

Tesis de Posgrado

Estudio sobre el catabolismo de gramina en la planta *Hordeum vulgare*

Ghini, Alberto Antonio

1987

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:

Ghini, Alberto Antonio. (1987). Estudio sobre el catabolismo de gramina en la planta *Hordeum vulgare*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2013_Ghini.pdf

Cita tipo Chicago:

Ghini, Alberto Antonio. "Estudio sobre el catabolismo de gramina en la planta *Hordeum vulgare*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2013_Ghini.pdf

Tesis
2013

Ej.2

ESTUDIO SOBRE EL CATABOLISMO DE
GRAMINA EN LA PLANTA

HORDEUM VULGARE

ALBERTO ANTONIO GHINI

-1987-

1987

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTUDIO SOBRE EL CATABOLISMO DE

GRAMINA EN LA PLANTA

HORDEUM VULGARE

Autor

Alberto Antonio Ghini

Director de Tesis

Dr. Gerardo Burton

Lugar de trabajo

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

-1987-

- 2013 -
ej. 2

Dedico esta tesis:

a mis padres, *Severino y Ana*, quienes
me dieron siempre un mundo de amor;

a mi esposa, *Elena*, por la felicidad
que me brinda cada día;

a la querida memoria de mis abuelos
Andrea, Virginia, Gennaro e Bettina.

Agradezco profundamente al Dr. G. Burton,
director de esta tesis, su interés por
el desarrollo de la misma, sus enseñanzas,
su apoyo y dedicación permanentes y la
afectuosidad con que me ha guiado a lo
largo de estos años.

Agradezco también profundamente al Dr. E.G.Gros, director de beca durante el transcurso de esta tesis, las enseñanzas recibidas, la confianza y el apoyo brindado, y fundamentalmente la preocupación y el interés que ha tenido en todo momento por mi formación científica

Agradezco también:

Al Dr Carlos P. Lantos (Dpto. Química Biológica, FCEN, UBA) por facilitarnos el uso del contador de centelleo líquido Tracor Analytic Mark III, y fundamentalmente, por su amistad y apoyo durante todos estos años.

Al CONICET por haberme otorgado, a través del UMYMFOR (CONICET-FCEN), las becas de iniciación y perfeccionamiento, durante cuyo transcurso se desarrolló parte de este trabajo de tesis.

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

Al Sr. C.G.Arabehty por los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C realizados.

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

Al Lic. J.B.Rodriguez por las cromatografías líquidas de alta resolución realizadas.

A la Dra. B.B.Deferrari y a la Lic. Z.M. Marcote por las pesadas de alta precisión del material radiactivo.

Al Dr. C.A.Russo por haberme transmitido desinteresadamente toda su experiencia en el trabajo con plantas de cebada, su colaboración permanente y por los datos utilizados en la escritura de esta tesis.

A los Dres. C.A. Buschi y C.D. Schteingart y al Dr. A.A. Vitale, por sus útiles consejos para el procesamiento de los extractos vegetales y la utilización de reactivos organometálicos, respectivamente.

A todos los compañeros del Dto de Química Orgánica, por su cordialidad y afecto constantes; y en especial, a los que han estado más cerca mío en diferentes etapas de la realización de esta tesis: C.M. du Mortier, C.A. Buschi, C.D. Schteingart, P.G. MacCormack, C.A. Stortz, A.M. Iribarren y M.S. Romero.

A mis compañeros de laboratorio: Lydia R. Galagovsky, Adriana S. Veleiro, Mario D. González, Adriana L. Brachet-Cota, Edith S. Monteagudo y Hugo N. Caro, por su constante amabilidad y cooperación, y por haber creado un ambiente de trabajo extremadamente agradable. En especial, agradezco a M. González su confianza y aliento permanentes, y a L. Galagovsky, el haber compartido todos los momentos alegres o tristes, de este trabajo.

A todo el personal del Dto de Química Orgánica, profesores, docentes auxiliares y no docentes, por su cordialidad permanente,

A mis hermanos, familia y amigos, por el cariño y la paciencia que tuvieron conmigo durante todos estos años.

INDICE

	pág.
<i>CAPITULO I: Introducción</i>	1
I.1. Metabolismo y acumulación de alcaloides	4
I.2. Alcaloides de cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	6
I.3. Distribución y biosíntesis de gramina en plantas de cebada	9
I.4. Catabolismo de gramina	16
I.5. Propiedades biológicas de la gramina	19
<i>CAPITULO II: Síntesis de indoles isotópicamente marcados</i>	21
II.1. Síntesis de indoles marcados en la cadena lateral	21
Gramina- α - ¹⁴ C	22
Gramina- α - ¹³ C	22
II.2. Síntesis de indoles marcados en la posición 2	28
Gramina-2- ¹⁴ C y gramina-2- ¹³ C	28
Indol-3-carboxaldehído-2- ¹⁴ C y ácido indol-3-carboxílico-2- ¹⁴ C	33
II.3. Síntesis de indoles marcados con ² H o ³ H	37
Indol-6- ² H	38
Gramina-6- ² H y gramina-6- ³ H	48
Indol-3-carboxaldehído-6- ² H	53

	pág.
II.4. Síntesis de posibles intermediarios del camino catabólico de gramina	57
<i>CAPITULO III Experiencias con plantas de cebada enteras</i>	63
III.1. Dosaje del alcaloide en raíces y plantas enteras	66
III.2. Determinación de la cinética de absorción de gramina por plantas de cebada en desarrollo	71
III.3. Obtención de la curva de velocidad de degradación de la cadena lateral del alcaloide a dióxido de carbono.	73
III.4. Inoculación de gramina-2- ¹⁴ C	82
III.5. Inoculación de gramina- α - ¹³ C	90
III.6. Experiencias de competencia y captura	100
III.7. Experiencias con indol-3-carboxaldehido-2- ¹⁴ C y ácido indol-3-carboxílico-2- ¹⁴ C	113
III.8. Experiencias con tallos de cebada	127
III.9. Experiencias con gramina marcada en el anillo indólico	135
III.10. Conclusiones finales	151

	pág.
<i>CAPITULO IV : Analisis Espectroscopico</i>	
IV.1. Espectros de RMN- ¹³ C	163
IV.2. Espectros de RMN- ¹ H	171
<i>CAPITULO V Parte Experimental</i>	179
Síntesis de indoles isotópicamente marcados	
V.1. Obtención de N-formil-2-aminotolueno- (formilo- ¹³ C)	184
V.2. Obtención de indol-2- ¹³ C	184
V.3. Obtención de gramina	
Procedimiento general	185
Gramina- α - ¹³ C	186
Gramina-2- ¹³ C	186
Gramina- α - ¹⁴ C	187
Gramina-2- ¹⁴ C	187
V.4. Obtención de indol-6- ² H	
2-nitro-4-aminotolueno	187
2-nitro-4-bromotolueno	188
6-bromoindol	189
Indol-6- ² H	190
V.5. Obtención de gramina-6- ² H y gramina-6- ³ H	
6-bromogramina	191

	pág.
Gramina-6- ² H	192
Gramina-6- ³ H	192
V.6. Obtención de indol-3-carboxaldehido	
Indol-3-carboxaldehido-2- ¹⁴ C	193
Indol-3-carboxaldehido-2- ¹³ C	194
Indol-3-carboxaldehido-6- ² H	195
V.7. Obtención de ácido indol-3-carboxílico-	
2- ¹⁴ C	195
V.8. Obtención de posibles catabolitos	
de gramina	
3-(hidroximetil)-indol	196
3-(aminometil)-indol	197
3-(metiliminometil)-indol	198
3-(metilaminometil)-indol	199
V.9. Ensayos de protección del grupo NH	
de indol y 6-bromoindol	199
Experiencias con plantas	
de cebada enteras	
V.10. Material vegetal	202
V.11. Germinación de cebada	202
V.12. Dosaje de gramina en plantas	
de cebada en desarrollo	203
V.13. Determinación de la cinética de	
absorción de gramina	205

	pág.
V.14. Obtención de las curvas de degradación de C- α y C-2 de gramina a CO ₂	207
V.15. Degradación de gramina-2- ¹⁴ C por plantas de <i>Hordeum vulgare</i>	
Inoculación de gramina-2- ¹⁴ C	208
Recuperación de gramina-2- ¹⁴ C no absorbida	208
Extracción del material vegetal	209
Disgregación del material vegetal insoluble	209
Aislamiento de triptofano de proteínas	210
Procesamiento de los extractos	210
V.16. Experiencias con gramina- α - ¹³ C	
Experiencia control	211
Experiencia con gramina- α - ¹³ C	214
V.17. Experiencias de competencia y captura	214
V.18. Experiencias con indol-3-carboxaldehido- 2- ¹⁴ C y ácido indol-3-carboxílico-2- ¹⁴ C	215
Determinación de la velocidad de degradación del C-2 a CO ₂	215
Extracción del material vegetal y la arena	216
Aislamiento e identificación de gramina y ácido indol-3-carboxílico-2- ¹⁴ C a partir de indol-3-carboxaldehido-2- ¹⁴ C	217

	pág.
V.19. Experiencias con tallos de cebada	
Determinación de la velocidad de absorción	218
Extracción de los tallos	
Ensayo con material inactivo	219
Procesamiento del material radiactivo	220
V.20. Experiencias con gramina marcada en el anillo bencénico	
Experiencia piloto con gramina-6- ³ H	221
Hidrólisis ácida del extracto de raíces	223
Análisis del material vegetal insoluble	224
Experiencia con gramina-(6- ² H, 2- ¹⁴ C)	225
 <i>Resumen</i>	 228
 <i>Bibliografía</i>	 234

Indice de Figuras

	pág.
Figura 1	15
Figura 2	17
Figura 3	25
Figura 4	27
Figura 5	29
Figura 6	31
Figura 7	32
Figura 8	34
Figura 9	35
Figura 10	37
Figura 11	39
Figura 12	40
Figura 13	42
Figura 14	45
Figura 15	47
Figura 16	47
Figura 17	49
Figura 18	50
Figura 19	51
Figura 20	53
Figura 21	54
Figura 22	55
Figura 23	56

	pág.
Figura 24	57
Figura 25	58
Figura 26	59
Figura 27	60
Figura 28	62
Figura 29	65
Figura 30	67
Figura 31	69
Figura 32	70
Figura 33	71
Figura 34	74
Figura 35	76
Figura 36	77
Figura 37	80
Figura 38	87
Figura 39	89
Figura 40	93
Figura 41	102
Figura 42	104
Figura 43	107
Figura 44	108
Figura 45	109
Figura 46	112

	pág.
Figura 47	119
Figura 48	126
Figura 49	138
Figura 50	152
Figura 51	154
Figura 52	167
Figura 53	169
Figura 54	175
Figura 55	176

Indice de Tablas

	pág
Tabla 1	23
Tabla 2	26
Tabla 3	46
Tabla 4	64
Tabla 5	78
Tabla 6	84
Tabla 7	98
Tabla 8	116
Tabla 9	122
Tabla 10	126
Tabla 11	129
Tabla 12	147
Tabla 13	148
Tabla 14	167
Tabla 15	168
Tabla 16	168
Tabla 17	169
Tabla 18	174

CAPITULO I

Introduccion

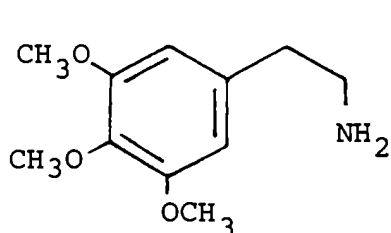
Desde tiempos muy antiguos el hombre ha utilizado a los alcaloides como medicina, venenos o pociones mágicas; sin embargo, sólo recientemente se ha alcanzado un conocimiento preciso acerca de las estructuras de muchos de estos interesantes compuestos¹.

El término alcaloide (parecido al álcali) fue propuesto por primera vez por el farmacéutico W. Meissner en 1819 para nombrar a los compuestos básicos que se obtenían desde extractos de plantas y cuyo análisis elemental indicaba la presencia de nitrógeno¹. Más allá de estos requisitos la definición de alcaloide aún hoy resulta dificultosa.

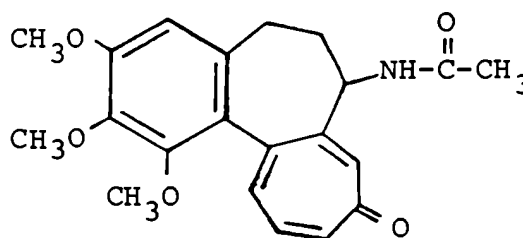
Los alcaloides tienen usualmente una estructura compleja con el átomo de nitrógeno involucrado en un anillo heterocíclico; generalmente presentan una marcada actividad farmacológica. Tales compuestos sólo están presentes en ciertos géneros y familias de plantas. Así, todas estas características deben ser consideradas cuando se clasifica una sustancia como alcaloide.

Las aminas simples como las alquilaminas y las colinas, no son consideradas como alcaloides debido a su amplia distribución en la naturaleza, aún en el reino animal. Algunas autoridades en el tema², introdujeron el término de "aminas biológicas" o "protoalcaloides" para nombrar estos compuestos presentes en los vegetales; aún algunos autores utilizan este término para diferenciar a los alcaloides de otras sustancias similares en las cuales el átomo de nitrógeno no forma parte de

un heterociclo, pero la tendencia general es considerar a esos compuestos como verdaderos alcaloides cuando las demás características así lo indiquen. Así, la mescalina (1), el principio alucinógeno activo obtenido de ciertas especies de cactus mejicanos, es considerado por la mayoría de las autoridades en el tema como un verdadero alcaloide, fundamentalmente debido a sus propiedades farmacológicas³ y a su limitada distribución en el mundo de las plantas. Por las mismas razones la colchicina (2) es considerado como un alcaloide, aún teniendo en cuenta que no es básica y que su átomo de nitrógeno no forma parte de un heterociclo.



1



2

Probablemente el primer interés científico en los alcaloides haya sido médico, debido a que muchas plantas usadas como drogas durante cientos de años deben su efecto a la presencia de alcaloides. Actualmente es todavía más interesante tratar de explicar los mecanismos por los cuales ciertos alcaloides ejer

cen su efecto farmacológico.

Desde el punto de vista de la Química Orgánica el estudio de los alcaloides ha ocupado siempre un lugar importante; puede decirse que con las investigaciones desarrolladas durante la primera mitad del siglo pasado sobre la naturaleza de los alcaloides de la cinchona comenzó el estudio de la química de los heterociclos⁴. Con el advenimiento de las modernas técnicas espectroscópicas el interés por los alcaloides ha ido en aumento, ya que éstas permitieron resolver en muchos casos los problemas complejos que presentaba la elucidación de sus estructuras.

Por otra parte, la síntesis de estos productos complejos ha contribuido a desarrollar este aspecto tan importante de la Química Orgánica.

A partir de los primeros años de la década del '50, la utilización de trazadores marcados con isótopos radiactivos permitió a los químicos orgánicos y bioquímicos comenzar a estudiar los caminos metabólicos por los cuales las plantas sintetizaban sus alcaloides desde sustratos sencillos.

Aunque el esfuerzo dedicado durante tantos años ha producido un considerable bagaje de conocimientos, los tres enfoques de la química de los alcaloides antes mencionados siguen constituyendo áreas de investigación activas en Química Orgánica.

I.1. Metabolismo y acumulación de alcaloides.

Los estudios sobre el metabolismo de los alcaloides han sido enfocados sobre los mecanismos a través de los cuales tales compuestos son sintetizados por las plantas; muchos de estos caminos se conocen ahora con gran detalle. De este modo, grandes grupos de alcaloides han sido relacionados biosintéticamente con aminoácidos: así, los alcaloides indólicos provienen de triptofano y los bencilisoquinolínicos de la tirosina².

Durante muchos años se ha sostenido que los alcaloides eran productos finales del metabolismo de las plantas, como es la urea en los mamíferos. Sin embargo resulta claro que en muchos casos esto no es así sino que los alcaloides se encuentran en un estado dinámico, en el cual su concentración total en cada momento resulta de un equilibrio entre sus velocidades de síntesis y degradación. En alguna medida este concepto era conocido desde la antigüedad en el caso de los alcaloides que presentaban actividad farmacológica conocida. Las plantas que contienen tales drogas tienen un tiempo óptimo para cosecharlas y raramente éste corresponde al período de senectud del vegetal. La implicancia clara que surge aquí es que el contenido de alcaloides debe alcanzar un máximo y luego declinar. A menudo la variación observada en el contenido de alcaloides no sigue un simple curso en el tiempo sino que se correlaciona con el estado de desarrollo del vegetal.

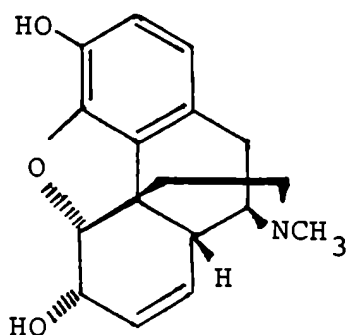
Es conocido también desde hace cientos de años que el contenido de un alcaloide en la planta puede variar aún durante el mismo día. Así, Theophrastos (400 a C) prescribía para la recolección de hierbas que poseían drogas que: "algunas raíces deben recolectarse a la noche, otras durante el día y otras antes de que les dé el sol" ⁵. Tales fluctuaciones han sido observadas por Fairbairn y colab.⁶ para los alcaloides del opio, demostrando que la morfina (3) estaba presente en una concentración cuatro veces mayor cuando las plantas se cosechaban a las 9 a.m. que cuando lo hacían a las 9 p.m..

La utilización de trazadores marcados con isótopos radiactivos ha provisto evidencias para la actividad metabólica de los alcaloides. Mediante estas técnicas se puede medir la velocidad de renovación del alcaloide, aún en los casos en que la concentración total permanece constante debido a que las moléculas están siendo continuamente degradadas y reemplazadas. Utilizando esta técnica, Frank y Marion demostraron que la vida media de la hordenina (4) en la cebada era de sólo 42 horas⁷.

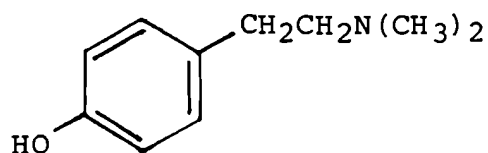
Las evidencias disponibles indican que los alcaloides no pueden considerarse más como productos finales inertes del metabolismo de las plantas. Sin embargo, existe muy poca información en cuanto al destino de las moléculas de alcaloide que son degradadas.

Cuando se suministró a las plantas alcaloides marcados con isótopos radiactivos, en la mayoría de los casos no se pudieron identificar rigurosamente los productos marcados formados.

De este modo el catabolismo de los alcaloides, junto con la causa por las cuales ciertas plantas sintetizan estas moléculas, es todavía hoy un misterio para la mayoría de los alcaloides conocidos.



3



4

I.2. Alcaloides de la cebada (*Hordeum vulgare*).

La cebada es un importante cereal domesticado de razas salvajes, las cuales todavía se encuentran en el sudoeste de Asia. Su cultivo se extiende desde el Artico hasta las altas montañas y puede crecer en desiertos ya que tolera mayor concentración salina que la mayoría de los cereales.

Aunque la cebada es un cultivo de clima frío resiste altas temperaturas si la humedad es baja, pero no se adapta a los climas cálidos y húmedos. Las zonas de mayor producción son:

Europa, el norte de Africa, Etiopía, el Cercano Oriente, URSS, China, India, Canadá y EEUU. En nuestro país el cultivo de cebada se extiende por todo el territorio nacional, desde La Quiaca hasta Tierra del Fuego⁸.

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

Los estudios químicos sobre la cebada comenzaron hace muchos años, debido al interés que despertaba para la fabricación de cerveza. El malta empleado en la fabricación de la cerveza está constituido por el grano de cebada recién germinado y secado. Debido a la corta duración de la germinación (24 a 48 horas dependiendo de la temperatura a la que ésta se realice), las plántulas están constituidas por raicillas las cuales se eliminan fácilmente por fricción⁹.

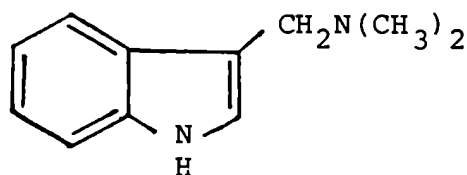
Se había encontrado que un medio de cultivo preparado con un extracto acuoso de estas raicillas no permitía el desarrollo de ciertos microorganismos¹⁰. Leger fue el primero en analizar si estas propiedades eran debidas a un principio químico. Estas investigaciones finalizaron con el aislamiento de un alcaloide que Leger denominó hordenina (4) y cuya estructura determinó¹¹⁻¹⁵.

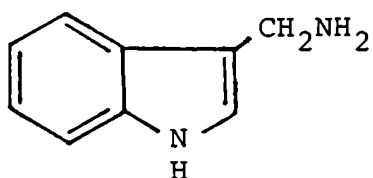
En 1935, H. von Euler y colab.¹⁶ aislaron por primera vez desde hojas de plantas de cebada, un alcaloide de fórmula molecular $C_{11}H_{14}N_2$ al cual dieron el nombre de gramina. Casi

simultáneamente, otros investigadores aislaron desde *Arundo donax* un compuesto de igual fórmula molecular, al que llamaron donaxina¹⁷. Estudios comparativos realizados por el grupo de von Euler¹⁸ indicaron que ambos productos eran idénticos y correspondían en realidad a una misma sustancia, para la cual establecieron definitivamente el nombre de gramina (5).

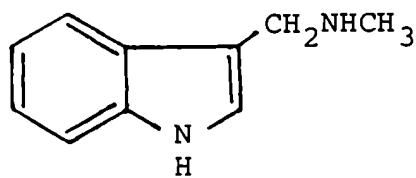
Posteriormente, se encontraron en tallos de cebada los alcaloides indólicos 3-(aminometil)-indol (6) y 3-(metilaminometil)-indol (7)¹⁹, los cuales están relacionados biosintéticamente con la gramina²⁰. También se encontraron en raíces de cebada otras β-feniletilaminas muy relacionadas tanto estructural como biosintéticamente con la hordenina^{21,22}; ellas son la tiramina (8), la N-metiltiramina (9) y la candicina (10).

La gramina fue aislada también desde flores de *Arundo donax*²³ y desde otros miembros de la familia Gramíneae^{14,24,25,26}, Aceraceae^{27,28} y Leguminoseae^{29,30}.

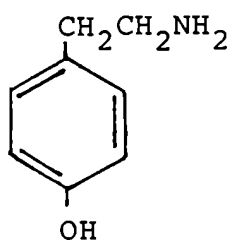




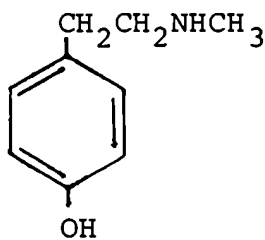
6



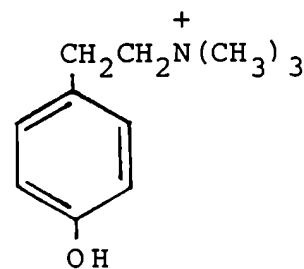
7



8



9



10

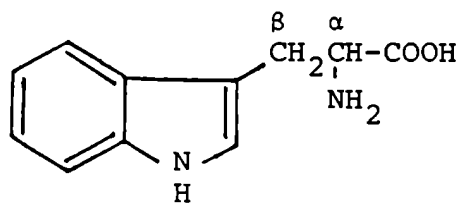
I.3. Distribución y biosíntesis de gramina en plantas de cebada.

Después de los primeros trabajos de von Euler y colab.^{16, 18,24}, quienes determinaron la localización y concentración de gramina en la planta de cebada en función del grado de desarrollo, muchos investigadores estudiaron la distribución y la biosíntesis de este alcaloide en cebada.

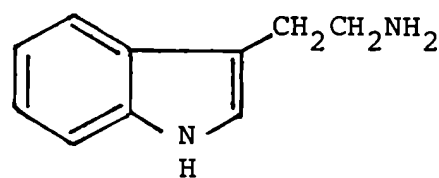
Es conocido que las semillas de cebada no contienen

alcaloides, pero que éstos comienzan a aparecer en las raíces a partir del primer día de la germinación^{21,22,31,32}. La gramina (5) aparece en los tallos de cebada al tercer día de la germinación y permanece en las plantas en cantidades detectables por 30-50 días^{18,33}. Después de este período las plantas no presentan alcaloides, aunque ellas retienen parte de su capacidad para degradar la gramina exógena.

La gramina no contiene la unidad indoletilamina presente en el triptofano (11) y la triptamina (12), sino que un sólo átomo de carbono separa al núcleo indólico del nitrógeno básico del alcaloide. Como hipótesis biogénica, no era de esperar la incorporación específica de triptofano- β -¹⁴C en el átomo de carbono metilénico de la gramina.



11



12

Se podía prever que el triptofano aportara sólo el núcleo indólico y que la gramina se biosintetizara en las plantas de cebada en una forma análoga a su síntesis química a partir de indol, formaldehído y dimetilamina. Sin embargo, cuando Bowden y Marion³⁴ suministraron triptofano- β -¹⁴C a plántulas de cebada de 6 días, pudieron aislar al cabo de 5 días, gramina marcada sólo en el grupo metileno de la cadena lateral.

Aún considerando que la incorporación de la radiactividad no fue al azar, este experimento no eliminaba la posibilidad de que la incorporación hubiera sido indirecta, ya que el precursor podía haber separado la cadena lateral (en una reacción similar a la que ocurre en microorganismos³⁵) en indol y una unidad de tres carbonos, la cual por posterior degradación podría proveer el fragmento de un carbono marcado, que produciría la incorporación en forma específica en la gramina.

Para eliminar esta posibilidad, Leete y Marion³⁶ suministraron triptofano (11) doblemente marcado en el C-2 del núcleo indólico y en el C- β de la cadena lateral a plantas de cebada de 5 días de germinación, y encontraron que la gramina aislada desde los tallos después de 6 días de agregar el trazador, estaba marcada específicamente en las posiciones esperadas. La relación de actividad entre las dos posiciones marcadas en la gramina era idéntica a la relación entre los átomos marcados en el precursor. Este resultado mostraba que el

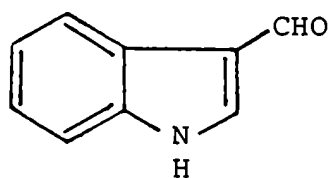
C- β de la cadena lateral del triptofano permanecía unido al núcleo indólico a través de todo el camino biosintético a gramina.

Posteriormente, Leete y colab.³⁷ administraron triptofano doblemente marcado con ^3H y ^{14}C en el C- β a tallos de cebada, y encontraron que la gramina aislada desde las plantas presentaba la misma relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ que el precursor y que ambos isótopos se encontraban en el grupo metileno del alcaloide, por lo cual sugirieron que el grupo metileno de la cadena lateral del triptofano permanecía intacto durante toda la secuencia biosintética.

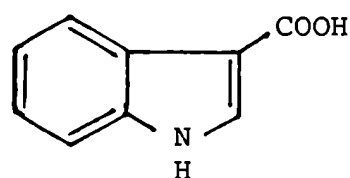
A la luz de estos resultados, dichos autores descartaron la posibilidad de que el indol-3-carboxaldehído (13) y el ácido indol-3-carboxílico (14) fuesen precursores de gramina en tallos de cebada, ya que el pasaje a través de ellos implicaría la ruptura de la unidad $-\text{CH}_2-$ del precursor. Sin embargo, los mismos autores señalaron que el triptofano- β - ^3H utilizado en esa experiencia debería estar fundamentalmente marcado con un solo átomo de tritio por molécula, por lo cual el indol-3-carboxaldehído podría haberse formado a partir de triptofano- β - ^3H reteniendo la mayor parte de la marcación, ya que debía esperarse que en la reacción enzimática estuviese favorecida la ruptura del enlace C- ^1H con respecto al C- ^3H . Los autores consideraron igualmente que el efecto isotópico no debería ser tan importante como para enmascarar los resul

tados obtenidos.

En un intento por aislar los intermediarios de la conversión de triptofano (11) en gramina (5), Breccia y Marion³⁸ suministraron indol-3-carboxaldehído- α -¹⁴C a plantas de cebada enteras de 6 días de edad, pero no encontraron gramina marcada al cabo de 5 días de la administración del trazador. Si bien no se había comprobado si las plantas absorbían el compuesto marcado en las condiciones utilizadas (el aldehído se suministró disuelto en etanol 65%), ni se determinó con precisión el momento en el cual debía buscarse la gramina marcada, los autores concluyeron que el indol-3-carboxaldehído (13) no era precursor de gramina en plantas de cebada. Whigman y colab.³⁹ trabajando en otras condiciones y sólo con tallos de cebada, encontraron resultados de incorporación en gramina diferentes a los obtenidos por Breccia y Marion³⁸ para algunos trazadores, pero en esta experiencia no se ensayó el indol-3-carboxaldehído. En la presente tesis se obtuvieron resultados de incorporación para el aldehído 13, los cuales se discuten en el Capítulo III.



