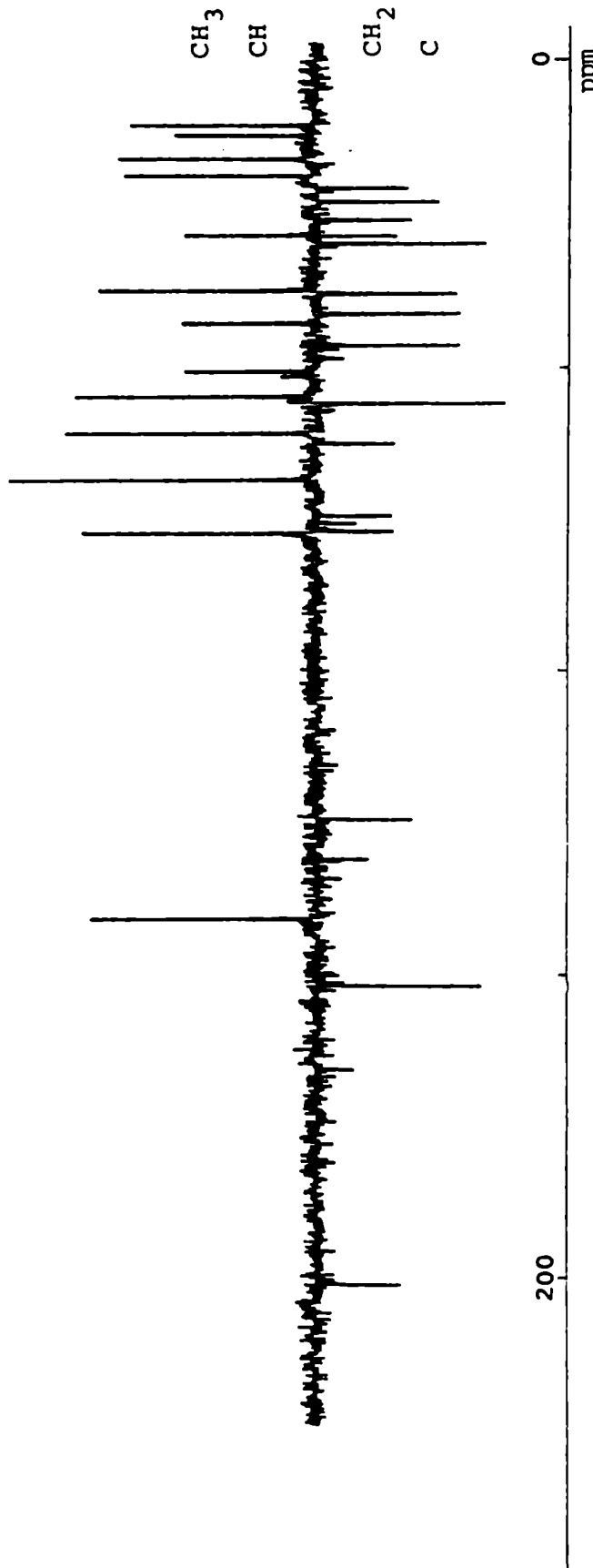


Figura 44: Espectro de RMN- ^{13}C de withaferina A 8 (APT: determinación de ^1H vecinos).

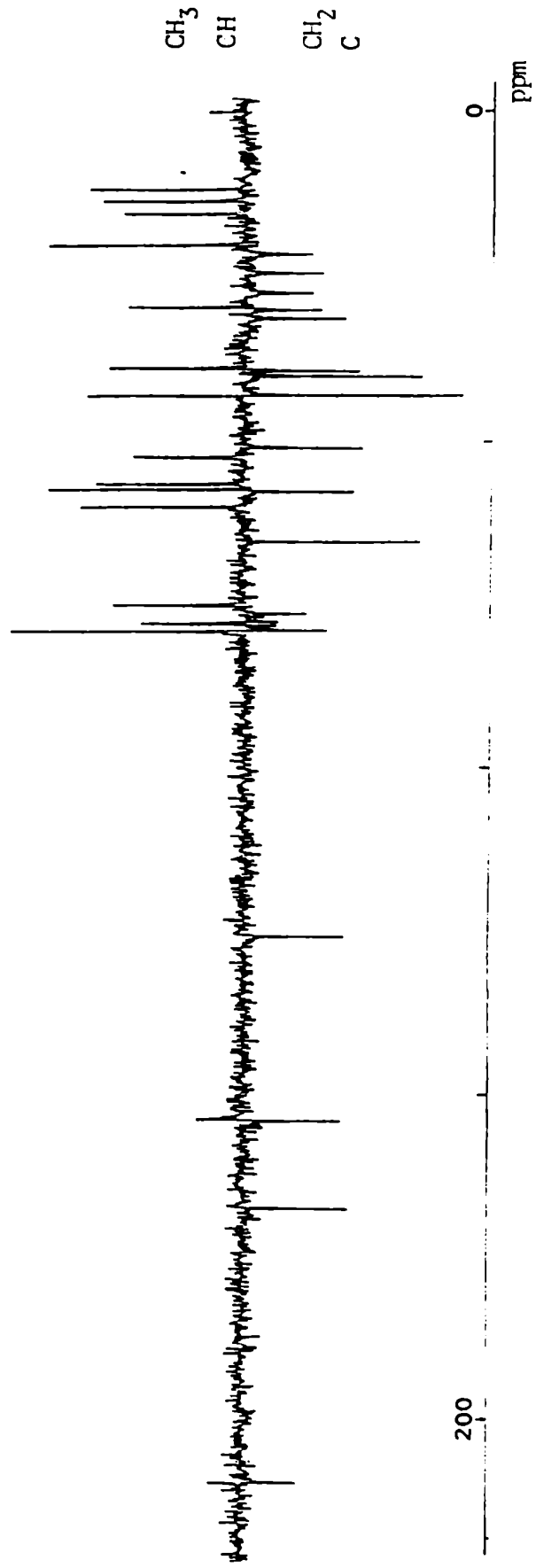


Figura 45: Espectro de RMN- ^{13}C de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33 (APT: determinación de ^1H vecinos)

Grupo 2:2,3-dihidrowithaferina A 35

El compuesto 35 presentaba en su espectro de masas un ión molecular a $m/e=472$ y fragmentos a $m/e=454$ ($M-H_2O$), 347 ($M-(f-1)$) y 304 ($M-(c-1)$) (tabla 9).

Su espectro RMN- 1H (tabla 7) no presentaba señales correspondientes a los protones vinílicos del anillo A, característicos de withaferina A 8 (ver pág. 63). La señal correspondiente al protón α unido al carbono 4 se desplazó a campos más altos, $\delta 3,53$ ppm apareciendo como triplete ($J=3$ Hz), observándose además un corrimiento hacia campos más altos de los metilos 18, 19 y 21. El resto de las señales coincidía aproximadamente con las de withaferina A. Este compuesto fue descrito anteriormente como 2,3-dihidrowithaferina A.^{7,21}

6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A 37

El compuesto 37 presentaba en su espectro de masas un ión molecular a $m/e=506$ y fragmentos a m/e : 470 ($M-36$), 454 ($M+2-3H_2O$), 452 ($M-3H_2O$) los cuales indican la presencia de un átomo de cloro en la molécula (tabla 9). En su espectro RMN- 1H (tabla 7) las señales correspondientes a los protones vinílicos aparecían a campos más altos que las análogas correspondientes a withaferina A (ver pág. 63). La señal correspondiente al H-2 aparecía como un doble doblete indicando una partición adicional a la presente en

Tabla 7: Espectros de RMN-¹H correspondientes a los compuestos 34, 37, 59, 40 y 60. (100MHz, DCl₃-TMS). Desplazamientos químicos expresados en δ.

Protón	<u>34</u>	<u>37</u>	<u>59</u>	<u>40</u>	<u>60</u>
Me-18	0,68 s	0,70 s	0,71 s	0,76 s	0,76 s
Me-21	0,99 d	0,97 d	0,97 d	1,03 d	1,03 d
	J=7 Hz	J=7 Hz	J=7 Hz	J=7 Hz	J=7 Hz
Me-19	1,33 s	1,27 s	1,28 s	1,48 s	1,28 s
Me-28	2,02 s	2,05 s	2,07 s	2,06 s	2,06 s
H-27	4,38 s	4,38 s	4,90 s	4,39 s	4,87 s
H-22	4,46 dt	4,44 dt	4,44 dt	4,44 dt	4,44 dt
	J _{22,23} =12Hz	J _{22,23} =12Hz	J _{22,23} =12Hz	J _{22,23} =12Hz	J _{22,23} =12Hz
	J _{22,20} =3Hz	J _{22,20} =3Hz	J _{22,20} =3Hz	J _{22,20} =3Hz	J _{22,20} =3Hz
H-2	-	6,02 dd	6,02 dd	5,96 d	6,02 d
		J _{3,2} =10Hz	J _{3,2} =10Hz	J _{3,2} =10Hz	J _{3,2} =10Hz
		J _{2,4} =2Hz	J _{2,4} =2Hz		
H-3		6,55 dd	6,55 dd	6,78 dd	6,78 dd
		J _{3,2} =10Hz	J _{3,2} =10Hz	J _{3,2} =10 Hz	J _{3,2} =10Hz
		J _{3,4} =2,5Hz	J _{3,4} =2,5Hz	J _{3,4} =4-4,5Hz	J _{3,4} =4,5Hz
H-4	3,52 t	5,04 m	5,6 m	4,54 d	5,80 d
	J=3 Hz			J=4-4,5 Hz	J=4,5 Hz
H-6	3,14 ba	3,8 ba		5,95 d	6,11 d
				J=5 Hz	J=5 Hz
CH ₃ COO-	-		2,08 s	-	2,08 s

Tabla 8: Espectros de RMN-¹³C correspondientes a los compuestos 37, 59, 40 y 60. (25,2 MHz, DCCl₃-TMS). Los desplazamientos químicos se expresan en δ .

Carbono	<u>37</u> ⁵⁷	<u>37</u> (SFORD)	<u>59</u>	<u>40</u>	<u>60</u>	Carbono	<u>37</u> ⁵⁷	<u>37</u> (SFORD)	<u>59</u>	<u>40</u>	<u>60</u>
1	200,2	200,39 s	199,71	201,22	201,22	15	23,9	23,99 t	23,94	24,35	24,25
2	127,6	127,28 d	127,56	130,77	133,58	16	27,2	27,34 t	27,22	27,27	27,24
3	143,0	143,37 d	142,54	142,57	140,08	17	57,3	51,77 d	51,72	52,09	52,00
4	66,6	65,75 dd	66,07	69,90	69,96	18	11,8	11,85 q	11,80	11,86	11,80
5	78,6	78,23 s	78,00	128,94	130,65	19	9,9	9,91 q	9,91	**	**
6	66,0	66,09 d	66,07	127,7	127,26	20	38,7	38,75 d	38,92	38,85	38,79
7	39,0	39,02 t	39,31	29,89	29,63	21	13,3	13,31 q	13,31	13,36	13,31
8	35,0	35,11 d	35,02	31,06	**	22	78,2	78,62 d	78,48	78,77	78,16
9	45,8	45,99 d	45,81	42,85	42,84	23	29,8	29,91 t	29,76	29,89	30,06
10	55,3	57,29 s	57,35	**	51,55	24	152,9	153,34 s	156,50	152,60	156,79
11	22,7	22,72 t	22,66	**	21,77	25	125,7	125,56 s	121,82	125,60	121,72
12	39,3	39,33 t	39,13	39,6	39,58	26	166,9	166,87 s	164,91	167,90	167,92
13	43,1	43,15 s	43,09	42,7	42,76	27	57,3	56,90 t	57,12	57,41	57,96
14	57,2	55,28 d	55,25	56,21	**	28	20,6	20,04 q	20,58	19,97	20,5
CH ₃ COO-	-	-	20,87	-	20,87	ClH ₃ COO-	-	-	170,60	-	**

** no se observan señales

6 α -cloro-5 β -hidrowithaferina A 37

m/e	intensidad relativa	asignación
506	3,1	M ⁺
470	3,0	M-ClH
454	2,2	M+2-3 H ₂ O
452	2,9	M-3H ₂ O
434	2,4	M-ClH-2H ₂ O
197	23,6	ión b
141	96,6	ión a
123	68	ión a-H ₂ O
95	100	123-CO
67	25,7	95-CO
84	53,7	C ₅ H ₈ O ⁺
43	11,7	C ₃ H ₇ ⁺

5,6-desoxiwithaferina A diacetilada 59

m/e	intensidad relativa	asignación
538	4,4	M ⁺
478	15,9	M-AcOH
418	20,8	M-2AcOH
307	7,3	M-AcOH-171 (ruptura 2)
282	4,5	M-AcOH-211 (ruptura 4)

m/e	intensidad relativa	asignación
197	13,0	ión b
141	8,3	ión a
124	20,7	ión f
123	58,5	ión a-H ₂ O
95	81,6	123-CO
67	54,6	95-CO
55	25,3	C ₄ H ₇ ⁺
43	100	C ₃ H ₇ ⁺

2,3-dihidrowithaferina A 34

m/e	intensidad relativa	asignación
471	2,2	M ⁺ +1
470	5,5	M ⁺
454	5,1	M-H ₂ O
436	3,9	M-2H ₂ O
418	2,6	M-3H ₂ O
347	11,2	M-125 (M-(f-1))
304	13,8	M-168 (M-(c-1))
197	35,6	ión b
169	32,2	ión c
143	16,1	ión e
141	100	ión a
125	69,9	ión f
123	67,8	ión a-H ₂ O

Tabla 9: (cont.)

m/e	intensidad relativa	asignación
95	67,3	123-CO
67	66,3	95-CO
55	68,0	$C_4H_7^+$
43	53,7	$C_3H_7^+$

withaferina A . Aparece un multiplete ancho a δ 5,04 ppm comprobándose a partir del espectro de RMN- ^{13}C por irradiación selectiva que correspondía a protones unidos al carbono 4.

El espectro RMN- ^{13}C (tabla 8) presentaba una señal característica poco común a δ 9,9 ppm. No aparecían las señales típicas de un epóxido y si las señales a δ 78,23 ppm y 66,09 ppm que se justificarían por la presencia de un grupo cloro o hidroxilo como sustituyentes de C-5 y/o C-6. Comparando con valores de literatura se identificó al compuesto 37 como 6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A . Así el acoplamiento adicional observado para el H-2 se produciría al abrirse el epóxido para formar una clorohidrina; el hidrógeno 4 α , ecuatorial en withaferina A 8 se convierte en hidrógeno axial y la constante de acoplamiento alílico entre los H-2 y H-4 pasa a ser importante. Las variaciones del acoplamiento alílico en relación a la estereoquímica han sido bien documentadas.⁷⁶ En withaferina A el ángulo entre H-C-2, el H-C-3 y el 4 α -H ecuatorial es pequeño y no hay acoplamiento (figura 28, pág65). Para el compuesto 37 este ángulo con el 4 α -H axial pasa de ser aproximadamente 50° y aparece acoplamiento (figura 46). Este cambio de posición del 4 α -H, justifica también la variación del $J_{3,4}$ que pasa de 5 Hz en withaferina A a 2,4 Hz en el 6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A.

En el espectro de RMN- ^{13}C la asignación de las señales correspondientes a los carbonos 4, 10, 14, 17 y 27 fue modificada respecto del espectro descrito en literatura en base al espectro obtenido con irradiación selectiva de los protones fuera de resonancia (-4 ppm) como se indica en la tabla 8.

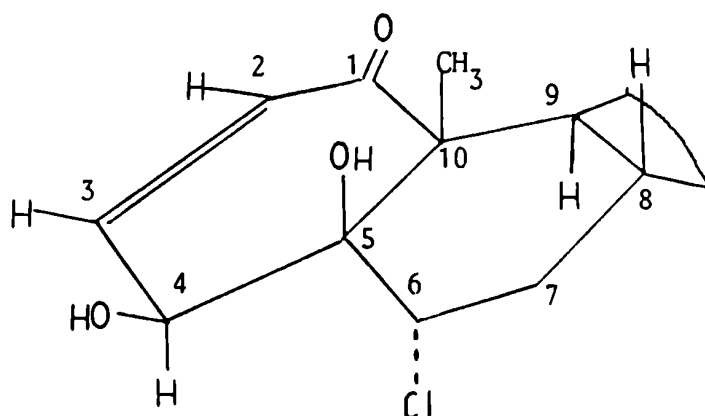
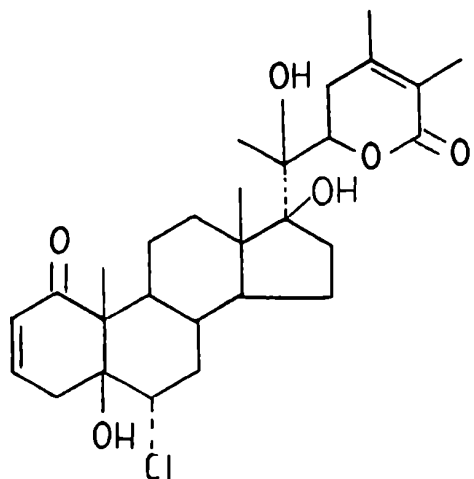
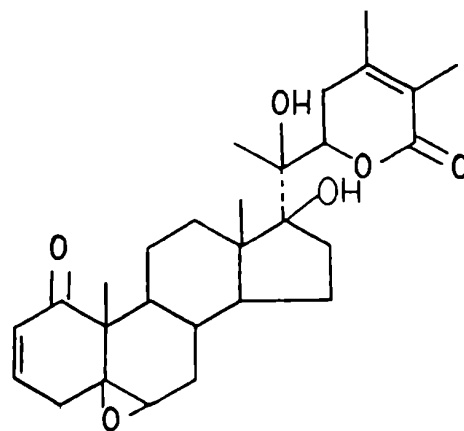


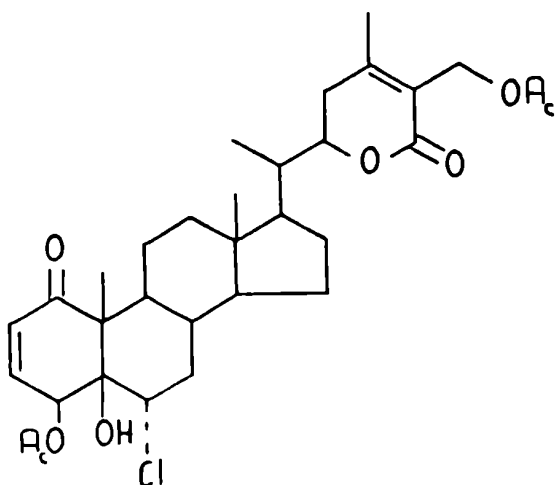
Figura 46: Anillos A y B en 6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A 37

La señal a δ 65,75 ppm se presentaba como doble doblete y fue asignada al C-4 debido a la existencia de acoplamiento residual entre este carbono y el H-C-3. El grupo de señales a δ 57,29 ppm, 55,28 ppm, 51,77 ppm y 56,90 ppm se presentaban respectivamente como singulete, doblete, doblete y triplete. Las señales singulete y triplete se asignaron sin ambigüedad al C-10 y C-27 respectivamente. Tanto la señal de C-14 como de C-17 darían lugar a un doblete. Se asignó la señal a δ 55,28 ppm al C-14 y a δ 51,77 ppm a C-17, por comparación de estas señales con las correspondientes en withaferina A 8 (tabla 6).

Se encuentra descrita en la literatura la reacción de 6 α -cloro-5 β -hidroxiwithanólido E 58 con acético glacial-AcONa a reflujo para dar el withanólido E 10 a través de una S_N2 intramolecular.⁹

5810

En forma similar se trató a la 6α -cloro- 5β -hidroxiwithaferina A 37 obteniéndose en este caso el producto diacetilado 59. La presencia del grupo hidroxilo en posición 4β desfavorecería la SN_2 intramolecular que llevaría a la formación de withaferina A 8. El diacetato de 6α -cloro- 5β -hidroxiwithaferina A fue identificado por espectroscopía de RMN- 1H y RMN- ^{13}C (tablas 7 y 8), La presencia de grupos acetato origina una señal a δ 170,60 ppm en el espectro de RMN- ^{13}C , debida al carbono carbonílico y otra señal adicional con respecto al espectro del 6α -cloro- 5β -hidroxiwithaferina A 37 (tabla 8) a δ 20,87 ppm debida al metilo del acetato.

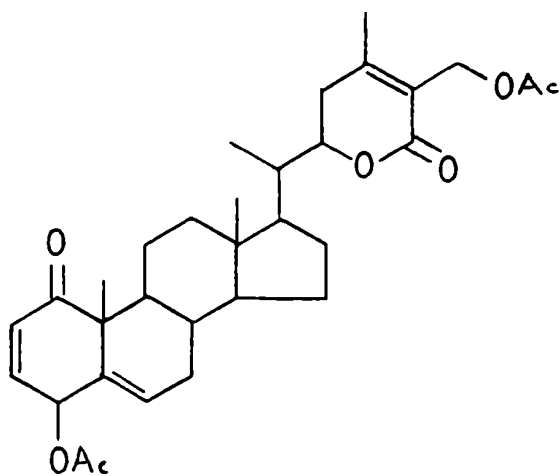
59

Se observa además, como se mencionó anteriormente (ver pág.74) que la introducción de un grupo acetato en C-27 desplaza la señal del C-24 a campos más bajos y causa protección en el C-25. La señal del C-4 en el espectro RMN-¹³C varía muy poco al introducir un grupo acetato en este carbono (tabla 8). La acetilación en posición 4 se manifiesta mejor en el espectro RMN-¹H en el cual la señal del H-C-4 se desplaza de δ 5,04 ppm en 6 α -cloro-5 β -hidroxiwithaferina A a δ 5,6 ppm en el compuesto acetilado. En este espectro también se modifica la resonancia de los H-C-27 que pasa de δ 4,38 ppm en el compuesto 59 a δ 4,9 ppm en el acetilado y aparece una señal adicional en δ 2,08 ppm debida a los grupos acetato.

5,6-desoxiwithaferina A 40

El espectro de RMN-¹³C del compuesto 40 mostraba 8 carbonos sp², dos de los cuales correspondían a carbonos carbonílicos en C-1 y C-26 (tabla 11) y no aparecían señales características de los esquemas de sustitución 5,6 presentes en jaborosalactona A 11, jaborosalactona D 29 o jaborosalactona E 32 (tabla 6). Las señales observadas en este espectro de RMN-¹H (tabla 10) debidas a los anillos D y E indicaban que se trataba de un withanólido similar a withaferina A en esta parte de la molécula. Comparando con los withanólidos descritos en literatura con tres dobles enlaces surgió que el compuesto correspondía a la 5,6-desoxiwithaferina A.⁷ Para completar su identificación, este compuesto se acetiló con una mezcla anhídrido acético/piridina obteniéndose el

acetato de 5,6-desoxiwithaferina A 60 descrito previamente en literatura.⁷ En las tablas 10 y 11 se dan los desplazamientos químicos de RMN-¹H y RMN-¹³C respectivamente, correspondientes al compuesto acetilado y en la tabla 9 se indican los principales fragmentos observados en su espectro de masas. En todos los casos los valores obtenidos concuerdan con los descriptos en literatura.⁷

60

Grupo 3:2,3-dihidro-3-etoxi-jaborosalactona A 42

En el espectro de RMN-¹H (tabla 10) del compuesto 42 había ausencia de señales correspondientes a protones vinílicos. Un triplete a δ 1,16 ppm (J:7Hz) y un cuarteto a δ 3,54 ppm (J:7Hz) indicaban la presencia de un grupo etoxilo. El resto de las señales era similar a las de jaborosalactona A 11.⁵⁴

En el espectro de RMN-¹³C las señales correspondientes a los anillos C, D y E eran casi idénticas a las originadas por los carbonos de jaborosalactona A pertenecientes a estos anillos (tabla 6). La presencia del par de señales a δ 64,80 ppm y 60,18 ppm, sugería la presencia de un epóxido en posición 5,6; la principal diferencia con respecto al espectro de RMN-¹³C de jaborosalactona A era la ausencia de las señales correspondientes a los carbonos 2 y 3 pertenecientes a un sistema 1-ona- α,β -insaturado. La presencia de dos señales adicionales a δ 64,36 ppm y 15,54 ppm se atribuyeron a la presencia del grupo etoxilo. Dado que este compuesto fue aislado de un extracto etanólico, se pensó en la formación de un artefacto durante el tratamiento con etanol en caliente similar a la formación de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33 con metanol en caliente a partir de withaferina A 8. Así en el espectro de RMN-¹H, el doblete a δ 2,80 ppm se asignó al H-C-2 (J_{2,3}:15Hz; J_{3,4}: 4 y 6Hz) y el multiplete a δ 3,80 ppm al H-C3. En el espectro de RMN-¹³C (tabla 11) la señal a δ 75,34 ppm se asignó al C-3 unido a un grupo etoxilo y la señal a δ 39,14 ppm al C-2. Se intentó

Tabla 10: Espectros de RMN-¹H de los compuestos 42, 43, 44 y 45.
(100 MHz, DCCl₃-TMS). Los desplazamientos químicos se expresan en δ.

Protón	<u>42</u>	<u>43</u>	<u>44</u>	<u>45</u>
Me-18	0,68 s	0,76 s	0,77 s	0,67 s
Me-21	0,99 d	1,01 d	1,03 d	0,97 d
	J=7Hz	J=6Hz	J=7Hz	J=6Hz
Me-19	1,31 s	1,31 s	1,29 s	1,16 s
Me-28	2,03 s	2,06 s	2,05 s	2,05 s
H-27	4,38 s	4,38 s	4,39 s	4,37 s
H-22	4,42 dt	4,46 dt	4,46 dt	4,42 dt
	J _{22,23} =3Hz	J _{22,23} =3Hz	J _{22,23} =3Hz	J _{22,23} =3Hz
	J _{22,20} =12Hz	J _{22,20} =12Hz	J _{22,20} =12Hz	J _{22,20} =12Hz
H-2	2,80 ddd	5,82 dd	5,84 dd	---
	J _{2,3} =15Hz	J _{2,3} =10Hz	J _{2,3} =10Hz	
	J _{3,4} =6Hz	J _{2,4} =2Hz	J _{2,4} =2Hz	
	J _{3,4} =4Hz			
H-3	3,80 m	6,56 ddd	6,60 ddd	---
		J _{3,2} =10Hz	J _{3,2} =10Hz	
		J _{3,4} =5Hz	J _{3,4} =5Hz	
		J _{3,4} =2Hz	J _{3,4} =2Hz	
H-4	---	2,40 m	2,60 m	---
H-6	3,24 ba	3,92 ba	3,92 ba	---
CH ₃ O	---	3,02 s	---	---
CH ₃ CH ₂ O	1,16 t	---	1,02 t	---
	J=7Hz		J=7Hz	
CH ₃ CH ₂ O	3,54 q	---	3,14 q	---
	J=7Hz		J=7Hz	

Tabla 11: Espectros de RMN-¹³C correspondientes a los compuestos 45, 42, 43 y 44 (25,2 MHz, DCCl₃-TMS). Desplazamientos químicos expresados en δ.

Carbono	<u>42</u>	<u>43</u>	<u>44</u>	<u>45</u>	Carbono	<u>42</u>	<u>43</u>	<u>44</u>	<u>45</u>
1	209,62	203,79	203,80	212,87	15	24,27	24,33	24,32	24,26
2	39,14	129,28	129,18	30,34	16	27,26	27,34	27,28	27,27
3	75,34	138,70	138,76	29,16	17	51,96	52,29	52,22	52,27
4	29,62	27,60	28,22	35,22	18	11,53	12,25	12,24	11,62
5	64,80	81,51	81,23	64,25	19	15,36	15,76	15,75	18,36
6	60,18	68,71	69,26	60,45	20	38,76	39,02	38,91	38,74
7	29,89	30,01	29,88	29,88	21	13,31	13,32	13,31	13,34
8	31,23	33,92	34,18	31,87	22	78,66	78,90	78,83	78,76
9	42,81	43,21	43,09	42,97	23	29,44	29,90	28,88	29,83
10	50,38	52,50	52,44	51,94	24	152,50	152,72	152,68	152,62
11	21,56	23,41	23,38	21,96	25	125,66	125,72	125,57	125,58
12	39,14	40,18	40,04	39,22	26	166,70	166,82	166,86	166,75
13	42,65	41,20	41,08	42,69	27	57,36	57,45	57,44	57,34
14	56,12	55,63	55,61	55,95	28	19,93	19,93	19,97	19,98
OCH ₃	---	49,71	---	---	Cl ₃ CH ₂ O	15,54	---	15,61	---
					Cl ₃ CH ₂ O	64,36		57,30	---

sintetizar la 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A a partir de jaborosalactona A por tratamiento con etanol-AcONa a reflujo (en condiciones similares a la preparación de la 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A) observándose reacción luego de 9 horas. En estas condiciones se obtuvo una mezcla de productos de descomposición distintos al compuesto deseado que no fueron identificados.

5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 43

El compuesto 43 presentaba en su espectro de masas un ión molecular a $m/e=486$ y fragmentos a $m/e=468$ ($M-H_2O$), 454 ($M-MeOH$), y 436 ($M-H_2O-MeOH$) indicando la presencia de un grupo metoxilo en la estructura del withanólido (tabla 12).

El espectro de RMN- ^{13}C (tabla 11) era muy similar al de jaborosalactona D 29 (tabla 6) excepto por las señales correspondientes a los carbonos 4, 5 y 6 y a la presencia de una señal adicional en δ 49,7 ppm asignada a un grupo metoxilo en posición 5. Este carbono presentaba la típica desprotección (aproximadamente 4 ppm) debida a la metilación del grupo hidroxilo en posición 5. Este metilo aparecía a campos altos, si comparamos con el valor correspondiente al metoxilo de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33⁶⁴ que aparece a δ 56,85 ppm lo que indicaba la presencia de un metoxilo protegido. Esto puede explicarse considerando que el grupo metoxilo se ubica por debajo del anillo A en el cono de protección del grupo carbonilo y del doble enlace 2,3 como se representa en la figura 47. La influencia del grupo carbonilo es en este caso particularmente interesante debido a que la anisotropía magnética de grupos vecinos no suele influir apreciablemente en los desplaza-

Tabla 12 : Espectros de masa de los compuestos del grupo 3.

5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 43

m/e	intensidad relativa	asignación
488	1,6	M+2
487	1,6	M+1
486	4,0	M
469	1,9	M+1-H ₂ O
468	6,1	M-H ₂ O
454	1,0	M-MeOH
450	1,5	M-2 H ₂ O
436	4,9	M-MeOH-H ₂ O
418	5,3	M-MeOH-2H ₂ O
345	1,2	M-141
315	2,6	ruptura 2
197	15,3	ión b
141	28,5	ión a
123	20,9	ión a-H ₂ O
95	24,3	123-CO
67	9,8	95-CO
45	100	C ₂ H ₅ O ⁺
43	13,7	C ₃ H ₇ ⁺

Tabla 12 : (cont.)

5 α -etoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 44

m/e	intensidad relativa	asignación
502	4,8	M+2
501	14,9	M+1
500	40,3	M
484	4,8	M+2-H ₂ O
483	20,5	M+1-H ₂ O
482	62,8	M-H ₂ O
456	5,0	M+2-EtOH
455	6,9	M+1-EtOH
454	19,1	M-EtOH
438	5,7	M+2-EtOH-H ₂ O
437	12,5	M+1-EtOH-H ₂ O
436	37,8	M-EtOH-H ₂ O
420	4,3	M+2-EtOH-2H ₂ O
419	12,0	M+1-EtOH-2H ₂ O
418	33,8	M-EtOH-2H ₂ O
329	10,0	M-171 (ruptura 2)
197	53,2	ión b
141	100	ión a
123	75,7	ión a-H ₂ O
95	90,1	123-CO
67	28,6	95-CO
55	14,8	C ₄ H ₇ ⁺
43	12,8	C ₃ H ₇ ⁺

Tabla 12: cont.2,3-dihidrojaborosalactona A 45

m/e	intensidad relativa	asignación
457	3,8	M+1
456	7,7	M
438	5,2	M-H ₂ O
420	8,2	M-2H ₂ O
315	4,8	M-ión a
297	3,9	M-ión a -H ₂ O
285	8,6	M-171 (ruptura 2)
245	10,6	M-211 (ruptura 4)
227	18,5	M-211-H ₂ O
197	5,8	ión b
141	100	ión a
140	28,6	ión d
127	12,2	ión e
123	57	ión a-H ₂ O
95	38,5	123-CO
84	32,7	C ₅ H ₈ O ⁺
67	20,8	95-CO
55	36,19	C ₄ H ₇ ⁺
43	28,7	C ₃ H ₇ ⁺

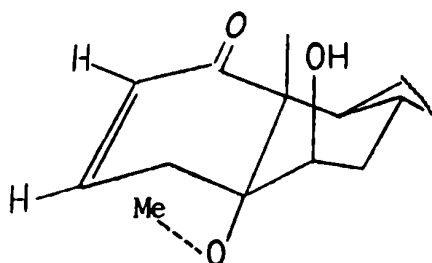


Figura 47: Estereoquímica de los anillos A y B en el compuesto 43 mientos químicos de ^{13}C .

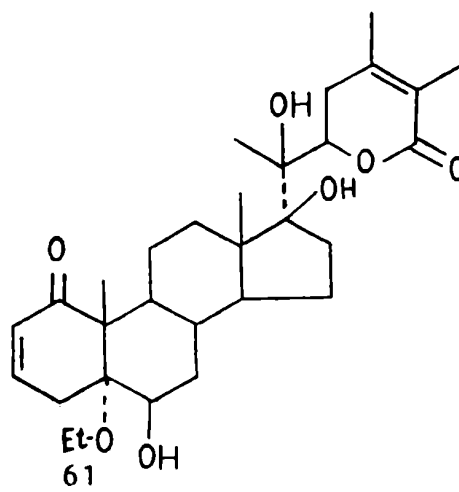
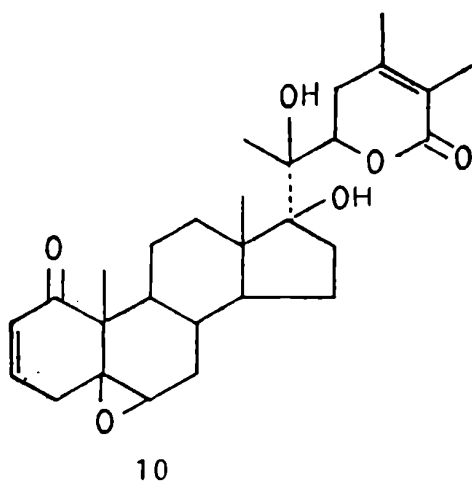
El espectro RMN- ^1H (tabla 10) del compuesto 43 era muy similar al de jaborosalactona D 29⁵⁵ excepto por una señal extra a δ 3,02 ppm asignada a los protones del grupo metilo en posición 5. Nuevamente este metilo aparecía a campos altos con respecto al metoxilo de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33,²¹ lo que se explica como se mencionó anteriormente por la ubicación del metoxilo con respecto al anillo A (figura 47).

En base a lo dicho anteriormente el compuesto 43 se identificó como 5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B, el cual se formaría durante la extracción con metanol en caliente en presencia de trazas de ácido a partir de jaborosalactona A 11. La estructura y estereoquímica de este compuesto se confirmaron por tratamiento de jaborosalactona A con metanol-ácido sulfúrico, obteniéndose un producto idéntico al aislado.

5 α -etoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 44

El compuesto 44 presentaba en su espectro de masas un ión molecular a $m/e=500$ y fragmentos a $m/e=482$ (M-H₂O), 454 (M-EtOH) y 436 (M-H₂O-EtOH) (tabla 12) indicando la presencia de un grupo etoxilo en la estructura del withanólido. Los espectros de RMN-¹H y ¹³C del compuesto 44 (tablas 10 y 11) eran casi idénticos a los del compuesto 43 excepto por la señal del metoxilo observada en 43 la cual era reemplazada por señales correspondientes a un grupo etoxilo. Nuevamente resultó evidente en ambos espectros el efecto de protección de la enona del anillo A sobre el metileno del grupo etilo. Por lo tanto el compuesto 44 se identificó como 5 α -etoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B.

A pesar de que Vande Velde y col. propusieron al 5 α -etoxi-1-oxo-6 β ,14 α ,17 β ,20-tetrahidro-20S,22R-witha-2,24-dienólido 61 como un compuesto natural aislado de *Withania somnifera*,⁷⁷ la presencia de 43 y 44 en extractos obtenidos con metanol y etanol en caliente respectivamente, indicaría que el compuesto anteriormente mencionado no es en realidad un compuesto natural como indicaron los autores, sino un artefacto obtenido en alguna etapa del aislamiento del mismo por reacción de withanólido E 10 con etanol.



2,3-dihidrojaborosalactona A 45

El compuesto 45 presentaba un tiempo de retención ligeramente menor que jaborosalactona A 11 al ser analizado por CLAR en fase reversa (ver pág.46, figura19); en base a las siguientes evidencias fue identificado como 2,3-dihidrojaborosalactona A.

El espectro de RMN-¹³C (tabla 11) mostraba la presencia de dos carbonilos y dos carbonos adicionales sp². Estos dos carbonos y uno de los carbonilos correspondían al anillo lactónico insaturado. El segundo carbonilo (δ 212,87 ppm) se asignó a un grupo ceto en C-1, el cual en ausencia de un doble enlace 2,3 resonaba a campos más bajos (9 ppm) comparado con el C-1 de la jaborosalactona A 11 (tabla 6). Las señales correspondientes a los anillos C, D y E eran casi idénticas a las originadas por los carbonos pertenecientes a estos anillos en jaborosalactona A (tabla 6), observándose además para el compuesto 45 dos señales adicionales a campos altos, δ 30,34 ppm y δ 29,16 ppm, que fueron asignadas respectivamente a los carbonos 2 y 3. La ausencia del sistema 1-ona α , β -insaturado modificaba también la resonancia del CH₃-19 el cual aparecía en el compuesto 45 desprotegido (3,3 ppm) con respecto a dicho metilo en jaborosalactona A (tabla 6).

El espectro de masas mostraba un ión molecular a m/e=456 y fragmentos a m/e=153 y 140 (tabla 12), los cuales fueron atribuidos al anillo A más los carbonos 6, 7 y 19 y 6 y 19 respectivamente (figura 48).

En las figuras 49 y 50 se representan los espectros de RMN-¹H y de RMN-¹³C obtenidos para este compuesto.

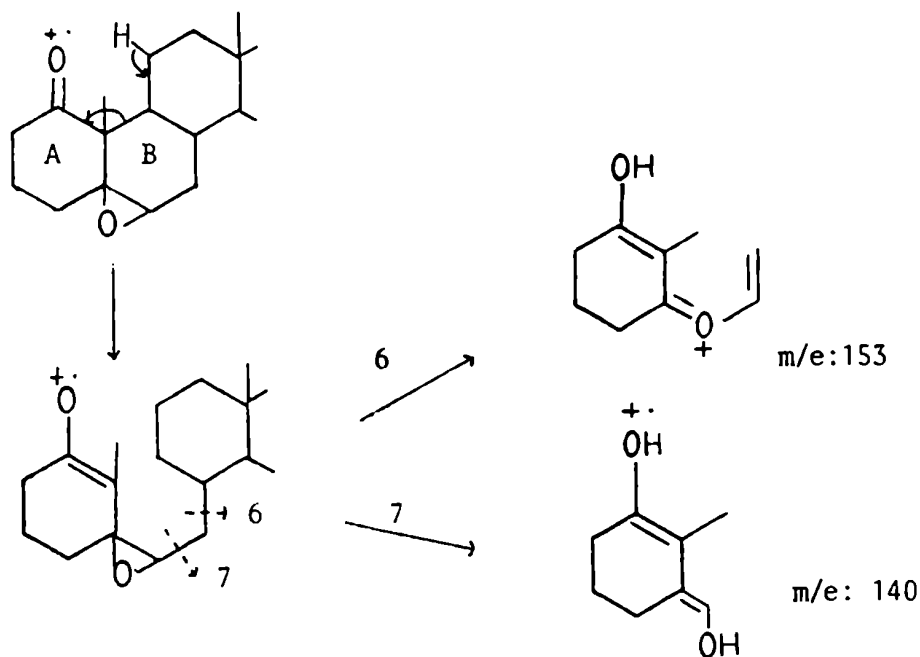


Figura 48: Fragmentación de los anillos A y B en la 2,3-dihidro-jaborosalactona A 45.

La estructura propuesta se confirmó por hidroxilación catalítica del doble enlace de jaborosalactona A 11. Se utilizó como catalizador una solución premeducida de dióxido de platino en dioxano, método utilizado por Kupchan para la obtención de 2,3-dihidrowithaferina A 34 a partir de withaferina A 8.²¹ En literatura se halla descripta la hidrogenación de jaborosalactona A 11 con paladio como catalizador,⁵⁴ según la cual se obtiene como producto la 2,3-dihidro-27-desoxijaborosalactona A 62. Al utilizar platino como catalizador se obtuvo una mezcla de productos, de la cual se aisló por CLAR en fase reversa como componente principal un producto idéntico a la 2,3-dihidrojaborosalactona A natural.

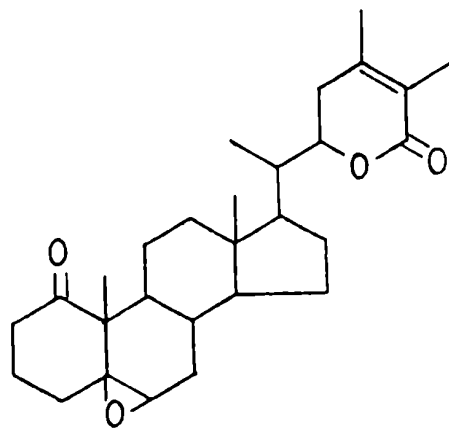
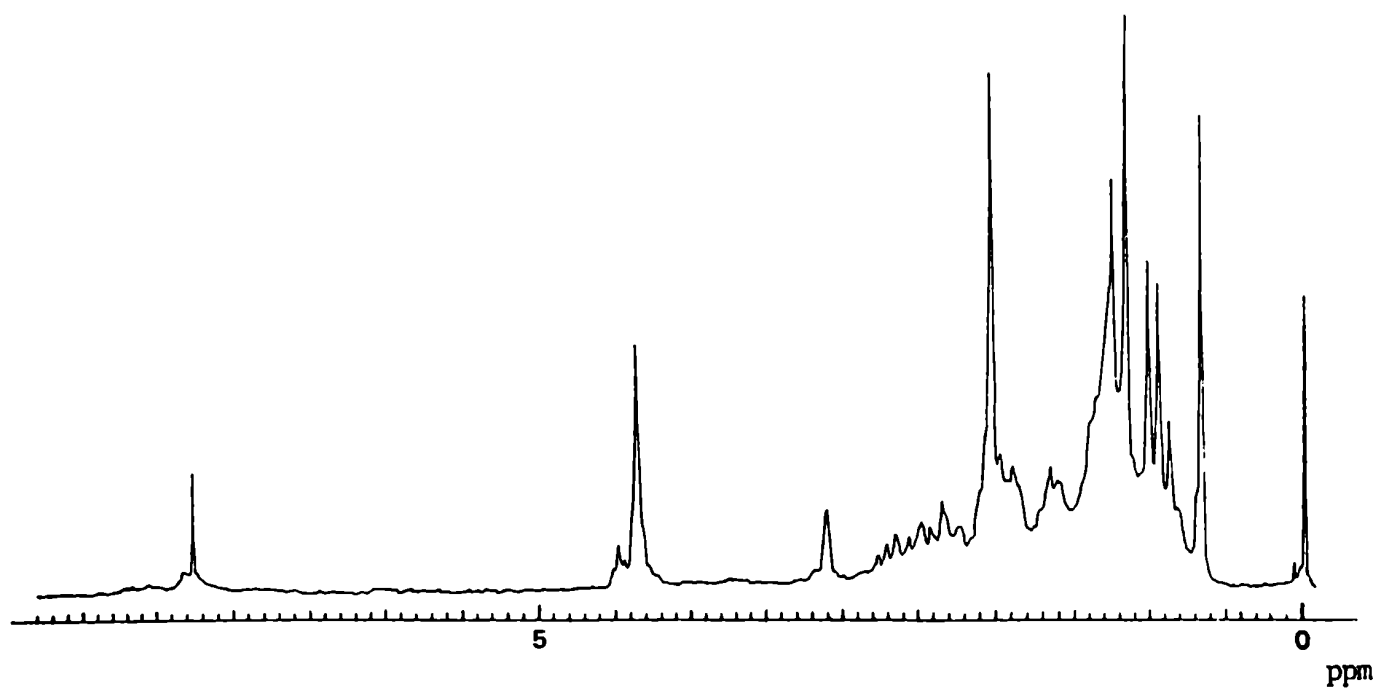
62

Figura 49: Espectro de RMN- ^1H de 2,3-dihidro-jaborosalactona A 45
(100 MHz- DCCl_3 -TMS).