13



14

Los resultados anteriormente comentados eran compatibles con el mecanismo hipotético propuesto por Wenkert⁴⁰ para la biosíntesis de gramina (Figura 1), el cual involucraba la ruptura $\alpha - \beta$ de la cadena lateral del triptofano a través de un aducto triptofano-fosfato de piridoxal (15) y una metilen indolenina (16).

Como se indicó en la página 8, los precursores inmediatos de la gramina 3-(aminometil)-indol (6) y 3-(metilamino metil)-indol (7) propuestos en esta hipótesis se encontraban presentes en la cebada; ellos producían gramina (5) cuando se los incubaba con S-adenosilmetionina en presencia de extractos de tallos de cebada¹⁹. Ambos compuestos fueron precursores de gramina cuando se los suministró marcados con carbono-14 en la posición 2 del anillo indólico a tallos de cebada en desarrollo²⁰.

De este modo, la biosíntesis de gramina ha sido elucidada en gran parte en cuanto al trabajo con precursores marcados. La evidencia final para el mecanismo propuesto debe obtenerse del aislamiento de la enzima dependiente de piridoxal; de hecho, se ha encontrado un preparado enzimático crudo el cual cataliza la conversión de triptofano en gramina y glicina⁴¹.

Experiencias realizadas con *Phalaris arundinacea* (Gramíneae)⁴² y *Lupinus hartweggi*⁴³ indicaron que la biosíntesis de gramina sigue el mismo curso que en cebada.

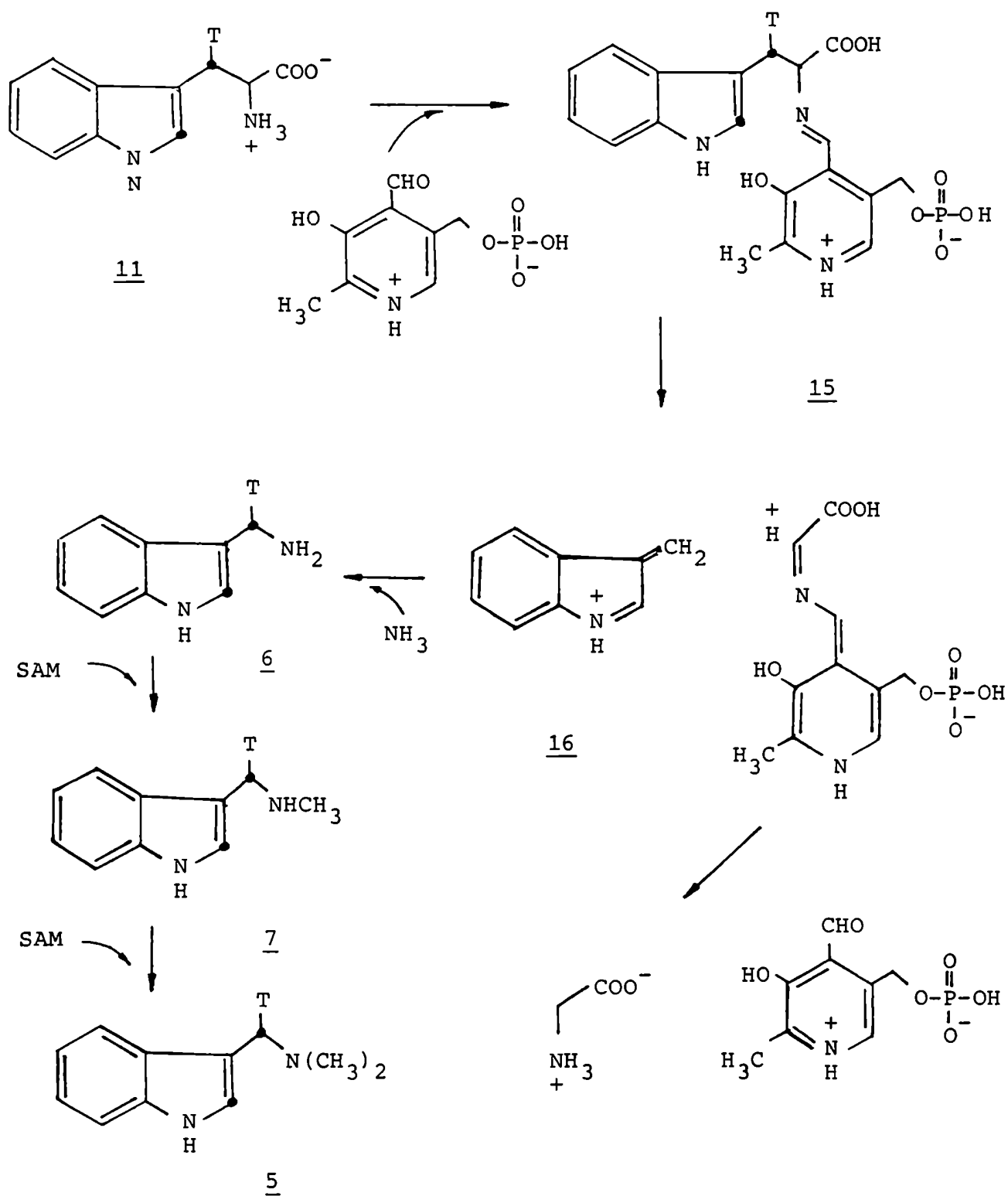


Figura 1: Esquema propuesto para la biosíntesis de gramina⁴¹.

(SAM: S-adenosilmetionina).

I.4. Catabolismo de gramina.

La gramina ha sido uno de los alcaloides más estudiados debido a su carácter de indolalquilamina y a su aplicación ex ten siva en la química preparativa de indol; fue incluso uno de los primeros alcaloides cuyo metabolismo fue estudiado uti lizando trazadores radiactivos³⁴. Sin embargo, existen muy po cos trabajos referidos al catabolismo de este alcaloide.

Leete⁴³ había aislado indol-3-carboxaldehído (13) radiac tivo desde plantas de ocho semanas de desarrollo de *L.hartweggi* a las que les había suministrado triptofano- β -¹⁴C y, dado que el aldehído no fue detectado cuando utilizó plantas de sólo 7 días de desarrollo trabajando en las mismas condiciones expe ri men ta les, él sugirió que el compuesto 13 se formaba por de gradación de la gramina en plantas maduras.

Digenis⁴⁴ informó que, cuando se administraba gramina do ble mente marcada con ³H y ¹⁴C en el C- α de la cadena lateral a tallos de cebada de 60 días de desarrollo en oscuridad, el 0,84% de la marca se incorporaba en el triptofano presente en la fracción proteica de las plantas. La relación ³H/¹⁴C en el producto aislado era la misma que en la gramina suministrada por lo cual dicho autor propuso que la degradación del alca loide seguía en parte un camino inverso al de su formación a través de un compuesto de tipo metilénindolenina, (16 en la Figura 1, página 15).

En otra serie de experiencias⁴⁵, el mismo autor encontró

que cuando se administraba sólo gramina- α - ^{14}C en las mismas condiciones de la experiencia anterior, el 10% de la radiactividad pasaba al CO_2 expelido por las plantas y el 0,4% a la fracción de triptofano (11). Estos resultados le permitieron sugerir que el C- α de la cadena lateral de la gramina se bio degradaba a CO_2 . Los intermediarios de este proceso degradativo fueron estudiados en otra experiencia similar⁴⁶ en la cual informó que el 10,1% y el 6,2% de la radiactividad inicial se encontraban respectivamente en los productos 3-(hidroximetil)-indol (17) y ácido indol-3-carboxílico (14), aislados desde los tallos al cabo de 8 días de dejar a los mismos en contacto con la solución de gramina- (α - ^3H , α - ^{14}C).

Los resultados obtenidos por Digenis le permitieron proponer un camino degradativo para la cadena lateral de la gramina en tallos de cebada el cual se esquematiza en la Figura 2.

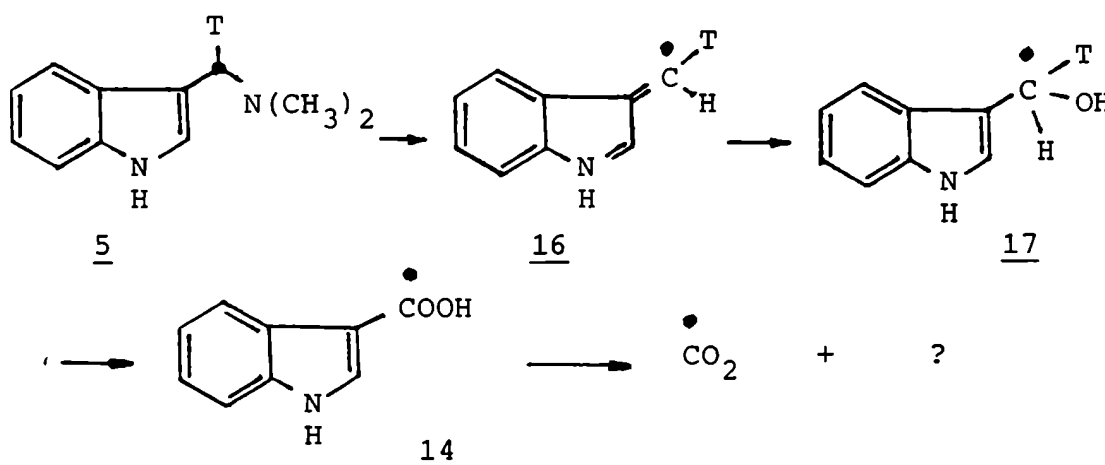


Figura 2: Esquema propuesto para la degradación de la cadena lateral de gramina⁴⁶.

A pesar de los resultados obtenidos, las conclusiones a las que arribó Digenis⁴⁴⁻⁴⁶ no están debidamente justificadas considerando la baja recuperación de la radiactividad lograda en todos los casos (menor del 30%). Resultaría probable, además, que en las condiciones en que se realizaron estas experiencias (tallos de plantas de 60 días de desarrollo, en oscuridad y dejando 8 días en contacto con el trazador), el camino metabólico propuesto no represente el catabolismo normal de la gramina en plantas de cebada intactas.

Dado el interés que despertaba el poder determinar paso a paso el camino de degradación de la gramina en plantas de cebada en desarrollo, y que, de acuerdo a los datos conocidos sobre el contenido del alcaloide en relación con la etapa de desarrollo de las plantas, parecía probable que el catabolismo de la gramina se pudiera estudiar utilizando trazadores radiactivos, fue el objetivo de la presente tesis estudiar el mencionado proceso catabólico. La cebada resultaba además una planta adecuada para llevar a cabo este tipo de experiencias, debido a que era posible su cultivo y desarrollo en condiciones totalmente controlables y reproducibles.

Para el estudio del catabolismo de la gramina se utilizaron trazadores isotópicos incorporados en distintas posiciones clave del alcaloide, para tener puntos de referencia que permitieran detectar los distintos productos en que se transformaba el mismo, y así intentar su aislamiento e identificación.

Aún en el caso en que no fuera posible aislar los productos de degradación, cabía la posibilidad de utilizar isótopos estables como ^{13}C los cuales facilitarían una identificación tentativa mediante las modernas técnicas espectroscópicas disponibles.

I.5. Propiedades biológicas de la gramina.

La acción biológica de la gramina (5) fue descrita por primera vez por von Euler y colaboradores¹⁸, quienes observaron que las variedades de cebada que contenían gramina eran más resistentes a la infección por nemátodes que aquellas que no contenían el alcaloide.

Recientemente, Zúñiga y colab.⁴⁷ observaron que la susceptibilidad de las plantas de cebada al ataque por áfidos, aumentaba con la edad de las plantas concomitantemente con la disminución en el contenido de gramina. Cuando infestaron distintas variedades de cebada con *Schizaphis graminum*, encontraron una relación lineal entre el contenido de gramina y la velocidad de crecimiento poblacional, por lo cual sugirieron que el alcaloide jugaba un rol importante en la resistencia de las plantas al ataque por áfidos.

La gramina (5) y los alcaloides relacionados aislados desde plantas de *Gramíneae*, *Leguminoseae* y otras familias disminuyen la utilizabilidad de estas pasturas para los ganados

bovino y ovino, ya que les confieren a las mismas un sabor desagradable para los animales⁴⁸; además, son responsables de la toxicidad observada en los rumiantes que se alimentan con ellas, causando lesiones en el riñón, glicosuria y pérdida de peso en los animales⁴⁹.

La toxicidad de la gramina ha sido relacionada a los efectos fisiológicos producidos por los compuestos del tipo de la triptamina (12)⁵⁰. Se ha informado también el efecto de la gramina sobre las mitocondrias, el cual se puede considerar como un mecanismo alternativo para su acción tóxica. En este sentido, es conocida también la acción de la gramina como desacoplante de la fotofosforilación⁵¹.

CAPITULO II

Sintesis de indoles

isotopicamente marcados

Para el estudio del catabolismo del alcaloide gramina (5) se debió (como se mencionara en la página 18) sintetizar dicho compuesto marcado con ^{13}C o ^{14}C en la cadena lateral (C- α) y en el carbono 2, y con ^3H en la posición 6 (anillo bencénico del núcleo indólico).

Por otra parte, para el caso de la marcación en C-2, resultaron útiles en los estudios de catabolismo los correspondientes indol-3-carboxaldehído (13) y ácido indol-3-carboxílico (14) marcados.

Finalmente, para el caso de la marcación en 6, fue necesario realizar previamente la síntesis de los compuestos marcados con ^2H , para asegurar la especificidad de la reacción utilizada.

II.1. Síntesis de indoles marcados en la cadena lateral.

La gramina (5), fue sintetizada por una reacción de Mannich a partir de indol (18), dimetilamina y formaldehído, según un procedimiento descrito por Kuhn y Stein⁵². Una adaptación de esta síntesis para obtener el producto marcado, fue informada posteriormente⁴⁴, pero las modificaciones realizadas a fin de hacerla compatible con la utilización de paraformaldehído- ^{14}C , no fueron descriptas por los autores.

Es por ello que surgió la necesidad de llevar a cabo un estudio exhaustivo de la reacción de Mannich involucrada⁵³, modificándose las condiciones de reacción y el proceso de aislamiento del producto. Además, el hecho de tener que utilizar

paraformaldehido radiactivo para sintetizar gramina- α - ^{14}C condujo al estudio de la reacción partiendo del polímero paraformaldehido. Esto involucraba una complejidad adicional, dado que el paraformaldehido es insoluble en el medio de reacción.

II.1.1. Gramina- α - ^{14}C .

La reacción de Mannich (Figura 3) para la obtención de gramina en las condiciones originales descritas por Kuhn y Stein⁵², no condujo a rendimientos satisfactorios cuando se utilizó el polímero paraformaldehido debido, como se indicara anteriormente, a la insolubilidad del mismo en el medio de reacción. En consecuencia, se ensayaron distintas condiciones de reacción las cuales se resumen en la Tabla 1, alcanzándose rendimientos satisfactorios al llevar a cabo la reacción en las condiciones de la entrada 10 (Tabla 1) y realizar una extracción exhaustiva del producto desde el seno de la reacción. La cromatografía en columna de sílicagel del producto crudo resultó el método más eficaz para la obtención de gramina con alto grado de pureza (superior en rendimiento y calidad a la sublimación y/o recristalización), necesario para los estudios "in vivo".

II.1.2. Gramina- α - ^{13}C .

Dado que se disponía de solución acuosa de formaldehido- ^{13}C ,

Tabla 1: Condiciones de reacción ensayadas para la reacción de Mannich entre indol, dimetilamina y paraformaldehído.

	Solvente	Condiciones de reacción	Tiempo a 25°C (hr)	Rendimiento ^a (%)	Observaciones ^b
1	Ac. acético	115°C hasta disolución	3	79	-
2	Ac. acético	115°C hasta disolución	18	57	-
3	Ac. acético	110°C hasta disolución	3	47	25% de exceso de dimetilamina
4	Ac. acético	110°C hasta disolución	3	44	50% de exceso de dimetilamina
5	Ac. acético: agua (5:1)	115°C, 10 min	2	34	1
6	Ac. acético: agua (5:1)	90°C, 5 min	2	59	Reacción en tubo cerrado
7	Ac. acético: HCl (c) (2:1)	100°C, 15 min	2	35	2
8	Ac. acético: HCl (c) (2:1)	25°C	48	31	-
9	Ac. acético: HCl (c) (2:1)	100°C, 15 min	2	54	3
10	Ac. acético	100°C, 10 min	1-2	100	4

continúa...

Tabla 1: continuación

a: Respecto de producto crudo.

b: En las entradas 1 a 9 la reacción se detuvo volcando la mezcla sobre agua y el producto se separó por filtración después de alcalinizar con hidróxido de sodio 1 N hasta pH 9. En la entrada 10, el producto precipitado al alcalinizar la mezcla se extrajo exhaustivamente con diclorometano:metanol (4:1).

¹: Los reactivos se agregaron en dos etapas; en la primera, se intentó disolver el paraformaldehído calentándolo 10 min a 80°C en el solvente ácido acético:agua.

²: Se dejó previamente el paraformaldehído en ácido acético:ácido clorhídrico (c) (2:1) 40 min a 50°C.

³: El paraformaldehído se dejó una noche en la mezcla de ácido acético:ácido clorhídrico (c) a temperatura ambiente y con agitación.

⁴: La reacción se repitió tres veces, obteniéndose los mismos resultados. El rendimiento obtenido luego de purificar por cromatografía en columna fue 75-80%.

Cuando no se indica otra cosa, los reactivos se agregaron en las proporciones estequiométricas.

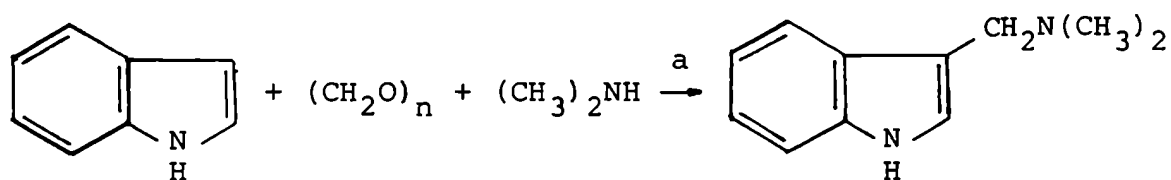


Figura 3: Síntesis de gramina- α - ^{14}C . (a: 110°C , 10 min.; 1-2 horas, temp. amb.; solvente: ácido acético).

la reacción de Mannich con indol y dimetilamina pudo realizarse sin inconvenientes en condiciones análogas a las descritas en I.1.1, con rendimientos algo superiores a los obtenidos con paraformaldehído.

El espectro de masas del producto presentaba una relación de iones $M-1/M/M+1$ de 13,5/53/6,2 que por comparación con el espectro de la gramina (Tabla 2), indicó un enriquecimiento del 93%. Una relación análoga se observó en los iones m/z 131/130 que contenían el C- α . La especificidad de la marcación quedó asegurada en base al espectro de RMN- ^1H (Figura 4) donde puede observarse el doblete del $^{13}\text{CH}_2$ a δ 3,7 ppm, $^1J_{^1\text{H}-^{13}\text{C}} = 134$ Hz y de los N- CH_3 a δ 2,28 ppm, $^3J_{^1\text{H}-^{13}\text{C}} = 5$ Hz. El espectro de RMN- ^{13}C , mostró una única señal a δ 53,15 ppm.

Tabla 2: Abundancia relativa de los iones en la zona de M⁺ y M-44 para gramina,
gramina- α -¹³C y gramina-2-¹³C

% Abundancia

m/z	176	175	174	173	132	131	130	129
Gramina	-	13	88	21	-	82	100	21
Gramina- α - ¹³ C	6	53	16	-	47	100	43	-
Gramina-2- ¹³ C	11	83	72	-	62	100	100	20

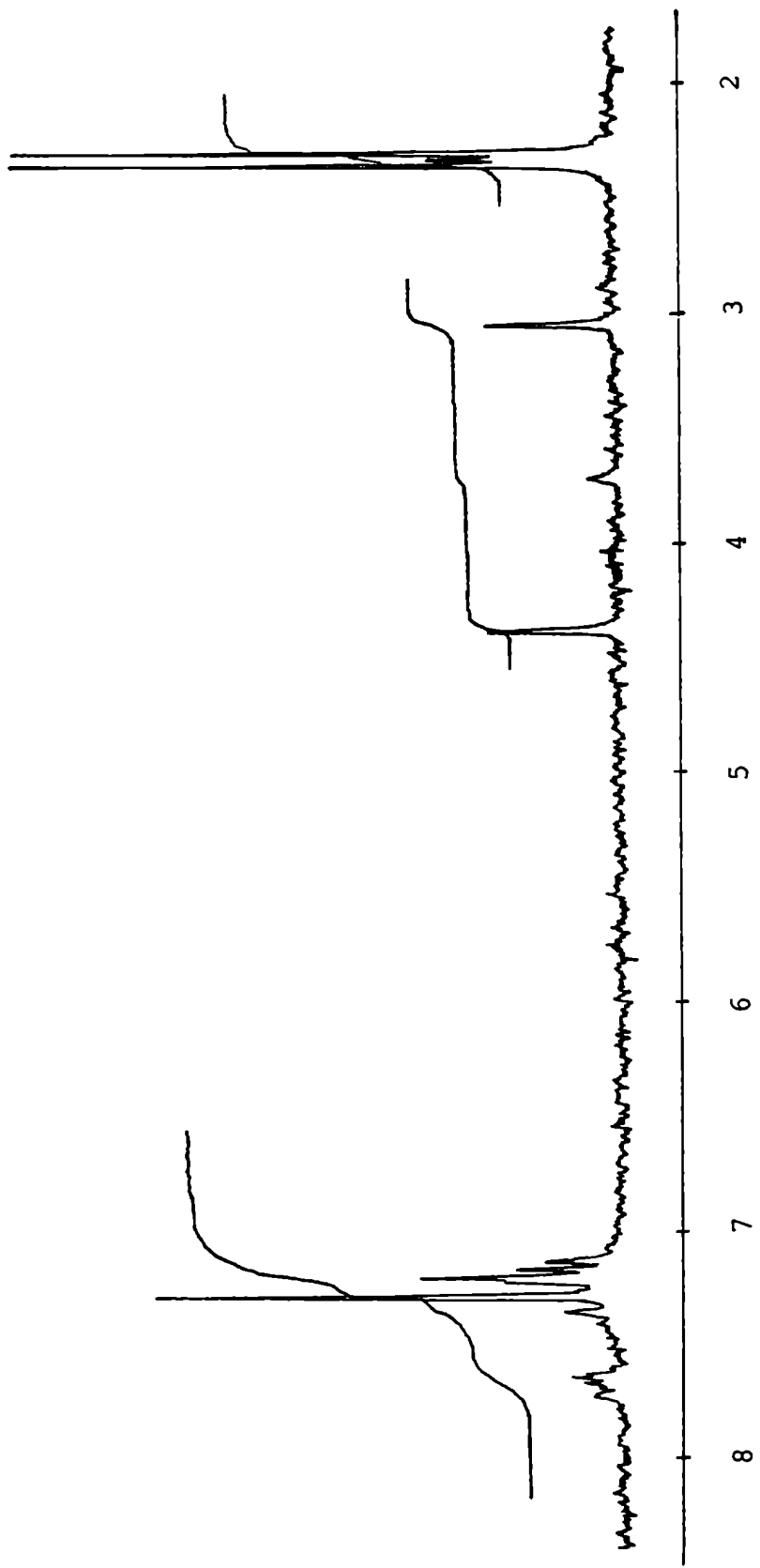


Figura 4: Espectro de RMN- ^1H de gramina- α - ^{13}C .

II.2. Síntesis de indoles marcados en la posición 2.

El estudio del destino del anillo indólico de la gramina en plantas de cebada, requirió la síntesis de este producto, como así también de otros compuestos relacionados, marcados en la posición 2 del anillo pirrólico.

II.2.1. Gramina-2-¹⁴C y gramina-2-¹³C.

Para la síntesis de gramina-2-¹⁴C se utilizó la técnica descripta en II.1, ya que se disponía de indol-2-¹⁴C como materia prima radiactiva. Sin embargo, para obtener gramina-2-¹³C fue necesario sintetizar indol-2-¹³C, dado que este producto no es comercial.

De la extensa literatura referida a la síntesis de indoles ⁵⁴, se eligió utilizar aquellos métodos que partieran de ácido fórmico-¹³C o sus sales, una materia prima fácilmente accesible.

La síntesis de o-formotoluidida se llevó a cabo por reacción entre ácido fórmico y o-toluidina recién destilada ⁵⁵, obteniéndose un rendimiento cuantitativo en el producto crudo, el cual se obtenía puro por recristalización de benceno:hexano (1:1), con un rendimiento final del orden del 95%. La síntesis a partir de formiato de sodio y clorhidrato de o-toluidina se descartó, puesto que utilizando las condiciones generales para la síntesis de amidas ⁵⁶, se obtuvieron rendimientos poco satisfactorios. De este modo, se sintetizó o-formotoluidida-(N-formilo-¹³C) (19),

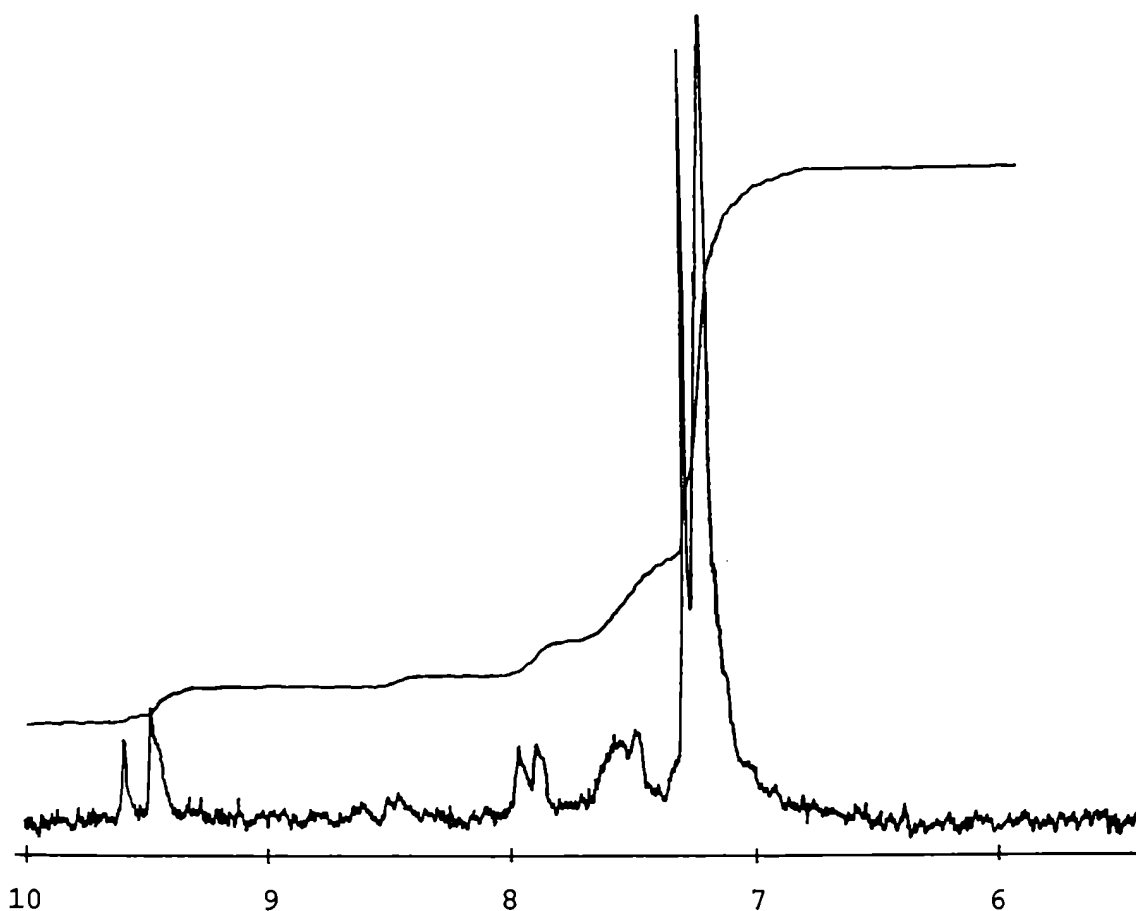
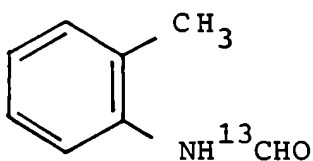


Figura 5: Espectro de RMN-¹H (campos bajos) de o-formotoluidida-
(N-formilo-¹³C).

El espectro de RMN-¹H del producto obtenido permitió determinar la proporción de producto marcado con ¹³C, que resultó ser del 90%, a partir de las integraciones del doblete correspondiente al hidrógeno del grupo formilo-¹³C (¹J_{H-¹³C} = 134 Hz) y del singulete del mismo hidrógeno en el grupo formilo-¹²C (Figura 5).



El indol-2-¹³C se intentó obtener inicialmente por una reacción de Madelung entre o-formotoluidida, potasio metálico y t-butanol⁵⁴, adaptando la técnica descrita a una escala pequeña; se probaron distintas modificaciones, pero en ningún caso el rendimiento global de la reacción superó el 15% respecto de la o-formotoluidida usada. Este valor se consideró insuficiente para la síntesis realizada con compuestos marca dos isotópicamente y por tanto, esta técnica fue deshechada.

Se ensayó entonces una modificación de la reacción de Madelung que había sido utilizada por Pichat y colab.^{57,58} para la síntesis de indol-2-¹⁴C; se encontraba descrito un rendi miento del 80% respecto de o-formotoluidida-(N-formilo-¹⁴C), obteniéndose indol-2-¹⁴C con la misma actividad específica que la del material de partida, (sólo un 15% de la radiactivida dad se encontraba en subproductos no volátiles). Además, el monóxido de carbono formado durante la reacción era inactivo. En una reacción paralela, llevada a cabo con o-formotoluidida fría y formiato de potasio-¹⁴C, los autores obtuvieron indol con sólo un 2% de la radiactividad inicial, mientras que el rendimiento másico era del 82%.

Sin embargo estos resultados no estaban de acuerdo con los obtenidos por Tyson⁵⁹, quien sugirió que el formiato de potasio podría actuar "in situ" como fuente de monóxido de carbono, produciendo formilación de la o-toluidina en el seno de la reacción. De ser este el caso, el incremento del rendi miento sería ficticio. (Figura 6).

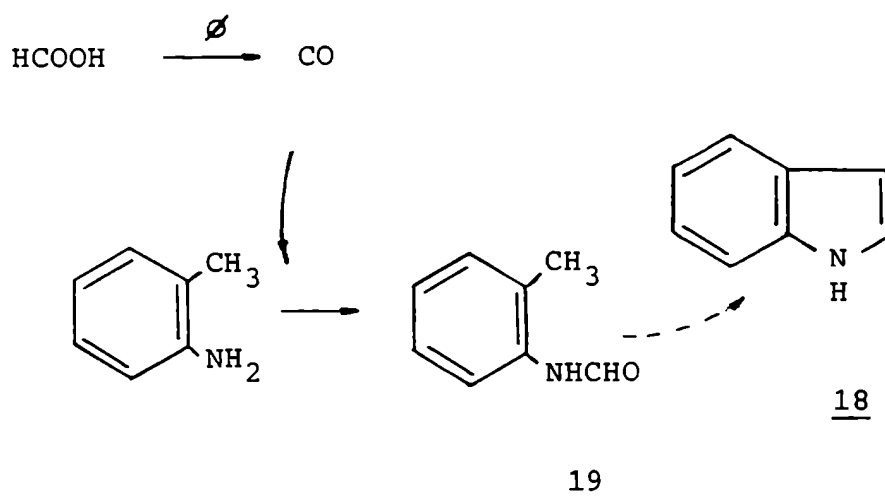


Figura 6: Participación del formiato en la síntesis de indol de Madelung, según Tyson⁵⁹.

La reacción realizada en las condiciones descritas por Pichat y colab.^{57,58} dio, luego de varios intentos, un rendimiento del 65%, el cual fue considerado aceptable. Se sintetizó entonces indol-2-¹³C partiendo de o-formotoluidida-(N-formilo-¹³C), en las mejores condiciones experimentales obtenidas. El producto obtenido se identificó por RMN-¹H (Figura 7) y RMN-¹³C y espectrometría de masas (EM).

El análisis del EM y fundamentalmente la relación de intensidades de los fragmentos M+1/M/M-1 del indol-2-¹³C obtenido (correspondientes a los iones de m/z 119, 118 y 117, respectivamente) que fueron de 9/100/70, comparados con la relación de los mismos fragmentos para el indol (9/100/9 para los iones de m/z 118, 117 y 116, respectivamente) correspondían a un enriquecimiento isotópico de sólo 60%. Como se había partido de

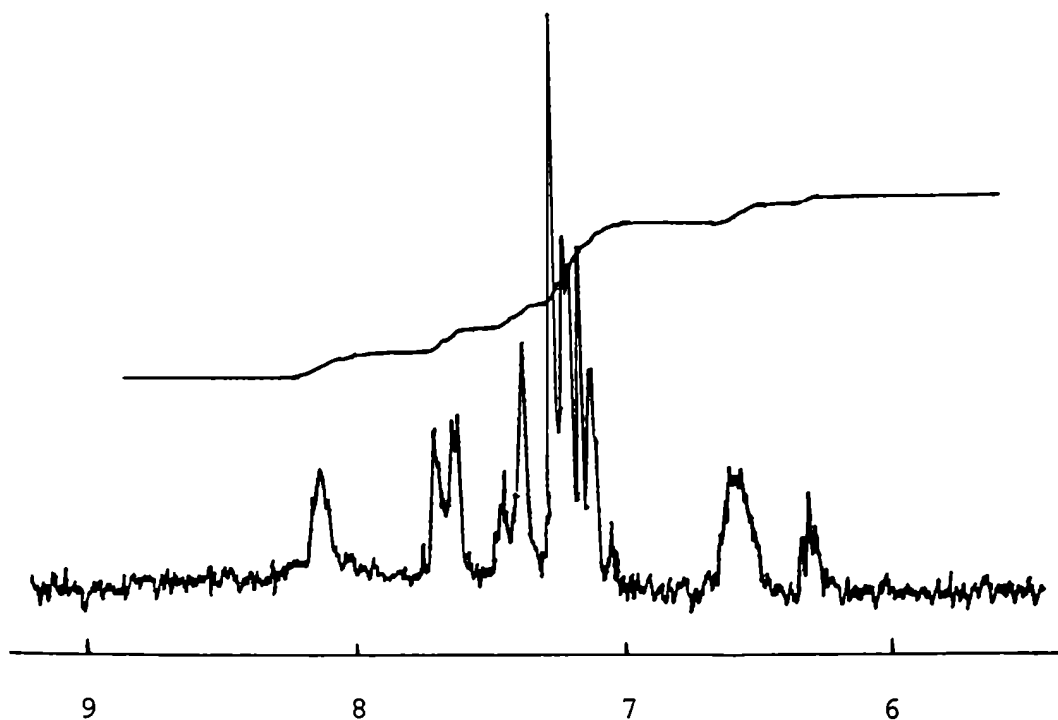


Figura 7: Espectro de RMN-¹H de indol-2-¹³C.

o-formotoluidida-(N-formilo-¹³C) (90% ¹³C), estos resultados indicaban que durante la reacción se produjo una dilución isotópica, confirmándose los resultados de Tyson⁵⁹ en cuanto a la intervención del formiato de potasio en la reacción. Además la utilización de o-toluidina como agente condensante no produciría un aumento del rendimiento, como sugiriera Tyson⁵⁹, sino que ésta sería utilizada como nueva materia prima para la obtención de indol después de transformarse en o-formotoluidida en el seno de la reacción. (Figura 6).

Con el indol-2-¹³C obtenido se realizó la síntesis de gramina-2-¹³C, en las mismas condiciones que las descritas

en II.1. Se obtuvo el producto deseado con un rendimiento isotópico del 100%, según se determinó por RMN- ^1H (Figura 8) y EM (Tabla 2, página 26). El espectro de RMN- ^{13}C de la gramina-2- ^{13}C obtenida presentó una sola señal a δ 129,9 ppm.

Para la obtención de indol-2- ^{13}C , se ensayó también otra modificación de la reacción de Madelung, aplicada a la síntesis de indoles sustituidos en la posición 2. El procedimiento consistía en el tratamiento de la amida con 2-3 equivalentes de n-butililitio (n-BuLi) en tetrahidrofurano (THF) entre -20 y 25°C ⁶⁰.

Se intentó extender el alcance de la reacción para la obtención de indol partiendo de o-formotoluidina, pero los resultados fueron negativos recuperándose el reactivo inalterado y o-toluidina. La presencia de la amina indicaría que la o-formotoluidina actuaría como nucleófilo antes que como base, por lo cual el n-BuLi sustraería el hidrógeno del grupo formilo en el intermediario propuesto por los autores, el cual no se reordenaría a indol sino que por ruptura daría la o-toluidina. El esquema propuesto por los autores se resume en la Figura 9.

II.2.2. Indol-3-carboxaldehído-2- ^{14}C y ácido indol-3-carboxílico-2- ^{14}C .

Como se indicó más arriba, fue necesario para el estudio del catabolismo de gramina, sintetizar los posibles metabolitos indol-3-carboxaldehído (13) y ácido indol-3-carboxílico (14), marcados con ^{14}C en la posición 2 del anillo indólico.

La síntesis del aldehído se realizó mediante una reacción

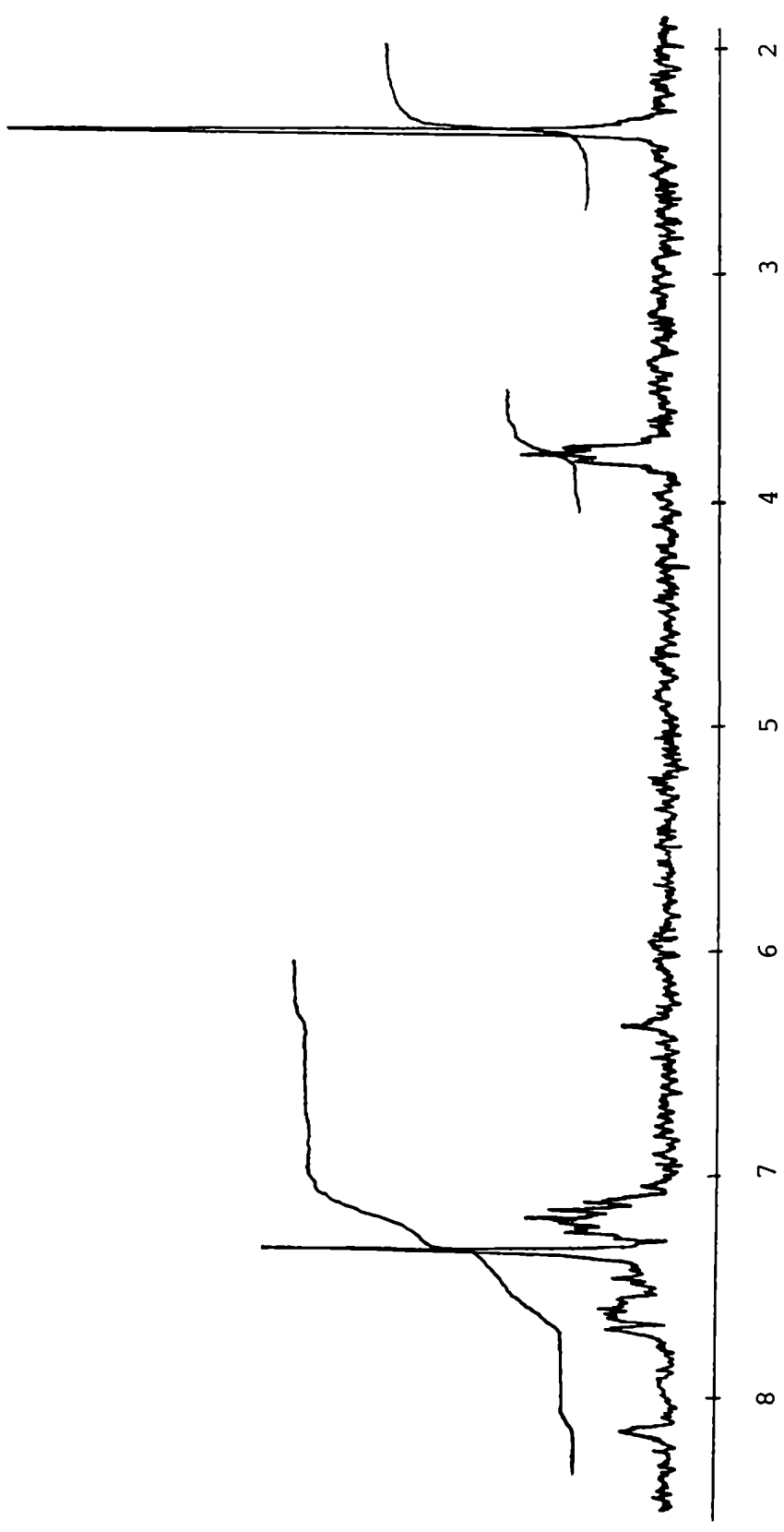
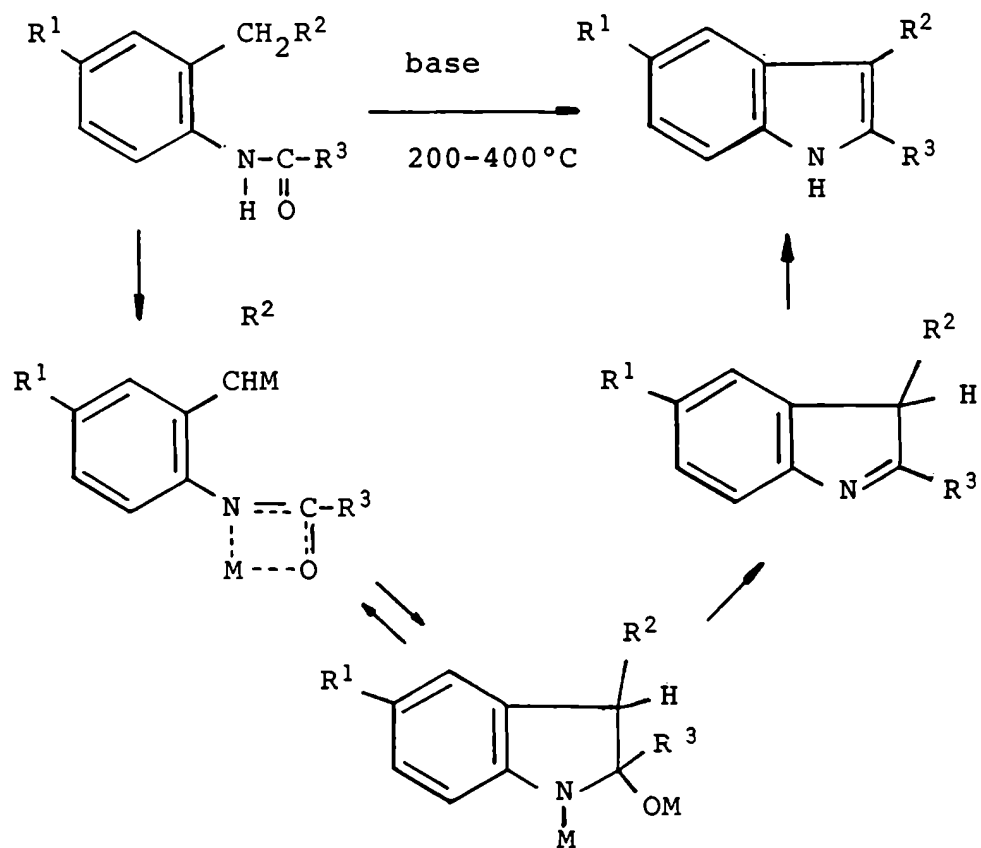


Figura 8: Espectro de RMN- ^1H de gramina-2- ^{13}C



$R^1 = R^2 = \text{H}$; $M = \text{Li, Na, K}$; $R^3 = \text{alquilo, arilo}$

Figura 9: Esquema de la reacción de Madelung modificada, propuesto por Houlihan y colaboradores⁶⁰.

de Vilsmaier-Haack⁶¹ entre indol-2-¹⁴C, dimetilformamida y oxicloruro de fósforo, obteniéndose un rendimiento casi cuantitativo y el producto en alto grado de pureza, el cual se purificó ulteriormente por cromatografía en columna de sílicagel.

Para la síntesis de ácido indol-3-carboxílico-2-¹⁴C, se ensayó la oxidación directa del aldehído en distintas condiciones y con diferentes reactivos. Las oxidaciones con el reactivo de Tollens y con el reactivo de Jones no dieron el resultado esperado, recuperándose el aldehído inalterado. Se intentó la utilización de oxidantes más poderosos, como el permanganato de potasio en medio alcalino⁶² y en las condiciones descriptas se pudo obtener el ácido aunque con un rendimiento de sólo 50%.

Los intentos realizados para mejorar este rendimiento, trabajando en condiciones más drásticas, aumentando el tiempo o la temperatura de reacción, redundaron en una disminución del mismo, puesto que se producía descomposición parcial del reactivo y/o producto. La reacción se realizó entonces en las condiciones descriptas⁶²; el aldehído sin reaccionar se recuperó cuantitativa-mente separándolo del ácido obtenido en la reacción por cromatografía en columna, eluyendo primero con cloroformo saturado con amoníaco (de este modo se obtenía el aldehído puro), mientras que el ácido se eluía posteriormente con cloroformo puro. Así, el rendimiento radioquímico de la reacción resultó cuantitativo.

Los esquemas sintéticos utilizados se resumen en la Figura 10.

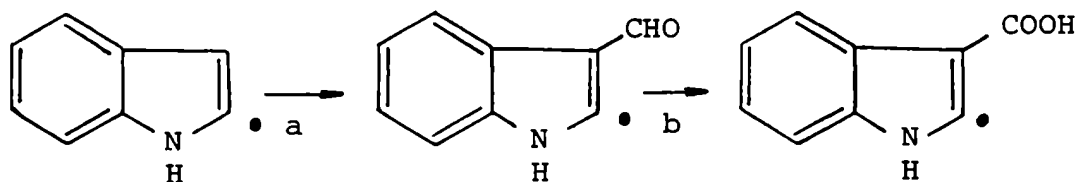


Figura 10: Síntesis de indol-3-carboxaldehído-2- ^{14}C (13) y ácido indol-3-carboxílico-2- ^{14}C (14). (a: $\text{POCl}_3/\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$; b: $\text{MnO}_4\text{K}/\text{KOH}/\text{Etanol}$).

II.3. Síntesis de indoles marcados con ^2H o ^3H .

La síntesis de indoles marcados isotópicamente en el anillo bencénico, constituye un campo poco estudiado de la química de estos heterociclos. La literatura referente a este tema en particular es muy escasa^{63,64} y en todos los casos se describe la marcación en las posiciones 5 y/o 7 (Figura 11). También se encontraba descrito un intercambio fotoquímico ^1H - ^2H en la posición 4 del triptofano, pero el mecanismo de la reacción involucraba la presencia del grupo NH_3^+ ⁶⁵.

Como se puede apreciar en la Figura 11, estos procedimientos no resultaban específicos, ya que se producían productos di o trideuterados según la reacción utilizada. Además, para la obtención de indol-5- ^3H , debería utilizarse $\text{B}^3\text{H}_4\text{Na}$, el cual es un reactivo costoso y poco conveniente para trabajar en gran escala y/o para obtener productos con alta actividad

específica.

Por otra parte para el estudio del catabolismo de gramina en plantas de cebada, era conveniente sintetizar el alcaloide marcado con tritio en la posición 6, ya que las posiciones 5 y 7 son más susceptibles a la hidroxilación enzimática³⁵ y por lo tanto esos hidrógenos resultarían más lábiles.

Considerando lo anteriormente expuesto, se buscó una secuencia sintética que permitiera obtener el producto deseado con alta especificidad y alto rendimiento radioquímico. Un método adecuado resultaba a partir de un compuesto halogenado en la posición deseada, someterlo a un intercambio metal-halógeno por tratamiento con un reactivo organolítico y finalmente obtener el producto marcado por reacción del compuesto organometálico obtenido con agua tritiada. Esta secuencia resultaba más conveniente que la de preparar el compuesto bencénico ya sustituido con el isótopo de hidrógeno y con este intentar la síntesis del indol por algún camino ya estudiado, puesto que en este caso sería mayor la utilización de compuestos radiactivos durante la secuencia global de síntesis con la consecuente pérdida de rendimiento y seguridad.

II.3.1. Indol-6-²H.

El esquema sintético propuesto requería por un lado, la obtención de 6-bromoindol (20) (ya que el intercambio metal-halógeno ocurre más fácilmente con bromo o iodo⁶⁶) y por otra parte, estudiar la reacción de intercambio a partir de aquél ya que no

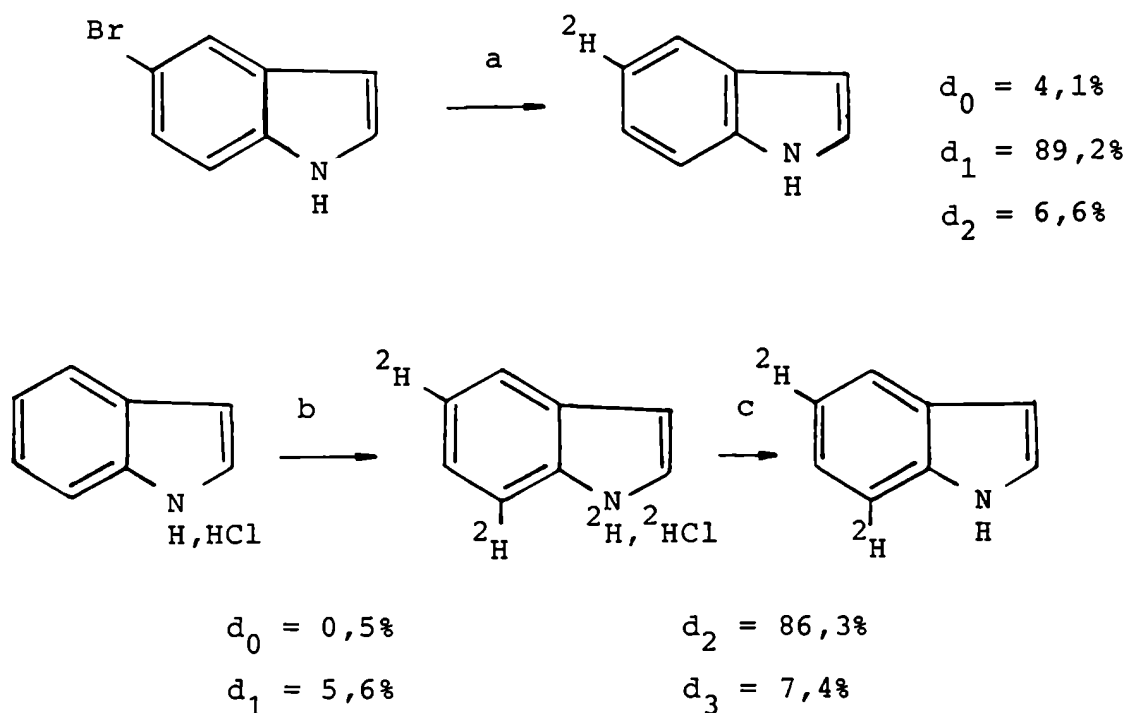


Figura 11: Métodos descritos para sintetizar indol deuterado en el anillo bencénico^{63,64}. (a: B^2H_4Na/Cl_2Pd ; b: 2H_2O , reflujo; c: 1^a NaOH, 2^a MnO_2).

se hallaban descritas en literatura reacciones de este tipo en el anillo bencénico del indol.

De los métodos descritos para sintetizar bromoindoles⁶⁷⁻⁶⁹ se eligió el desarrollado por Dellar y colab.⁶⁹, ya que los materiales de partida y los reactivos requeridos en dicha síntesis eran fácilmente accesibles en el laboratorio y el 6-bromoindol (20) se obtenía con rendimiento y pureza aceptables. La secuencia sintética seguida se detalla en la Figura 12.

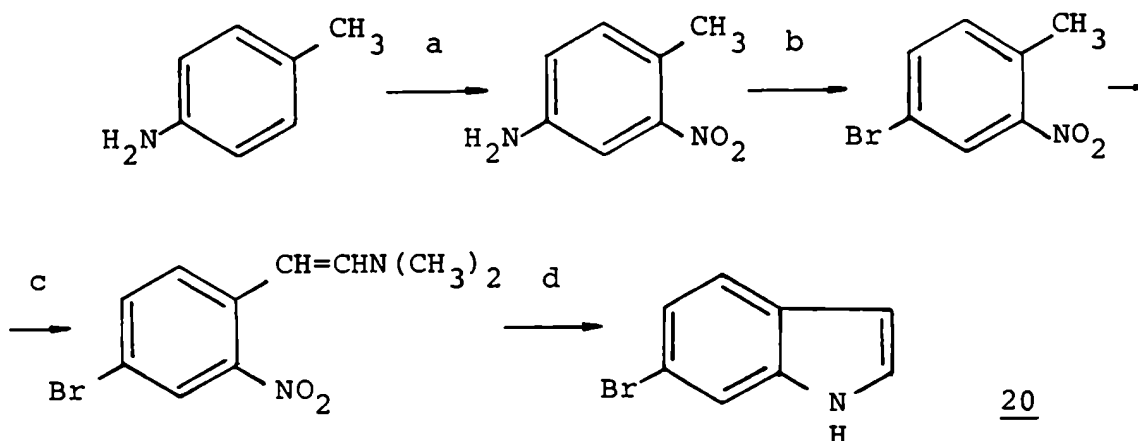


Figura 12: Síntesis de 6-bromoindol (20). (a: $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$; b: 1^a HNO_2 , 2^a $\text{BrH}/\text{Br}_2\text{Cu}_2$; c: Dietilacetal de dimetilformamida; d: H_2 , Ni Raney).

La síntesis de 2-nitro-4-aminotolueno, se hizo siguiendo la técnica descrita para la obtención de m-nitro-N,N-dimetilanilina⁷⁰ el producto se obtuvo puro con un rendimiento de 70-75%. El resto de las reacciones se hicieron siguiendo la técnica descrita⁶⁹ salvo que se usó el dietilacetal de la dimetilformamida.

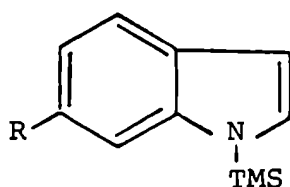
El primer ensayo para la reacción de intercambio se realizó agregando 2 equivalentes de n-butillitio (n-BuLi) al 6-bromoindol disuelto en tetrahidrofurano (THF), a -20°C , pero en este caso se recuperó el reactivo inalterado después del agregado de agua. Este procedimiento resultó igualmente inefectivo, aún si se modificaba tanto la temperatura como el tiempo de reacción.

Se pensó que el anión del indol, formado en primer instancia por reemplazo del hidrógeno ácido, podría prevenir el posterior

metal-halógeno "in situ", agregando directamente 1 equivalente de n-BuLi a la mezcla de reacción. Esta reacción se realizó en

intercambio metal-halógeno, por lo cual se intentó proteger el nitrógeno del indol. Como es conocido, los derivados sililados se utilizan para proteger grupos amino sustituyentes de haluros aromáticos en reacciones organometálicas⁷¹, encontrándose descrito en la literatura la utilización del grupo trimetilsililo como protector para el caso particular del indol⁷².

Si bien el tratamiento secuencial de indol con n-BuLi y cloruro de trimetilsililo dio 1-trimetilsililindol (21) con buen rendimiento, la síntesis de 1-trimetilsilil-6-bromoindol (22) por la misma técnica⁷² no dio el resultado esperado ya que este compuesto resultó ser muy inestable, descomponiéndose a 6-bromoindol al tratar de aislarlo. Sin embargo, el análisis por CCD de la mezcla de reacción indicaba una conversión cuantitativa al 1-trimetilsilil derivado, el cual poseía idéntico R_f al del 1-trimetilsililindol.



(21) : R = H

(22) : R = Br

Se intentó entonces realizar la reacción de intercambio metal-halógeno "in situ", agregando directamente 1 equivalente de n-BuLi a la mezcla de reacción. Esta reacción se realizó en distintas condiciones (Tabla 3, página 46) y en ningún caso se obtuvo el producto deseado sino otro, que fue tentativamente

principales en el espectro de masas, que permiten justificar esta aseveración.