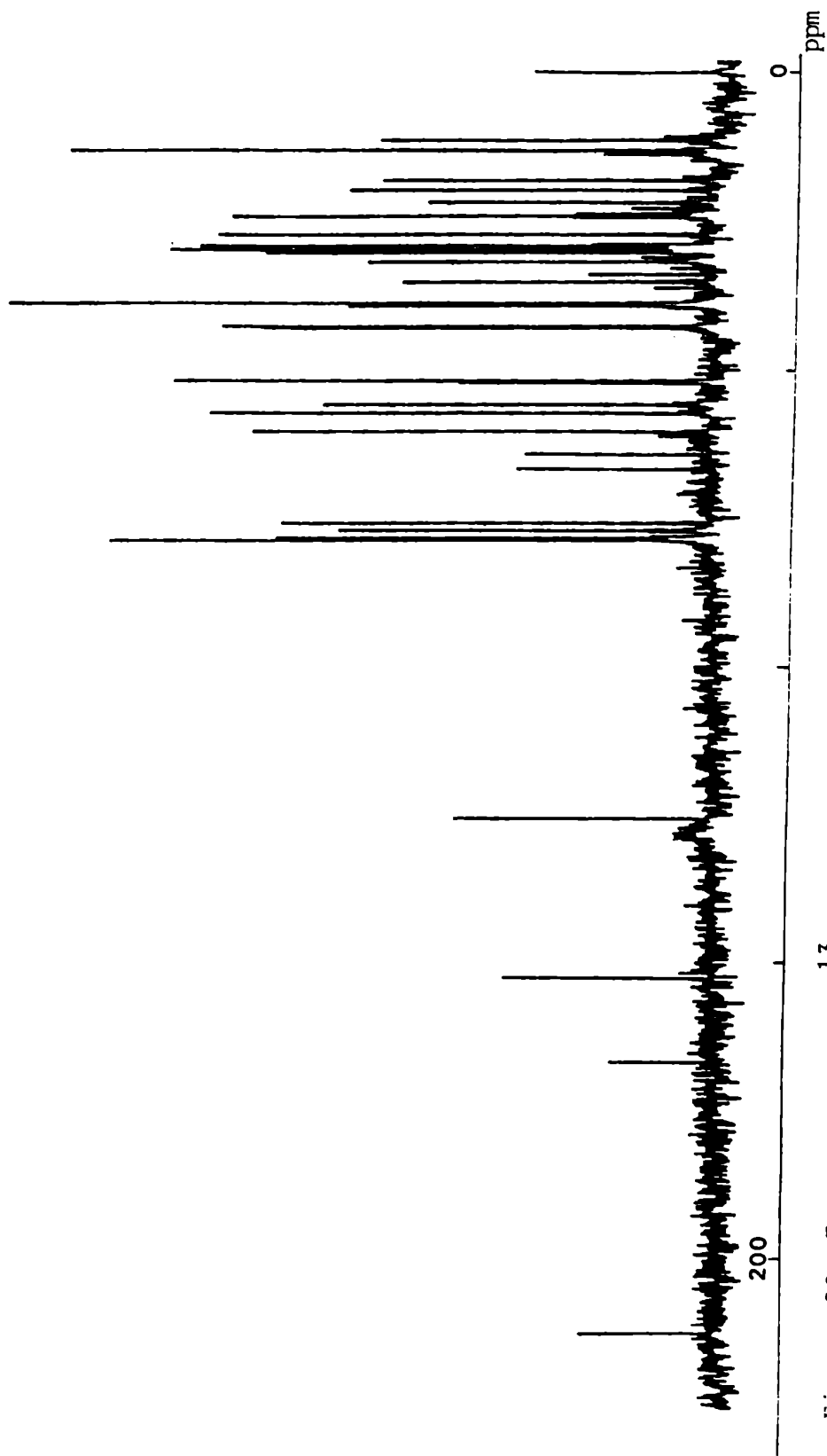


Figura 50: Espectro de RMN- ^{13}C de 2,3-dihidrojaborosalactona A 45. (25,2 MHz, DCCl_3 -TMS).

BIOSINTESIS DE WITHANOLIDOS

EN *ACNISTUS BREVIFLORUS*

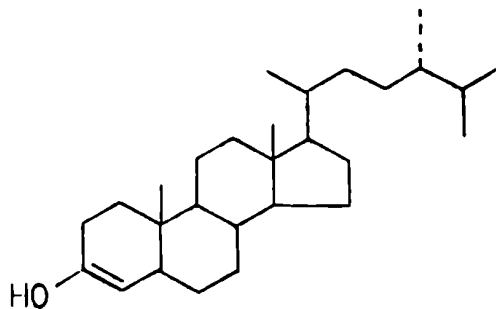
ANTECEDENTES

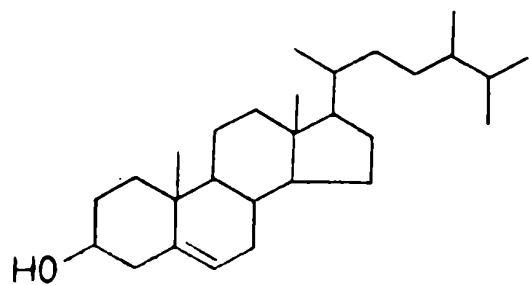
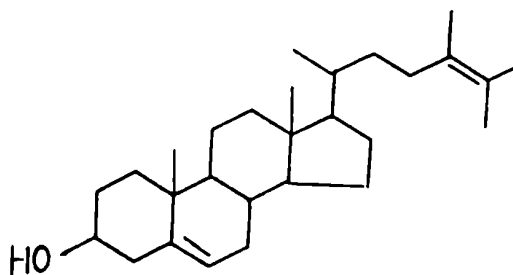
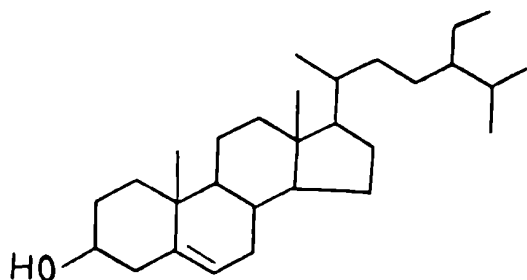
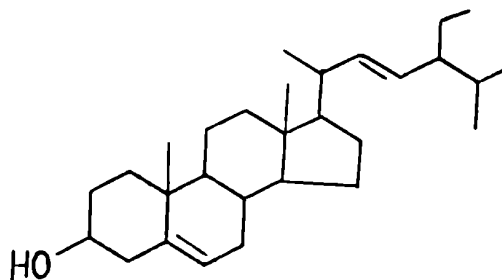
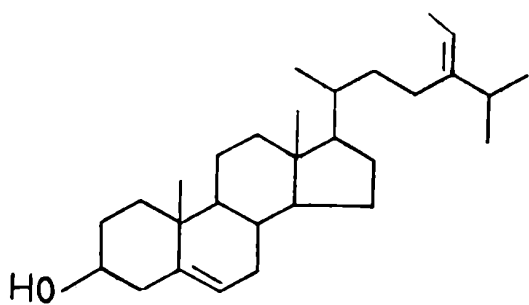
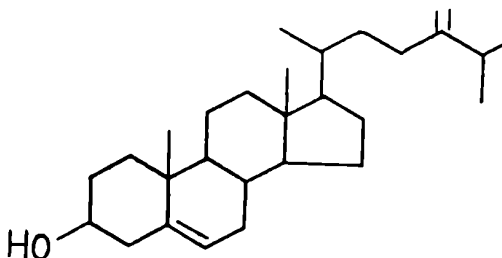
En un estudio biosintético preliminar con la planta *Withania somnifera*, Lockley y col. identificaron como esteroides principales de esa planta a campesterol 63, 24-metilcolesta-5,24-dien-3 β -ol 64, sitosterol 65, stigmasterol 66, y 28-isofucoesterol 67; también se identificaron cantidades menores y variables de 24-metilencolesterol 68 (generalmente menos del 2 % del total de esteroides).⁷⁸ (Figura 51)

Por otra parte en cultivos "in vitro" de yemas de *Withania somnifera* no se encontraron withanólidos en cantidad detectable; sin embargo se aislaron de dichos cultivos cantidades comparativamente grandes de 24-metilencolesterol.⁷⁹

En base a estos resultados se consideraron posibles precursores de withanólidos al campesterol, 24-metilcolesta-5,24-dien-3 β -ol y 24-metilencolesterol, todos ellos fitosteroides de 28 carbonos.

Posteriormente Lockley y colaboradores estudiaron la incorporación de 24(R,S)-24-metil(28-³H)colesterol (o sea una mezcla de campesterol (28-³H) y dihidrobrasicasterol (28-³H) 69 y 24-metilencolesterol 28-³H, observándose marcación con tritio en los withanólidos aislados sólo en las experiencias realizadas con 24-metilencolesterol.⁵⁸

69

Campesterol 6324-metilcolesta-5,24-dien-38-ol 64sitosterol 65stigmasterol 6628-isofucoesterol 6724-metilencolesterol 68Figura 51 : Esteroles aislados de *Withania somnifera*.⁵⁹

Se hicieron también experiencias para determinar si otros 4-des-metilesteroles estaban involucrados en la biosíntesis de withanólidos.⁵⁸ Los trabajos efectuados para investigar la intermediación del 24-metilcolesta-5,24-dien-3 β -ol arrojaron resultados confusos; no se encontró marcación de tritio en withanólidos aislados de *Withania somnifera* a la que se administró 24-metilcolesta-5,24-dien-3 β -ol (28-³H) pero sin embargo se observó una gran pérdida de tritio del esteroide administrado luego de su reaislamiento de la planta. Por lo tanto no pudo descartarse totalmente a este esteroide como posible precursor de withanólidos. En la figura 52 se encuentra resumido el resultado de estos estudios biosintéticos.

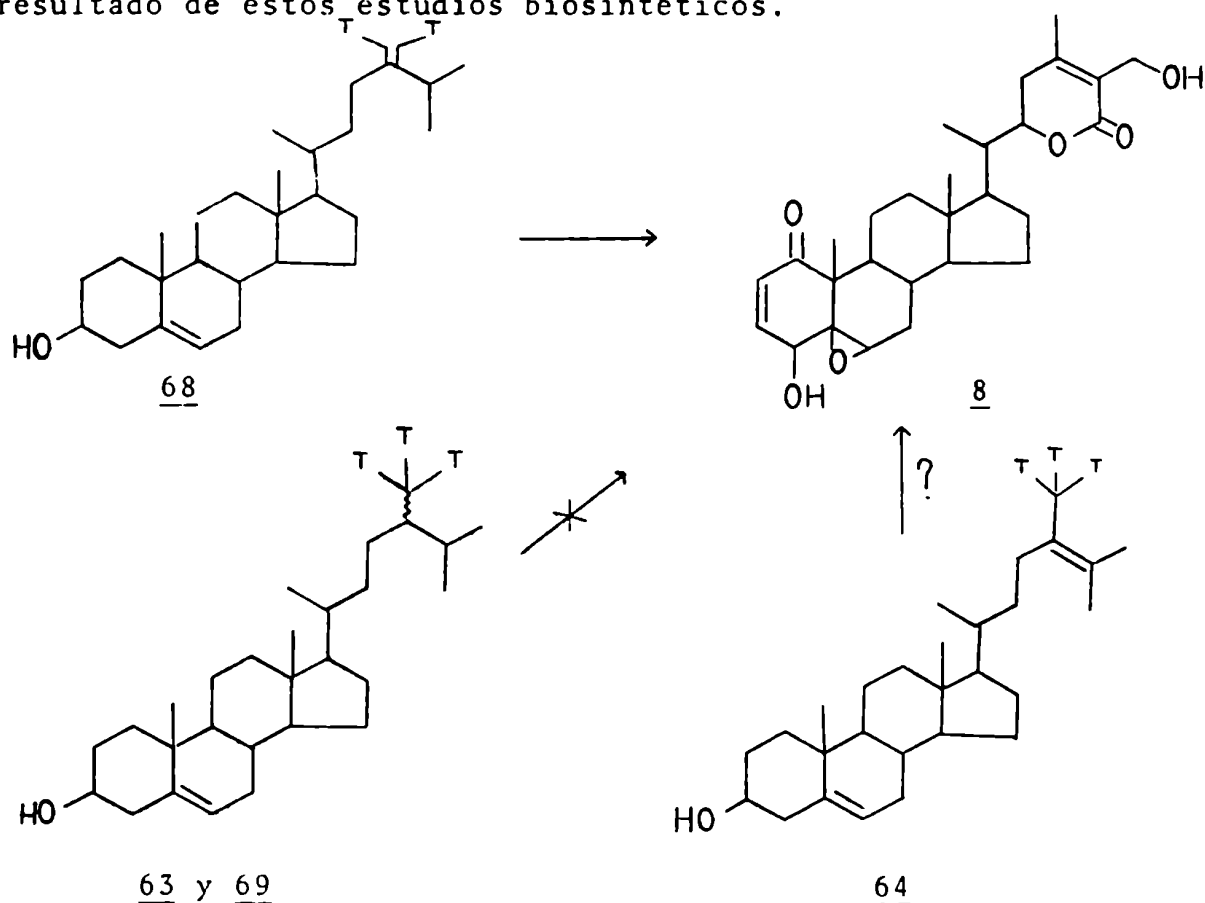


Figura 52: Posibles precursores de los withanólidos.

En un mismo experimento y con fines de comparación los autores administraron a plantas de *Withania somnifera* una mezcla de 24-metilencolesterol ($28\text{-}^3\text{H}$) y 3-(R,S)-mevalonolactona ($2\text{-}^{14}\text{C}$) y es interesante señalar que la relación de radioactividad $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ que es una medida de la incorporación relativa al esteroide de la mevalonolactona, no fue idéntica para el withanólido D 9, y withaferina A 8 sino que fue significativamente mayor para el primero.⁵⁸ Esto puede admitir variadas interpretaciones, por ejemplo puede representar una compartimentalización de los sitios de biosíntesis o bien de las reservas de precursores de los dos withanólidos, o podría deberse a diferentes efectos isotópicos que conducen a la withaferina A y el withanólido D.

Por otra parte aunque Vande Velde y colaboradores⁴⁴ consideraron, como se mencionó en el capítulo I (pág. 17), al ergosta-5,25-dien-3 β -24-diol 30 como posible precursor de withanólidos, la intervención de este esteroide o la de 24-metilencolesterol en la biosíntesis de withanólidos no fue confirmada. Sin embargo, si alguno de éstos u otro esteroide alquilado en C-24 estuviera presente en el camino que conduce a withanólidos, el último paso sería la oxidación de uno de los metilos proquirales (26 ó 27) a carboxilo, dando el anillo lactónico característico de estos compuestos.

En este trabajo de tesis se intentó determinar el origen biogénico de los carbonos 26, 27 y 28 de los withanólidos; con este fin se estudió la incorporación de tres precursores simples:

- a) (R,S)-mevalonolactona- $2\text{-}^{14}\text{C}$.
- b) D,L-metionina- $^{14}\text{CH}_3$.
- c) acetato de sodio- $1\text{-}^{14}\text{C}$.

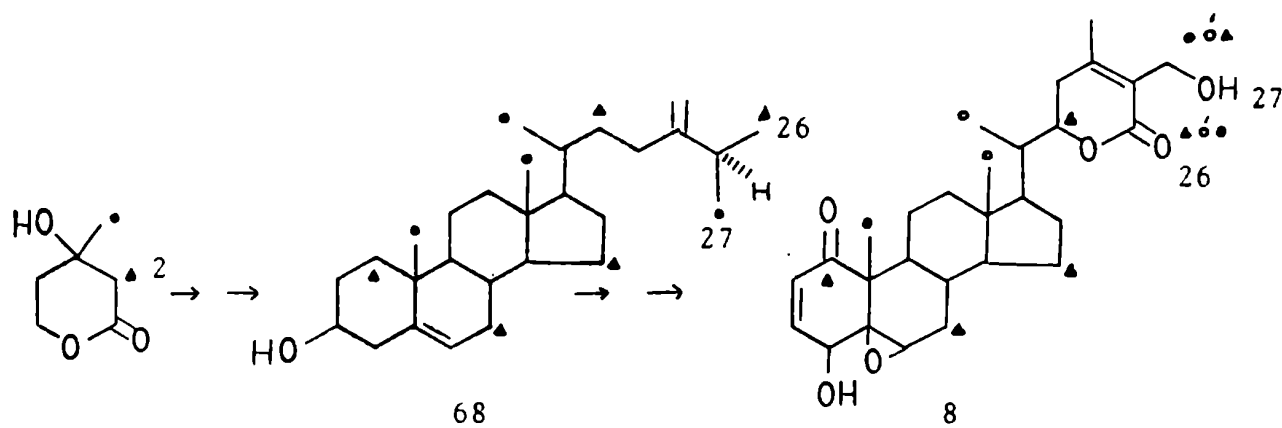


Figura 53: Posible origen biogénético de los carbonos 26 y 27 de los withanólidos.

Los carbonos 26 y 27 deberían provenir de los carbonos 2 y 3 de la mevalonolactona dependiendo de cuál de los metilos proquirales del esteroil precursor se oxide a carboxilo. En *Physalis peruviana* se ha establecido que el metilo pro R de varios 24-alkil esteroides proviene del carbono 2 de la mevalonolactona.⁸⁰ En la figura 53 se indican los carbonos involucrados tomando como ejemplo de esteroil precursor al 24-metilencolesterol y como withanólido biosintetizado a la withaferina A 8.

Por otra parte el origen biogénético de estos carbonos se podría determinar utilizando acetato de sodio-1-2-¹³C como precursor. Considerando la localización de marcas en el 24-metilencolesterol biosintetizado a partir de acetato-1-¹⁴C,⁸¹ el esqueleto withanólido quedaría marcado como se indica en la figura 54 si éste se biosintetizara a partir de dicho precursor simple.

Si se pudieran aislar withanólidos biosintetizados a partir de acetato de sodio-1,2-¹³C₂, quedarían marcados simultáneamente los carbonos 25 y 26 o 25 y 27 dependiendo del origen de estos car-

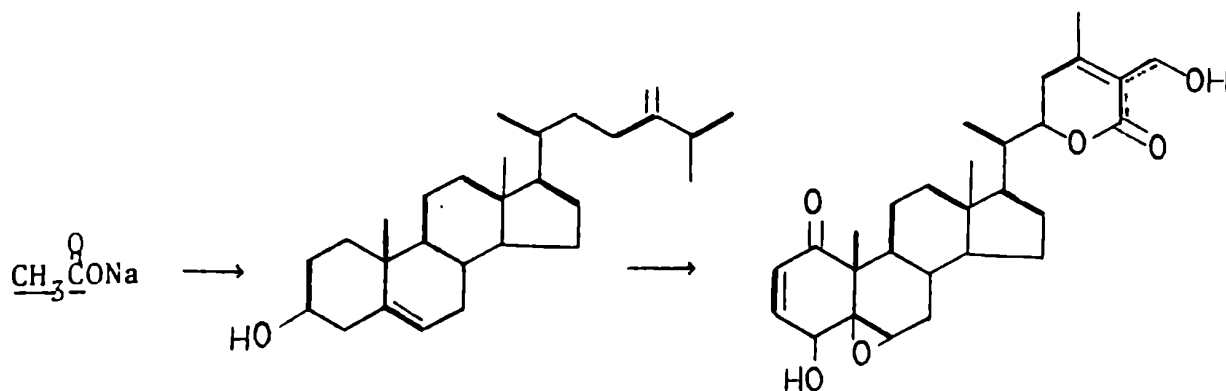


Figura 54: Posible distribución de la marca en withaferina A biosintetizada a partir de acetato-1-2- $^{13}\text{C}_2$ (los trazos gruesos indican unidades intactas de acetato).

bonos, el cual se podría discriminar por análisis de los acoplamientos ^{13}C - ^{13}C en el espectro de RMN- ^{13}C de dichos withanólidos. Se vería aumentado el tamaño de los satélites correspondientes a la señal del carbono 26 si los carbonos 25 y 26 provinieran de una misma unidad de acetato; en cambio si fueran los carbonos 25 y 27 los que derivaran de una unidad intacta de acetato se observaría un aumento de los satélites de acoplamiento correspondientes al carbono 27. Se debe recordar que estos satélites normalmente no se observan en compuestos naturales debido a la baja abundancia natural de unidades ^{13}C - ^{13}C la cual es aproximadamente 0,01%.

Por otra parte, el carbono 28 derivaría de una reacción de trasmetilación desde la S-adenosilmetionina hacia un esteroide precursor.^{82,83} Estudios realizados permiten suponer el mecanismo de alquilación esquematizado en la figura 55.

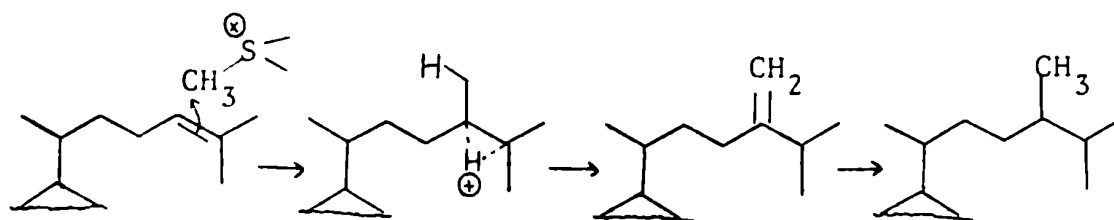


Figura 55: Posible mecanismo de alquilación de un estero1 precursor de withanólidos que daría lugar al carbono 28.⁸²

La incorporación de D,L-metionina-¹⁴CH₃ en el C-28 de withanólidos confirmaría esta suposición.

DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Para poder llevar a cabo los estudios biosintéticos mencionados anteriormente, fue necesario en primer lugar encontrar condiciones de cultivo reproducibles de las plantas de *Acnistus breviflorus* a partir de semillas provenientes de la provincia de Tucumán y realizar el análisis cuantitativo de los withanólidos presentes en las distintas etapas de crecimiento. Posteriormente se llevaron a cabo los ensayos de incorporación de precursores y las reacciones de degradación del esqueleto withanólido que permitieran aislar los carbonos de interés.

Condiciones de cultivo de las plantas de *Acnistus breviflorus*.Aislamiento, separación y análisis cuantitativo de los withanólidos

Con el fin de sistematizar las condiciones de cultivo, las semillas de *Acnistus breviflorus* se cultivaron en una cámara de crecimiento especialmente construída, como se describe en la parte experimental, haciéndolas germinar en tierra, arena y solución salina.⁸⁴ Teniendo en cuenta los resultados mencionados en el capítulo III, el aislamiento de los withanólidos se realizó por extracción directa de las plantas con éter etílico en frío durante 24 horas. En una primera etapa la separación de withanólidos se logró por cromatografía bidimensional del extracto según el método de Lockley⁵⁸ usando acetato de etilo-benceno (4:1) (o acetato de etilo-tolueno (4:1)) y metanol-cloruro de metileno (1:14) como solvente de desarrollo. Posteriormente la cuantificación de

los withanólidos se llevó a cabo por comparación cromatográfica con soluciones patrones utilizando placas de sílicagel de 250 μ m, o por CLAR mediante el método del estandar externo, ambos descritos en detalle en el capítulo III (ver pág51).

Contenido de withanólidos en las distintas etapas de crecimiento de las plantículas de *Acnistus brevisflorus*

El contenido de withanólidos en las distintas etapas de crecimiento de las plantículas de *Acnistus brevisflorus* se determinó por comparación cromatográfica con soluciones patrones. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 13 y 14. En ambos casos aparecen alrededor del día 15 manchas que revelan como withanólidos sin corresponder a ninguno de los patrones aislados de *Acnistus brevisflorus*, por lo que se podría tratar de probables precursores de los mismos. La planta biosintetizaría withanólidos en cantidad apreciable entre los días 14 y 18, lo cual indica que este sería el momento apropiado para obtener la máxima incorporación específica de precursores marcados. Más adelante se detallan experiencias realizadas con distintos trazadores marcados con ^{14}C que confirman esta suposición.

Tabla 13 : Germinación en solución salina

Edad días	0	3	6	9	12	15	18	24	
withaferina A <u>8</u> μgr/planta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	?	0,75	0,75	
jaborosalactona D <u>29</u> μgr/planta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	?	0,50 ^a 0,75	0,50 ^a 0,75	
jaborosalactona A <u>11</u> μgr/planta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	?	0,5	0,5	
							SEMILLAS	BROTOS	PLANTICULAS

Tabla 14: Germinación en arena

Edad días	0	12	15	18	24
withaferina A <u>8</u> μgr/planta	0,0	0,0	?	1,0 a 1,5 (0,5)*	1,0
jaborosolactona D <u>29</u> μgr/planta	0,0	0,0	?	1,0 (0,5)*	1,0
jaborosolactona A <u>11</u> μgr/planta	0,0	0,0	?	1,0 (0,5)*	1,0
	SEMILLAS	BROTOS		PLANTICULAS	(BROTOS)*

Ensayos de incorporación de precursores

Como se mencionó al comienzo de este capítulo, los estudios biosintéticos se basaron en el análisis de las incorporaciones de R,S-mevalonolactona-2-¹⁴C, D,L-metionina-¹⁴CH₃ y acetato de sodio-1-¹⁴C en withanólidos. A continuación se detallan los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

Incorporación de R,S-mevalonolactona-2-¹⁴C

Para estudiar la incorporación de mevalonolactona se probaron las siguientes formas de administración:

Método A: Vía tallos en hojas aisladas

Método B: Vía raíces de plantículas en arena

Método C: Vía raíces de brotes y plantículas en solución salina.

En el primer caso (método A) se sumergió el tallo de una hoja recién cortada en una solución acuosa del precursor. En el segundo caso (método B) las semillas de *Acnistus breviflorus*, previamente lavadas con una solución de hipoclorito de sodio se germinaron en arena calcinada, y la mevalonolactona-2-¹⁴C se administró en la solución de riego⁸⁴ en el momento deseado. Finalmente el método C consistió en sumergir las raíces de brotes o plantículas en una solución acuosa de mevalonolactona-2-¹⁴C. En la tabla 15 se resumen los resultados obtenidos al administrar mevalonolactona-2-¹⁴C de actividad específica 4,7 mCi/mMol y 53 mCi/mMol.

Entre los resultados que surgen de la tabla 15 cabe mencionar el hecho de que al aumentar el porcentaje de mevalonolactona-2-¹⁴C administrada, se observó mayor incorporación en withaferina A 8 (experiencias 1 y 2). Dado que las incorporaciones en withaferina A disminuyen luego del tercer día de administración (experiencias 3 a 7) se puede concluir que la withaferina A no se acumula en el vegetal sino que es metabolizada a otros compuestos distintos de jaborosalactona A 11 y jaborosalactona D 29. La mayor incorporación en masa observada al administrar mevalonolactona-2¹⁴C a plantículas de 15 días de edad (experiencias 5 a 7) estaría de acuerdo con los resultados mencionados anteriormente, según los cuales los withanólidos se biosintetizarían en cantidades apreciables entre los días 14 y 18 del proceso biosintético.

En las experiencias 8 a 9 el precursor se administró a una hoja de tres meses de edad según el método A, observándose un aumento notable en la incorporación en withaferina A entre las 17 y 24 horas de administración, mientras que entre las 24 y 48 horas de administración la incorporación para este withanólido se mantiene estable, por otra parte la incorporación en jaborosalactona A no varía significativamente entre las 17 horas y 48 horas de administración.

La estereoquímica de la mevalonolactona-2-¹⁴C que quedaba sin incorporar en las experiencias detalladas en la tabla 15, fue determinada sumergiendo nuevas plantas en el agua remanente en los vasos usados para administrar mevalonolactona-2-¹⁴C durante uno, dos y tres días. En las tres experiencias se aislaron withanólidos marcados, lo cual indicó que quedaba sin incorporar una mezcla de R,S mevalonolactona-2-¹⁴C.

Incorporación de D,L-metionina-¹⁴CH₃

En la tabla 16 se resumen los resultados obtenidos por administración de metionina-¹⁴CH₃ de actividad específica 5 mCi/mMol y 56,7 mCi/mMol a *Acnistus breviflorus*. En todos los casos los withanólidos se aislaron y cuantificaron por CLAR usando columnas de sílicagel (ver pág.51).

Analizando los resultados de la tabla 16 se observa que al administrar este precursor a plantículas de 15 días de edad (experiencia 1) la incorporación en masa fue muy superior a la obtenida en el resto de las experiencias (2 a 7) como era de esperar.

Si se compara la incorporación obtenida al administrar un pulso de metionina (experiencias 5, 6 y 7) con la obtenida en las experiencias 2, 3 y 4, se ve que en ambos casos la incorporación aumentó con el tiempo lo cual indicaría la existencia de una reserva interna grande de este precursor que diluye la metionina administrada en ambos casos. Comparando ambos grupos de experiencias se observa que las masas de withaferina A biosintetizadas son similares, lo cual indica que el sistema estaba usando toda su capacidad biosintética. Por otra parte las actividades específicas relativas fueron del mismo orden aumentando en el mismo sentido, lo cual indica que una vez que la metionina administrada se diluyó en la reserva interna existente, no sufrió nuevas diluciones y siguió los mismos caminos independientemente de la masa de metionina administrada.

Tabla 16 : Incorporación de metionina-¹⁴CH₃

	Edad	Metionina mCi/mMol	Tiempo horas	%Incorporación absoluta	WA 8	JLA 11	JLD 29	WA 8 mCi/mMol	WA 8 %inc. en masa
1	Plantúculas	5	26,5	48	0,034	0,009	0,026	0,0034	2,46
2	15 meses	5	81,0	24	0,037	---	0,017	0,0014	0,028
3	15 meses	5	79,1	48	0,064	---	0,020	0,0019	0,038
4	15 meses	5	55,0	48	0,050	---	0,032	0,0010	0,019
5	15 meses	56,7	20,5	15	0,054	0,090	---	0,017	0,030
6	15 meses	56,7	21,6	24	0,105	0,108	---	0,020	0,034
7	15 meses	56,7	16,5	48	0,210	0,198	0,046	0,030	0,053

El aislamiento y análisis cuantitativo de los withanólidos se realizó en todas las experiencias por CLAR usando columnas de sílicagel.

Incorporación de acetato de sodio-1-¹⁴C

En la tabla 17 se resumen los resultados obtenidos al administrar acetato de sodio-1-¹⁴C 50 μ Ci/mMol, a hojas provenientes de plantas de 1 año de edad según el método A. Nuevamente como en el caso de los otros dos precursores ya mencionados, se observó un aumento en la incorporación en withanólidos entre el primer y el tercer día de administración, principalmente en withaferina A 8. En base a estos resultados se administró acetato de sodio-1,2-¹³C₂ a 30 hojas según el método A, intentando determinar la incorporación del precursor por observación de los satélites originados en acoplamientos ¹³C-¹³C de unidades de acetato en espectros de RMN-¹³C a 75 MHz. Sin embargo los porcentajes de incorporación no fueron suficientes para distinguir las especies enriquecidas de la abundancia natural.

Incorporación de jaborosalactona A-¹⁴C

La comparación de los resultados obtenidos a distintos tiempos de administración de los tres precursores mencionados anteriormente a hojas de *Acnistus breviflorus*, sugieren que la jaborosalactona A 11 se biosintetizaría antes que la withaferina A. Para confirmarlo se realizaron distintas experiencias inoculando jaborosalactona A-¹⁴C, la cual se obtuvo por administración de mevalonolactona-2-¹⁴C a 10 hojas de *Acnistus breviflorus* según el método A. La withaferina A y jaborosalactona A radioactivas se aislaron por cromatografía en placa preparativa, realizándose luego una nueva purificación

Tabla 17 : Incorporación de acetato de sodio-1-¹⁴C.

	Edad meses	Acetato de sodio μCi/mMol	mgr	Tiempo horas	% Incorporación	WA <u>8</u>	JLA <u>11</u>	JLD <u>29</u>	WA <u>8</u> μCi/mMol
1	5	50	2,1	24	0,04	0,052	---		1,4
2	HOJAS	50	2,0	48	0,04	0,08	0,02		3,8
3	5	50	2,0	72	0,23	0,67	0,05		5,9

El aislamiento y análisis cuantitativo de withanólidos se realizó por CLAR mediante columnas de sílicagel.

de estos withanólidos en forma independiente. La misma se llevó a cabo por cromatografía en placa preparativa sobre sílicagel, usando como solvente de desarrollo una mezcla de acetato de etilo-hexano-isopropanol (30:3:2), la cual se vió que era apropiada en las separaciones por CLAR de estos compuestos sobre sílicagel. La jaborosalactona A radioactiva se purificó por CLAR preparativa y su pureza química y radioquímica se confirmó por RMN-¹H y CLAR preparativa donde la radioactividad coeluyó con el pico de jaborosalactona A. La withaferina A radioactiva se sometió a un proceso similar y se reservó para usarla en las reacciones de degradación.

La jaborosalactona A-¹⁴C se administró a una hoja de tres meses de edad según el método A y a 10 plantículas de 15 días de edad según el método C. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 18. En ambos casos se aislaron withaferina A y jaborosalactona A marcadas siendo semejantes los porcentajes de incorporación; en el segundo caso se aisló además jaborosalactona D marcada. La cantidad de withaferina A marcada en relación a la de jaborosalactona A marcada fue mayor en las inoculaciones a plantículas, lo cual está de acuerdo con los resultados anteriores (ver pág. 124) que indicaban la aparición de withaferina A 8 entre los días 15 y 18 de crecimiento.

En base a los resultados anteriores se puede decir que la jaborosalactona A sería biosintetizada inicialmente en las plantículas sin acumularse hasta el día 18 transformándose en esta etapa en withaferina A por hidroxilación en posición 4β. En hojas aisladas la jaborosalactona A-¹⁴C se diluiría con jaborosalactona A endógena y se convertiría en withaferina A por hidroxilación en posición 4β y en jaborosalactona D por apertura hidrolítica del epóxido.

Tabla 18 : Conversión de jaborosalactona A -¹⁴C por *Acnistus breviflorus*

	% Incorporación Absoluta		
	JLA <u>11</u>	WA <u>8</u>	JLD <u>29</u>
HOJAS	5,6	2,0	1,4
PLANTICULAS	3,4	3,1	-

Reacciones de degradación de withanólidos

Como se mencionó al comienzo de este capítulo, uno de los principales objetivos de los estudios biosintéticos realizados fue determinar el origen biogenético de los carbonos 26 y 27 de los withanólidos.

En base a los resultados obtenidos al incorporar los precursores simples mencionados anteriormente, se decidió trabajar con withanólidos radioactivos aislados de hojas de *Acanthopanax breviflorum* inoculadas con R,S-mevalonolactona-2-¹⁴C. Con el fin de aislar los carbonos 25, 26 y 27 y comparar sus actividades se sometieron a distintas reacciones de degradación a la withaferina A 8 y la jaborosalactona A 11.

Aislamiento de los carbonos 25, 26 y 27 como ácido glicérico

Degradación de withaferina A

La withaferina A se sometió al esquema degradativo indicado en la figura 56. El tratamiento de la misma con MeOH-AcONa seguido por acetilación con Ac₂O-Pir dió 2,3-dihidro-2,27-diacetoxi-3-metoxiwithaferina A 70 la cual fue ozonizada y el ozónido resultante reducido con zinc en ácido acético, obteniéndose el éster del ácido glicérico 71. La hidrólisis alcalina de este éster dió como productos la β-hidroximetilcetona 72 y ácido glicérico 73 (C-25, 26 y 27). Para hidrolizar dicho éster debieron buscarse las condiciones adecuadas; en todos los casos las hidrólisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

Al alcalinizar con CO_3HNa (pH:8) durante 1 hora, apareció un precipitado blanco gelatinoso debido a la presencia de sales de zinc, el cual fue filtrado al vacío por celite y el filtrado resultante extraído con diclorometano. No se detectó presencia de β -hidroximetilcetona 72 en esta fase ni de ácido glicérico en la fase acuosa. La ausencia de dichos productos de hidrólisis se debió a que los mismos habían quedado adsorbidos sobre las sales de zinc, lo cual se comprobó al disolver las mismas en medio ácido y analizar la solución resultante por ccd. Posteriormente la hidrólisis se llevó a cabo a pH:8 durante 45 minutos pero alcalinizando con NaOH 0,1 N y transcurrido este tiempo se acidificó la solución con ClH(d) hasta disolución total de las sales de zinc (pH:5) (evitando de esta manera la pérdida de los productos de hidrólisis por adsorción sobre las mismas). Luego de extraer con diclorometano se analizaron ambas fases por ccd observándose una hidrólisis incompleta del éster. En base a estos resultados se repitió el tratamiento anterior aumentando el tiempo de hidrólisis (2hs). Al analizar la fase acuosa por ccd se observó una sola mancha debida a la β -hidroximetilcetona 72 lo que indicaba una hidrólisis completa del éster; el ácido glicérico se identificó por cromatografía en papel (CP) con una muestra auténtica de ácido glicérico.

La β -hidroximetilcetona 72 se trató con Ac_2O -Pir obteniéndose una mezcla de productos. El análisis de la misma por $\text{RMN-}^1\text{H}$ indicaba la presencia de un producto minoritario correspondiente a la β -hidroximetilcetona acetilada 74 mientras que los dos productos mayoritarios (75 y 76), se originaron por deshidratación de la β -hidroximetilcetona 72.

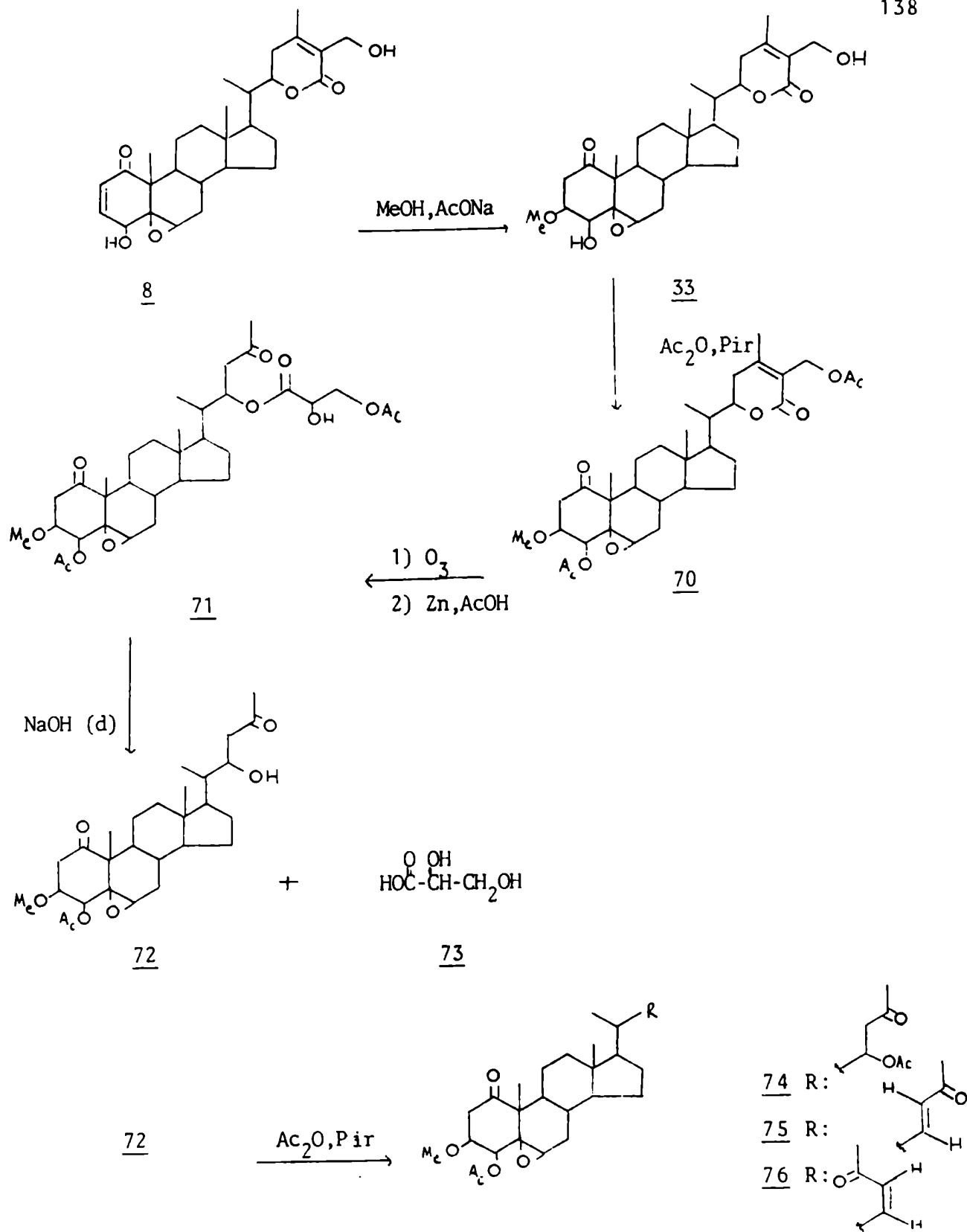


Figura 56: Aislamiento de los carbonos 25, 26 y 27. Degradación de withaferina A 8.

El aislamiento a partir de la fase acuosa y posterior ruptura del ácido glicérico se probó usando una muestra auténtica del mismo. La ruptura se llevó a cabo con IO_4Na en un recipiente cerrado originándose como productos de reacción formaldehído (C-27), dióxido de carbono (C-26) y ácido fórmico (C-25) como se indica en la figura 57.

Una vez finalizada la reacción, el balón de reacción se conectó a una serie de trampas y se pasó nitrógeno a través del sistema. El formaldehído y el dióxido de carbono se recogieron haciendo burbujear la corriente de nitrógeno a través de soluciones acuosas de dimedona 0,4% (derivado dimedona-formaldehído) y de $(\text{HO})_2\text{Ba}$ (CO_3Ba). Sin embargo parte del formaldehído quedó retenido en el balón de reacción y el mismo se aisló por agregado de una solución acuosa de dimedona 0,4% al contenido del balón ajustando previamente

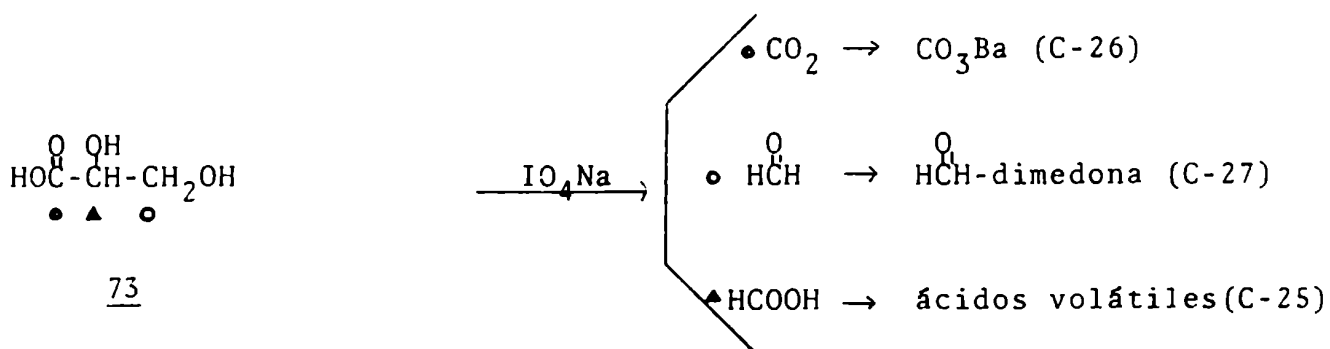


Figura 57: Ruptura del ácido glicérico.

te el pH a 6,5. La aparición del precipitado dimedona-formaldehído fue inmediata (previamente se comprobó que la presencia de IO_4Na no influía en la reacción). Una vez separado el precipitado de dimedona-formaldehído el filtrado se alcalinizó, se lavó con diclorometano descartándose esta fase, se ajustó a pH:2 y se liofilizó. El ácido fórmico se recogió junto con la fracción de ácidos volátiles que pudieran estar presentes en la solución.

En la tabla 19 se resumen las distintas condiciones probadas para la ruptura del ácido glicérico.

Tabla 19: Reacción de ruptura del ácido glicérico con IO_4Na

	pH reacción ^a	pH arrastre por N_2	$\overset{\text{O}}{\text{HCH}}$ -dimedona %	CO_3Ba %
1	3	3	0	0
2	6,5	6,5	15	10
3	5,8	5,8	20	25
4	5,8	3 (T amb)	55	45
5	5,8	3 (calor)	55	45

(a) El tiempo de reacción fue en todos los casos de 48 hs.

El mejor rendimiento de la reacción de ruptura con IO_4Na se obtuvo al trabajar a pH:5,8 usando buffer fosfato 0,2 M como medio de reacción. Se probó además llevar la mezcla de reacción a pH:3 antes de pasar N_2 , con el fin de favorecer la formación de CO_2 , lo que se comprobó al observarse una aparición más rápida de CO_3Ba (línea 4). El calentamiento de la mezcla de reacción durante el pa-

saje de N_2 no produjo diferencias apreciables en la evolución de CO_2 y H_2CO .

En base a los resultados obtenidos con una muestra auténtica de ácido glicérico, el aislamiento del mismo a partir de la fase acuosa derivada de la hidrólisis alcalina suave del éster 71 se llevó a cabo por acidificación a pH:5 y liofilización. El sólido se extrajo durante 24 horas con acetona y luego de filtrar y evaporar la solución a sequedad el residuo se redisolvió en buffer fosfato 0,1 M (pH:5,8). La ruptura con IO_4Na se llevó a cabo según las condiciones probadas para la ruptura del ácido glicérico.

Degradación de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A

La 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A 42 se sometió a una degradación similar a la anterior como se esquematiza en la figura 58. Se aisló ácido glicérico el cual se trató con IO_4Na como se describió anteriormente para la degradación de withaferina A 8 aislándose los carbonos 25, 26 y 27.