Un comportamiento similar ya había sido descrito por Gerd

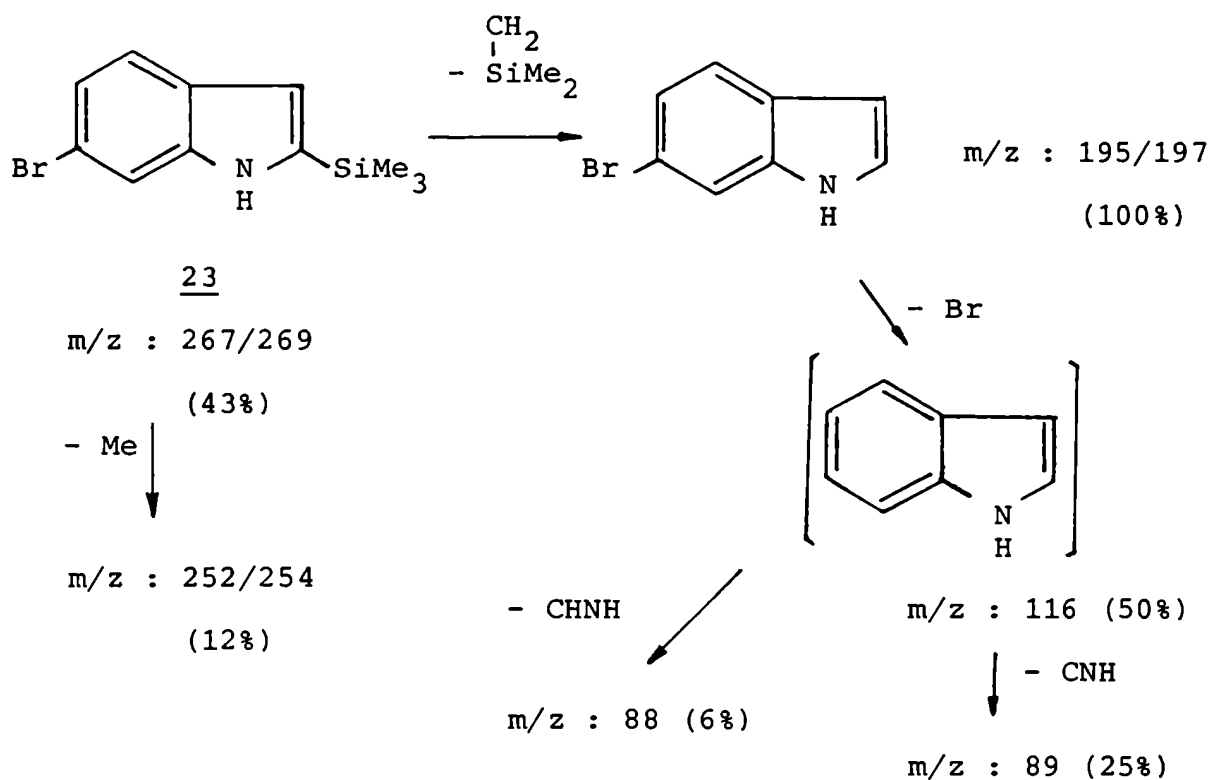


Figura 13: Principales fragmentos en el espectro de masas del compuesto obtenido por reacción de 1-trimetilsilil-6-bromoindol (22) con n-butillitio.

identificado por espectrometría de masas como 2-trimetilsilil-6-bromoindol (23). En la Figura 13, se esquematizan las rupturas principales en el espectro de masas, que permiten justificar esta aseveración.

Un comportamiento similar ya había sido descrito por Sandberg y Russell⁷³, quienes informaron que en la preparación de

2-litioindoles a partir de N-dimetil-(1,1-dimeteil)-sililindol con n-BuLi, el tratamiento del producto con agua deuterada producía el correspondiente indol sililado en la posición 2. Los autores consideraron que la litiación ocurría en la posición 2, pero que el derivado litiado se reordenaba rápidamente para producir después de la deuteración el compuesto informado. Este comportamiento constituye un ejemplo del reordenamiento aniónico de derivados de silanos, ya estudiado por otros autores⁷⁴.

En consecuencia, se decidió utilizar el 6-bromoindol (20) sin proteger pero usando *ter*-butillitio (t-BuLi), más reactivo, para la formación del dianión del 6-bromoindol.

Debido a la alta reactividad frente al oxígeno y a las precauciones con que se debe trabajar cuando se utiliza t-BuLi, se decidió utilizar n-BuLi (como en los casos anteriores) para la reacción con el hidrógeno ácido del indol, mientras que el dianión se obtuvo "in situ" por agregado posterior de 2 equivalentes de t-BuLi. Después del tiempo adecuado, la reacción se finalizó por agregado de agua deuterada y extracción del producto formado con diclorometano.

Dado que los compuestos indol (18) y 6-bromoindol (20) son estructuralmente muy similares, ellos no pudieron separarse por cromatografía de adsorción sobre sílicagel. Dado que la reacción de intercambio metal-halógeno requería de un método rápido de distinguir entre ambos compuestos, se intentó separarlos por CCD en fase reversa usando como solventes mezclas de etanol:agua y

metanol:agua, pero en ambos casos la separación no resultaba eficiente sino después de varios desarrollos, lo que hacía al método bastante lento.

La separación de los compuestos 18 y 20 se logró por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) utilizando una columna Altex Ultrasphere ODS (5 μ m) (250 x 10 mm) y una mezcla de metanol:agua (9:1) como eluyente. En la Figura 14 se muestra el cromatograma correspondiente a una mezcla obtenida en una reacción de ensayo.

Una vez logrado un método de separación adecuado del producto y reactivo, se buscaron las condiciones óptimas de reacción. En un primer ensayo se utilizó éter etílico como solvente a -78°C , obteniéndose indol-6- ^2H con un rendimiento de 50% según se determinó por CLAR, mientras que el 6-bromoindol que no reaccionaba se recuperó inalterado.

Dado que el 1-litio-6-bromoindol (24) resultó insoluble en éter, la reacción se repitió en tetrahidrofurano (THF), con el propósito de aumentar la solubilidad del anión facilitando así el intercambio metal-halógeno. Sin embargo en esas condiciones se obtuvieron sólo productos de descomposición que no fueron posteriormente identificados.

Utilizando una mezcla de éter etílico con la mínima cantidad de THF de modo de mantener al monoanión en solución, se ensayaron distintos tiempos y temperaturas hasta encontrar las condiciones óptimas de reacción, obteniéndose indol-6- ^2H con

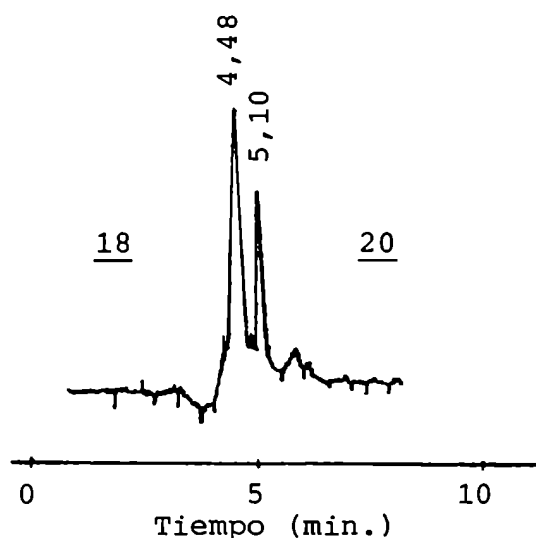


Figura 14: Separación de indol (18) (tr: 4,48 min.) y 6-bromoindol (20) (tr: 5,10 min.) por CLAR.
Columna: Altex ODS-5 μm (250 x 10 mm).
Solvente: metanol:agua (9:1) a 3 ml/min.
Detector: UV a 280 nm.

un rendimiento del 85% y recuperándose 15% de 6-bromoindol sin reaccionar. Los resultados de los distintos ensayos se encuentran resumidos en la Tabla 3 y la secuencia sintética se esquematiza en la Figura 15.

El indol-6- ^2H se obtuvo por dilución del producto obtenido con agua (con lo cual se intercambiaba el ^2H de la posición 1), y posterior extracción con diclorometano. El producto se purificó por CLAR preparativa y se identificó por EM y RMN de ^1H , ^2H y ^{13}C .

El espectro de RMN- ^2H (figura 16), presentó una sola señal

Tabla 3: Reacciones ensayadas para la obtención de indol-6-²H.

Sustrato	Reactivo	Solvente	Condiciones de reacción	Producto
6-bromoindol (20)	n-BuLi; 4 eq.	THF	- 20°C; 30 min.	<u>24</u>
	n-BuLi; 2 eq.	THF	- 78° a 25°C; 45 min.	<u>24</u>
	n-BuLi; 1 eq.	Et ₂ O	- 78° a 25°C; 45 min.	<u>24</u>
	n-BuLi; 1 eq.	Et ₂ O:THF (4:1)	- 78° a 0°C; 30 min.	<u>24</u>
1-TMS-6-bromo indol (22)	n-BuLi; 1 eq.	THF	- 78° a 25°C; 15 min.	<u>23</u> (50%)
	n-BuLi; 1 eq.	Et ₂ O	- 78°C; 30 min.	<u>23</u>
1-litio-6-bro moindol (24)	n-BuLi; 1 eq.	THF	- 20°C; 30 min.	N.R.
	n-BuLi; 1 eq.	THF	- 78°C; 30 min.	N.R.
	t-BuLi; 2 eq.	THF	- 78°C; 5 min.	descompone
	t-BuLi; 2 eq.	Et ₂ O	- 78°C; 30 min.	<u>18</u> (50%)
	t-BuLi; 2 eq.	Et ₂ O:THF	- 78°C, 30 min.;	<u>18</u> (85%)
		(4:1)	- 25°C, 30 min.	

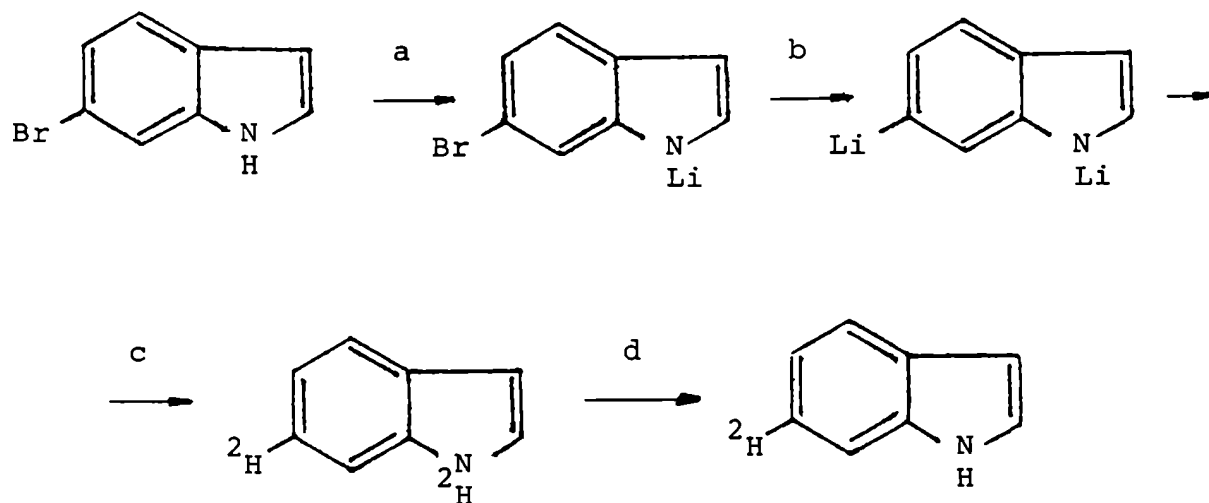


Figura 15: Síntesis de indol-6-²H. (a: n-butillitio; b: *ter*-butillitio; c: ²H₂O; d: H₂O).

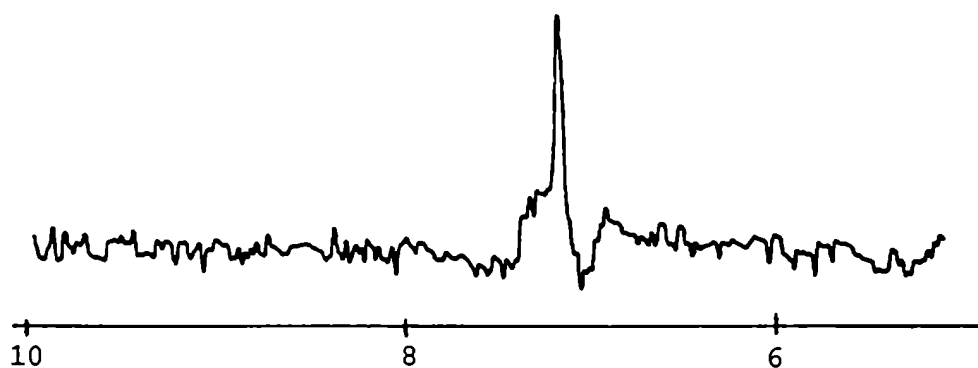


Figura 16: Espectro de RMN-²H de indol-6-²H.

correspondiente al ^2H de la posición 6 a δ 7,17 ppm. En las Figuras 17 y 18, se pueden observar los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C de indol-6- ^2H y una muestra auténtica de indol, los cuales se discutirán en la sección de espectroscopía (Capítulo 4).

El espectro de masas del indol-6- ^2H indicó que la reacción transcurría con un excelente rendimiento isotópico, ya que el análisis de sus rupturas principales y la relación entre las intensidades de los fragmentos M+1/M/M-1 (Figura 19), indicaban un 100% de monodeuteración, con lo cual esta técnica novedosa resultó superior a las anteriormente conocidas y especialmente útil para la obtención de indol y sus derivados con alta actividad específica, cuando se desea obtener el producto marcado con isótopos radiactivos.

II.3.2. Gramina-6- ^2H y gramina-6- ^3H .

Una vez obtenido el indol-6- ^2H quedaban abiertas dos posibilidades para la obtención de gramina-6- ^3H : por reacción de Mannich a partir de indol-6- ^3H , utilizando la técnica ya descrita para la síntesis de gramina marcada (Sección II.1); u obteniendo primero 6-bromogramina (25) y a través de ésta gramina-6- ^3H , por un tratamiento similar al realizado en la obtención de indol-6- ^2H .

Aunque la obtención de gramina (5) siguiendo el primer criterio ya se había llevado a cabo, esta metodología presentaba la desventaja de tener que realizar un paso más con el producto

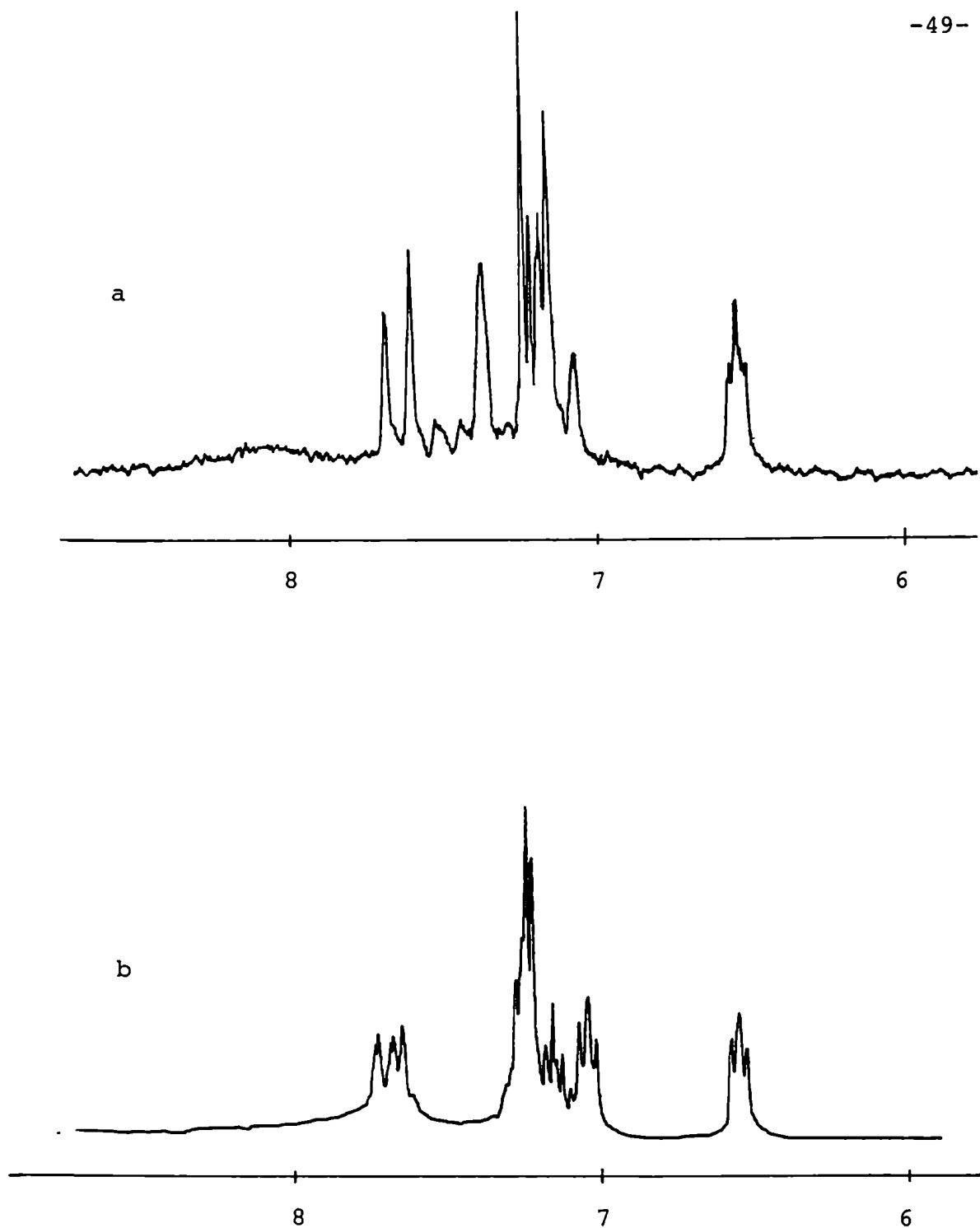


Figura 17: Espectros de RMN-¹H de: a) indol-6-²H; b) indol.

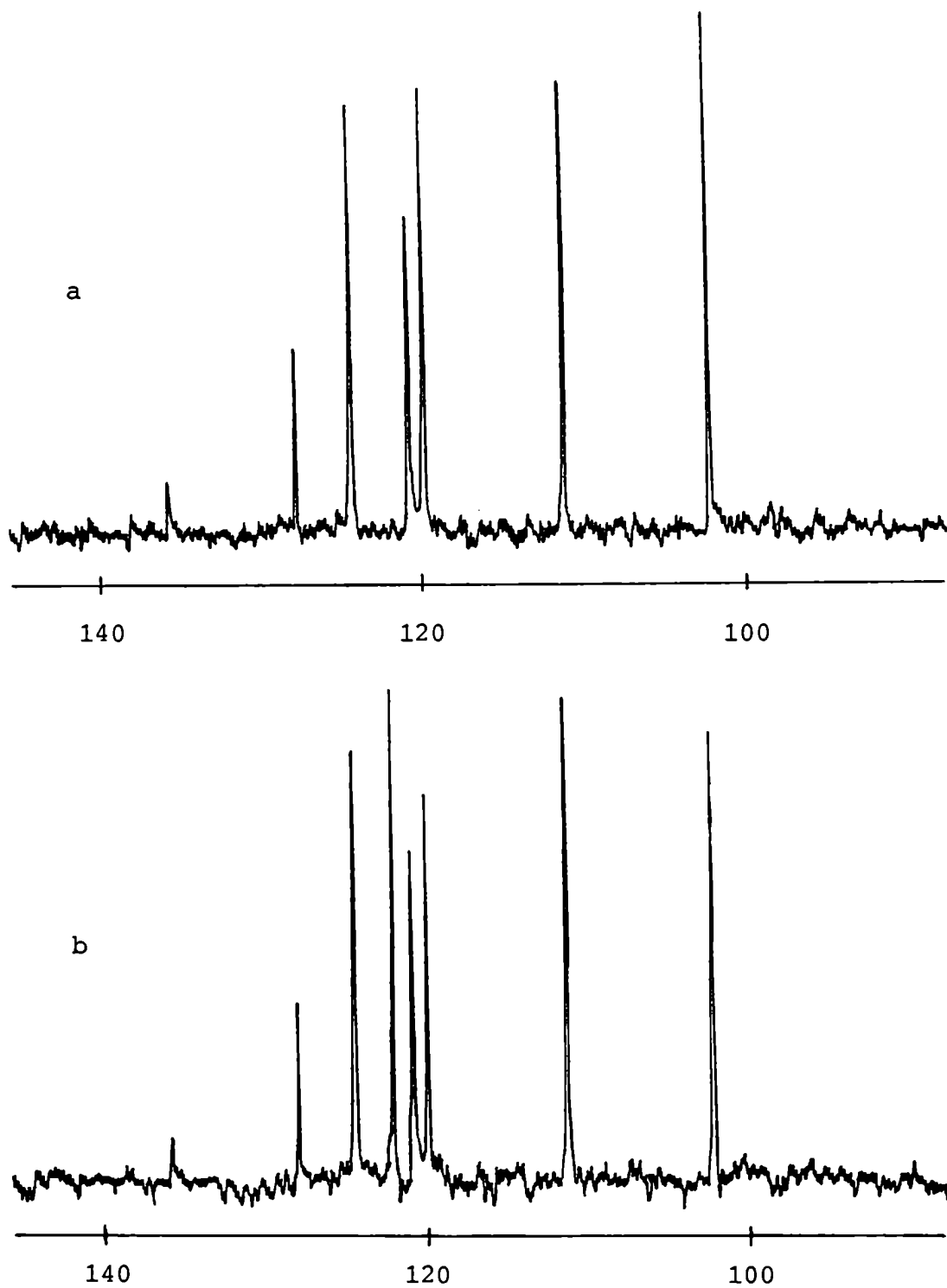


Figura 18: Espectros de RMN- ^{13}C de: a) indol-6- ^2H ; b) indol.

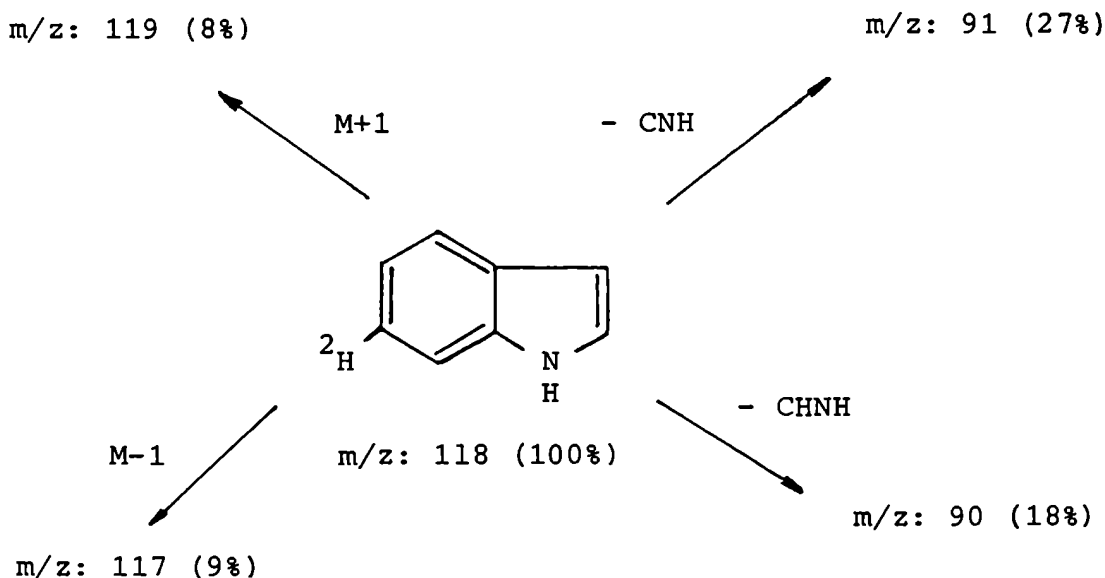


Figura 19: Fragmentos principales observados en el espectro de masas del indol-6-²H. (Relación M+1/M/M-1 en el indol: 9/100/9).

radiactivo, con la consecuente disminución del rendimiento radioquímico (el rendimiento de la obtención de gramina oscilaba entre el 80 y el 85%). La segunda posibilidad permitía, de ser viable, dejar sólo para el último paso de la síntesis la utilización del material radiactivo.

La 6-bromogramina (25) se obtuvo por una reacción de Mannich sobre el 6-bromoindol (20), siguiendo el procedimiento experimental descrito para la síntesis de gramina. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílicagel, obteniéndose puro con un rendimiento superior al 80%, el cual

se identificó por EM y RMN de ^1H y ^{13}C . Además, el producto se diferenciaba de gramina por CCD utilizando sílicagel como adsorbente.

Ya que el indol es un compuesto relativamente volátil, en la separación por CLAR de indol-6- ^2H y 6-bromoindol parte del producto podría perderse durante la evaporación del solvente (metanol:agua). Sin embargo, si la reacción de trititación se llevaba a cabo sobre 6-bromogramina, en caso de quedar compuesto sin reaccionar se presentaba otra ventaja adicional ya que la gramina-6- ^3H podía purificarse por CCD preparativa en sílicagel.

El paso siguiente se examinó realizando la reacción de li-titación en las mismas condiciones que las ensayadas para el 6-bromoindol, obteniéndose gramina-6- ^2H por agregado de $^2\text{H}_2\text{O}$ con un rendimiento cuantitativo. El producto obtenido se identificó por RMN de ^1H , ^2H y ^{13}C .

El espectro de RMN- ^2H (Figura 20), presentó una sola señal a δ 7,15 ppm, correspondiente al ^2H de la posición 6. Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C del compuesto deuterado y de gramina auténtica (Figuras 21 y 22) se discutirán con detalle en el Capítulo IV.

La reacción se repitió con $^3\text{H}_2\text{O}$, obteniéndose gramina-6- ^3H , la cual fue purificada por CCD preparativa en sílicagel. La secuencia de reacciones se indica en la Figura 23.

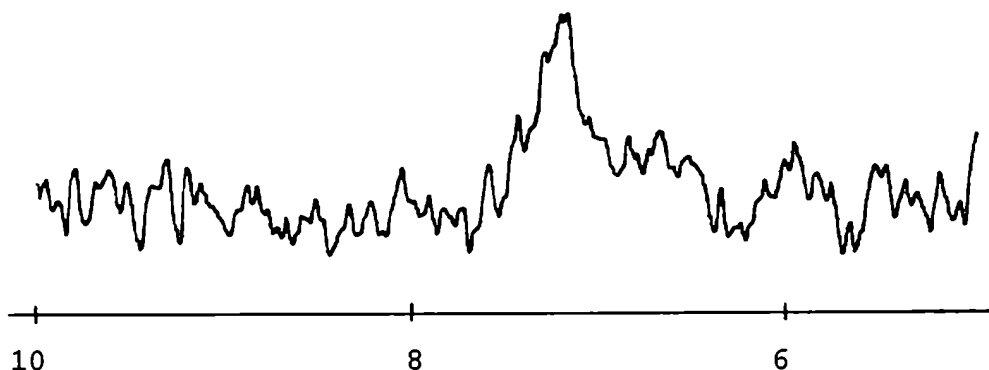


Figura 20: Espectro de RMN- ^2H de gramina-6- ^2H .

II.3.3. Indol-3-carboxaldehido-6- ^2H .

Los productos deuterados que se obtuvieron no sólo fueron de suma utilidad para estudiar los resultados de las reacciones que se ensayaban, ya sea en el grado de desarrollo o en la especificidad, lo que se hacía por cromatografía o espectrometría de masas respectivamente, sino que sirvieron para realizar un estudio exhaustivo de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de estos compuestos alguno de los cuales estaban mal asignados en la literatura. Este aspecto se tratará con detalle en el Capítulo IV.

Relacionado con este último tema, y teniendo en cuenta que había dudas en las asignaciones de los carbonos 4, 5 y 6 del indol-3-carboxaldehido (13), se sintetizó este compuesto marcado con ^2H en la posición 6 por una reacción de Vilsmaier-Haack con indol-6- ^2H (página 33).