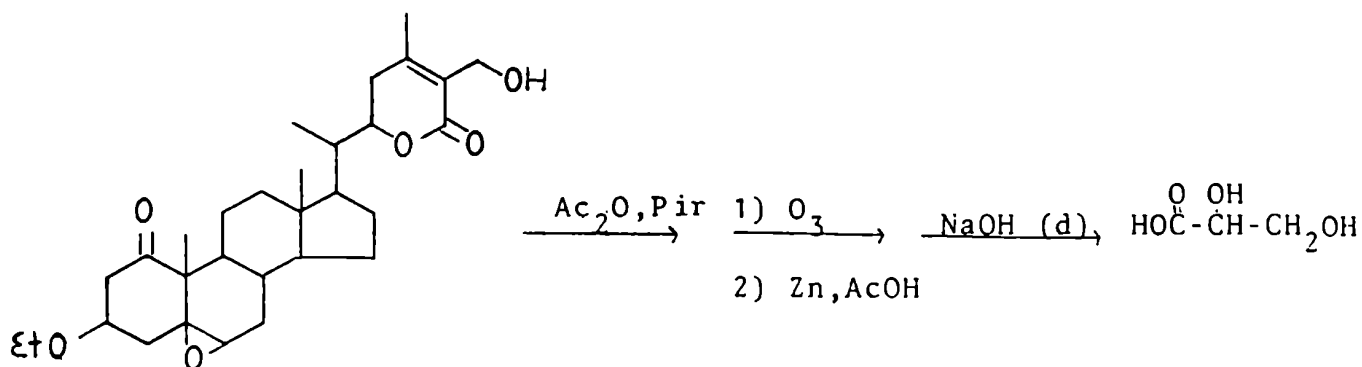


Figura 58: Aislamiento de los carbonos 25, 26 y 27. Degradación de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A.

Degradación de withaferina A radioactiva

La withaferina A 8 radioactiva se aisló a partir de hojas de *Acanthopanax breviflorus* inoculadas con mevalonolactona-2-¹⁴C como se detalló anteriormente (ver pág.134). La pureza química y radioquímica de la withaferina A sin diluir se confirmó por espectroscopía RMN-¹H y CLAR preparativa donde la radioactividad coeluyó con el pico de withaferina A. Luego de diluir con producto frío, se recristalizó hasta actividad constante y se sometió al esquema de degradación indicado en la figura 56. Como se detalló anteriormente el ácido glicérico se trató con IO₄Na aislándose formaldehído (C-27) como su derivado dimedona, dióxido de carbono (C-26) como carbonato de bario y ácido fórmico (C-25) junto con la fracción de ácidos volátiles. Las actividades específicas de la withaferina A y sus productos de degradación se indican en la tabla 20.

Tabla 20: Actividades específicas de withaferina A y sus productos de degradación obtenidos según el esquema indicado en la figura 56.

compuesto	Act. esp. (dpm/mMol)	Act. esp.rel.(%)
withaferina A <u>8</u>	$6,20 \times 10^6$	100
2,3-dihidro-3-metoxi- withaferina A <u>33</u>	$6,18 \times 10^6$	99,7
β -hidroximetilcetona <u>72</u>	$6,06 \times 10^6$	97,7
CO ₂ (C-26)	$9,9 \times 10^4$	1,6
H ₂ CO (C-27)	$1,0 \times 10^4$	0,16
HCO ₂ H	$1,3 \times 10^4$ a	0,20

(a) valor estimado de la radioactividad total de la fracción de ácidos volátiles

Los resultados resumidos en la tabla 20 indican que el carbono 26 se encuentra 10 veces más marcado que el carbono 27. Por otro lado los carbonos 25 y 27 tienen radioactividades comparables, lo cual indica una pequeña dispersión de la marca. Estos resultados demuestran que el carbono 26 deriva del carbono 2 de la mevalonolactona y dado que este carbono es estereoespecíficamente incorporado en el pro-R-metilo (C-26) de varios esteroides (sitosterol, 24-metilcolesterol, stigmasterol, α -spinasterol)⁸⁰ sería este metilo el que se oxida a carboxilo (C-26) en los withanólidos.

Por otra parte los valores de la tabla 20 muestran que la radioactividad total del ácido glicérico es menor que la esperada considerando que los withanólidos derivan de la mevalonolactona-2-¹⁴C a través del 24-metilcolesterol y deberían tener marcados los carbonos 1, 7, 15, 22 y 26. En este caso se esperaría encontrar en el ácido glicérico un 20% de la actividad presente en withaferina A. Los valores muy inferiores encontrados sugieren que existiría una ruta alternativa en la biosíntesis de withanólidos en *Acanthopanax breviflorus*, en la cual se rompería la cadena lateral de un esteroide precursor con pérdida del carbono 26, si bien los resultados anteriores no permiten establecer en que enlace de la cadena tiene lugar la ruptura.

Aislamiento de C-1 como ácido benzoico y del C-26 como benzofenona

Con el fin de comprobar la existencia de una ruta alternativa con ruptura de la cadena lateral, se compararon las actividades

del C-26 y del C-1 (perteneciente al núcleo esteroidal) aislados mediante un mismo camino degradativo de withanólidos marcados biosintetizados a partir de mevalonolactona-2-¹⁴C.

Si no hubiera ruptura de cadena, ambos carbonos provenientes del C-2 de mevalonolactona deberían tener actividades específicas equivalentes, en caso contrario la actividad específica del C-26 sería menor que la del carbono proveniente del núcleo esteroidal (C-1).

Degradación de withaferina A

La withaferina A se sometió al esquema degradativo indicado en la figura 59. Por tratamiento de la misma con MeOH-AcONa se obtuvo 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33. A una solución de la misma en THF, se agregó una solución de fenil-litio en el mismo solvente observándose inmediatamente la precipitación de la correspondiente sal de litio la cual sólo se redisolvió al calentar la mezcla de reacción a ebullición durante 1 hora bajo atmósfera de N₂, formando una solución marrón oscura.

Una solución de idéntico aspecto a la anterior se obtuvo por agregado de la solución de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33 en THF sobre un exceso de fenil-litio en THF. En estas condiciones se formó una suspensión fina marrón clara que luego de ser sometidas a ondas de ultrasonido a temperatura ambiente durante 2 horas dio una solución marrón oscura. En ambos casos se aisló un aceite marrón oscuro por evaporación del solvente, que se purificó por columna de sílicagel. El producto principal se analizó por RMN-¹³C

y si bien su espectro no pudo ser totalmente asignado, éste indicaba ausencia de grupos carbonilo y presencia de fenilos en la molécula. Este producto se oxidó con $\text{SO}_4\text{H}_2/\text{CrO}_3$, sometiéndose inmediatamente a una destilación por arrastre con vapor. La benzofenona y el ácido benzoico destilados se recogieron sobre una solución alcalina y se separaron posteriormente por extracción. La benzofenona (C-26) se derivatizó obteniéndose finalmente la oxima correspondiente. Luego de acidificar la solución acuosa, el ácido benzoico (C-1) se extrajo exhaustivamente con éter etílico. La presencia de ácido benzoico en el extracto etéreo se comprobó por ccd pero el mismo se aisló con muy bajo rendimiento y no fue posible su recristalización.

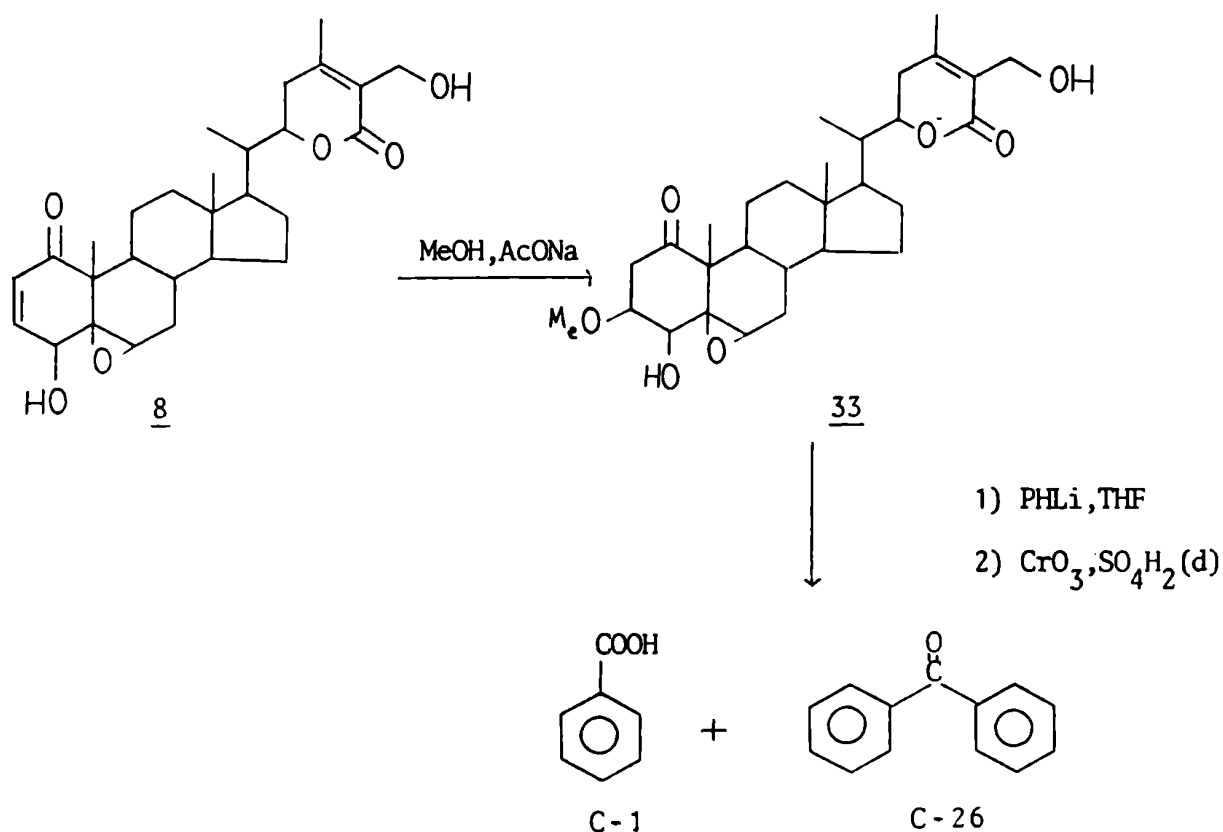


Figura 59: Aislamiento de los carbonos 1 y 26. Degradación de withaferina A **8**.

Degradación de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A 42

La 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A 42 se sometió a un esquema degradativo similar al anterior.

En este caso al agregar una solución de fenil-litio en THF sobre una solución de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A no se observó precipitación de la sal de litio como en el caso de la 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33, sino que se formó una suspensión fina que se transformó en una solución marrón oscura luego de someterla a ondas de ultrasonido durante tres horas a temperatura ambiente. Esto indicaría que la introducción de un hidroxilo en posición 4 β del esqueleto withanólido es crítica en la solubilidad de la sal formada. El producto de fenilación aislado en este caso se trató como se describió anteriormente aislándose la oxima de la benzofenona (C-26) y el ácido benzoico (C-1) con rendimientos similares.

Degradación de withaferina A radioactiva.Aislamiento de los carbonos 1 y 26

La withaferina A 8 radioactiva se aisló mediante una experiencia análoga a la mencionada anteriormente (ver pág. 134) administrando mevalonolactona-2-¹⁴C a 10 hojas de *Acanthopanax breviflorus* vía tallos. Se aislaron withaferina A radioactiva (I.A. 4,1%) y jaborosalactona A 11 radioactiva (I.A. 3,4%). Esta última se reservó para estudios posteriores. Luego de comprobar la pureza química y radioactiva como en el caso anterior, se diluyó con producto frío, se recrystalizó hasta actividad específica constante y se

sometió al esquema de degradación indicado en la figura 59.

El C-26 se aisló como oxima de benzofenona la cual se recristalizó hasta actividad constante. El C-1 se aisló como ácido benzoico pero debido al bajo rendimiento obtenido en el aislamiento no pudo ser recristalizado. Las actividades específicas de la withaferina A y sus productos de degradación se indican en la tabla 21.

Los resultados indicados en esta tabla apoyan la existencia de una ruta alternativa que involucra la ruptura de la cadena lateral de un esteroide precursor en el camino a withanólidos que conduce a withanólidos. En este caso la benzofenona (C-26) está 3,5 veces menos marcada que lo esperado para una única ruta sin ruptura de la cadena. La actividad específica del C-1 es mayor que la correspondiente a la del C-26 lo que está de acuerdo con lo dicho anteriormente. Dado que no se pudo calcular exactamente la actividad específica de este carbono, no fue posible determinar si en el esqueleto withanólido se conserva el C-22 radioactivo o este se pierde al producirse la ruptura de la cadena.

Tabla 21: Actividades específicas de withaferina A y sus productos de degradación obtenidos según el esquema degradativo indicado en la figura 59.

compuesto	Act. esp. (dpm/mMol)	Act. esp. rel. (%)
withaferina A <u>8</u>	$3,7 \times 10^6$	100
2,3-dihidro-3-metoxi- withaferina A <u>33</u>	$3,7 \times 10^6$	100
benzofenona (C-26)	$2,2 \times 10^5$	5,9
ác. benzoico (C-1)	$> 6,4 \times 10^5$	$> 17,3$

Discusión de los resultados obtenidos en los estudios biosintéticos.

El hecho de que las incorporaciones absolutas en withanólidos sean menores al cabo de 6 días de administración, para cualquiera de los precursores utilizados, que luego de 3 días de administración (tablas 15, 16 y 17, 128, 131, y 133), está indicando que withaferina A 8, jaborosalactona A 11 y jaborosalactona D 29 no deben ser consideradas como productos finales, sino como intermediarios que se convierten en otros withanólidos y/o en otros metabolitos distintos de los withanólidos. Las experiencias realizadas con jaborosalactona A-¹⁴C (tabla 18, ver pág.135) apoyan esta hipótesis, dado que en este caso sólo un 9% de la actividad administrada está presente en la mezcla de withanólidos aislados de hojas y un 6,5% en el caso de plantículas de 15 días de edad, lo que indica un metabolismo activo de estos compuestos.

Como se mencionó anteriormente la jaborosalactona A sería precursor de withaferina A y de jaborosalactona D como se esquematiza en la figura 60.

Según estas consideraciones debería reverse la hipótesis de Glotter y colaboradores⁴ según la cual un withanólido 4-desoxi-5,6-insaturado sería precursor de los 4-desoxi-5,6-epoxiwithanólidos como jaborosalactona A y por un camino biosintético diferente de los 4-hidroxiwithanólidos, como withaferina A (ver pág.15) Cuando se hizo esta propuesta se creía que, salvo en el caso de *Physalis peruviana*, las plantas que producían withanólidos con un sistema 4-hidroxi-5,6-epoxi, no tenían del tipo 4-desoxi-

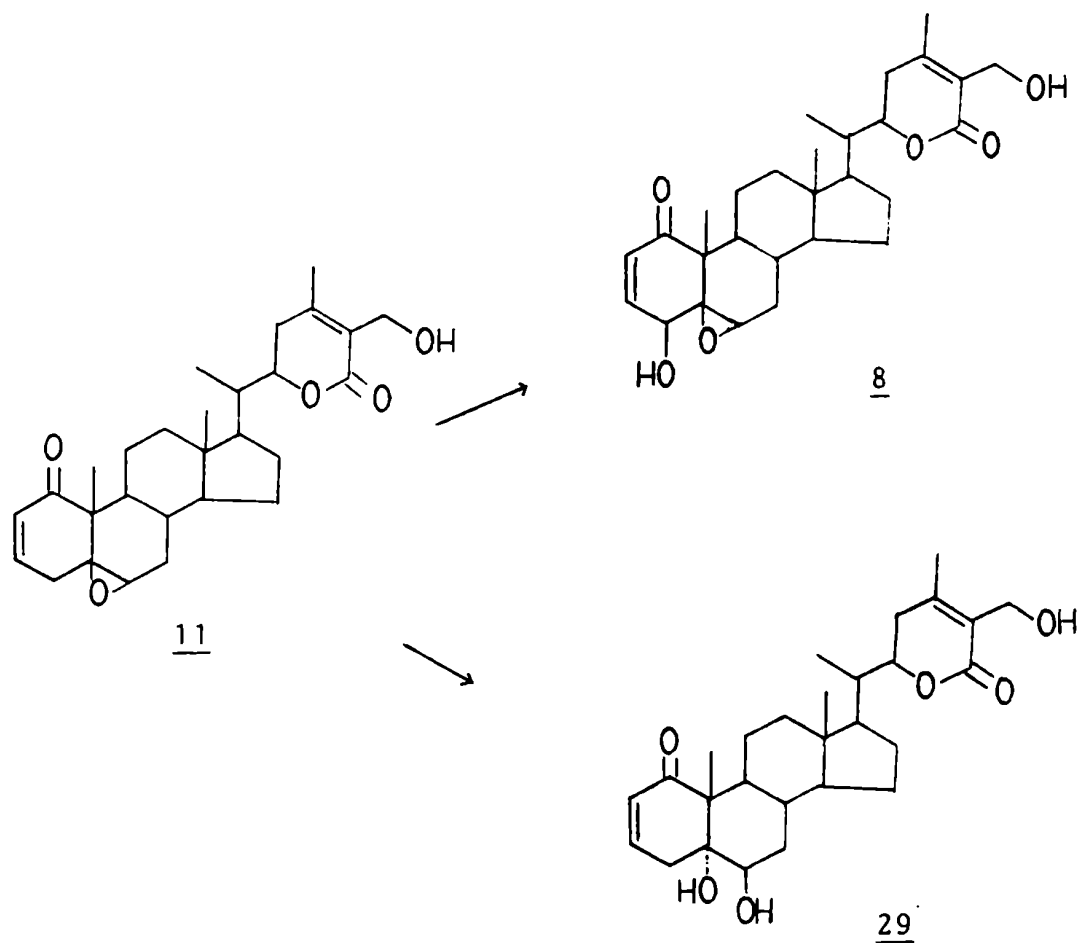


Figura 60: Jaborosalactona A como precursor de withaferina A y de jaborosalactona D.

5,6-epoxi (ver pág. 55). Recientemente fue propuesto un camino biosintético similar para la formación de withanólidos en plantas de *Withania somnifera*.¹⁰ Dado que en *Acnistus breviflorus* se encontraron ambos tipos de sistemas: 4-desoxi y 4-hidroxi-5,6-epoxiwithanólidos y teniendo en cuenta los resultados obtenidos según los cuales jaborosalactona A actúa como precursor de jaborosalactona D y de withaferina A, el camino biosintético propuesto por Lavie¹⁰ no se mantiene para esta planta. No se puede descartar sin embargo, la existencia de un withanólido 4-desoxi-5,6-insaturado como pre-

cursor de jaborosalactona A.

Las bajas incorporaciones obtenidas con acetato- $1-^{14}\text{C}$ y con metionina- $^{14}\text{CH}_3$ (tablas 16 y 17, ver pág.131 y 133) se pueden explicar considerando que estos precursores están involucrados en un número grande de caminos biosintéticos, muchos de los cuales son probablemente más activos que aquellos que conducen a withanólidos. La incorporación comparativamente alta de metionina- $^{14}\text{CH}_3$ en withanólidos en hojas aisladas comparada con las incorporaciones en plantículas de 15 días de edad, indica, como era de esperar, un metabolismo más activo de aminoácidos durante la germinación probablemente involucrados en la biosíntesis de proteínas.

En base a los resultados obtenidos en las degradaciones de withaferina A 8 (tablas 20 y 21, ver pág. 142 y 147) que sugieren la existencia de dos caminos alternativos para la biosíntesis de withanólidos, es necesario reconsiderar el rol del 24-metilencolesterol como precursor de los mismos.

Como se mencionó al comienzo de este capítulo, Lockley y colaboradores⁵⁸ incorporaron 24-metilencolesterol-($28-^3\text{H}$) en withanólidos, sugiriendo que los compuestos aislados habían retenido el carbono 28 del precursor. Sin embargo estos resultados deben ser considerados con precaución dado que la incorporación podría justificarse si hubiera ruptura de la cadena lateral de un esterol precursor entre los carbonos 24 y 25, lo cual implicaría un camino biosintético sin pérdida del carbono 28 del esterol precursor. Este tipo de ruptura justificaría además la baja actividad específica encontrada en ambas reacciones de degradación para el C-26 (tablas 20 y 21) y las bajas incorporaciones de D,L-metionina- $^{14}\text{CH}_3$ en withanólidos detallados en la tabla 15 (ver pág.128), suponiendo

do que el carbono 28 derive del metilo de la metionina. Sin embargo estas incorporaciones, al igual que la del 24-metilencolesterol-(28-³H) en withanólidos, se podrían originar también vía el camino minoritario con oxidación del C-26 a ácido carboxílico. Por otra parte, la incorporación del 24-metilencolesterol-(28-³H) podría además ser explicada por migración de tritio, pues no se realizó ninguna degradación para confirmar que el tritio estaba aún en carbono 28. Este último argumento está también respaldado por los resultados obtenidos por estos mismos autores con 24-metilcolesta-5,24-dien-3 β-ol-(28-³H)⁵⁸, pues en este último caso se observó pérdida de tritio en el esteroI al ser reaislado de la planta.

La ruptura de la cadena lateral con posterior reconstrucción del anillo lactónico no es un fenómeno inusual en la biosíntesis de lactonas esteroidales como en el caso de los cardenólidos^{85.86} y bufadienólidos de plantas⁸⁷ en los cuales están involucrados procesos similares. En estos procesos biosintéticos la cadena lateral del colesterol se rompe dando lugar a un intermediario pregnano el cual condensa luego a través del C-20 con acetato u oxalacetato para formar los anillos butenólido o bufadienólido respectivamente. En la figura 61 se esquematiza la formación del anillo butenólido de cardenólidos a partir de mevalonolactona-3-¹⁴C. El camino biosintético involucra la ruptura de la cadena lateral del colesterol formándose el anillo butenólido por incorporación de una unidad acetato.

En la figura 62 se representan algunos de los posibles caminos biosintéticos que conducirían a withanólidos a partir de mevalonolactona-2-¹⁴C y metionina-¹⁴CH₃.

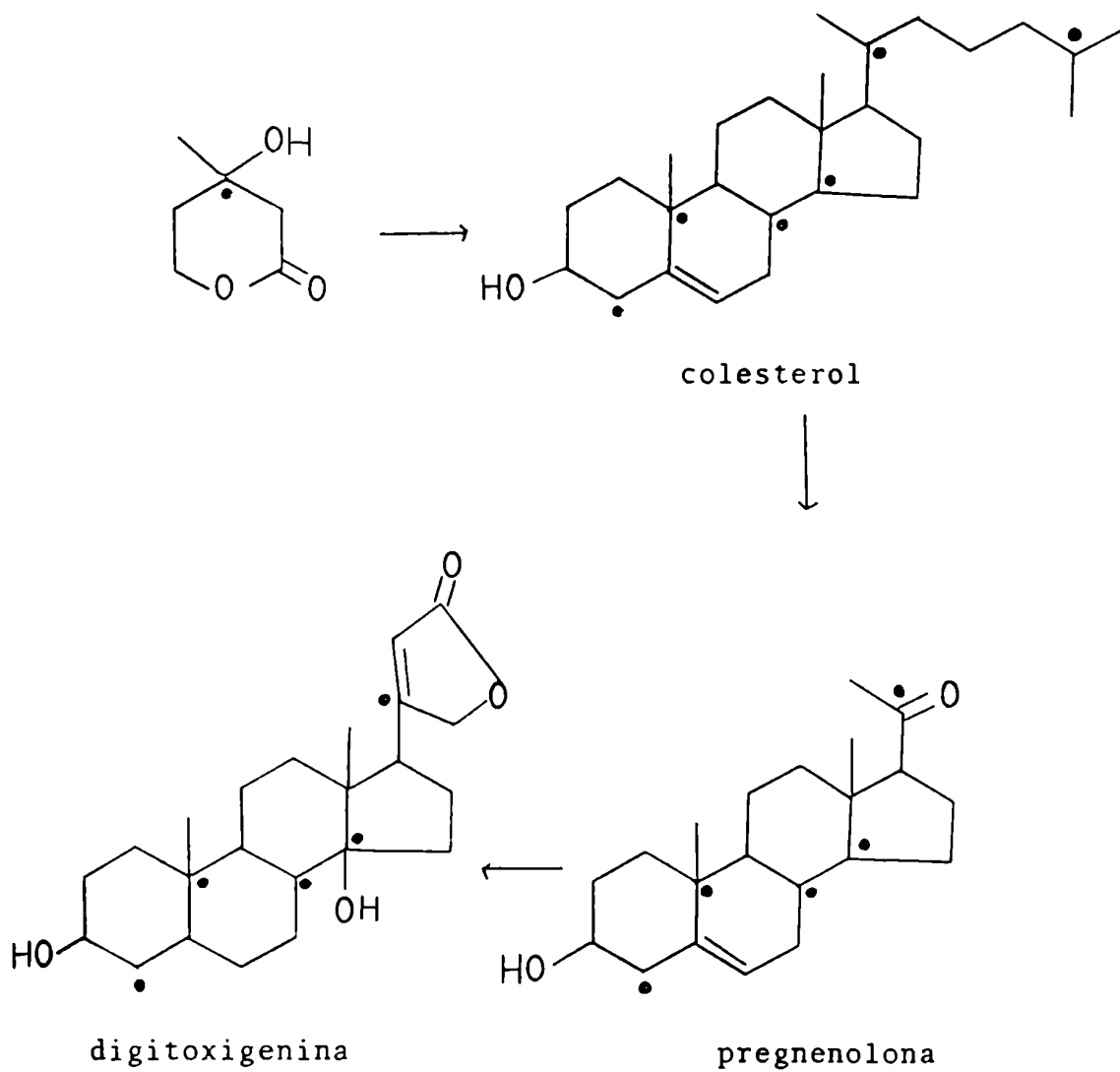


Figura 61: Biosíntesis de digitoxigenina a partir de mevalonolactona. 85,86

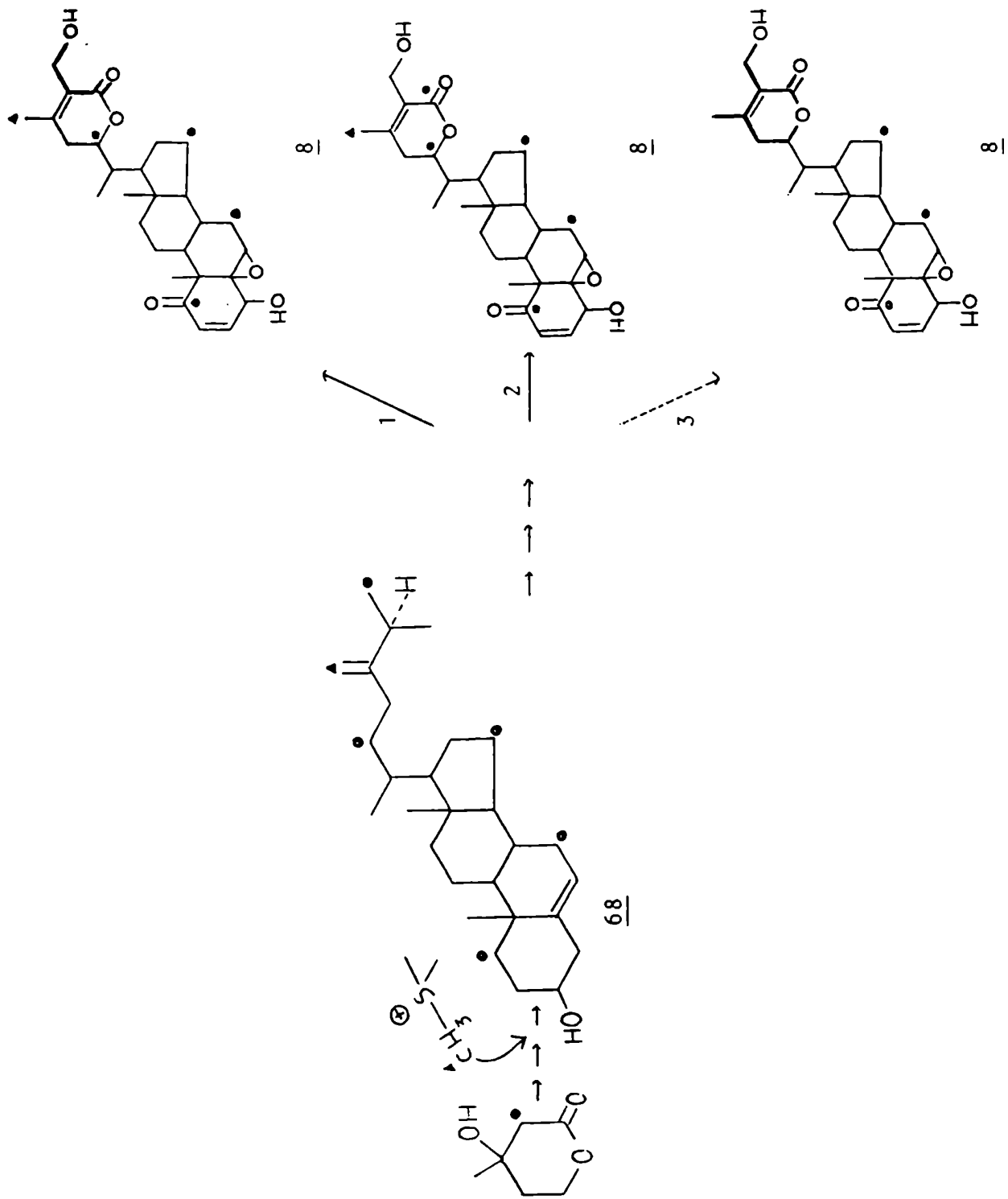


Figura 62: Camino 1: Ruptura del enlace 24,25; camino 2: Sin ruptura de cadena; camino 3:

Otras rupturas posibles

CAPITULO V
PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentos y métodos empleados

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

Los espectros de resonancia magnética protónica (RMN- ^1H) se efectuaron a 100 MHz con un Varian XL-100 o a 500 MHz en un Bruker WH-500; los espectros de resonancia magnética nuclear ^{13}C (RMN- ^{13}C) se realizaron a 25,2 MHz, en un espectrómetro Varian XL-100 o a 75 MHz en un Bruker WB-300.

En todos los espectros de resonancia magnética nuclear se usó tetrametilsilano como referencia interna, y el solvente que se indica en cada caso. Los desplazamientos químicos se expresan en (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

Las abreviaturas usadas en la descripción de los espectros son: s: singulete; d: doblete; dd: doble doblete; ddd: doble doblete; t: triplete; c: cuarteto; m: multiplete y ba: banda ancha.

Los espectros de masas (EM) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro Varian Mat CH-7A con inserción directa.

Todos los solventes fueron purificados por destilación y evaporados a presión reducida a menos de 45 °C. Las mezclas de solventes están expresadas en relación de volúmenes.

Métodos cromatográficos

Cromatografía en capa delgada (ccd)

Se utilizaron placas preparadas con sílicagel G (Merck), de un espesor aproximado de 250 μm , preparadas por inmersión en una suspensión de la misma en una mezcla de Cl_2CH_2 -MeOH (3:1), así como cromatoplasmas de sílicagel Alugram Sil G/uv 254 de 250 μm de espesor y Alugram Nano-Sil G/uv 254 de 200 μm .

Se utilizaron además cromatoplasmas en fase reversa de alta resolución marca Merck HPTLC-RP 18.

Para trabajos preparativos se usaron placas preparadas con sílicagel 60 PF 254 (Merck) de 2 mm de espesor, activadas 1 hora a 105° y placas preparadas marca Merck.

Como reveladores universales se usaron:

- a- SO_4H_2 - H_2O (1:1)
- b- vapores de iodo

Como reveladores específicos se usaron:

- c- verde de bromocresol en etanol 0,04%
- d- 2,4-dinitrofenilhidrazina en ClH 2N
- e- MnO_4K - IO_4Na

Los sistemas de desarrollo utilizados fueron:

sistema 1: acetato de etilo-hexano-isopropanol (30:3:2)

sistema 2: acetato de etilo

sistema 3: cloruro de metileno-metanol (14:1)

sistema 4: cloruro de metileno-metanol (10:1)

sistema 5: etanol- $\text{Cl}_2\text{CH}_2\text{-NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ (53:30,3:15,2:1,5)

sistema 6: cloruro de metileno-metanol (97:3)

sistema 7: hexano-acético (96:4)

Cromatografía en papel

La cromatografía en papel (CP) se realizó utilizando papel Whatman N°1, desarrollando con una mezcla de acetato de etilo-ác. acético-ác. fórmico-agua (18:3:1:4) (sistema 8).

Cromatografía en columna

Los rellenos utilizados fueron sílicagel 60 (63-200 μm), sílicagel H (Merck, 10-40 μm) eluidas bajo presión con aire comprimido y columnas preparadas Lobar Lichroprep Si 60 B (40-63 μm) eluidas bajo presión usando una bomba impulsora de solvente marca Prominent-Electronic 1001 SCJ provista de un amortiguador de pulsos; los solventes de elución se indican en cada caso.

Cromatografía líquida de alta resolución

Las experiencias realizadas mediante cromatografía de alta resolución (CLAR) se llevaron a cabo en un cromatógrafo líquido

1084B Hewlett Packard, equipado con un detector de onda variable operando a 260 nm, un inyector de volumen variable con un sistema automático y un colector automático de fracciones y en un cromatógrafo Micromeritics equipado con un detector de índice de refracción, un inyector manual 730 y una bomba impulsora de solvente.

Las columnas usadas para trabajos analíticos y preparativos (hasta 150 μ gr) fueron una Li Chrosorb Si 100, 10 μ m (250x4,6 mm (DI) Hewlett Packard y otra empaquetada con un empaquetador de columnas Micromeritics 705.

En trabajos preparativos a mayor escala se usó una columna Alltech R-Sil 18 HL 10 μ m (500x10 mm DI) y una Altex Ultrasphere ODS 5 μ m (250x10 mm DI).

Las medidas de radioactividad se realizaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3003, o un Tracor Analytic Marck III. Las muestras se disolvieron en una mezcla de 1 ml de agua y 14 ml de solución centellador de dioxano que contenía naftaleno (50 gr), 2,5-difeniloxazol (3,5 gr) y 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno (0,150 gr) por cada 500 ml.

Las muestras radioactivas no eluidas de la sílica se suspendieron en idéntica solución y se agregaron 500 mgr de gelificante Cab-O-Sil para evitar la sedimentación del sólido.

La L-metionina(metil-¹⁴C) 56,7 mCi/mMol y la R,S-(2-¹⁴C)-mevalonolactona, 53 mCi/mMol fueron adquiridas a Amersham Inter-

national Limited. La D,L-metionina-(metil- ^{14}C), 5 mCi/mMol, se obtuvo por dilución de la anterior con el producto frío.

La R,S-(2- ^{14}C)-mevalonolactona 48,6mCi/mMol fue adquirida a New England Nuclear Corp.

La R,S-(2- ^{14}C)-mevalonolactona 4,7 mCi/mMol se preparó a partir de N-N'-dibenciletilendiamonio-bis(3,5-dihidroxi-3-metilpentanoato), 9,5 mCi/mMol, adquirido a New England Nuclear Corp.

El acetato de sodio-1- ^{14}C (50mCi/mMol se adquirió a la Comisión Nacional de Energía Atómica y el acetato de sodio-1-2- ^{13}C (90atom% ^{13}C) a Merck Sharp and Dohme Canada Limited.

AISLAMIENTO, SEPARACION Y
ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE
WITHANOLIDOS

Material vegetalExtracto etéreo

1,830 kg de hojas frescas recolectadas en el mes de diciembre en la zona de "Horco Molle" a 20 km de la ciudad de Tucumán, provenientes de cuatro plantas diferentes, se colocaron en éter etílico en un lapso no mayor de cuatro minutos luego de ser cortadas. Se dejaron en lugar fresco una semana. Se separó la fase acuosa y se hizo una segunda extracción igual a la primera.

Los extractos reunidos en ambas extracciones, fueron concentrados a 650 ml por destilación a baño maría y luego bajo nitrógeno obteniéndose un extracto húmedo de 45 grs.

Este se llevó a seco obteniéndose un residuo verde oscuro de 25gr.

Dicho extracto se purificó por columna de sílica H (30 gr) eluidas con aire comprimido. Se sembró en pastilla usando 50 gr de sílicagel y se eluyó con hexano-acetato de etilo desde una relación 100-0 hasta 0-100, acetato de etilo-isopropanol y metanol sucesivamente, obteniéndose las siguientes fracciones.

Fracción N°	masa (gr)	constituyentes principales
1	2,00	ceras y colorantes
2	0,98	withanólidos menos polares que JLA <u>11</u> y colorantes
3	9,47	JLA <u>11</u> y colorantes

Fracción N°	masa (gr)	constituyentes principales
4	4,55	WA <u>8</u> , JLA <u>11</u> y colorantes
5	3,40	WA <u>8</u> , JLD <u>29</u> y colorantes
6	2,80	JLD <u>29</u> y colorantes
7	0,80	compuestos más polares que JLD <u>29</u> y colorantes

La fracción 1 contenía ceras y colorantes amarillos, los cuales no fueron analizados.

La fracción 2 presentaba manchas que revelaban como withanólidos y eran menos polares que jaborosalactona A 11. Su análisis detallado será objeto de estudios posteriores.

La fracción 3 estaba constituida principalmente por jaborosalactona A y colorantes; 5gr de esta fracción se recromatografiaron por columna de sílica H (100 gr). Se separaron dos fracciones principales una constituida fundamentalmente por jaborosalactona A (1,489 gr) y otra por una mezcla de jaborosalactona A y withaferina A 8 (0,825 gr). Las fracciones intermedias no fueron analizadas.

La fracción 4 contiene principalmente jaborosalactona A y withaferina A. Se recromatografió por columna de sílicagel H (100 gr) aislándose dos fracciones principales: una constituida principalmente por jaborosalactona A (0,634 gr) y otra por una mezcla de jaborosalactona A y withaferina A (0,724 gr). Las fracciones intermedias no fueron analizadas.

La fracción 5 estaba constituida principalmente por withaferina A y jaborosalactona D. Parte de esta fracción, así como parte de

las fracciones mezcla de withaferina A y jaborosalactona A aisladas de las fracciones 3 y 4 fueron purificadas por CLAR en fase reversa y los withanólidos puros se usaron en reacciones de síntesis

Las fracciones 6 y 7, fracciones intermedias no analizadas, junto con la fracción 2, serán estudiadas posteriormente en nuestro laboratorio.

Extractos alcohólicos

Se utilizaron fracciones obtenidas según la técnica de Bukovits⁶² constituidas por mezclas complejas de withanólidos y colorantes.

Purificación de un extracto metanólico

De un extracto metanólico, prepurificado sobre sílicagel 60 (Merck), se aisló una mezcla compleja de withanólidos. Esta se purificó por CLAR en fase reversa como se indica a continuación.

columna: Alltech R-Sil 18 HL 10 μ m (500 \times 10 mm)

eluyente: metanol-H₂O (70:30)

flujo: 4 ml/min

masa total de withanólidos: 55 mgr

CLAR(compuesto, Tr (min)): 29, 13,5; 8, 15; 33+37, 17; 43, 21; 40, 26; 32, 31.

Separación de la mezcla 33+37

columna: Altex Ultrasphere ODS 5 μ m (250 \times 10 mm)

eluyente: metanol-H₂O (70:30)

flujo: 4 ml/min

masa total: 5 mgr

CLAR(compuesto, Tr(min)): 33, 8,5; 37, 9.

Purificación de un extracto etanólico

Como en el caso anterior se purificó por CLAR una mezcla compleja de withanólidos obtenida a partir en este caso de un extracto etanólico sobre sílicagel 60 (Merck).

columna: Alltech R-Sil 18 HL 10 μ m (500 \times 10 mm)

eluyente: metanol-agua (70:30)

flujo: 4 ml/min

masa total de withanólidos: 50 mgr.

CLAR(compuesto, Tr(min)): 34, 13,5; 8, 15; 37, 16,5; 42, 22,5; 40,
26; 44, 28; 32, 31.

Identificación de los withanólidos aislados. Datos espectroscópicosWithaferina A 8

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: 0,72 (3H, s, Me-18), 1,05 (3H, d, J=7Hz Me -21), 1,42 (3H, s, Me-19), 2,04 (3H, s, Me-28), 4,37 (2H, s, H-27), 4,44 (2H, dt, J=3 y 12Hz, H-22), 6,22 (1H, d, J_{2,3}=10Hz, H-2), 6,95 (1H, dd, J_{2,3}=10Hz, J_{3,4}=5Hz, H-3), 3,77 (1H, d, J=5Hz, H-4) 3,22 (1H, ba, H-6).

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver Tabla 6.

jaborosalactona A 11

RMN-¹H (100MHz, DCCl₃) ppm: 0,74 (3H,s, Me-18), 1,04 (3H,d, J=6Hz, Me -21), 1,28 (3H, s, Me-19), 2,08 (3H, s, Me-28), 4,40 (2H, s, H-27), 4,44 (2H, dt, J=3 y 12Hz, H-22), 6,02 (1H-dd, J_{2,3}=10Hz, J_{2,4}=3Hz, H-2), 6,86 (1H, ddd, J_{3,2}=10Hz, J_{3,4α}=7Hz, J_{3,4β}=3Hz, H-3), 3,15 (1H,ba, H-6).

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 6.

jaborosalactona D 29

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: 0,78 (3H, s, Me-18), 1,03 (3H,d, J=6Hz, Me-21), 1,34 (3H,s, Me-19), 2,08 (3H, s, Me-28), 4,39 (2H,s, H-27), 4,46 (2H, dt, J=3 y 12Hz, H-22), 5,91 (1H, dd, J_{2,3}=10Hz, J_{2,4}=2Hz, H-2), 6,62 (1H, ddd, J_{2,3}=10Hz, J_{2,4α}=5Hz, J_{3,4β}=2Hz, H-3), 3,67 (1H,ba, H-6).

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 6.

jaborosalactona E 32

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: 0,78 (3H, s, Me-18),
 1,05 (3H, d, J=7Hz, Me-21), 1,41 (3H, s, Me-19), 2,09
 (3H, s, Me-28), 4,38 (2H, s, H-27), 4,46 (2H, dt, J=3 y
 12Hz, H-22), 5,94 (1H, dd, J_{2,3}=10Hz, J_{2,4}=3Hz, H-2), 6,70
 (1H, ddd, J_{2,3}=10Hz, J_{3,4 α} =6Hz, J_{3,4 β} =2,5Hz, H-3), 3,90
 (1H, ba, H-6).

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 6.

2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33

RMN-¹H (100MHz, DCCl₃) ppm: 0,68 (3H, s, Me-18), 0,98 (3H, d,
 J=6Hz, Me-21), 1,29 (3H, s, Me-19), 1,29 (3H, s, Me-19),
 2,05 (3H, s, Me-28), 4,38 (2H, s, H-27), 4,46 (2H, dt,
 J=3 y 12Hz, H-22), 2,61 (2H, dd, H-2)
 3,7 (1H, m, H-3), 3,5 (1H, m, H-4), 3,27 (1H, ba, H-6),
 3,35 (3H, s, CH₃O-).

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: 209,8 (C-1), 39,6 (C-2), 77,5
 (C-3), 75,9 (C-4), 64,9 (C-5), 60,1 (C-6), 29,8 (C-7),
 31,2 (C-8), 42,8 (C-9), 50,4 (C-10), 21,5 (C-11), 27,3
 (C-12), 42,7 (C-13), 56,0 (C-14), 24,2 (C-15), 39,1 (C-16),
 52,0 (C-17), 11,5 (C-18), 15,5 (C-19), 38,8 (C-20), 13,3
 (C-21), 78,7 (C-22), 29,4 (C-23), 153,0 (C-24), 125,7
 (C-25), 167,0 (C-26), 57,4 (C-27), 20,0 (C-28), 56,8
 (C-3-OCH₃).

2,3-dihidrowithaferina A 34

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 7.

E.M. m/e (%); ver tabla 9.

6α-cloro5β-hidroxiwithaferina A 37

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 7.

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 8.

E.M. (%): ver tabla 9.

Tratamiento de 37 con AcOH-AcONa a reflujo

Una solución de 6α-cloro-5β-hidroxiwithaferina A 37 (8mgr) en AcOH glacial (3ml) se reflujoó 20 horas con AcONa anhidro (10gr). Se dejó luego 10 horas a temperatura ambiente hasta completar la reacción, se volcó sobre agua (20ml), se secó sobre SO₄Mg y se extrajo con Cl₂CH₂. Se obtuvo un producto homogéneo por ccd (sistema 2), que se identificó como 6α-cloro-5β-hidroxiwithaferina A diacetilada 59 (9,7 mgr).

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 7.

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 8.

5,6-desoxiwithaferina A 40

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 7.

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 8.

Acetilación de 5,6-desoxiwithaferina A

Se acetiló 5,6-desoxiwithaferina A 40 (2,6mgr) con anhídrido acético-piridina. El producto se extrajo con Cl₂CH₂, se purificó por placa usando una mezcla Cl₂CH₂-MeOH 5% como solvente de desarrollo. El producto principal se recuperó de la sílica por elución en columna con Cl₂CH₂, identificándose como diacetato de 5,6-desoxiwithaferina A 60 (3,7mgr).

RMN-¹H(100 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 7

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 8

E.M.(%): ver tabla 9.

2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A 42

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 10.

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 11.

5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 43 (p.f. 200-201°C; AcOEt).

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 10.

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 11.

E.M. (%): ver tabla 12.

Obtención de 43 por tratamiento de jaborosalactona A 11 con MeOH-SO₄H₂.

A una solución de jaborosalactona A 11 (5,9mgr) en metanol (4ml) se le agregó SO₄H₂ 8N (0,03ml). Se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente, se volcó sobre CO₃HNa acuoso (5ml) y se extrajo con Cl₂CH₂. Se observó un producto homogéneo por ccd (sistema 1) de propiedades idénticas al 5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 43 (6 mgr).

5 α -etoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 44 (p.f. 203-204°C; AcOEt).

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 10.

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver tabla 11.

E.M. (%): ver tabla 12.

Purificación de una fracción cruda de jaborosalactona A 11
obtenida a partir de un extracto metanólico de *Acnistus breviflorus*.