La formación del producto deseado se determinó por CCD en

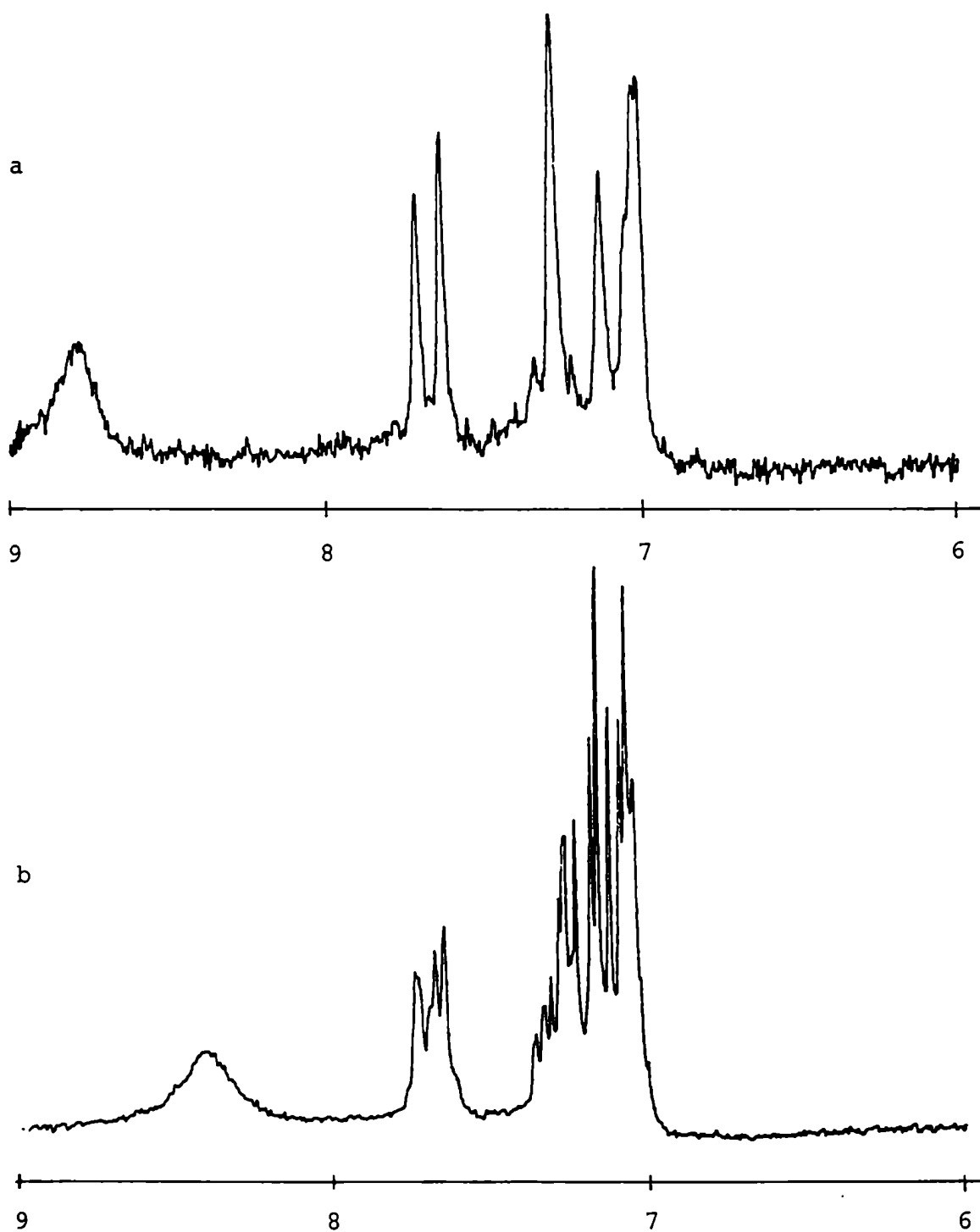


Figura 21: Espectros de RMN- ^1H de: a) γ -aminobutyric acid-6- ^2H ; b) γ -aminobutyric acid; (zona de campos bajos).

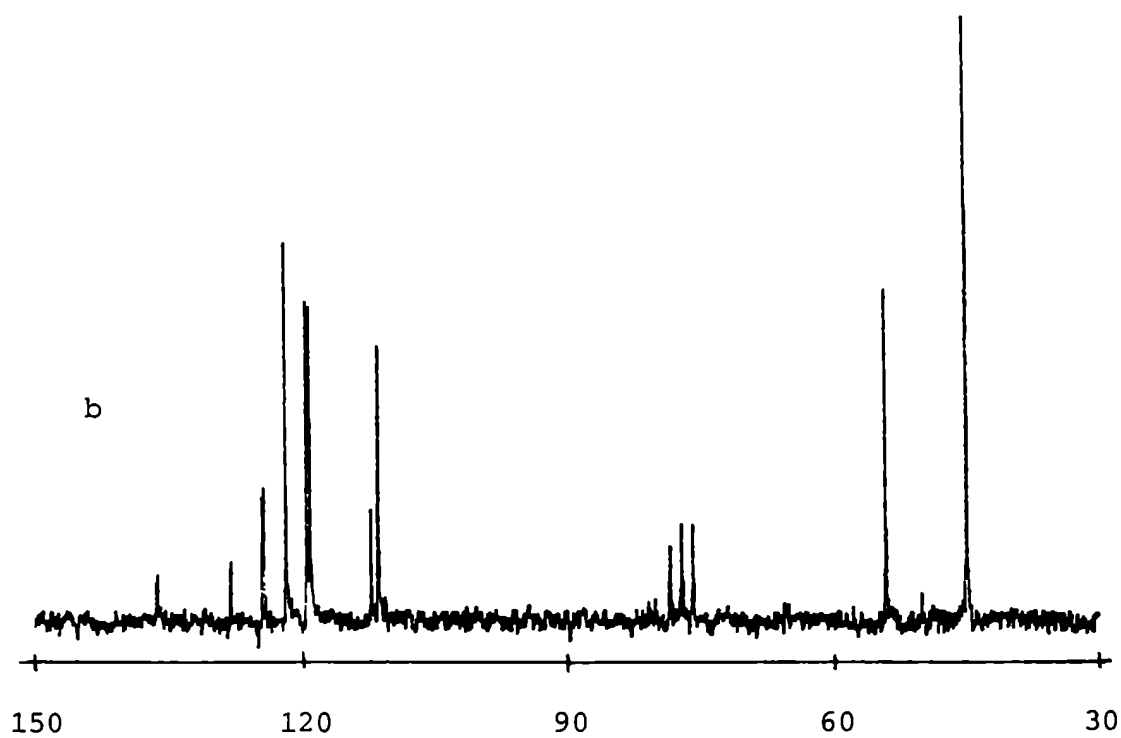
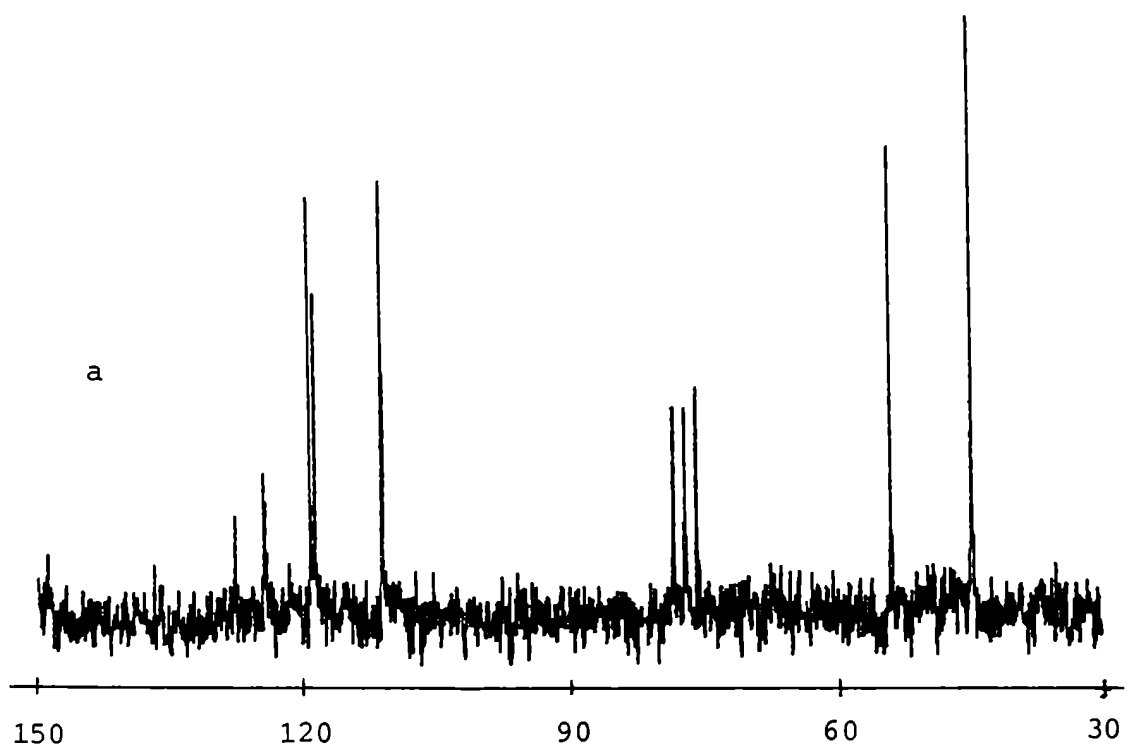


Figura 22: Espectros de RMN- ^{13}C de: a) gramina-6- ^2H ; b) gramina.

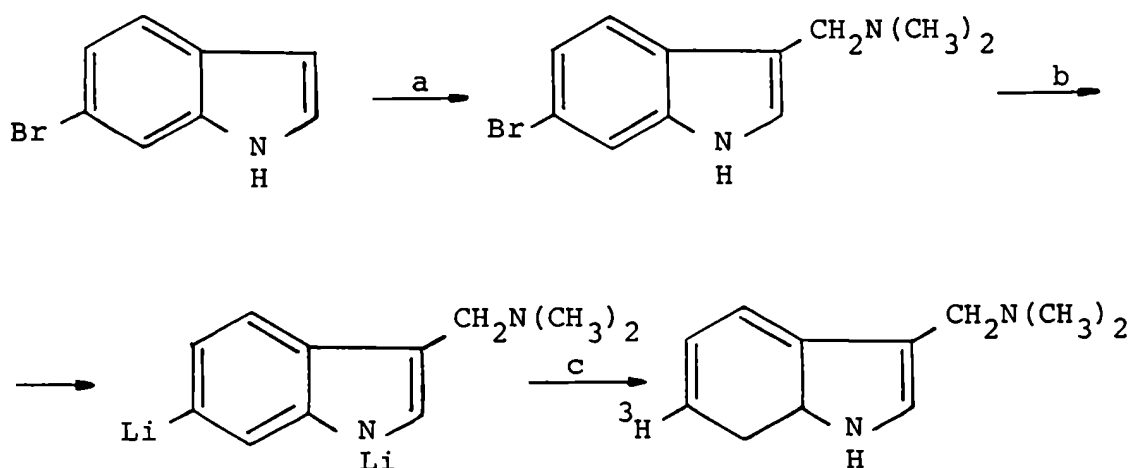


Figura 23: Síntesis de gramina-6-³H. (a: CH₂O/HN(CH₃)₂; b: 1^o n-BuLi, 2^o t-BuLi; c: 1^o ³H₂O, 2^o H₂O).

fase reversa (etanol:agua, 1:1), ya que en este sistema era posible diferenciar indol (18) (Rf 0,4), indol-3-carboxaldehído (13) (Rf 0,5), 6-bromomoiñdol-3-carboxaldehído (26) (Rf 0,3); este último se obtuvo como subproducto al utilizar mezclas crudas de indol-6-²H y 6-bromoiñdol. El producto fue identificado por RMN de ¹H, ²H y ¹³C.

El espectro de RMN-²H (Figura 24) presentaba una sola señal, asignada al ²H de la posición 6, a δ 7,29 ppm. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C del producto deuterado junto a los obtenidos para el compuesto sin deuterar, se pueden observar en las Figuras 25 y 26; éstos se discutirán detalladamente en el Capítulo IV.

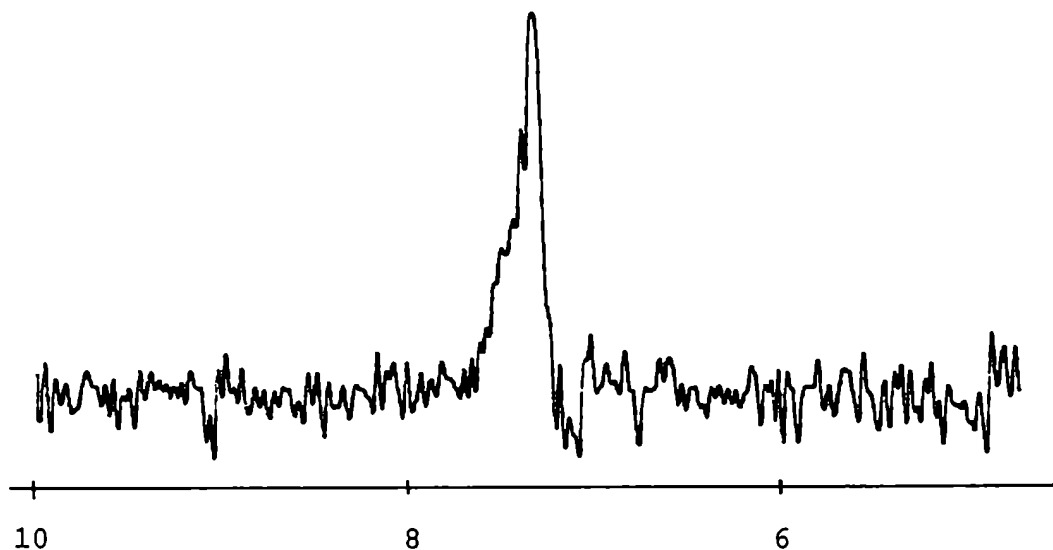


Figura 24: Espectro de RMN-²H de indol-3-carboxaldehído-6-²H.

Las rupturas principales obtenidas en el espectro de masas y la relación de las intensidades de los fragmentos M+1/M/M-1 para el compuesto deuterado y sin deuterar, se ilustran en la Figura 27.

II.4. Síntesis de posibles intermediarios del camino catabólico de gramina.

La síntesis de posibles intermediarios se realizó a partir de indol-3-carboxaldehído (13) comercial; este compuesto y el ácido indol-3-carboxílico (14), eran los únicos compuestos de esta serie de que se disponía en el laboratorio.

La síntesis de 3-(hidroximetil)-indol (17) se realizó por reducción de 13 con borohidruro de sodio⁷⁵; el producto obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílicagel y fue iden

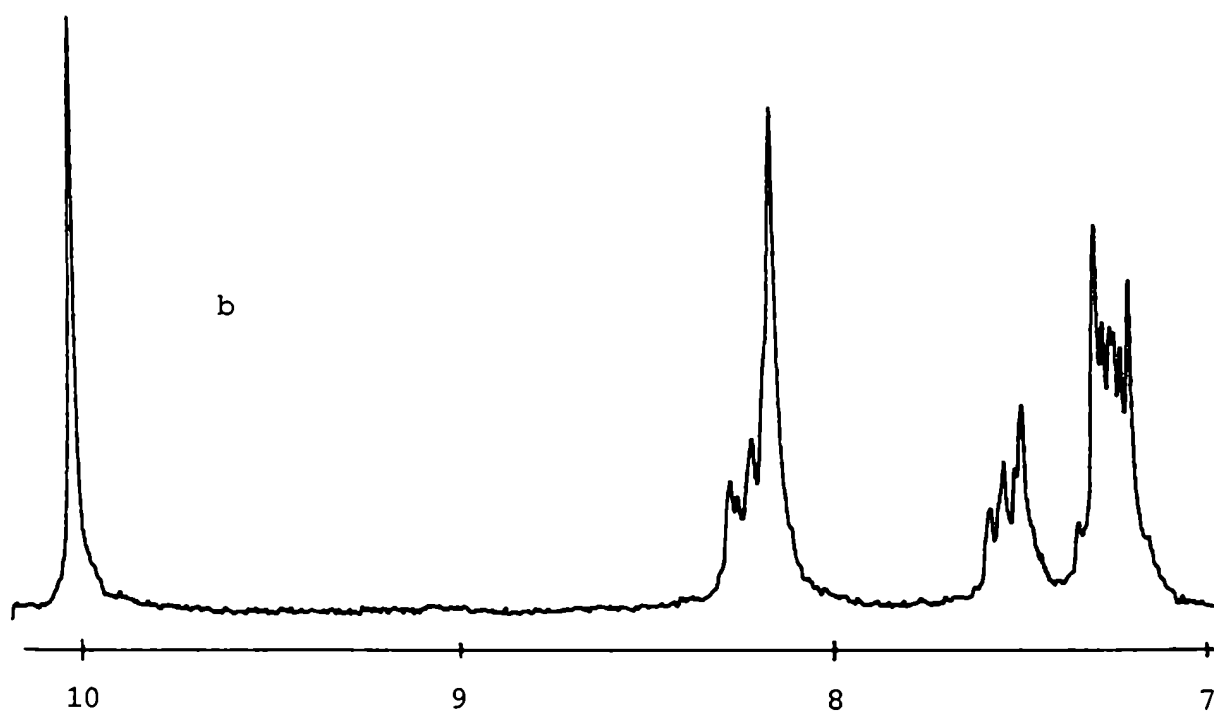
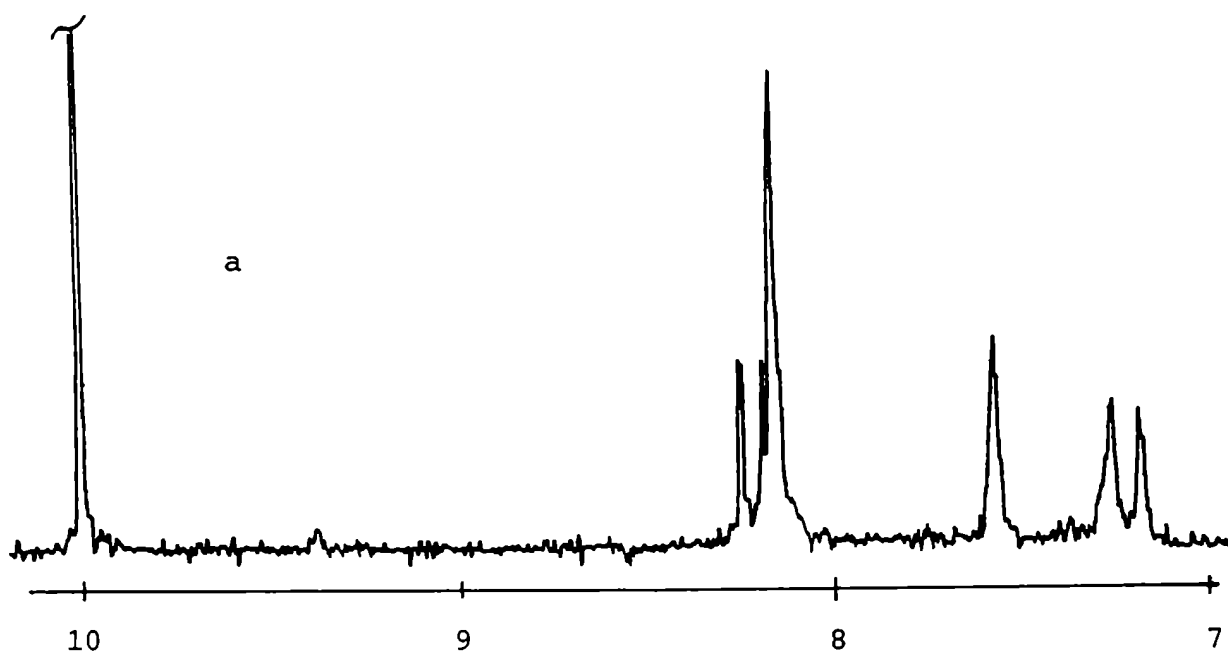


Figura 25: Espectros de RMN- ^1H de: a) indol-3-carboxaldehido-6- ^2H ; b) indol-3-carboxaldehido.

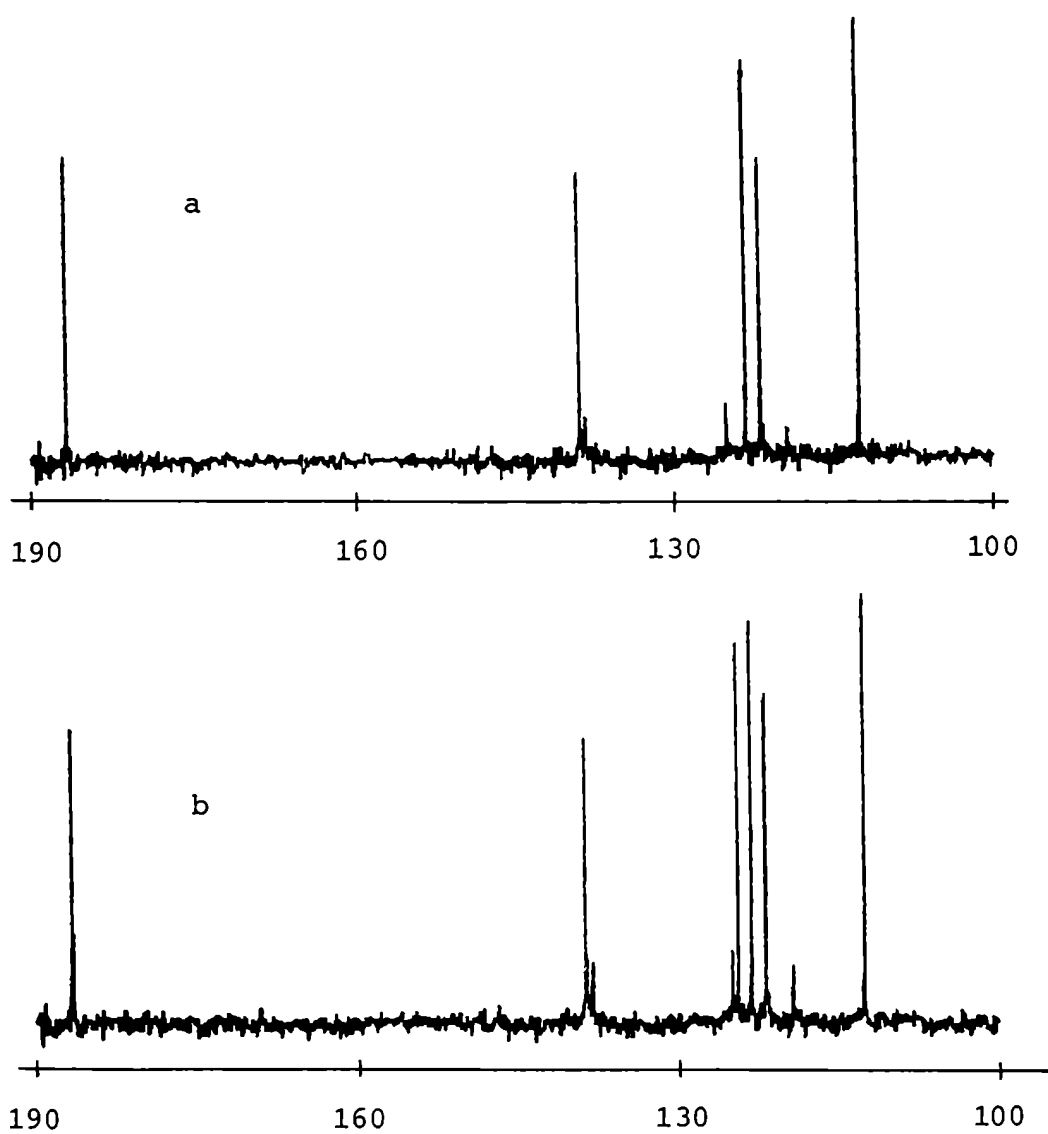


Figura 26: Espectros de RMN- ^{13}C de: a) indol-3-carboxaldehido-6- ^2H ; b) indol-3-carboxaldehido.

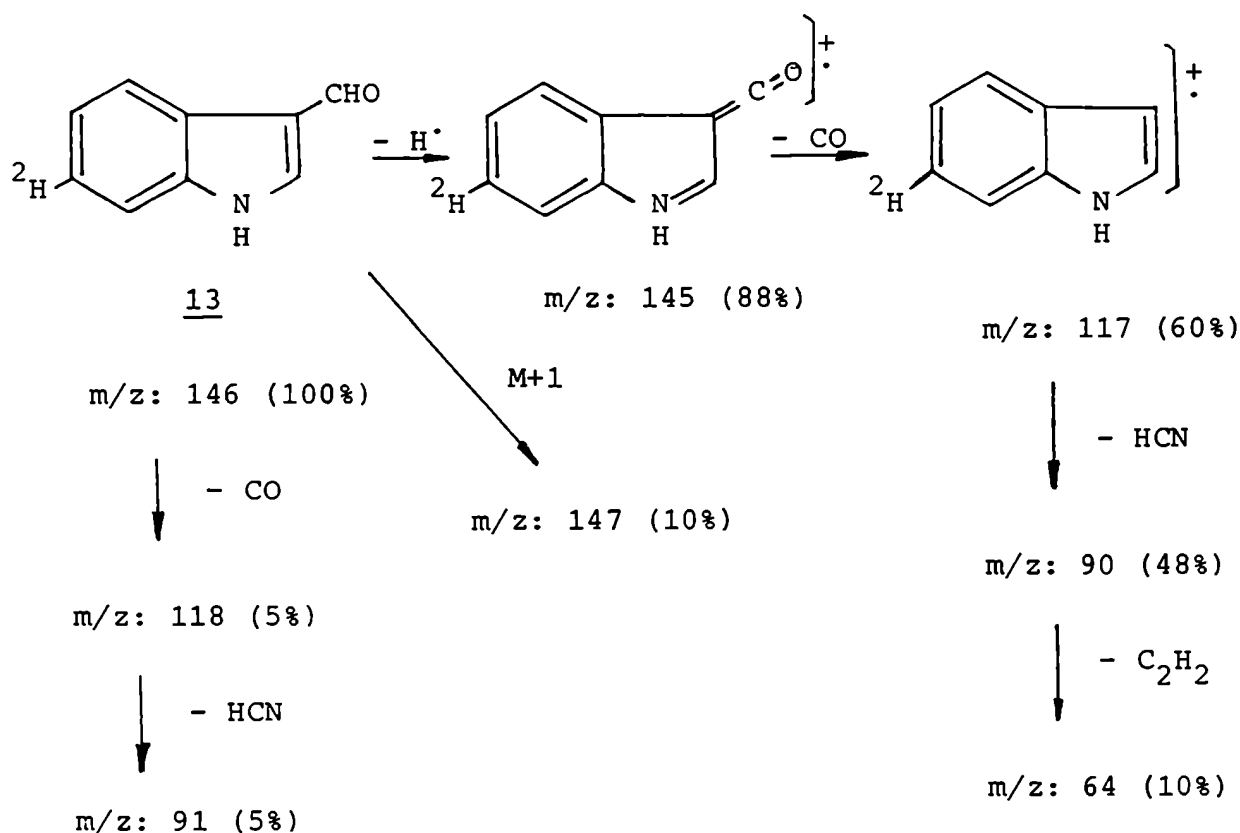


Figura 27: Principales fragmentos en el espectro de masas de indol-3-carboxaldehído-6- ^2H . (Relación M+1/M/M-1 en el indol-3-carboxaldehído: 11/96/100).

tificado por EM y RMN de ^1H y ^{13}C (Capítulo IV).

Se ensayó también la reducción de 13 con hidruro de aluminio y litio, pero en este caso se obtuvo un producto menos polar que fue identificado por RMN- ^1H como 3-metilindol (27). Del mismo modo, cuando se intentó obtener 17 por reacción de 3-indolil-litio con formaldehído en éter etílico, se obtuvo el isómero

1-(hidroximetil)-indol (28), el cual fue identificado por su espectro de RMN-¹H.

Los compuestos 3-(aminometil)-indol (6) y 3-(metilamino metil)-indol (7) se sintetizaron según la técnica descrita en literatura⁶², excepto que la reducción de la imina (29) intermediaria en la obtención de 7 se realizó por hidrogenación catalítica sobre Pd/C. Los productos obtenidos fueron identificados por RMN-¹³C y/o ¹H y por EM. Las secuencias sintéticas utilizadas se esquematizan en la Figura 28.

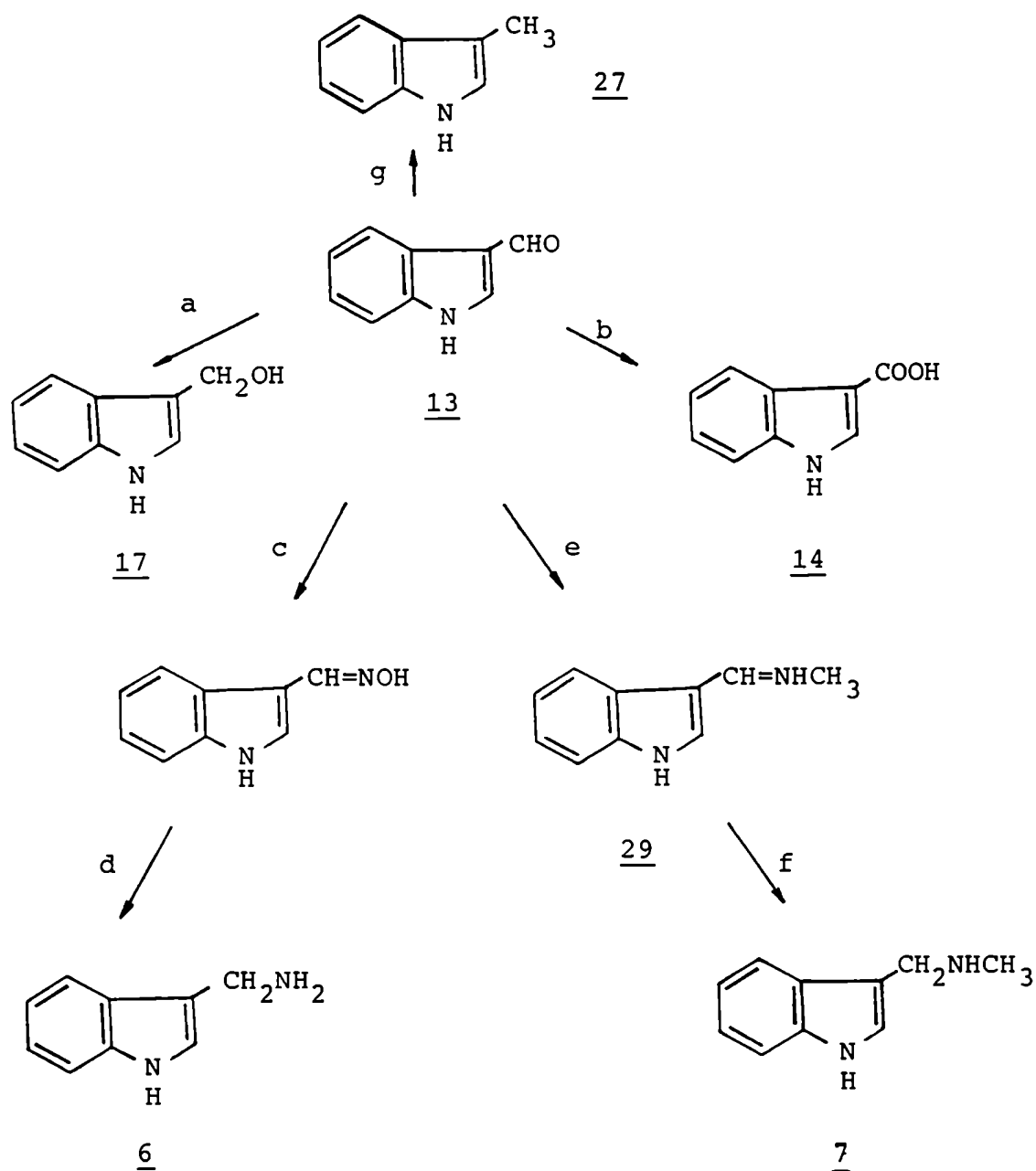


Figura 28: Síntesis de posibles metabolitos de gramina (5).