La fracción cruda (150mgr) se prepurificó por columna Lobar Lichroprep Si 60 B (40-63 μ m) eluída bajo presión.

Se trató luego por CLAR en fase reversa usando una columna Alltech R-Sil 18 HL 10 μ m (500 \times 10 mm) y una mezcla MeOH-H₂O (80:20) para eliminar los colorantes. Se aisló una fracción constituida principalmente por jaborosalactona A 11 y dihidrojaborosalactona A 45, la cual se separó por CLAR según las siguientes condiciones:

columna: Alltech R-Sil 18 HL 10 μ m (500 \times 10mm).

eluyente: MeOH-H₂O (70:30)

flujo: 5 ml/min

CLAR compuesto (masa, Tr): 45 (14,6; 9,14); 11 (68,5; 11,14).

2,3-dihidrojaborosalactona A 44 (p.f. 180-182°C;AcOEt).

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) : ver tabla 10.

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃): ver tabla 11.

E.M. (%) : ver tabla 12.

Obtención de dihidrojaborosalactona A 45

A una solución de jaborosalactona A 11 (10mgr) en dioxano (1ml) se añadió una solución prerreducida de óxido de platino (6mgr) en dioxano (1ml). La mezcla se hidrogenó 1 hora a 1 atm con agitación, se filtró y evaporó. La dihidrojaborosalactona A se aisló del producto obtenido por CLAR en fase reversa.

BIOSINTESIS DE
WITHANOLIDOS

Material vegetal

Las semillas de *Acnistus breviflorus* (Griseb) utilizadas provienen de la provincia de Tucumán recolectadas en el mes de diciembre durante los años 1980 y 1981.

Ensayos de germinación

1-Condiciónes generales de germinación y desarrollo

El crecimiento de las plantas se realizó en una cámara de acrílico, con circulación forzada de aire caliente. Su temperatura interna se reguló a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en el centro de la cámara, siendo la temperatura en el nivel inferior de 23°C .⁸⁸

Las plantas recibieron luz natural, suplementada con dos tubos fluorescentes Sylvania tipo Gro Lux, de 20W cada uno. Los ciclos de luz y oscuridad se regularon mediante un reloj interruptor, en 12 cada uno.

2-Prueba del poder germinativo

Las semillas de *Acnistus breviflorus* se sembraron en una bandeja de plástico llena de tierra y se cubrieron con una capa fina de arena. Se agregó agua periódicamente para mantener la humedad de la tierra.

En estas condiciones creció normalmente un 80% de las plantas apareciendo las primeras raíces entre los días 10 y 13 posteriores a la siembra.

Al mes las plantas se transplantaron individualmente a macetas con tierra abonada en donde siguieron un desarrollo normal

Este método, aunque permite el desarrollo de las plantas, no parecía ser muy adecuado para la inoculación de precursores marcados por la gran cantidad de microorganismos presentes que pudieran falsear los resultados.

3-Germinación y desarrollo en arena

Las semillas de *Acnistus breviflorus* se sumergieron 2 minutos en una solución al 1% de hipoclorito de calcio y luego se lavaron con agua destilada.

A continuación se sembraron sobre arena lavada y calcinada y se humedeció periódicamente el sistema con solución salina⁸⁴ compuesta por sustancias orgánicas e inorgánicas, previamente esterilizada.⁸⁴

En estas condiciones germinaron un 50% de las semillas apareciendo las primeras raíces entre los días 10 y 13 posteriores a la siembra y los primeros cotiledones alrededor del día 15. A partir del día 25 las plantas comenzaron a secarse siguiendo su desarrollo normal sólo si eran transplantadas previamente a tierra.

4-Germinación y desarrollo en solución salina

30 semillas de *Acnistus breviflorus* se esterilizaron por inmersión en una solución acuosa al 1% de hipoclorito de calcio durante 2 minutos.

A continuación se sumergieron en solución nutriente contenida en crisoles de 10 mm de diámetro previamente lavados con etanol

y esterilizados en estufa a 110 °C durante 1 hora. Los crisoles se cubrieron con papel aluminio.

Las primeras raíces aparecen entre los días 4 y 5 posteriores a la siembra y las plantículas entre los días 10 y 13, germinando aproximadamente el 50% de las semillas.

Luego de aproximadamente 20 días comienzan a aparecer hongos y las plantas no siguen su desarrollo normal.

5-Conclusiones acerca del proceso de germinación y desarrollo

Las plantas destinadas a realizar experiencias con hojas, se cultivaron en tierra en bandejas de plástico y fueron transplantadas alrededor del mes de edad a macetas pequeñas y luego a macetas más grandes.

Las plantas destinadas a ser inoculadas se sembraron en arena o solución salina y se transfirieron a recipientes cilíndricos de 2 cm de ancho y 3 cm de altura en el momento de la inoculación.

Inoculación de precursores marcados

Obtención de mevalonolactona a partir de N,N'-dibenciletilediamonio bis (3,5)dihidroxi-3-metilpentanoato

La sal (14,3mgr, 9,4mCi/mMol) se disolvió en agua (220µl) y se le agregó una solución salina de hidróxido de sodio 1N (60 µl).

La N,N'-dibenciletilediamina se removió extrayendo con etér etílico. La solución acuosa se trató en batch con resina Amberlite IR 120 H⁺ y se agitó controlando el pH hasta pH final 6-6,5. La solución se filtró a través de algodón, se lavó varias veces con H₂O destilada y se liofilizó obteniéndose R,S-mevalonolactona-2-¹⁴C (3,4 mgr, 4,7mCi/mMol).

Administración de precursores simples

A hojas vía tallos

El tallo de una hoja recién cortada se aplastó en su extremo y sumergió en (0,3-0,5 ml) de solución acuosa del precursor simple R,S -mevalonolactona 2-¹⁴C (4,7 y 53 mCi/mMol) ,D,L-metionina-¹⁴CH₃ (5 y 56,7 mCi/mMol) o acetato de sodio-1-¹⁴C (0,05 mCi/mMol, contenida en un recipiente de vidrio descrito anteriormente (ver pág.174)

Las cantidades de radioactividad inoculadas y los tiempos de administración se indican en las Tablas 15, 16 y 17 (cap. IV). El agua evaporada se fue reponiendo periódicamente.

A plantículas vía raíces en arena

10 plantículas pequeñas se colocaron en un recipiente idéntico al usado en el método anterior el cual contenía una capa de arena calcinada de 0,5 cm de altura.

La mevalonolactona-2-¹⁴C (4,7 mCi/mMol) se disolvió en agua y se suministró como solución de riego vía raíces.

Las cantidades de radioactividad inoculadas y tiempos de administración se indican en la tabla 15 (cap. IV). El agua evaporada se repuso periódicamente.

A plantículas vía raíces en solución salina

10 plantículas se sumergieron en una solución de R,S-mevalonolactona-2-¹⁴C (4,7 mCi/mMol) o D,L-metionina-¹⁴CH₃ (5 mCi/ mMol) en solución salina (0,3-0,4 ml) contenida en un recipiente como los descritos anteriormente. Las cantidades de radioactividad inoculadas y tiempos de administración se indican en la tabla 15 (cap. IV). El agua evaporada se repuso periódicamente.

Aislamiento de los withanólidos marcados

Las hojas y plantículas inoculadas se lavaron cuidadosamente con H₂O y se extrajeron con éter etílico (10 ml por hoja o cada 10 plantículas) durante 24 horas.⁵⁸ Luego de decantar y evaporar el éter, el residuo se purificó según los siguientes métodos:

- por ccd bidimensional usando como solventes de desarrollo acetato de etilo-benceno (4:1) o acetato de etilo-tolueno (4:1) y cloruro de metileno-metanol (14:1).

b) El residuo se redisolvió en acetato de etilo y se filtró a través de una columna de sílicagel 60 usando acetato de etilo como eluyente. La solución se llevó a 1 ml y se purificó por CLAR usando una columna Li Chrosorb Si 100 10 μ m (250 \times 4,6 mm) y una mezcla acetato de etilo- hexano- isopropanol (30:3:2) como eluyente.

Administración de R,S-mevalonolactona-2-¹⁴C a 10 hojas de *Acnistus brevisflorus*

Experiencia 1: 10 hojas de *Acnistus brevisflorus* recién cortadas se sumergieron en una solución acuosa de R,S-mevalonolactona-2-¹⁴C (53 mCi/mMol, 143 μ Ci) durante 3 días. Transcurrido este lapso se extrajeron los withanólidos como se indicó anteriormente.

Los principales withanólidos, withaferina A 8 y jaborosalactona A 11, se aislaron por ccd preparativa en sílicagel usando cloruro de metileno-metanol (14:1) y purificándose luego por ccd en sílicagel usando una mezcla de acetato de etilo- hexano-isopropanol (30:3:2) como solvente de desarrollo cada una de las fracciones anteriores.

La withaferina A radioactiva (5,6 mgr; 3,85 10^8 dpm/mMol; inc. absoluta 2,9%) y la jaborosalactona A radioactiva (4.0 mgr, 5,18 $\times 10^8$ dpm/mMol; inc. absoluta 2,9%) tenían idénticas propiedades al ser analizadas por CLAR y RMN-¹H que los respectivos patrones.

2 mgr de la withaferina A radioactiva se diluyeron con material frío (120 mgr) y se recrystalizó hasta actividad específica cons-

tante ($6,20 \times 10^6$ dpm/mMol) la cual se reservó para usar en reacciones de degradación.

La jaborosalactona A radioactiva se purificó por CLAR y se utilizó en experiencias de incorporación.

Experiencia 2: En una experiencia análoga a la anterior se administró R,S-mevalonolactona-2- ^{14}C (48,6 mCi/mMol, 143 μCi) a 10 hojas de *Acnistus breviflorus* recién cortadas.

Se aisló withaferina A radioactiva (9,5 mgr, $3,2 \times 10^8$ dpm/mMol; inc. absoluta 4,1%) y jaborosalactona A radioactiva (13 mgr, $1,8 \times 10^8$ dpm/mMol; inc. absoluta 3,4 %). 2,5 mgr de la withaferina A radioactiva se diluyeron con material frío (210 mgr) y se recrystalizaron hasta actividad específica constante ($3,7 \times 10^6$ dpm/mMol).

Administración de ^{14}C -jaborosalactona A

Se utilizó ^{14}C -jaborosalactona A ($5,1 \times 10^8$ dpm/mMol) obtenida a partir de R,S-mevalonolactona-2- ^{14}C (53 mCi/mMol) como se describió anteriormente (experiencia 1).

Administración vía hojas

La jaborosalactona A radioactiva (0,0032 μCi) se disolvió en 200 μl de agua. Se agregaron 2 gotas de Tween 20 y se sometió a ondas de ultrasonido.

Se sumergieron en la misma 2 hojas durante 24 horas; los withanólidos se extrajeron con éter etílico en frío y aislaron por CLAR como se describió anteriormente.

Administración vía plantículas

La jaborosalactona A radioactiva (0,0032 μ Ci) se disolvió en 200 μ l de agua. Se agregaron 2 gotas de Tween 20 y se sometieron a ondas de ultrasonido.

Se sumergieron en la misma 10 plantículas de 15 días de edad durante 3 días. La extracción y aislamiento de withanólidos son análogos a la experiencia anterior.

Secuencia degradativa para la obtención de los carbonos 25, 26 y 27.Aplicación a withaferina A 8a) Obtención de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33

La withaferina A 8 (50 mgr) se disolvió en una solución de acetato de sodio 0,05N en metanol (10ml). Se calentó durante 9 horas a reflujo y se dejó luego 12 horas a temperatura ambiente con agitación.

Se evaporó el metanol y se extrajo con cloruro de metileno. Por evaporación del solvente se obtuvo un producto cristalino, homogéneo por ccd (sistema 3) que se identificó como 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33 (58,3 mgr).

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: ver pág.

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: ver pág.

b) Acetilación de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A

La 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33 (58,3 mgr) se acetiló con anhídrido acético (1,5 ml) y piridina (1,5 ml), durante 24 horas a temperatura ambiente protegiendo de la luz. Se volcó luego la mezcla de reacción sobre ácido clorhídrico-H₂O (1:10) y se extrajo con cloruro de metileno. Luego se secó sobre sulfato de magnesio y filtrar, se evaporó el solvente. Se obtuvo un producto homogéneo por ccd (sistema 3) que se identificó como el diacetato de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 70 (68mgr).

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: 0,68 (3H,s,Me-18), 0,98 (3H,d,J=6,5 Hz, Me-21), 1,28 (3H,s, Me-19), 2,08 (3H,s,Me-28), 2,09 (3H,s, CH₃CO₂), 2,70 (2H,m,H-2), 3,27 (1H,ba, H-6), 3,41 (3H,s,CH₃O), 3,60 (1H,m,H-3), 4,37 (1H,dt,J=12 y 4 Hz, H-22), 4,63 (1H,d,J=2,5 Hz, H-4), 4,87 (2H,s,H-27).

c) Ozonólisis reductiva del diacetato de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A

El diacetato de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 70 (68 mgr) se disolvió en una mezcla de cloruro de metileno-acetato de etilo (1:1) (75 ml) y se ozonolizó durante 1 hora 30 minutos a 0°C hasta desaparición del producto de partida por ccd (sistema 4). Se observó una mancha blanca en el origen al revelar con iodo debida a la presencia del ozónido. Este se disolvió en ácido acético 50% (15ml) y se agregó polvo de zinc (50 mgr).

Se calentó una hora con aire caliente y se dejó 24 horas a 25 °C en oscuridad. La mezcla de reacción se llevó luego a pH:8 con solución de hidróxido de sodio 0,1 N. Se observó aparición de un precipitado blanco. Se dejó 2 horas a temperatura ambiente con agitación y se extrajo con cloruro de metileno. Se llevó a pH:5 con ácido clorhídrico y se extrajo nuevamente con cloruro de metileno, el cual se unió al extracto anterior.

La fase acuosa se reservó para tratamiento posterior. (ver ruptura de ácido glicérico, pág.184).

La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó el solvente. Se obtuvo un producto homogéneo por ccd (sistema 3) que se identificó como la β -hidroxicetona 72 (45 mgr).

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃): 0,68 (3H,s,Me-18), 0,98 (3H,d,J=6,5Hz Me-21), 1,20 (3H,s,Me-19), 2,09 (3H,s,CH₃CO₂), 2,20 (3H, s, CH₃CO), 2,46 (2H,d,J=6Hz, H-23), 2,80 (2H,m,H-2), 3,28 (1H,ba,H-6), 3,41 (3H,s,CH₃O), 3,62 (1H,m,H-3), 4,20 (1H, m,H-22), 4,63 (1H,d,J=2,5 Hz,H-4)

RMN-¹³C (25,2 MHz, DCCl₃) ppm: 208,6 (C-1), 40,6 (C-2), 76,4 (C-3), 75,4 (C-4), 61,4 (C-5), 58,6 (C-6), 30,9 (C-7), 31,2 (C-8), 43,2 (C-9), 51,0 (C-10), 20,7 (C-11), 27,4 (C-12), 42,6 (C-13), 56,1 (C-14), 24,3 (C-15), 39,1 (C-16), 52,9 (C-17), 11,7 (C-18), 14,1 (C-19), 42,7 (C-20), 12,7 (C-21), 68,9 (C-22), 43,5 (C-23), 210,3 (C-24), 29,3 (C-25), 57,1 (C-3-OCH₃), 169,5 (C-4-COCH₃), 21,1 (C-4-COCH₃).

d) Acetilación de la β -hidroximetilcetona 72

La β -hidroximetilcetona 72 (16,3 mgr) se disolvió en piridina (0,3ml) y se agregó anhídrido acético (0,3 ml). Se dejó la mezcla de reacción 24 hs en oscuridad con agitación. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico-H₂O (1:20) y se extrajo con cloruro de metileno. Al analizar el producto por ccd (sistema 4) se observó una mezcla de productos (10 mgr). El análisis de la misma por RMN-¹H indicaba la presencia de un producto minoritario correspondiente a la β -hidroximetilcetona acetilada 74 mientras que los dos productos mayoritarios se originaron por la deshidratación de la hidroximetilcetona (75 y 76).

RMN-¹H (100 MHz, DCCl₃) ppm: 0,68 (s, Me-18, 75 y 76), 0,70 (s, Me-18, 74), 1,27 (s, Me-19); 2,01 (s, CH₃CO₂-22, 74), 2,08 (s, CH₃CO₂), 2,11, 2,18, 2,22 (s, Me-25), 4,63 (d, H-4), 5,35 (m, H-22, 74), 6,0 (d, H-23 J_{23,22}=16Hz), 6,16 (d, H-23 J_{23,22}=10Hz), 6,64 (dd, H-22, J_{22,23}=16Hz J_{22,20}=9Hz), 7,06 (dd, H-22 J_{22,23}=10Hz J_{22,20}=6Hz).

e) Aislamiento de los carbonos 25, 26 y 27. Ruptura del ácido glicérico.

La fase acuosa reservada anteriormente (pág.182) se liofilizó y se extrajo durante 24 horas con acetona. Una alícuota del extracto se analizó por CP junto con ácido glicérico patrón (sistema 8). Al revelar con $\text{IO}_4\text{Na-MnO}_4\text{K}$ se observó una mancha amarillenta que coincidió a la debida al ácido glicérico patrón.

Por análisis de otra alícuota por ccd (sistema 5) se observó una mancha amarilla que coincidía con la originada por el ácido glicérico patrón al revelar con verde de bromocresol en etanol 0,04%. Se evaporó la acetona y el residuo (mezcla de ácido glicérico y sales) se disolvió en buffer fosfato 0,1M (pH:5,8) (2ml) y se agregó IO_4Na (120 mgr). La solución se dejó en oscuridad a 25 °C durante 48 horas.

Se llevó luego a pH:3 con ácido clorhídrico diluido y por pasaje de nitrógeno se recogió el carbonato de bario (12 mgr) provenientes del C-26, formado por captura en una trampa conteniendo solución saturada de hidróxido de bario. Este se filtró sin entrar en contacto con el aire. El contenido restante del balón de reacción se filtró, el filtrado se llevó a pH:6,5 y se agregó al filtrado una solución acuosa de dimedona 0,4% (5ml). El precipitado formado se filtró obteniéndose el derivado dimedona-formaldehído a partir del formaldehído proveniente del C-27 (20 mgr).

La solución acuosa se alcalinizó con solución acuosa de hidróxido de sodio, se lavó con cloruro de metileno descartándose esta fase, se ajustó el pH a 2 y se liofilizó. El ácido fórmico proveniente del C-25 se aisló junto con el resto de ácidos volátiles.

Aislamiento de los carbonos 25, 26 y 27 a partir de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A.

f) Acetilación y ozonólisis de la 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A 42

La 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A 42 (38 mgr) se acetiló con anhídrido acético-piridina (1:1) (3ml). Se obtuvo un producto homogéneo por ccd (sistema 3), el cual fue ozonolizado luego de disolverlo en una mezcla de cloruro de metileno- acetato de etilo (1:1) (75 ml). El ozónido resultante se disolvió en ácido acético 50% (10 ml) y se agregó polvo de zinc (25 mgr).

El éster del glicérico resultante se hidrolizó en medio alcalino, separándose luego el esteroide por extracción con cloruro de metileno. La fase acuosa se reservó para posterior ruptura de ácido glicérico.

g) Ruptura del ácido glicérico.

La fase acuosa se trató como se detalló en el ítem (e) (ver pág.184). Se aisló el carbonato de bario (6,7mgr) (C-26), el derivado dimedona-formaldehído (12 mgr) (C-27) y el ácido fórmico (C-25) junto con el resto de los ácidos volátiles.

h) Aplicación de la secuencia degradativa descripta a withaferina A radioactiva.

Se partió de withaferina A 8 radioactiva (40 mgr, $6,20 \times 10^6$ dpm/mMol) y se agregó una solución de acetato de sodio 0,05 M en metanol (12 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo 9 horas y se dejó luego 12 horas a temperatura ambiente. Se evaporó a sequedad y el residuo se suspendió en cloruro de metileno y se filtró. Por evaporación del solvente se obtuvo 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A. El tratamiento de la misma con anhídrido acético-piridina (1:1) (2ml) por 16 horas a temperatura ambiente dió diacetato de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 70 (48 mgr, $6,18 \times 10^6$ dpm/mMol). Este compuesto se disolvió en acetato de etil-cloruro de metileno (1:1) (75 ml) y se ozonizó a 0°C durante 90 minutos. Se evaporó el solvente y el ozónido resultante se trató con polvo de zinc (35 mgr) y ácido acético 50% (10 ml). Luego de 24 horas a 25 °C se llevó a pH:8 por agregado de una solución de hidróxido de sodio 0,1 N y la mezcla se agitó durante 2 horas. La solución se acidificó con ácido clorhídrico diluído hasta pH:5 y se extrajo con cloruro de metileno. Por evaporación del solvente se obtuvo la β -hidroximetilcetona 72 (32 mgr, $6,06 \times 10^6$ dpm/mMol). La fase acuosa se liofilizó a sequedad y el residuo se extrajo exhaustivamente con acetona. El residuo obtenido por evaporación del solvente se disolvió en buffer fosfato 0,1M (pH=6) (3ml) y se trató con IO_4Na (120 mgr). Después de 48 horas a 25 °C se burbu-

jeó nitrógeno, previa acidificación con ácido clorhídrico diluído hasta pH:3. El dióxido de carbono se recolectó como carbonato de bario (7,6 mgr, $9,90 \times 10^4$ dpm/mMol). El resto de la mezcla de reacción se llevó a pH:6,5 y se agregó solución acuosa de dimedona 0,4%. El derivado dimedona-formaldehído se filtró y se recristalizó de metanol acuoso (13,1 mgr, 9514 dpm/mMol).

La solución acuosa se alcalinizó con NaOH(d) se lavó con cloruro de metileno descartándose esta fase, se ajustó el pH a 2 y se liofilizó. La fracción de ácidos volátiles tenía una radioactividad total de 1100 dpm.

Secuencia degradativa para aislar los carbonos 1 y 26.

Degradación de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A

i) Reacción de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A con fenil-litio

A una solución de fenil-litio (5mmol) en THF (2ml) recién destilado, contenida en un balón pequeño cerrado con un tapón de látex reversible, bajo atmósfera de nitrógeno, se agregó por medio de una jeringa una solución de 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona A 42 (36 mgr) en THF (2 ml) manteniendo la mezcla de reacción a 0°C. Se sometió la misma a ondas de ultrasonido hasta formación de una suspensión homogénea y luego a temperatura ambiente con agitación durante 3 horas. Se volcó sobre hielo (reacción exótermica). Se llevó luego a leve acidez con ácido clorhídrico 2 N y se extrajo con cloruro de metileno. Se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y evaporó el solvente. Se obtuvo un producto marrón claro aceitoso. El análisis por ccd (sistema 6) mostró una mancha principal y algunos productos minoritarios al revelar con SO_4H_2 50%, observándose la desaparición total del producto inicial. Se purificó la mezcla por columna de sílicagel (eluyente cloruro de metileno con cantidades crecientes de metanol) y se aisló el producto principal. El espectro RMN- ^{13}C de dicho producto no pudo ser totalmente asignado, pero en el mismo se detectaron presencia de fenilos y ausencia de carbonilo.

j) Oxidación y aislamiento del C-26 como benzofenona y del C-1 como ácido benzoico.

El producto de fenilación se suspendió en ácido sulfúrico 10% (7ml) y se agregó CrO_3 (1,5 gr). La mezcla se destiló inmediatamente bajo corriente de nitrógeno y se recogió en un balón conteniendo hidróxido de sodio 10% (5ml). Se agregó agua al balón de reacción para que su volumen se mantuviera entre 7 y 10 ml, hasta recoger unos 60 ml de destilado. Este destilado alcalino se extrajo con éter y se llevó a seco obteniéndose gotas aceitosas. El análisis por ccd (sistema 2) mostró una mancha que coincidía con la de la benzofenona patrón al revelar con 2,4-dinitrofenilhidrazina en ClH 2N.

La benzofenona cruda aislada se redisolvió en etanol- H_2O (5:1) (72 ml) y se agregó clorhidrato de hidroxilamina (9 mgr). Se agregó hidróxido de sodio (16,8 mgr) con agitación. Se calentó 5 minutos a baño maría hasta disolución total y la mezcla de reacción se volcó sobre una mezcla de H_2O -ácido clorhídrico (20:3) (345ml). Apareció un precipitado blanco que se separó por filtración. Se aislaron 2 mgr de oxima de benzofenona (p.f. 142-143°C).

La fase acuosa se acidificó con ácido clorhídrico diluido y se extrajo con éter etílico exhaustivamente. El extracto etéreo se secó sobre SO_4Na_2 y filtró. El análisis de una alícuota por ccd (sistema 7) muestra una mancha amarilla que coincide con la del ácido benzoico patrón al revelar con verde de bromocresol 0,04% en etanol. Se evaporó el solvente y se obtuvieron algunos cristales con olor a ácido benzoico pero no fue posible pesar con exactitud debido al bajo rendimiento de la reacción (< 0,5 mgr).

Aislamiento de los carbonos 1 y 26 a partir de withaferina Ak) Obtención de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A

ver ítem (a) pág. 180.

l) Reacción de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A con fenil-litio.

Según una técnica análoga a la detallada en el ítem (i), se trató con fenil-litio (5mMol) en THF (2ml), una solución de 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A (43 mgr) en THF (2ml). Se obtuvo un producto marrón claro aceitoso.

m) Oxidación y aislamiento del carbono 26 como benzofenona y del carbono 1 como ácido benzoico.

El producto crudo de fenilación se suspendió en ácido sulfúrico 10% (10ml) y se agregó CrO_3 (1,5 gr). La mezcla se trató como se indicó en el ítem (j) aislándose la oxima de la benzofenona (3,6 mgr) y ácido benzoico (<0,5mgr).

n) Aplicación de la secuencia degradativa descrita a withaferina A radioactiva

Se partió de withaferina A 8 radioactiva (86,6 mgr, $3,7 \times 10^6$ dpm/mMol) la cual se trató con una solución de acetato de sodio en metanol 0,05N obteniéndose 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33 (91 mgr, $3,7 \times 10^6$ dpm/mMol). Esta se trató con fenil-litio en THF

y el producto crudo de fenilación se sometió a oxidación, destilación y derivatización, según la técnica descrita anteriormente, obteniéndose la oxima de la benzofenona que se recrystalizó hasta actividad específica constante ($3,3\text{mgr}, 2,2 \times 10^5 \text{ dpm/mMol}$). El ácido benzoico no pudo ser recrystalizado debido al bajo rendimiento de la reacción ($< 0,1\text{mgr}, > 6,4 \times 10^5 \text{ dpm/mMol}$).

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio sobre el proceso biosintético que conduce a la formación del anillo lactónico de los withanólidos y en particular determinar el origen biogenético de los carbonos 26 y 27 de los mismos. Dicho estudio implicó además de las experiencias con distintos trazadores marcados y la degradación química de los withanólidos marcados, el desarrollo de un método eficiente de aislamiento y separación de los withanólidos.

Se eligió para realizar este trabajo a la planta *Acanthopanax breviflorus* (Griseb) oriunda del noroeste de la Argentina (se utilizaron hojas y semillas provenientes de la provincia de Tucumán). Los métodos separativos desarrollados permitieron a su vez el aislamiento y caracterización de los withanólidos minoritarios presentes en los extractos.

Los temas desarrollados en esta Tesis fueron:

1- Introducción: En este capítulo se dan ejemplos de los principales sistemas de sustitución encontrados en los withanólidos. Estos compuestos se diferencian fundamentalmente por la posición y número de grupos hidroxilo, átomos de cloro y presencia o ausencia de dobles enlaces y/o anillos epóxido. Se mencionan, además, las propiedades biológicas de algunos withanólidos y se hace referencia a caminos biosintéticos hipotéticos que conducirían a la formación de los anillos A y B y anillo lactónico presente en la cadena lateral de estos compuestos.

2. Withanólidos en *Acnistus breviflorus*; Se mencionan los withanólidos aislados previamente de plantas de *Acnistus breviflorus* por Lavie y colaboradores (de plantas cultivadas en Israel a partir de semillas oriundas de nuestro país) y por Bukovits a partir de plantas de este género provenientes de la provincia de Tucumán. Se hace además una breve referencia a los métodos utilizados anteriormente en la separación de withanólidos. Posteriormente se detalla un nuevo método de aislamiento, separación y análisis cuantitativo de withanólidos. El mismo consiste en la extracción de las hojas frescas de *Acnistus breviflorus* con éter etílico en frío y posterior separación de los withanólidos por CLAR a partir de dichos extractos prepurificados usando columnas de sílicagel H eluidas bajo presión. El análisis cuantitativo se realizó por CLAR usando columnas de sílicagel por aplicación del método del estándar externo. Se comparan los resultados obtenidos por este método con las técnicas separativas tradicionales. Se aislaron 12 withanólidos, 4 de los cuales no habían sido aislados anteriormente.

3. Estudio espectroscópico y elucidación estructural de withanólidos de *Acnistus breviflorus* : Luego de una breve introducción en la cual se dan las principales características de los espectros de masas y de RMN-¹H de los withanólidos, en particular de withaferina A, se analizan en detalle los espectros 2DJ y I vs frecuencia de withaferina A realizados a 500 MHz. A continuación se realiza una reinterpretación del análisis de los espectros de RMN-¹³C de los withanólidos en base al concepto de efecto γ introducido por

Beierbeck y colaboradores. Posteriormente se analizan los datos espectroscópicos obtenidos para cada uno de los compuestos aislados (RMN- ^1H , ^{13}C y E.M.). En algunos casos la identificación se completó mediante la obtención de derivados o por síntesis química de los mismos.

Se identificaron los siguientes compuestos:

withaferina A 8, jaborosalactona A 11, jaborosalactona D 29, jaborosalactona E 32, 2,3-dihidro-3-metoxiwithaferina A 33, 2,3-dihidrowithaferina A 34, 6 α -cloro-5 β -hidroxiowithaferina A 37, 5,6-desoxiwithaferina A 40, 2,3-dihidro-3-etoxijaborosalactona a 42, 5 α -metoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 43, 5 α -etoxi-4,5-dihidrojaborosalactona B 44, 2,3-dihidrojaborosalactona A 45.

Los cuatro últimos compuestos no habían sido descriptos hasta el momento, los tres primeros son artefactos que se forman por extracción con solvente (metanol o etanol) en caliente, mientras que el último es un withanólido natural.

4. Biosíntesis de withanólidos en *Acnistus breviflorus*: En este capítulo se dan los antecedentes de estudios biosintéticos relacionados a los withanólidos y se plantea el posible origen biogénico de los carbonos 26, 27 y 28 de dichos compuestos.

En particular en esta tesis se intentó determinar el origen biogénico de los carbonos 26 y 27, para lo cual se desarrollaron las siguientes líneas de trabajo:

a) Búsqueda de las condiciones de cultivo de las semillas de *Acnistus breviflorus* y de las condiciones óptimas de incorporación de precursores.

- b) Aislamiento, separación y análisis cuantitativo de los withanólidos principales (withaferina A 8, jaborosalactona A 11, jaborosalactona D 29).
- c) Incorporación de precursores simples (R,S-mevalonolactona-2-¹⁴C, D,L-metionina-¹⁴CH₃ y acetato de sodio-1-¹⁴C).
- d) Reacciones de degradación de los withanólidos marcados para determinar las posiciones en que se incorporó la marcación en el anillo lactónico.

En base a estos estudios se concluyó que jaborosalactona A 11, jaborosalactona D 29 y withaferina A 8 no deben ser considerados como productos finales, sino como intermediarios que son posteriormente metabolizados. Por otra parte se llevaron a cabo experiencias de incorporación con jaborosalactona A -¹⁴C, obtenida biosintéticamente, que indican que jaborosalactona A sería un precursor de withaferina A y jaborosalactona D.

En base a los resultados observados en la degradación de withaferina A radioactiva se postula la existencia de dos caminos alternativos para la biosíntesis de withanólidos: según uno de ellos se rompería la cadena lateral de un esteroide precursor con pérdida del C-26 y posterior reconstrucción del anillo lactónico; por una ruta alternativa el C-26 derivaría del C-2 de mevalonolactona y dado que este carbono es estereoespecíficamente incorporado al proR-metilo (C-26) de varios esteroides, sería este metilo el que se oxida a carboxilo (C-26) en los withanólidos.

5. Parte experimental: Se describe la parte experimental de la labor realizada que incluye los datos numéricos de los espectros de los compuestos descritos en esta tesis.



Parte de este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones:

"Analytical and preparative separation of withanolides from crude extracts of *Acnistus breviflorus* leaves by high-performance liquid chromatography".

Gerardo Burton, Adriana Veleiro and Eduardo G. Gros.

Journal of Chromatography, 248 (1982) 472.

"Reverse Phase Separation of withanolides from *Acnistus breviflorus*".

Gerardo Burton, Adriana Veleiro and Eduardo G. Gros.

Journal of Chromatography, 315 (1984) 435.

"2,3-dihidrojaborosalactone A. A new withanolide from *Acnistus breviflorus*".

Adriana Veleiro, Gerardo Burton and Eduardo G. Gros.

Phytochemistry, en prensa.

"Biosynthesis of withanolides in *Acnistus breviflorus*".

Adriana Veleiro, Gerardo Burton and Eduardo G. Gros.

Phytochemistry, en prensa.

"Biosynthesis of withanolides in *Acnistus breviflorus*. Tracer experiments with labelled acetate, mevalonolactone, methionine and jaborosalactone A. Biogenetic relationship among the main withanolides".

Adriana Veleiro, Gerardo Burton and Eduardo G. Gros.

Phytochemistry, en prensa.

BIBLIOGRAFIA

- 1) I. Kirson, E. Glotter, A. Abrahan y D. Lavie, *Tetrahedron*, 26, 2209 (1970).
- 2) P. A. Kurup, *Curr. Sci.*, 25, 57 (1956).
- 3) A. Yarden y D. Lavie, *J. Chem. Soc. (C)*, 2925 (1962).
- 4) E. Glotter, I. Kirson, D. Lavie, A. Abraham, *Biorganic Chemistry*, vol. 2, Academic Press, New York, 1978, pp 57-95 y referencias allí citadas.
- 5) I. Kirson y E. Glotter, *J. Nat. Prod.*, 44, 633 (1981).
- 6) L. R. Row, K. S. Reddy, N. S. Sarma, T. Matsuura y R. Nakashima, *Phytochemistry*, 19, 1175 (1981).
- 7) S. S. Nittala y D. Lavie, *Phytochemistry*, 20, 2735 (1981).
- 8) F. Eastwood, I. Kirson, D. Lavie y A. Abraham, *Phytochemistry*, 19, 1503 (1980).
- 9) A. Bagghi, P. Neogi, M. Sahai, A. B. Ray, Y. Oshima, *Phytochemistry*, 23, 853 (1984).
- 10) L. R. Row, K. S. Deddy, K. Dhaneji, y T. Matsuura, *Phytochemistry*, 23, 427 (1984).
- 11) V. V. Velde, D. Lavie, R. D. Budhiraja, S. Sudhir y K. N. Garg, *Phytochemistry*, 22, 2253 (1983).
- 12) V. V. Velde y D. Lavie, *Phytochemistry*, 21, 731 (1982).
- 13) M. Sahai, A. Ali, A. B. Ray, D. J. Slatkin y I. Kirson, *J. Chem. Research (S)*, 152, (1983).
- 14) P. A. Ramaiah, D. Lavie, R. Budhiraja, S. Sudhir y K. N. Garg, *Phytochemistry*, 23, 143 (1984).
- 15) A. G. González, J. L. Bretón y J. Trujillo, *An. Quim. Real Soc. esp. Fis. y Quim.*, 70, 69 (1974).

- 16) A. G. González, J. L. Bretón y J. Trujillo, An. Quim. Real Soc. esp. Fis. y Quim., 70, 64 (1974).
- 17) I. Kirson, E. Glotter, A. B. Ray, A. Ali, H. E. Gottlieb y M. Sahai, J. Chem. Research (S), 120 (1983).
- 18) N. Günter, Nguyễn Quyêt Chiên y Nguyễn Hùn Khôi, Phytochemistry, 23, 2293 (1984).
- 19) F. B. Power y A. H. Salway, J. Chem. Soc., 99, 490 (1911).
- 20) S. M. Kupchan, K. W. Doskotch, P. Boellinger, A. T. Mc Phail, G. A. Sim y J. A. Saenz Renauld, J. Amer. Chem. Soc., 87, 5805 (1965).
- 21) S. M. Kupchan, W. K. Anderson, P. Bollinger, A. T. Mc Phail, R. W. Doskotch, R. M. Smith, J. A. Saenz Renauld, H. K. Schnoer, A. L. Burligame y D. H. Smith, J. Org. Chem., 34 3858 (1969).
- 22) B. Shohat, S. Gitter, A. Abrahan y D. Lavie, Cancer Chemother. Rep., 51, 271 (1967); Chem. Abstr. 67, 105691h (1967).
- 23) B. Shohat, S. Gitter, D. Lavie, Int. J. Cancer, 5, 244 (1970), Chem. Abstr., 72, 109573b (1970).
- 24) B. Shohat, Krebsforsch. Kem. Onkol., 80, 97 (1973), Chem. Abstr. 80, 103803v (1974).
- 25) M Yoshida, A. Hoshi, K. Kuretani, M. Ishiguro y N. Ikekawa, J. Pharmacobiol. Dyn., 2, 92 (1979), Chem. Abstr. 91, 49276n (1979).
- 26) P. A. Kurup, Current. Sci. (India), 25, 57 (1956), Chem. Abstr. 50, 10344h (1956).
- 27) P. A. Kurup, Antibiot. Chemotherapy, 8, 511 (1958), Chem. Abstr. 53, 1458e (1959).

- 28) P. A. Kurup y J. Mohan Das, *Naturwissenschaften*, 50, 603 (1963).
- 29) S. Ben-Efraim y A. Yarden, *Antibiot. Chemoterapy*, 12, 576 (1962), *Chem. Abstr.*, 58, 1718h (1963).
- 30) P. D. Sthi, P. C. Randram, K. B. Sharma y S. S. Subramanian, *Indian J. Pharm.* 36, 122 (1974); *Chem. Abstr.*, 82, 119459q (1975).
- 31) A. Fugner, *Arznie. Forsch.* 23, 932 (1973), *Chem. Abstr.* 79, 142880s (1973).
- 32) B. Shohat, I. Kirson y D. Lavie, *Biomedicine*, 28, 18 (1978); *Chem. Abstr.*, 89, 70864w (1978).
- 33) G. A. Cordell y N. R. Farnsworth, *Lloydia*, 40; 1 (1977).
- 34) K. Chrowdhury y R. K. Neogy, *Biochem. Pharmacol.*, 24, 919 (1975). *Chem. Abstr.*, 83, 108297e (1975).
- 35) L. R. Das Gupta, P. D. Sethi, K. B. Sharma y S. S. Subramanian, *Indian J. Pharm.*, 32, 79 (1970); *Chem. Abstr.*, 73, 63549p (1970).
- 36) A. W. Nicholas y J. P. Rosazza, *Biorganic Chemistry*, 5, 367, (1976); *Chem. Abstr.*, 86, 133769e (1977).
- 37) J. P. Rosazza, A. W. Nicholas y M. E. Gustafson, *Steroids*, 31, 671 (1978); *Chem. Abstr.*, 89 105843t (1978).
- 38) B. Shohat, S. Gitter y D. Lavie, *Proc. Internat. Symp. on Plant Toxins*, 2°1970, Editors A. de Vries y E. Korchwa, Gordon y Breach, New York, Pág. 769, *Chem. Abstr.*, 82, 1330675 (1975).
- 39) K. R. S. Asher, N. E. Nemmy, M. Eliyahn, J. Kirson, A. Abrahan y E. Glotter, *Experientia*, 36, 998 (1980).
- 40) R. D. Budhiraja, S. Sudhir y K. N. Garg, *Planta Medica*, 134 (1984).

- 41) A. Abrahan, I. Kirson , D. Lavie y E. Glotter, *Phytochemistry* 14, 189 (1975).
- 42) E. Glotter, I. Kirson, A. Abrahan y D. Lavie, *Tetrahedron*, 29 1353 (1973).
- 43) S. S. Subramanian, P. D. Sethi, E. Glotter, I. Kirson y D. Lavie, *Phytochemistry*, 10, 685 (1971).
- 44) V. V. Velde y D. Lavie, *Phytochemistry*, 22, 2253 (1983).
- 45) M. J. Begley, L. Crombie, P. J. Harm y D. A. Whiting, *J. C. S. Chem. Comm.*, 1108 (1972).
- 46) R. B. Bates y S. R. Morehead, *J. C. S. Chem. Comm.* 125 (1974).
- 47) M. J. Begley, L. Crombie, P. J. Harm y D. A. Whiting, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 82, (1973).
- 48) I. Kirson, H. E. Gottlieb y E. Glotter, *J. Chem. Res. (S)* 125, (M) 2134 (1980).
- 49) B. M. Amengual, *Archivos de Farmacia y Bioquímica de Tucumán*, tomo IV, N°2, 8 (1948).
- 50) A. G. Conta, S. M. Albónico y H. R. Juliani, *An. Asoc. Quim. Argentina*, 59, 373 (1971).
- 51) G. J. Bukovits y E. G. Gros, *Phytochemistry*, 18, 1237 (1979).
- 52) G. J. Bukovits y E. G. Gros, *An. Asoc. Quim. Argentina* 69, 7 (1981).
- 53) G. J. Bukovits y E. G. Gros, *An. Asoc. Quim. Argentina*, 69, 15 (1981)
- 54) R. Tschesche, H. Schwarzg y G. Legler, *Tetrahedron*, 22, 1121 y 1129 (1966).

- 55) R. Tschesche, M. Baumgarth y P. Welzel, *Tetrahedron*, 24, 5169, (1968).
- 56) D. Lavie, E. Glotter y Y. Shvo, *J.Chem.Soc.*, (C)7517 (1965).
- 57) S. S. Nittala, V. V. Velde, F. Frolow y D. Lavie, *Phytochemistry*, 20, 2547 (1981).
- 58) W. J. S. Lockley, H. H. Rees y T. W. Goodwin, *Phytochemistry*, 5, 937 (1976).
- 59) M. E. Gustafson, A. W. Nicholas y J. P. Rosazza, *J. Chromatography*, 170, 437 (1979).
- 60) I. Hunter, M. Walden, E. Heftmann, E. Glotter y I. Kirson, *J. Chromatography*, 170, 437 (1979).
- 61) A. Tishbee y I. Kirson, *J. Chromatography*, 95, 425 (1980).
- 62) Tesis doctoral, G. J. Bukovits (1981).
- 63) J. W. Blunt y J. B. Stothers, 9, 439 (1977), *Org. Mag. Reson.*
- 64) S. W. Pelletier, N. V. Mody, J. Nowacki y J. Bhattacharyya, *J. Natural Products*, 42, 512 (1979).
- 65) H. E. Gottlieb y I. Kirson, *Org. Mag. Reson.*, 16, 20 (1981).
- 66) H. Beierbeck y J. K. Saunders, *Can. J. Chem.*, 54, 2985 (1976).
- 67) L. Tokér, G. Jones y C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 5465 (1968).
- 68) L. D. Hall y J. K. M. Sanders, *J. Org. Chem.*, 46, 1132 (1981)
- 69) L. M. Jackman, S. Sternhell, "Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy in organic chemistry", Pergamon Press. Oxford, 1969, pp 238-241.
- 70) N. S. Bhacca y D. H. Williams, "Applications of NMR spectroscopy in organic chemistry", Holden-Day, Inc, pág.50 (1966).

- 71) M. Karplus, J. Amer. Chem. Soc., 85, 2870 (1963).
- 72) L. D. Hall y J. K. M. Sanders, J. Amer. Chem. Soc., 102, 1503 (1980)
- 73) F. Fringuelli, H. E. Gottlieb, E. W. Hagman, A. Tatichi, E. Wenkert y P. M. Workulich, Gazz. Chim. Ital., 105, 1215 (1975).
- 74) E. Wenkert, M. J. Gasic, E. W. Haganan y L. D. Wart, Org. Mag. Reson., 7, 51 (1975),
- 75) J. N. Shoolery, J. Nat. Products, 47, 226 (1984).
- 76) Sterhell, Quart. Rev. (S) 123, (R) 36, 1969.
- 77) V. V. Velde y D. Lavie, Phytochemistry 20, 1359 (1981).
- 78) W. J. S. Lockley, D. P. Roberts, H. H. Rees y T. W. Goodwin, Tet. Letters. 3773 (1974).
- 79) P. L. C. Yn, M. M. El-Olmy y S. J. Stohs, Lloydia, 37, 593 (1974).
- 80) S. Seo, A. Uomori, Y. Yorshinura, K. Takeda, J. Amer. Chem. Soc., 105, 6343 (1983).
- 81) R. B. Herbert, "The biosynthesis of secondary metabolites", Chapman and Hall, pág. 53 (1981).
- 82) referencia 81, pág. 57.
- 83) L. J. Goad, J. R. Lenton, F. F. Krapp y T. W. Goodwin, Lipids, 9, 582 (1974).
- 84) P. R. White, "The cultivation of animal and plant cells", 2^o edición, Ronald press, 1963.
- 85) E. Leete, H. Gregory y E. G. Gros, J. Amer. Chem. Soc., 87, 3475 (1969).
- 86) E. G. Gros, E. Leete, J. Amer. Chem. Soc. 87, 3479 (1969).
- 87) L. Galagovsky, A. M. Porto, G. Burton y E. G. Gros, Z. Naturforsch., 39c, 38 (1984).
- 88) A. Ghini, G. Burton y E. G. Gros, Phytochemistry, 21, 605, (1982)