(a: BH_4Na ; b: $\text{MnO}_4\text{K}/\text{HOK}$; c: $\text{Cl}^-\text{OHNH}_3^+$; d: Aleación de Devarda; e: CH_3NH_2 aq.; f: H_2 , Pd/C; g: H_4AlLi).

CAPITULO III

*Experiencias con plantas
de cebada enteras*

El estudio del catabolismo de gramina en plantas de cebada en desarrollo, requirió conseguir un método de crecimiento del material vegetal en condiciones totalmente controladas y reproducibles, de modo que las experiencias se pudieran realizar en cualquier época del año.

Por este motivo, las semillas se germinaron en una cámara de crecimiento sobre arena calcinada y lavada, a temperatura constante de 25°C y con luz natural suplementada con tubos fluorescentes Sylvania Gro Lux con fotoperíodos de 12 horas. Durante los primeros 4 días de desarrollo sólo se suministró agua destilada a las plántulas; posteriormente, se suministraron también las sustancias minerales necesarias a través de una solución de riego, cuya composición se indica en la Tabla 4. De este modo, se evitó el desarrollo sobre tierra, el cual resultaba indeseable por la falta de control que permitía en cuanto a los materiales y microorganismos presentes en cada germinación particular. Las plantas germinadas y crecidas en las condiciones descritas, presentaban un desarrollo normal al cabo de 30 días, período que se consideró suficiente para el estudio del catabolismo del alcaloide.

En la Figura 29, se puede ver una fotografía de las plántulas de cebada de 4 días de desarrollo, crecidas en las condiciones en que fueron cultivadas durante la presente tesis.

Una vez logradas las condiciones de desarrollo óptimas para las plantas, se dosó el contenido normal del alcaloide en

Tabla 4: Composición de la solución salina empleada en el desarrollo sobre arena de plantas de *Hordeum vulgare*.

Sustancia	Concentración	
MgSO ₄	1,8	g/l
Ca(NO ₃) ₂	1,0	g/l
Na ₂ SO ₄	1,0	g/l
KCl	0,40	g/l
NaH ₂ PO ₄	83	mg/l
MnCl ₂	30	mg/l
Fe ₂ (SO ₄) ₃	16	mg/l
ZnSO ₄	7,5	mg/l
H ₃ BO ₃	7,5	mg/l
KI	3,8	mg/l
CuSO ₄	13	µg/l
MoO ₃	2,5	µg/l

raíces y plantas enteras. De esta forma pudo determinarse la etapa más conveniente del desarrollo del vegetal para realizar los estudios de catabolismo, como así también la cantidad de alcaloide que se debía utilizar en cada experiencia, a fin de perturbar en la menor medida posible el metabolismo de las plantas.

Es conocido que las semillas de cebada no contienen

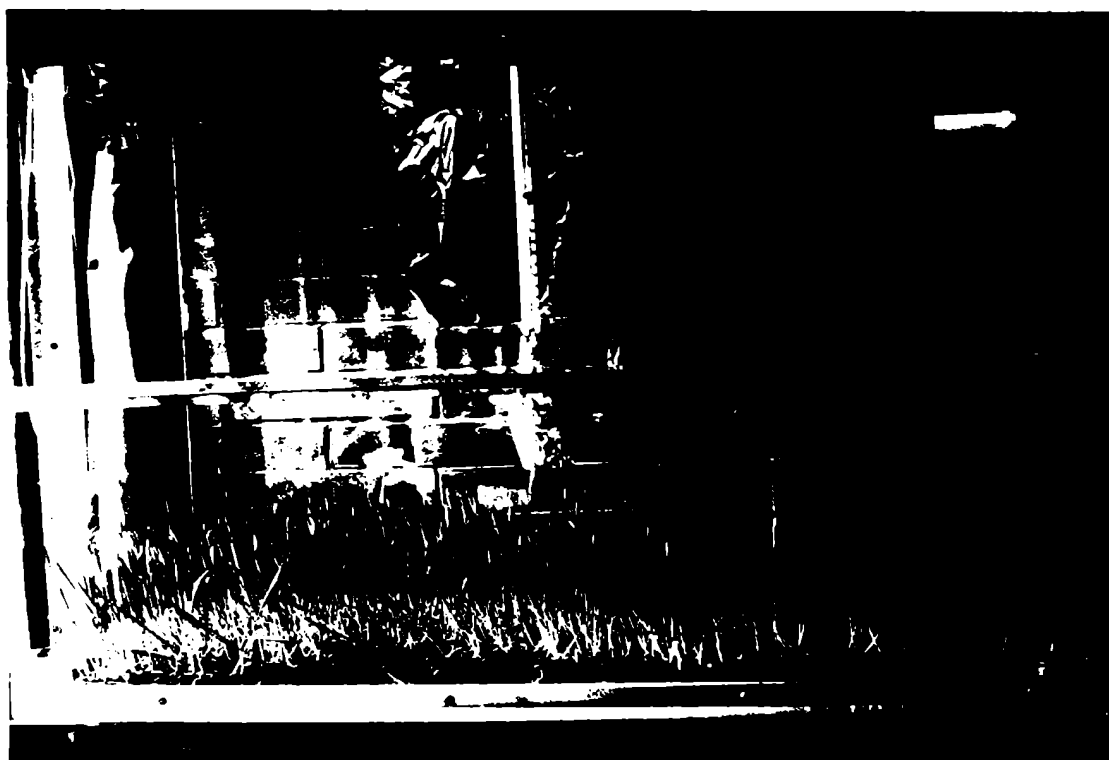


Figura 29: Plántulas de *Hordeum vulgare* de 4 días de desarrollo, tal como fueron cultivadas durante la presente tesis.

alcaloides y que éstos aparecen en los primeros días de la germinación^{21,22,31,32}. Como se indicó anteriormente (Capítulo I, página 10), se encontraba descrito que la gramina aparece en los tallos el tercer día después de la germinación y permanece en cantidades detectables hasta los 50 días de desarrollo de las plantas, aproximadamente^{18,33}. Sin embargo, se hallaba descrito que el contenido de gramina variaba con la época del año en cultivos de *Phalaris arundinacea*^{76,77}. Como la aparición

del alcaloide en las plantas y su cantidad, podría estar influenciada también por las condiciones de crecimiento del vegetal así como por la variedad de cebada utilizada en este trabajo (MAGNIF 102 INTA), se decidió realizar una determinación cuantitativa.

III.1. Dosaje del alcaloide en raíces y plantas enteras.

La extracción de las bases nitrogenadas desde el material vegetal, se realizó macerando las plantas o raíces en un mortero con metanol:ácido clorhídrico concentrado (100:1,2). El extracto se lavó con hexano y se separó por CCD preparativa bidimensional sobre sílicagel, utilizando como solventes mezclas de diclorometano:metanol:amoníaco concentrado (8:2:0,1) y acetona:amoníaco concentrado (100:1), respectivamente. La zona del cromatograma correspondiente a gramina, se determinó en cada caso por comparación con muestras auténticas, y el alcaloide se aisló por elución de la sílicagel con metanol:ácido clorhídrico concentrado (100:1,2). La solución así obtenida fue utilizada directamente para determinar el contenido de gramina endógeno en plantas de cebada en desarrollo, comparando la absorbancia a 276 nm en su espectro ultravioleta (obtenido usando como referencia la solución proveniente de la elución de una zona del cromatograma libre de compuestos), con los valores obtenidos para soluciones de gramina de concentración conocida (Figura 30). Dado que en el espectro de gramina en solu-

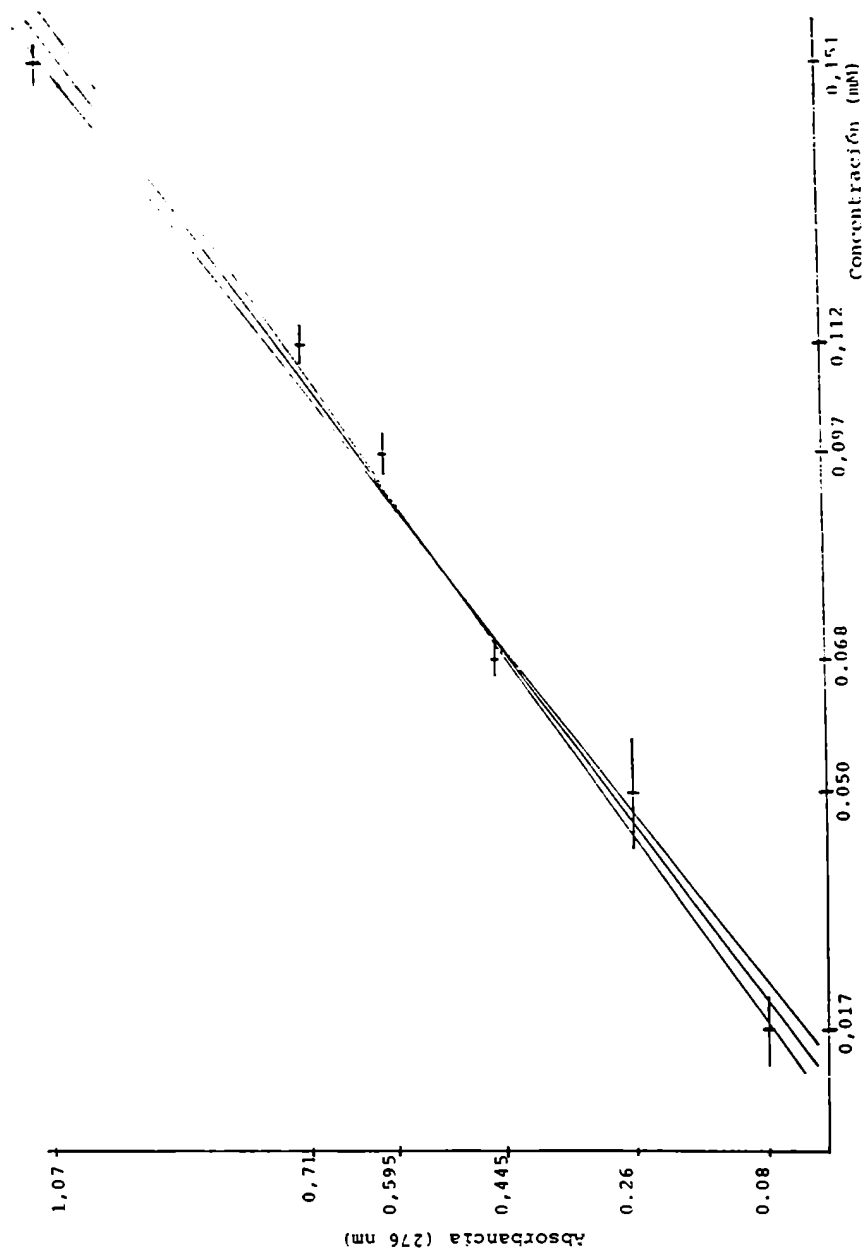


Figura 30: Curva de calibración utilizada para la determinación cuantitativa de gramina.

ción de metanol:ácido clorhídrico (100:1,2) (Figura 31.b) los máximos de absorbancia a 276, 269 y 287 nm se encontraban mejor resueltos que en los espectros obtenidos en solución de metanol (Figura 31.a), se decidió medir los espectros de gramina extraída en cada determinación directamente en el solvente con que se desorbía de la sílicagel.

En todos los casos, el máximo de absorción a 276 nm resultó ser el mejor resuelto del espectro, por lo cual se decidió utilizar esa longitud de onda para las determinaciones cuantitativas. No obstante, se determinó el espectro completo de la gramina extraída y no sólo su absorbancia a 276 nm para tener otro criterio más de identificación del producto aislado.

Los resultados obtenidos en raíces (Figura 32) y plantas enteras (Figura 33), indicaron que la gramina se hallaba presente tanto en las raíces como en la parte aérea del vegetal desde los primeros días del desarrollo, mayoritariamente en los tallos. El hecho que la relación entre la cantidad del alcaloide presente en tallos y raíces sea mucho mayor para las plantas de 19 días que para las más jóvenes, sugeriría una posible translocación de la gramina hacia las partes aéreas de las plantas; esto favorecería la distribución homogénea del alcaloide suministrado y absorbido por las raíces en las experiencias que se describen a continuación.

A la luz de estos resultados, se decidió estudiar el catabolismo de la gramina utilizando plantas de cebada de 11 a 21 días

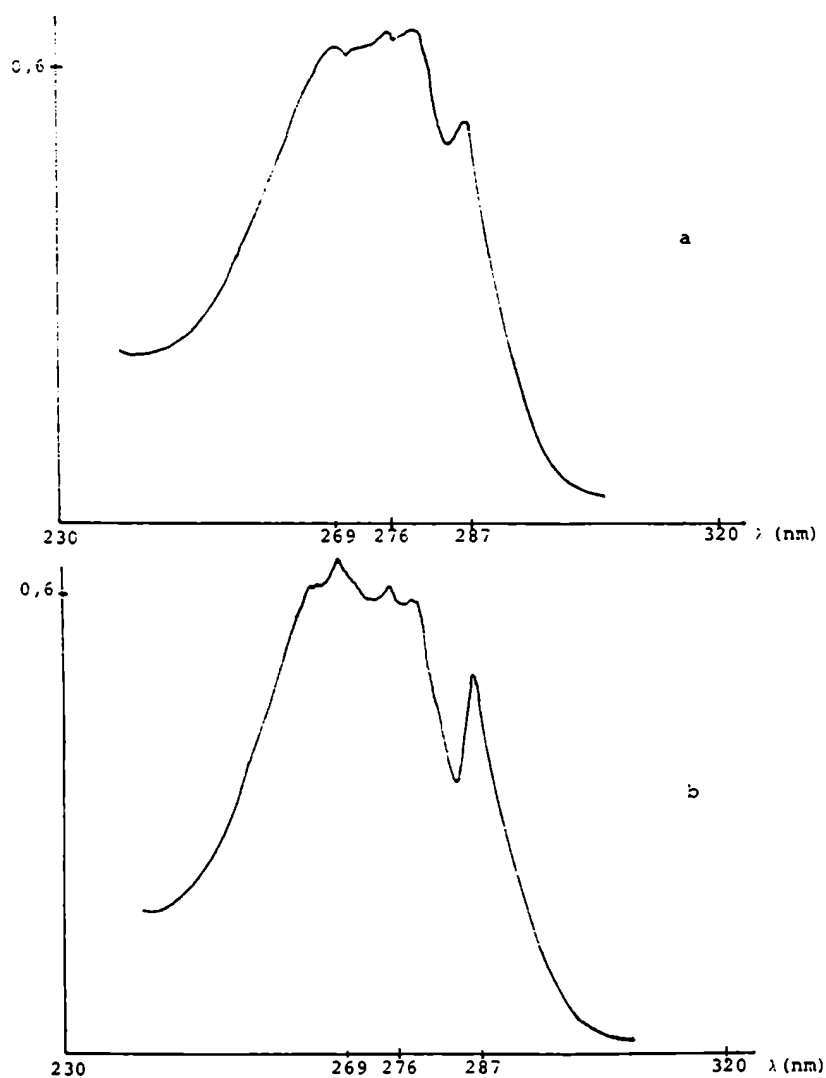


Figura 31: Espectros ultravioleta de gramina (5); a: disuelta en metanol; b: en metanol:HCl (100:1,2).

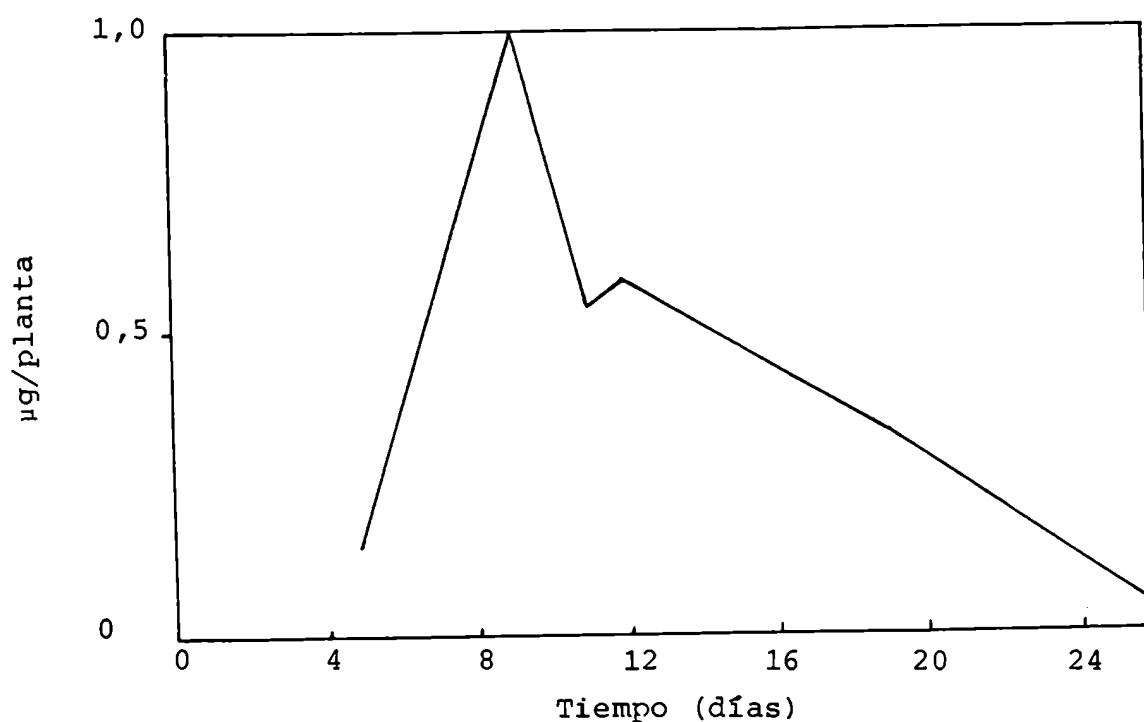


Figura 32: Contenido de gramina en función del tiempo en raíces de plantas de cebada en germinación.

de edad, para asegurar que la adición externa de gramina perturba se en la menor medida posible el metabolismo normal del alcaloide, el cual está presente en esa etapa del desarrollo de las plantas en una concentración de 17 µgr/planta (Figura 33).

La gramina marcada que se utilizó en dichas experiencias, se suministró disuelta en la solución salina de riego (la disolución del alcaloide se logró disolviéndolo previamente en la cantidad mínima de metanol y diluyendo hasta el volumen deseado con solución salina de riego); la radiactividad suministrada se determinó

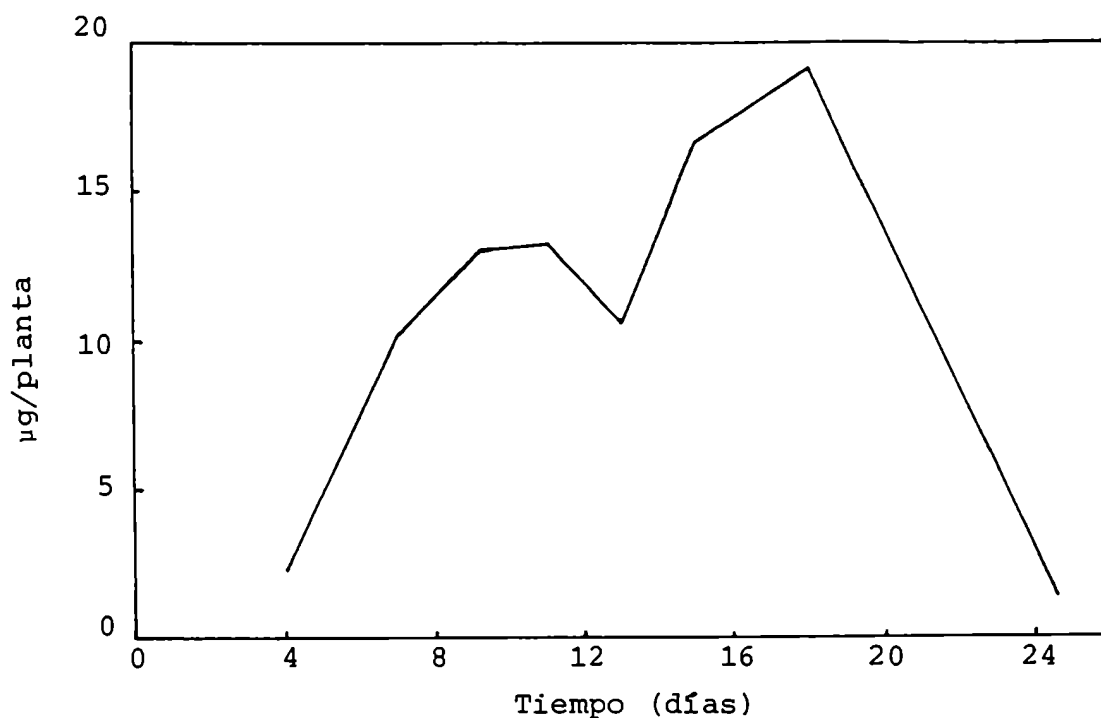


Figura 33: Contenido de gramina en función del tiempo en plantas de cebada en germinación.

en una alícuota de dicha solución y el resto se administró a las plantas en el momento adecuado, distribuyendo la solución cuidadosamente entre las raíces de las plantas y evitando el contacto con los tallos; de este modo, se aseguraba que la absorción se realizaba exclusivamente a través de las raíces.

III.2. Determinación de la cinética de absorción de gramina por plantas de cebada en desarrollo.

Con el fin de conocer la eficiencia del sistema de inoculación del alcaloide y la etapa óptima para el estudio del

catabolismo de gramina, se determinó la velocidad de absorción de gramina por plantas de cebada intactas entre los 11 y 21 días de edad, suministrando a las mismas gramina-¹⁴C y determinando la radiactividad remanente en la arena a distintos tiempos .

Para realizar estas experiencias las plantas se transfirieron a vasos de precipitados a los 6 días de edad (cada vaso contenía el mismo número de plantas y la misma cantidad de arena), y fueron mantenidas dentro de la cámara de crecimiento, de modo que las condiciones de desarrollo fueron totalmente equivalentes en todas las determinaciones.

Se utilizaron plantas de 11 y 14 días de desarrollo, a las cuales se les suministró la cantidad de gramina- α -¹⁴C suficiente para tener una relación de 17 μ gr de alcaloide por planta, cantidad que se consideró adecuada puesto que correspondía a una relación de sólo 1 a 1,5 veces el contenido normal del alcaloide (Figura 33, página 71).

Las plantas fueron separadas de la arena en el momento adecuado, teniendo sumo cuidado en no dañar las raíces las cuales se lavaron con agua destilada dentro mismo del vaso de precipitados. Se agregó gramina fría a la arena y se extrajo exhaustivamente con metanol:ácido clorhídrico (100:1,2) determinándose se la radiactividad remanente en el extracto (alícuotas de los extractos analizadas por CCD demostraron que toda la radiactividad presente se encontraba en la gramina que no había sido ab

sorbida por las plantas).

Las curvas de absorción de gramina por plantas de cebada de 11 y 14 días de desarrollo se muestran en la Figura 34; las mismas indicaron que el método de inoculación del alcaloide era efectivo, puesto que la gramina era absorbida rápidamente a través de las raíces en las primeras horas siguientes al agregado exógeno del alcaloide marcado, disminuyendo luego la velocidad de absorción probablemente debido a una disminución en la concentración del alcaloide residual; dicha variación, también podría estar influenciada por un aumento en el nivel endógeno de gramina. Para las plantas de 14 días, la absorción resultó ser algo más rápida en las primeras horas, aunque en ambos casos se llegó al mismo valor final.

III.3. Obtención de la curva de velocidad de degradación de la cadena lateral del alcaloide a dióxido de carbono.

El destino catabólico de la cadena lateral de la gramina había sido investigado por Digenis y colaboradores⁴⁴⁻⁴⁶ en tallos etiolados de cebada, en una experiencia en la cual sólo pudo recuperarse una fracción de la radiactividad originalmente localizada en la cadena lateral del alcaloide (Capítulo I, página 17). Los autores consideraron que debían existir otros caminos alternativos para la degradación de la gramina por plantas de cebada.

Se decidió entonces determinar la importancia relativa del

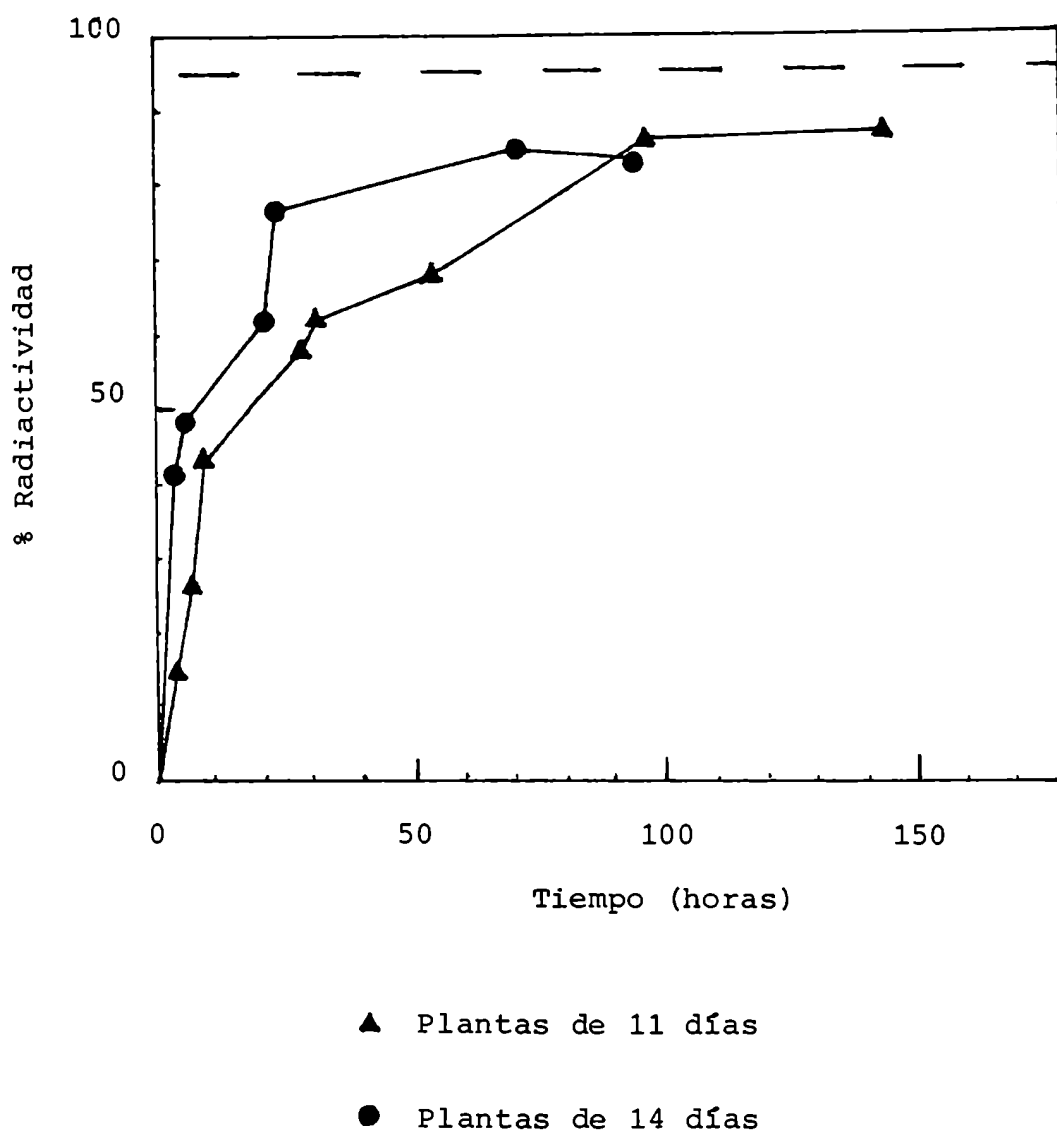


Figura 34: Curvas de absorción de gramina- α - ^{14}C por plantas de cebada intactas.

camino catabólico en el cual el carbono α era eliminado como CO_2 (y así la posible existencia de otros caminos alternativos), pero en plantas intactas de cebada crecidas en condiciones normales. Con este fin, se suministró separadamente a plantas de 11 y 14 días gramina- α - ^{14}C y se midió la radiactividad presente en el CO_2 expelido como una función del tiempo. La cantidad de alcaloide suministrado a las plantas fue nuevamente entre 1 y 1,5 veces el contenido normal de gramina en esa etapa del desarrollo de las plantas.

En la Figura 35 se muestra el perfil cinético de la evolución de CO_2 radiactivo obtenido para plantas de cebada de 11 días junto a la correspondiente curva de absorción de gramina; se observa una etapa de retraso de unas pocas horas seguida por un incremento de la velocidad de degradación total, la cual alcanza un máximo al cabo de 60 horas, disminuyendo después a medida que se hace menor la cantidad disponible de gramina suministrada.

En la Figura 36 se presenta la curva correspondiente a plantas de 14 días, junto a la correspondiente curva de absorción de gramina; se puede observar que la etapa de retraso en la evolución de CO_2 radiactivo es más corta que en las plantas de 11 días y que el máximo de velocidad se alcanza también en menos tiempo. Como en este caso la velocidad de absorción del alcaloide resultó también mayor, esto indicaría la presencia de un metabolismo ligeramente más activo en las plantas de 14 días.

Tanto con las plantas de 11 como con las de 14 días, se

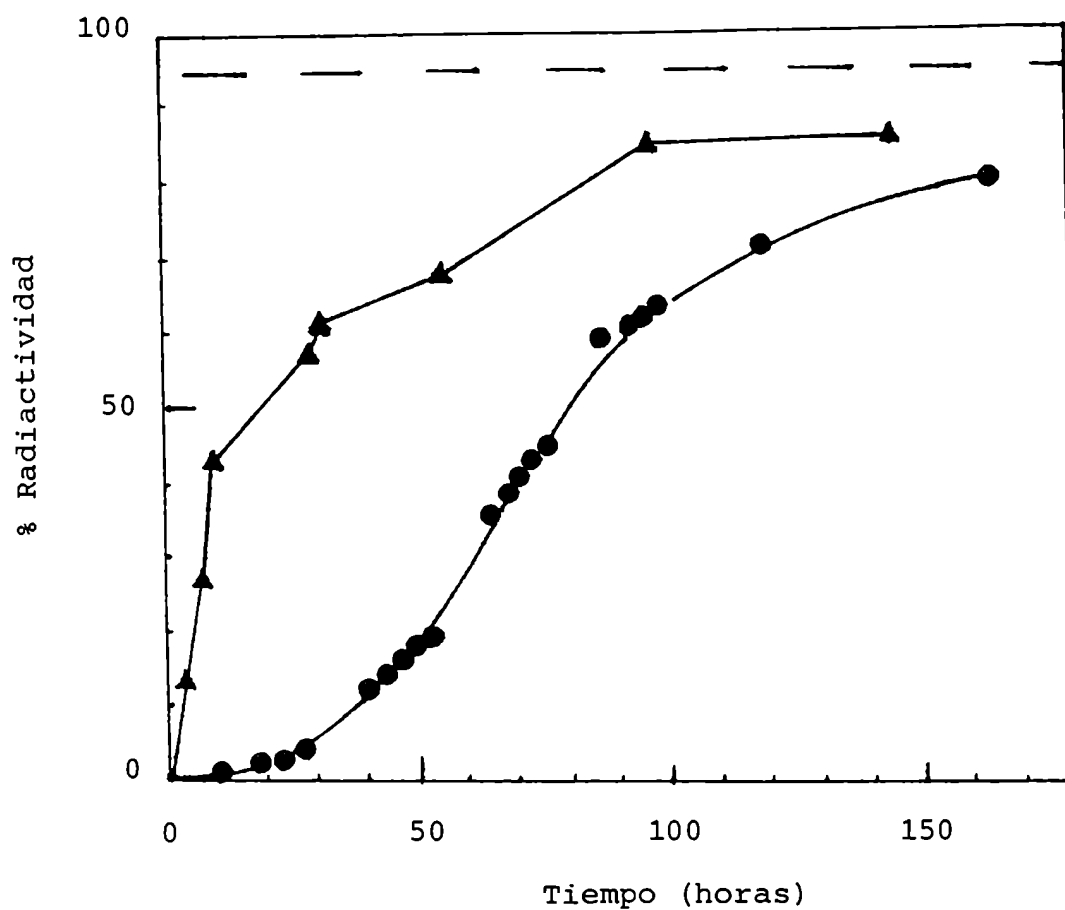


Figura 35: Porcentaje de gramina- α - ^{14}C absorbida (▲) y de $^{14}\text{CO}_2$ expirado (●) en función del tiempo, por plantas de cebada de 11 días. Los segmentos sólidos indican los períodos de oscuridad.

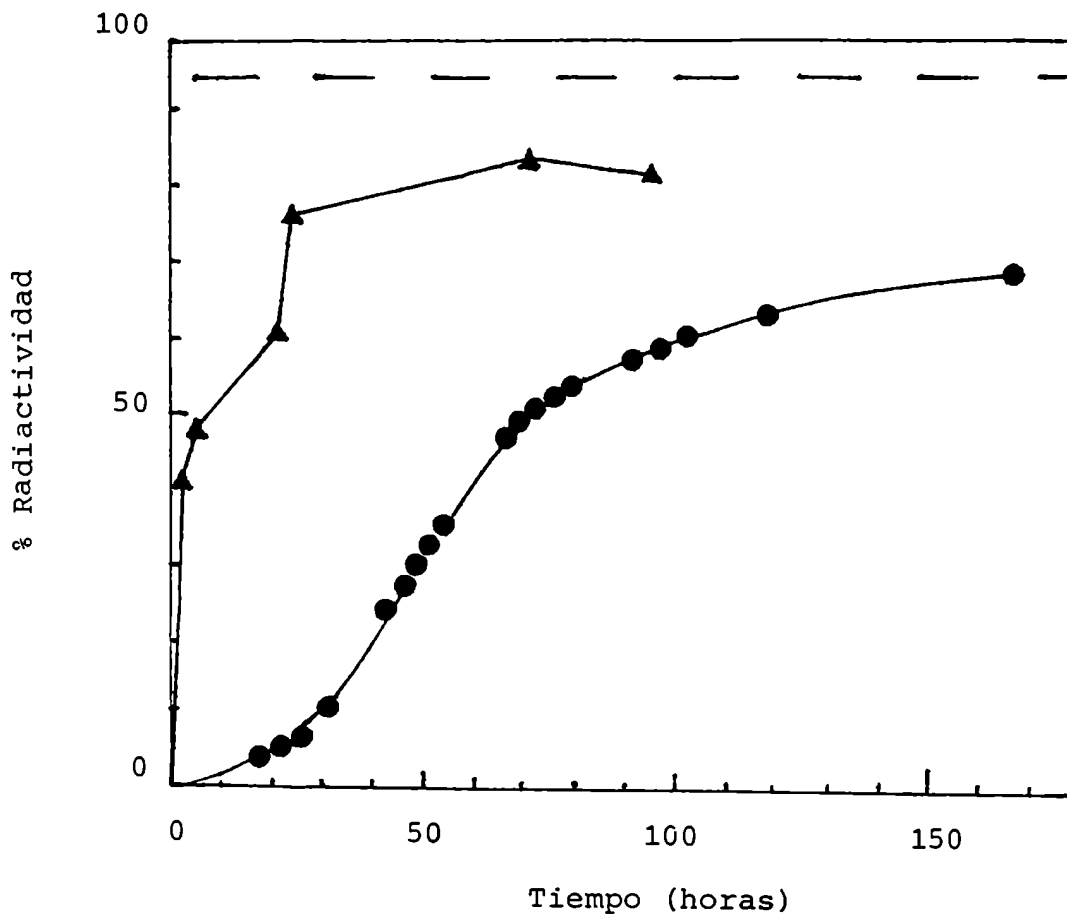


Figura 36: Porcentaje de gramina- α - ^{14}C absorbida (▲) y de $^{14}\text{CO}_2$ expirado (●) en función del tiempo, por plantas de cebada de 14 días. Los segmentos sólidos indican los períodos de oscuridad.

Tabla 5: Distribución de la radiactividad en las plantas
7 días después de haberles suministrado gramina- α - ^{14}C .

	Radiactividad en el extracto MeOH:HCl (%)	Radiactividad en la gramina aislada (%)
Raíces	35	24
Parte aérea	65	23

obtuvo una conversión casi total (95% y 85% respectivamente) del carbono- α de la gramina absorbida en dióxido de carbono en un período de 7 días. La radiactividad no incorporada en CO_2 se encontró en el extracto metanol:ácido clorhídrico de las plantas utilizadas, según se indica en la Tabla 5.

Para determinar si la radiactividad remanente en la arena era debida a la gramina suministrada que no había sido absorbida, o a algún producto del catabolismo excretado por las plantas a través de las raíces, se agregó gramina fría a la arena y se realizó la extracción en forma similar a la descrita en los experimentos de absorción, (Sección III.2). La gramina extraída se purificó por CCD preparativa encontrándose que contenía el total

de la radiactividad presente en la arena al finalizar el experimento; se concluyó entonces que aquella era debida a la presencia del alcaloide que no fue absorbido durante el transcurso del experimento. Este procedimiento fue repetido en cada experiencia en que se suministró gramina- α - ^{14}C o gramina-2- ^{14}C , obteniéndose en todos los casos resultados idénticos.

Con el fin de poder obtener mediciones durante el período de oscuridad, lo cual permitiría determinar si había diferencias en cuanto al metabolismo del alcaloide respecto al período en que las plantas reciben luz, se realizó una experiencia utilizando plantas de 11 días de desarrollo crecidas en condiciones de "día invertido" (con fotoperíodos de 12 horas pero en los cuales la etapa de oscuridad coincidía con la de luz en las experiencias anteriores) y suministrando la gramina radiactiva durante la etapa de oscuridad. Estas condiciones se lograron colocando la cámara de crecimiento en un cuarto oscuro y regulando los fotoperíodos de modo de obtener luz durante la noche y oscuridad durante el día. Excepto por esta diferencia, el experimento se realizó en las mismas condiciones que los anteriores.

La curva de evolución de CO_2 radiactivo se presenta en la Figura 37; en ella es evidente que la etapa de retraso es más pronunciada y que la velocidad máxima se alcanza recién a las 80 horas; sin embargo, la conversión total fue también del 90% al cabo de 7 días; o sea que la curva aparece retrasada en apro-

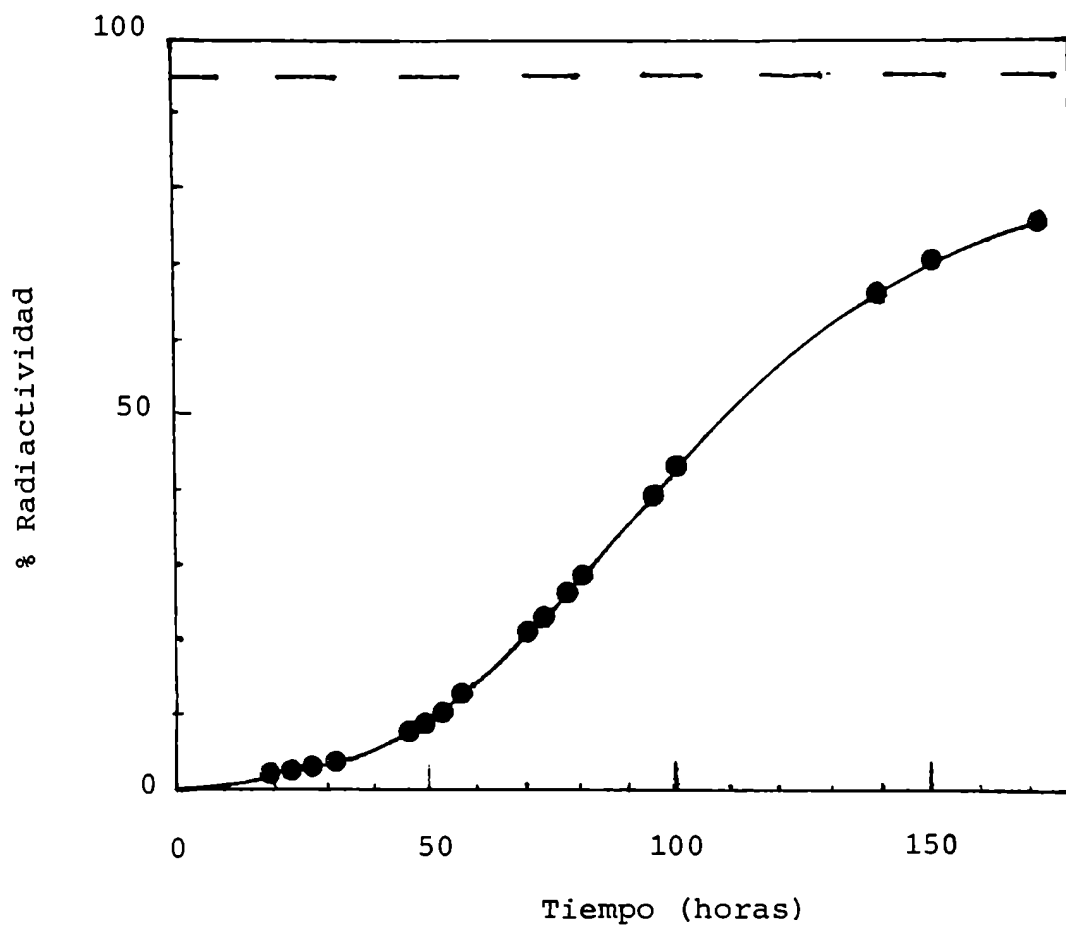


Figura 37: Porcentaje de $^{14}\text{CO}_2$ expirado en función del tiempo, por plantas de cebada de 11 días creciendo con fotoperíodos invertidos. Los segmentos sólidos indican los períodos de oscuridad.

ximadamente 20 horas con respecto a la obtenida para plantas de 11 días en las cuales la gramina se suministró durante un período de luz.

Si bien no se determinó la curva de absorción del alcaloide en estas condiciones, estos resultados indicarían que las plantas necesitan pasar al menos por una etapa de iluminación para seguir el proceso catabólico normal y que la luz debería influenciar en algunos de los pasos iniciales del catabolismo de la gramina.

Un aspecto notable de los resultados obtenidos fue que en los experimentos que se iniciaron con plantas de 11 días, la velocidad para la evolución de CO_2 radiactivo fue máxima cuando la edad de las plantas era de 13-14 días, y caía notablemente cuando estas tenían 16 días, mientras en los experimentos en que se utilizaron plantas que tenían 14 días de edad, la velocidad máxima se alcanzó cuando las plantas tenían 16 días. De aquí, se deduce que el período de retraso observado no se debía aparentemente a la falta de actividad enzimática sino a una plausible acumulación de gramina y/o intermediarios del camino catabólico del alcaloide en la planta.

Los resultados obtenidos indican que el carbono α de la cadena lateral de la gramina se convierte cuantitativamente en CO_2 en plantas de cebada intactas en desarrollo, y no se encontró ninguna evidencia para la existencia de otros caminos alternativos que pudieran finalizar en otros productos, bajo condiciones expe-

rimentales que no perturben el metabolismo de las plantas.

III.4. Inoculación de gramina-2-¹⁴C.

Una vez determinado que el c- α de la cadena lateral de la gramina se degradaba totalmente a CO₂ durante el catabolismo del alcaloide en plantas de cebada intactas, se ensayó la inoculación de un trazador marcado en una posición de la molécula más favorable para la determinación de los productos intermedarios en la degradación del alcaloide. Con este fin se utilizó gramina-2-¹⁴C la cual fue sintetizada a ese efecto según se describió en la página 28.

En una primera experiencia realizada con gramina-2-¹⁴C, se utilizaron plantas de cebada de 11 días de desarrollo. A los 7 días de haberle suministrado el alcaloide, las plantas se cosecharon separándose en parte aérea y raíces y se realizó una extracción secuencial exhaustiva de cada fracción primero con metanol y luego con agua, utilizando extractores Soxhlet. Se determinó la radiactividad presente en los extractos metanólicos y acuosos como así también en los residuos sólidos no extraibles, para lo cual se dejó en digestión una alícuota de cada sección del vegetal con protosol⁷⁸. Finalmente, se determinó la radiactividad remanente en el agua de riego y en la arena donde habían crecido las plantas, la cual, como se indicó anteriormente (página 79), era debida a la gramina administrada que no fue absorbida por las plantas. Los resultados obtenidos se resumen en

la Tabla 6.

Los extractos metanólicos de raíces y parte aérea fueron separados por cromatografía en columna de sílicagel, con el fin de identificar los productos radiactivos presentes. Sin embargo, la única sustancia activa identificable fue gramina que no había sido catabolizada, la cual se identificó por CCD utilizando testigos de muestra auténtica y una mezcla de diclorometano:metanol:amoníaco concentrado (8:2:0,1) como solvente. La radiactividad recuperada en gramina correspondía respectivamente, al 70 y 60% de la presente en los extractos metanólicos de tallos y raíces. El resto de la radiactividad se encontró distribuida en varias fracciones minoritarias, y dada la pequeña cantidad de masa presente no pudo ser asignada a ningún compuesto en particular.

Se analizaron también los residuos sólidos no extraíbles con metanol y agua, con el fin de determinar la radiactividad presente en la fracción proteica y particularmente en el triptofano, ya que era conocido que dicho aminoácido es el precursor biosintético de gramina en tallos de cebada en germinación. Como se indicó anteriormente (Capítulo I, página 16), otros autores habían estudiado la posibilidad de que el triptofano fuera un catabolito de la gramina en tallos de cebada⁴⁴; sin embargo, los resultados obtenidos por este autor no estaban de acuerdo con los obtenidos por Wightman³⁹, si bien hay que considerar que unos determinaron la radiactividad presente en el triptofano libre³⁹ y otros en el hidrolizado de proteínas⁴⁴.

Tabla 6: Degradación de gramina-2-¹⁴C. (a)

	Fracción	% Radiactividad Recuperada ^(b)			
		Total	Gramina	Proteínas	Triptofano
Extracto metanólico	Tallos	14%	8,2%	-	-
	Raíces	3,4%	2,2%	-	-
Extracto acuoso	Tallos	0,1%	-	-	-
	Raíces	0,03%	-	-	-
Extracto CH ₃ OH:HCl	Arena	9,3%	8,5%	-	-
	Agua de riego	Arena	5,4%	5,0%	-
Sólido (no extraíble)	Tallos	1,2%	-	0,9%	0,6%
	Raíces	0,7%	-	0,5	-

(a): se utilizaron 230 plantas de 11 días de desarrollo; la cantidad de gramina-2-¹⁴C suministrada fue de 22 µg/planta (2,5 x 10⁷ dpm).

(b): el signo "-" indica que ese ítem no fue analizado.

Para tratar de determinar cuál era la hipótesis verdadera, se aisló el triptofano unido a proteínas, previa hidrólisis del tejido vegetal no extraíble. De los métodos conocidos para la hidrólisis de proteínas en tejido vegetal⁷⁹, se eligió la digestión en solución de hidróxido de bario ya que en este medio no se producía la descomposición del triptofano. Se ensayaron también distintos sistemas cromatográficos adecuados para la separación de aminoácidos en capa delgada preparativa⁸⁰, eligiéndose sílica-gel como adsorbente y una mezcla de diclorometano: metanol:amoniaco (17%), (4:4:2) como solvente de desarrollo. En esas condiciones el triptofano presentaba Rf 0,8, separándose de los demás aminoácidos, los cuales presentaban un Rf menor. De este modo se separó el triptofano de la mezcla de aminoácidos provenientes de la hidrólisis (comparando con una muestra de triptofano auténtico, el cual se revelaba con el reactivo de Ehrlich⁸¹).

El análisis de los resultados obtenidos en esta experiencia (Tabla 6) indicó que, contrariamente a lo que se había propuesto, la parte mayoritaria de la radiactividad suministrada inicialmente presente en el núcleo indólico de la gramina no se encontraba en el tejido vegetal, después de 7 días de haber suministrado el alcaloide a las plantas. Se consideró entonces la posibilidad de que el C-2 de la gramina podría transformarse en una molécula pequeña, probablemente CO₂, la cual sería expelida por las plantas.

Para verificar esta hipótesis se realizó una experiencia

en condiciones idénticas a la anterior, pero recogiendo el CO_2 expelido por las plantas durante 7 días a partir de la administración del alcaloide, en forma análoga a las experiencias realizadas con gramina- α - ^{14}C (página 73).

Los resultados obtenidos en esta nueva experiencia fueron totalmente coincidentes con los obtenidos en la anterior, ya que se observó que el 56,5% de la radiactividad suministrada (62% considerando sólo la gramina-2- ^{14}C absorbida), se encontraba en el CO_2 expelido por las plantas durante los 7 días siguientes a la administración del alcaloide. La radiactividad recuperada desde la arena y el agua de riego (8,5%) fue otra vez asignada a la gramina no absorbida, según se determinó por extracción y análisis por CCD. El material vegetal remanente no fue analizado, ya que se habían utilizado sólo 30 plantas y no fue el objetivo de la experiencia.

En la Figura 38 se puede observar la curva de evolución de CO_2 radiactivo en función del tiempo para plantas de cebada de 11 días, a partir del momento en que se suministró a las mismas gramina-2- ^{14}C . Comparando con el perfil cinético obtenido para la degradación de gramina- α - ^{14}C , (Figura 35, página 76), es evidente que la etapa de retraso es mayor en este caso, ya que la velocidad máxima de evolución de CO_2 radiactivo se alcanza recién entre las 70 y 90 horas. Esto indicaría un proceso degradativo secuencial del alcaloide, el cual comenzaría por la degradación oxidativa de la cadena lateral con pérdida del C- α como CO_2 y

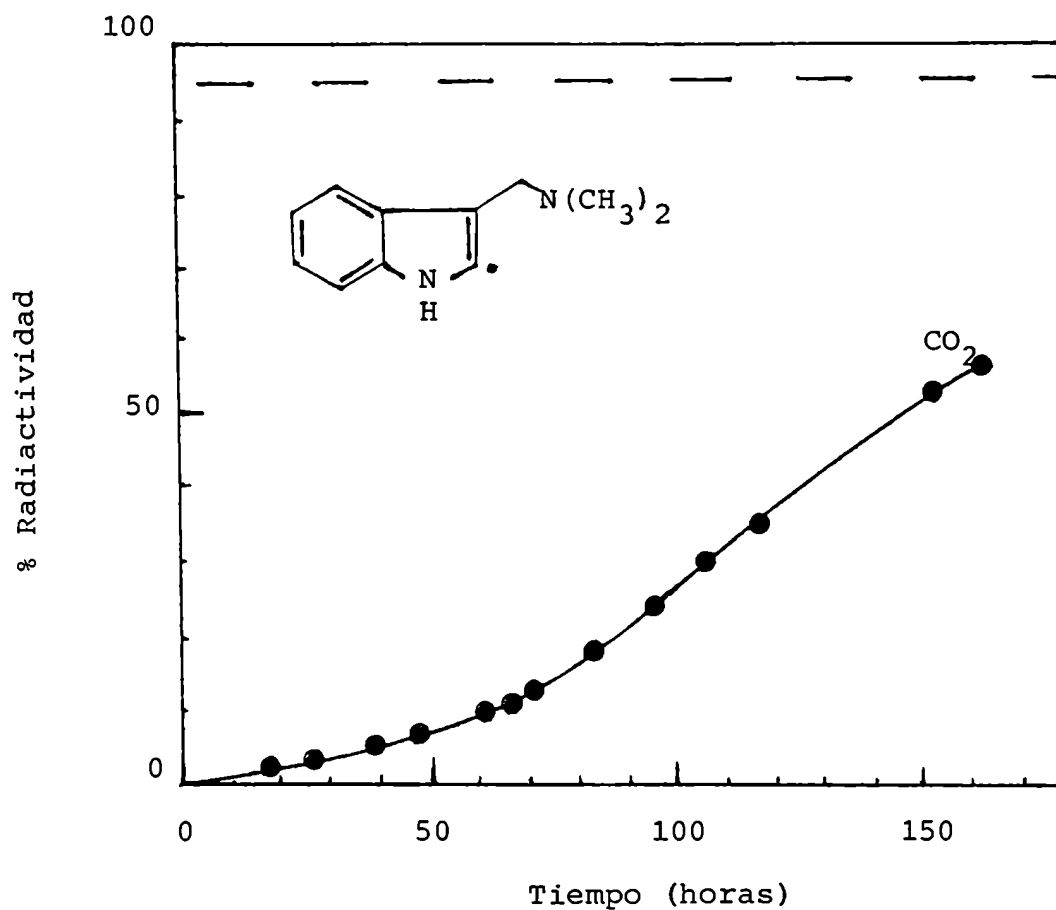


Figura 38: Porcentaje de $^{14}\text{CO}_2$ expirado en función del tiempo por plantas de cebada de 11 días de desarrollo, a partir de la administración de gramina-2- ^{14}C . Los segmentos sólidos indican períodos de oscuridad.

posterior ruptura del anillo indólico, la cual produciría también la pérdida del C-2 de la gramina como CO₂ aunque no en forma cuantitativa.

El hecho que la mayor parte de la radiactividad presente en los extractos metanólicos de raíces y parte aérea (aún después de 7 días) fuera debida a gramina absorbida no metabolizada, aún cuando la absorción del alcaloide resultaba ser extremadamente rápida (Figura 34, página 74), sugeriría que el primer paso en la degradación del alcaloide sería el que regula la velocidad total de su catabolismo, mientras que los intermediarios formados tendrían una vida media muy corta permaneciendo siempre en muy baja concentración.

Con estos resultados y los obtenidos inoculando gramina- α -¹⁴C, se determinó el momento más adecuado para intentar el aislamiento e identificación de los intermediarios en el catabolismo de gramina; para ello se utilizaron las cinéticas de absorción del alcaloide y de evolución de CO₂ radiactivo en el tiempo (Figura 35, página 76 y Figura 38).

En la Figura 39 se puede observar las curvas de radiactividad presente dentro de las plantas en función del tiempo: la que provendría de gramina y/o intermediarios que aún conservan la cadena lateral del alcaloide (curva I) cuya máxima concentración se encontraría entre las 30 y 50 horas después de haber suministrado el trazador, y la que provendría de intermediarios y/o catabolitos finales que aún conservan el C-2

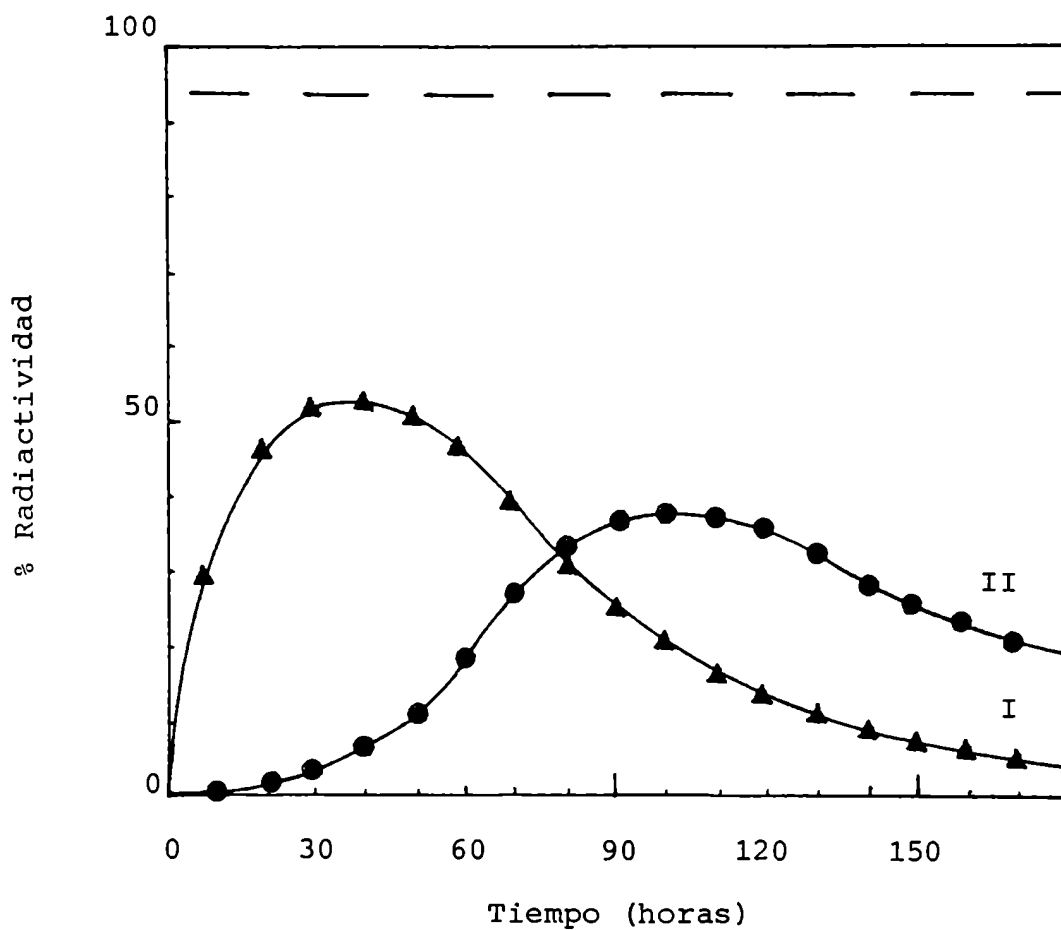


Figura 39: Radiactividad dentro de las plantas proveniente de compuestos con C- α y C-2 (curva I) y con sólo C-2 (curva II).

originalmente presente en la gramina pero no el C- α (Curva II) cuya máxima concentración se encontraría entre las 100 y 120 horas después de la administración del alcaloide. Los períodos indicados, serían los más adecuados para intentar la identificación de los catabolitos de gramina a partir del alcaloide marcado en la posición α o en la posición 2 respectivamente.

III.5. Inoculación de gramina- α - ^{13}C .

Dada la dificultad encontrada en las experiencias anteriores debido a la baja concentración de intermediarios del catabolismo de la gramina, y considerando además la inestabilidad característica de los compuestos indólicos monosustituidos en la posición 3 (como serían los primeros catabolitos de la gramina) se consideró la posibilidad de determinar la identidad de alguno de ellos evitando el aislamiento desde el extracto metanólico (con las consiguientes separaciones cromatográficas que ello implica) y reduciendo a un mínimo el tiempo de exposición a la luz y, en general, la manipulación de estos compuestos.

La RMN- ^{13}C provee una metodología adecuada para este tipo de experiencias⁸², ya que si se dispone de un trazador marcado con carbono-13 con alta especificidad en alguna posición de la molécula, sería posible seguir esta marcación determinando los espectros de RMN- ^{13}C en forma directa sobre los extractos, sin necesidad de posteriores purificaciones; las sustancias

que no posean la marcación isotópica actuarían como un "fondo invisible" , debido a la baja abundancia natural de carbono-13, (1,1%).

Como se disponía de gramina- α -¹³C (90% de enriquecimiento isotópico) la cual había sido sintetizada como se describió en II.1.2 (página 22), se realizó una experiencia con plantas de cebada de 11 días a las que se les suministró: a un conjunto gramina- α -¹⁴C, y a otro gramina- α -¹³C. En el primer caso, se determinó la radiactividad en el CO₂ expelido por las plantas hasta las 40 horas después de haberles suministrado el trazador (experiencia control). De este modo, se podía, por un lado asegurar la correspondencia con los experimentos anteriores en que se utilizó gramina- α -¹⁴C y por otro, determinar las fracciones de mayor concentración de catabolitos y/o gramina extraídos desde la planta. El período de 40 horas se eligió teniendo en cuenta las consideraciones discutidas en la página 88.

Al finalizar la experiencia, había evolucionado como CO₂ el 29% de la radiactividad originalmente presente en el alcaloide. Este resultado concordaba con los obtenidos en la experiencia anterior en que se determinó la cinética de degradación del C- α de la gramina en plantas de cebada de 11 días. (Figura 35, página 76).

Las plantas enteras se extrajeron secuencialmente con metanol y agua en atmósfera de nitrógeno y protegidas de la

luz. Los extractos metanólicos y acuosos se lavaron con hexano para eliminar las ceras, y la fase de lavado fue desechada ya que resultó inactiva en la experiencia control cuando se ensayó por radiactividad. Los porcentajes de radiactividad encontrados en cada extracto de la experiencia control, se detallan en la Tabla 7, (página 98).

Los extractos metanólicos y acuosos se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio a 25°C y protegidos de la luz, y se guardaron hasta su utilización a -20°C en oscuridad y bajo atmósfera de nitrógeno. Los residuos de los extractos metanólicos se disolvieron en una solución de cloroformo-d:metanol-d₄ (1:1) (4 ml), y se determinaron los espectros de RMN-¹³C en la fracción soluble. Los residuos insolubles se disolvieron en agua destilada (3ml), y se juntaron con los extractos acuosos; se agregó agua deuterada (1 ml) , y se determinaron también los espectros de RMN-¹³C. Los espectros obtenidos de los extractos de la experiencia control se utilizaron como "blancos", para los que se obtuvieron en las mismas condiciones en la experiencia en que se suministró gramina-α-¹³C.

La comparación de los espectros obtenidos de los extractos acuosos de ambas experiencias, (Figura 40, a y b, respectivamente), permitió distinguir la presencia de señales adicionales en el espectro correspondiente a la experiencia con gramina-α-¹³C, las cuales podían asignarse tentativamente a los productos iniciales del catabolismo de gramina, ya que estas se-

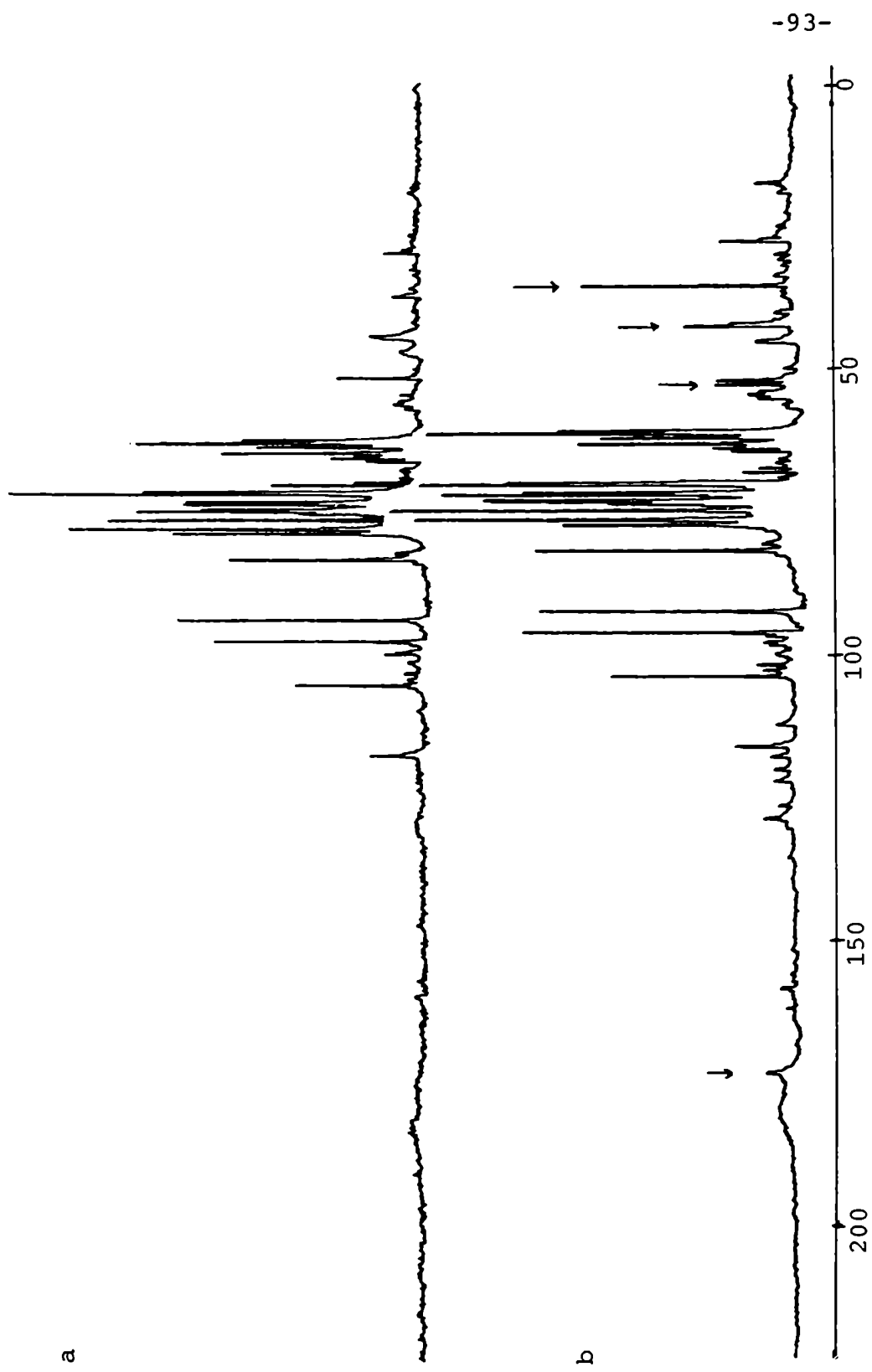
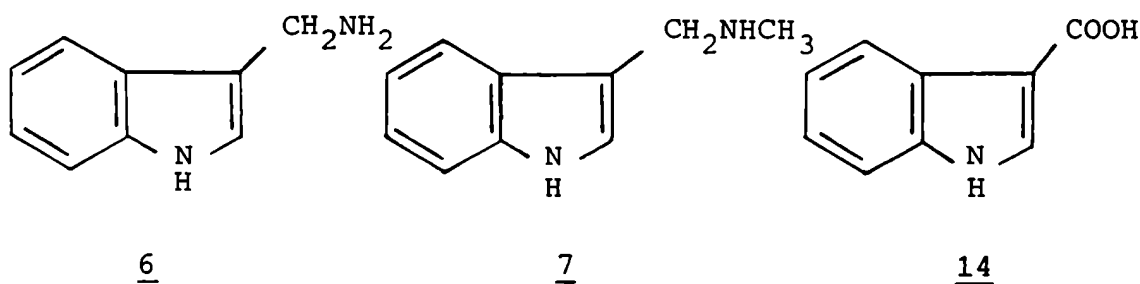


Figura 40: Espectros de RMN- ^{13}C de extractos acuosos; a: control; b: experiencia gramina- α - ^{13}C .

ñales, (indicadas con una flecha en la Figura 40. b), aparecerían en la zona del espectro esperada para los catabolitos propuestos. Comenzando desde campos altos, las señales a δ 35,7 ppm, 42,7 ppm y 175,0 ppm, podrían corresponder al C- α de 3-(aminometil)-indol (6), 3-(metilaminometil)-indol (7) y ácido indol-3-carboxílico (14), respectivamente. Se observó también en este espectro la presencia de una señal a 53,15 ppm, la cual correspondía a la gramina- α - ^{13}C absorbida por las plantas, que no había sido catabolizada durante el período en que se desarrolló la experiencia.

Extrañamente, no se observaron diferencias en los espectros realizados en metanol-cloroformo deuterados de ambos experimentos aunque la radiactividad encontrada en el extracto metanólico de la experiencia en que se utilizó gramina- α - ^{14}C , era mayor en ese extracto que en el acuoso. Esta aparente anomalía podía atribuirse a una deficiente extracción de las plantas con metanol y/o una disolución menos eficaz en el solvente deuterado, en la experiencia en que se utilizó gramina- α - ^{13}C . De todos modos, estos



resultados fueron auspiciosos, ya que por primera vez parecía encontrarse una evidencia para la existencia de los catabolitos propuestos.

Para confirmar estos resultados, se sintetizaron las substancias postuladas como metabolitos en la degradación de la cadena lateral del alcaloide con el fin de poder comparar las señales obtenidas en el espectro de RMN-¹³C anteriormente descriptos, con los desplazamientos obtenidos para las muestras auténticas.

Como se indicó anteriormente (página 16), los compuestos 6 y 7 ya habían sido considerados por otros autores como posibles catabolitos de la gramina en cebada; además, la presencia de un sistema enzimático capaz de realizar una secuencia de desmetilación como la propuesta, ya se había determinado en plantas de cebada en desarrollo para la degradación del alcaloide hordenina (4)⁸³, realizando experiencias de observación directa por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono-13.

Como el carbono- α de la gramina se degradaba cuantitativamente a CO₂, se postularon también como posibles intermediarios en el camino catabólico, todos los compuestos con un solo carbono sustituyendo la posición 3 del indol con diferentes grados de oxidación. Así, se sintetizaron: 3-(aminometil)-indol (6), 3-(metilaminometil)-indol (7), 3-(hidroximetil)-indol (17), indol-3-carboxaldehído (13) y ácido indol-3-carboxílico (14),

según se describió en el Capítulo II.

Lamentablemente, no se pudieron determinar los espectros de RMN-¹³C de los productos obtenidos en las mismas condiciones que los realizados con los extractos vegetales acuosos, debido a la baja solubilidad en agua de las sustancias sintetizadas, por lo cual, los espectros se debieron realizar en metanol:cloroformo. Los desplazamientos químicos del C- α de los compuestos analizados, en esas condiciones, fueron de 36,9 ppm, 46,7 ppm y 185,2 ppm, para los compuestos 6, 7 y 14 respectivamente, los cuales no coincidían exactamente con las señales observadas en el espectro de la Figura 40.b; la señal del C- α de la gramina presente en el extracto, coincidía con la obtenida para el alcaloide. Si bien las diferencias de desplazamiento químico entre los C- α de las sustancias 6, 7 y 14 propuestas y las señales observadas podrían atribuirse a efectos del solvente esto no pudo ser confirmado. Los desplazamientos químicos de las sustancias sintetizadas se discuten en detalle en el Capítulo IV.

La fracción soluble en metanol:cloroformo deuterados obtenida en la experiencia en que se suministró gramina- α -¹⁴C se fraccionó según un método de aislamiento e identificación de indoles simples desde plantas superiores, descrito en la literatura⁸⁴. Siguiendo ese procedimiento, se pudo determinar que sólo el 7% de la radiactividad inicialmente presente en el extracto, pasaba a la fase de tolueno en la que deberían enconu

trarse los posibles metabolitos 13, 14 y 17. La separación cromatográfica de esta fracción y los subsecuentes ensayos de actividad, indicaron que la radiactividad se encontraba en la fracción que contenía, entre otros compuestos, a 13 y 17 pero no en la que contenía 14. Sin embargo, la pequeña cantidad de sustancia impidió la posterior caracterización.

Dado que el análisis de los espectros de los extractos metanólicos de ambas experiencias indicaba la presencia de azúcares libres en una proporción elevada, se intentó separar inespecíficamente los azúcares y aminoácidos del resto del extracto. Esto se realizó disolviendo el residuo seco del extracto metanólico no extraíble con tolueno, con n-butanol y extrayendo posteriormente la solución alcohólica con agua saturada con n-butanol. De este modo, los azúcares y aminoácidos pasaban a la fase acuosa mientras que la grama y los demás compuestos que se querían analizar permanecían en la fase alcohólica.

La determinación de la radiactividad presente en estos extractos (Tabla 7), demostró que sólo una fracción minoritaria pasaba a la fase acuosa, mientras que el 90% de la actividad quedaba en la metanólica. Se cromatografiaron en capa delgada alícuotas de cada extracto utilizando solventes adecuados (página 210), reveladores selectivos (ninhidrina, anisaldehído/sulfúrico) y testigos de azúcares y aminoácidos, con lo cual se obtuvo una buena separación de los productos

Tabla 7: Distribución de la radiactividad en las experiencias referidas en la Sección III.5.

Trazador: gramina- α - ^{14}C ($1,14 \times 10^6$ dpm/mg; 20 μg /planta).

Extracto	Porcentaje de radiactividad recuperada	
	Total	Observaciones
		Tolueno: 2,1%
Metanólico	38%	n-butanol: 32,5% (gramina: 27%) Agua: 3%
Acuoso	6%	---
Arena	17%	Gramina: 13%
CO_3Ba	29%	$^{14}\text{CO}_2$ evolucionado en 40 horas

presentes en el extracto acuoso. En los cromatogramas obtenidos desde el extracto butanólico, no se detectó la presencia de azúcares y aminoácidos, demostrándose así la eficacia de la separación realizada.

Una vez encontradas las condiciones adecuadas para la CCD del extracto acuoso, se realizó una radiocromatografía. Se sembró aproximadamente 10000 dpm del extracto con el propósito de detectar en qué sustancias se encontraba la acti-

vidad determinando la impresión producida sobre una placa radiográfica después de permanecer en contacto con el cromatograma durante un tiempo adecuado⁸⁵. Al cabo de ese tiempo, no se observó ninguna impresión sobre la placa radiográfica, a pesar de que la cantidad de radiactividad sembrada era superior al umbral necesario para la detección, según se comprobó utilizando gramina radiactiva como testigo. Este resultado se interpretó entonces, considerando que la radiactividad estaría distribuida en una gran variedad de sustancias, como hidratos de carbono y/o aminoácidos, por lo cual la concentración en cada zona en particular de la placa sería insuficiente para permitir su detección. La radiactividad presente en dichos compuestos podría deberse a la remetabolización de una fracción del $^{14}\text{CO}_2$ (producido en la degradación de gramina), durante el proceso fotosintético.

Finalmente, se analizó el extracto butanólico remanente, el cual contenía la parte mayoritaria de la radiactividad total extraída desde las plantas, utilizando las técnicas cromatográficas de rutina para el aislamiento de gramina. Nuevamente, el alcaloide resultó ser el único compuesto activo identificable. Este resultado junto a la evidencia obtenida por RMN- ^{13}C en la experiencia en que se suministró gramina- α - ^{13}C , pusieron de manifiesto una vez más las dificultades que se encontraban en el estudio del catabolismo de gramina en plantas de cebada en desarrollo, debido a la alta velocidad

de degradación del alcaloide y la consecuentemente baja concentración de metabolitos intermediarios.

III.6. Experiencias de competencia y captura.

Como se indicó en la Sección III.5, los primeros catabolitos de la gramina en plantas de cebada en desarrollo deberían poseer una función oxigenada en el C- α ; sin embargo, tales compuestos no pudieron aislarse desde las plantas en que se realizaron las experiencias. Así, fue necesario utilizar otros métodos alternativos para la determinación de tales posibles metabolitos.

La presencia de un determinado intermediario en un proceso catabólico puede confirmarse suministrando a las plantas ese compuesto inactivo después de haberles suministrado el compuesto cuyo metabolismo se está estudiando marcado con un isótopo radiactivo en una posición tal, que de tener lugar la conversión propuesta permanezca en el metabolito que se ensaya⁸⁶. Si esta transformación realmente ocurre, el compuesto inactivo agregado diluirá la marcación del producto endógeno formado disminuyendo así la radiactividad específica del producto final y acumulándose el intermediario radiactivo.

El estudio del catabolismo de gramina en plantas de cebada ofrecía un sistema adecuado para la utilización de tales técnicas de "captura", puesto que se disponía de los metabolititos que se deseaban ensayar y de un método estandarizado

para la detección de la disminución de la actividad específica, como era la determinación de la cinética de evolución de CO_2 radiactivo. Así, la administración luego de un tiempo de espera adecuado de un compuesto intermediario en la degradación de gramina- α - ^{14}C a $^{14}\text{CO}_2$, debería producir una curva de evolución de CO_2 radiactivo diferente de aquellas que se habían obtenido suministrando sólo el alcaloide marcado en la cadena lateral (esta curva se indicará como "normal" en las experiencias que se describen a continuación).

Se realizaron entonces experiencias de competencia utilizando gramina- α - ^{14}C y, separadamente, 3-(hidroximetil)-indol (17), indol-3-carboxaldehído (13) y ácido indol-3-carboxílico (14), los cuales, en los tres casos, se agregaron a las plantas 48 horas después de haberles suministrado el alcaloide; este tiempo se eligió teniendo en cuenta las observaciones discutidas en la Sección III.4 (página 88). En todos los casos se utilizaron plantas de 11 días de desarrollo y las curvas de evolución de CO_2 radiactivo se obtuvieron tomando cada determinación por duplicado, en la forma que se indicó en III.3.

En la Figura 41 se puede ver el resultado obtenido para la experiencia realizada con indol-3-carboxaldehído; los círculos negros representan la curva normal de evolución de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de gramina- α - ^{14}C (página 76), mientras que los triángulos corresponden a la curva obtenida en esta experiencia. Es evidente la separación de las curvas debido a la dilución

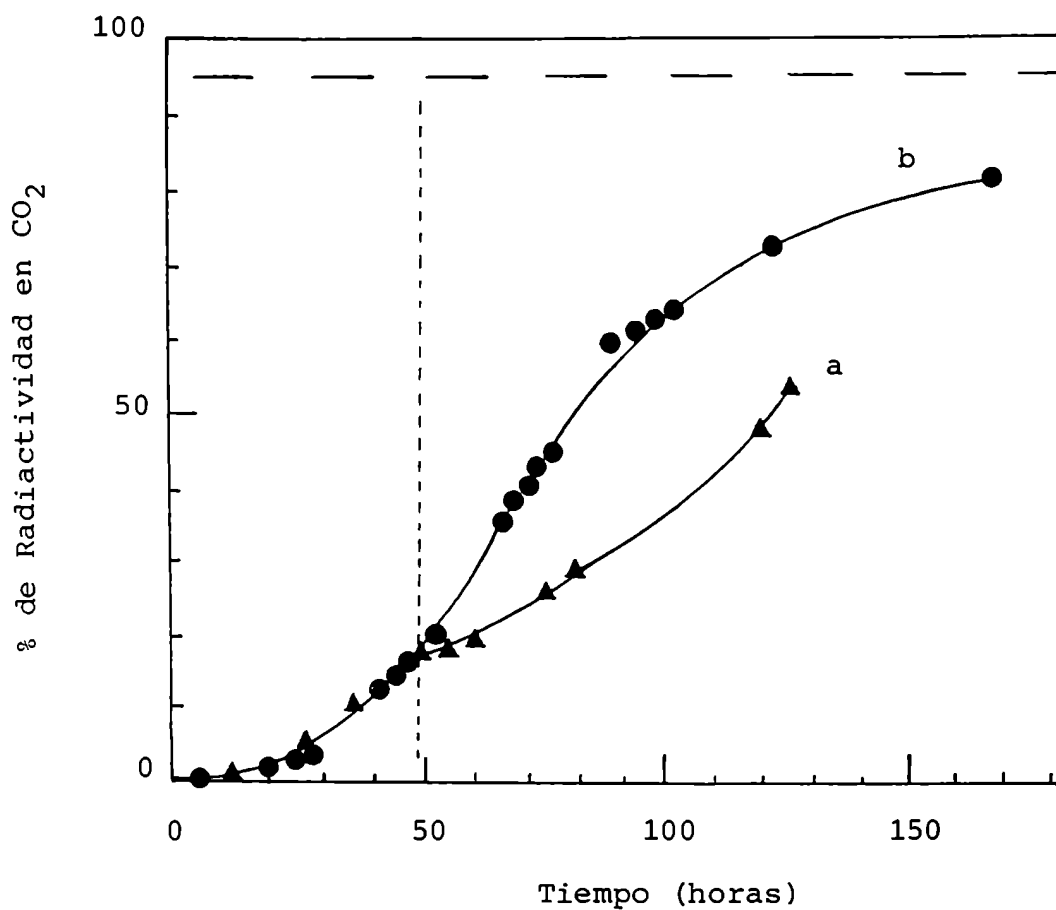


Figura 41: Biodegradación de gramina- α -¹⁴C. Experiencia de competencia con indol-3-carboxaldehido (a) agregado a las 48 horas, comparada con la curva normal (b) de la Figura 35.

isotópica del producto marcado después de la administración del aldehído frío, lo cual indicaría su existencia como catabolito de gramina; la respuesta inmediata indicaría la presencia de un metabolismo activo en ese momento, lo que estaría de acuerdo con lo previsto de acuerdo al análisis realizado en III.4 (página 88).

Otro resultado interesante obtenido del análisis de la Figura 41, surgió de la observación del tiempo que tardaban las plantas en recuperar el valor normal de radiactividad evolucionada como CO_2 a partir del momento en que se suministró el aldehído, y que resultó ser de aproximadamente 60 horas: éste sería el tiempo requerido por el sistema enzimático para degradar el exceso de intermediario administrado en la experiencia. Dado que como ya se indicó, el sistema era activo en ese momento, ese tiempo indicaría la capacidad limitada de las plantas de cebada en cuanto a la cantidad de sustancia que podría ser biodegradada simultáneamente.

En la Figura 42 se muestran las curvas de evolución de CO_2 radiactivo obtenidas en las experiencias en que se ensayaron separadamente 3-(hidroximetil)-indol y ácido indol-3-carboxílico. Nuevamente resultó notable la separación de las curvas correspondientes a las experiencias en cuestión respecto de la curva "normal" indicada en línea de trazos, lo que indicaría el papel de intermediarios que tendrían los compuestos ensayados, en el catabolismo de gramina en plantas de cebada en desarrollo.

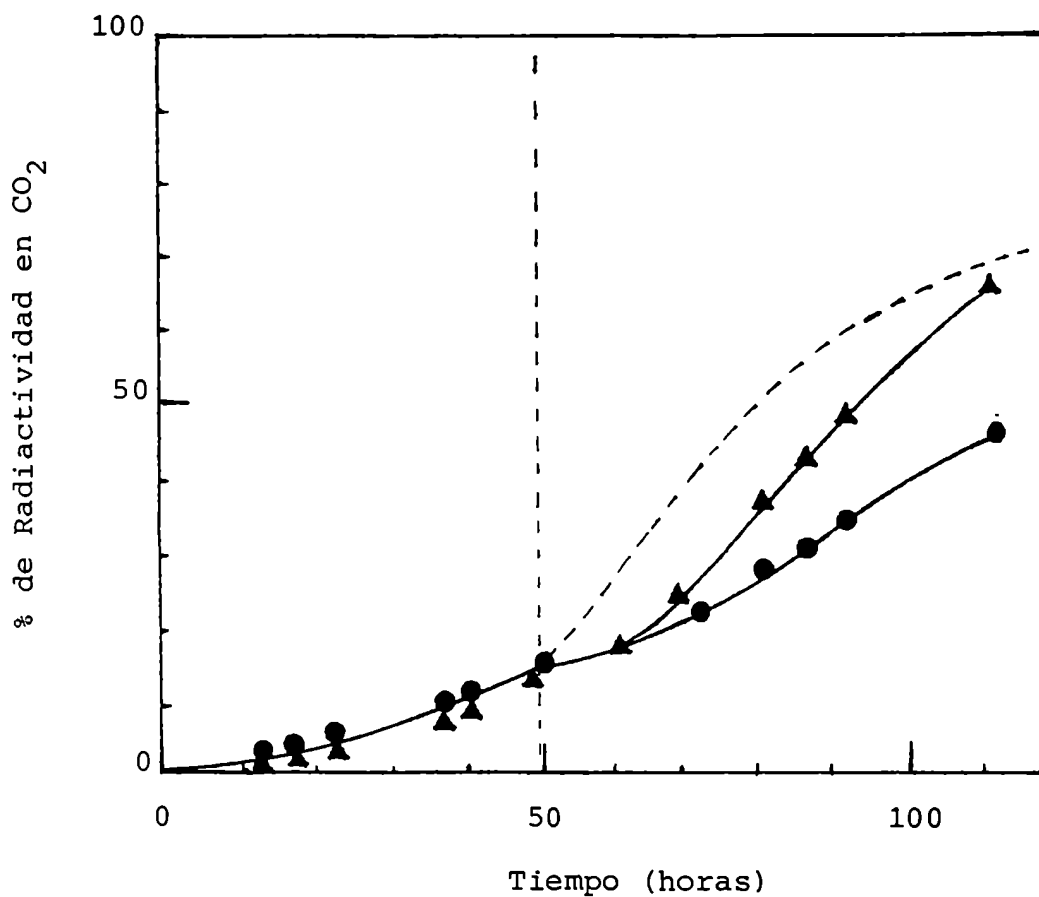


Figura 42: Biodegradación de γ -aminobutyric acid (α -¹⁴C). Experiencias de competencia con 3-(hidroximetil)-indol (●) y ácido indol-3-carboxílico (▲) agregados a las 48 horas; (-----: curva normal).

Un análisis más minucioso de las curvas obtenidas en las tres experiencias, permitió inferir que la secuencia metabólica para la degradación de la cadena lateral del alcaloide, sería: gramina (5) \rightarrow 3-(hidroximetil)-indol (17) \rightarrow indol-3-carboxaldehído (13) \rightarrow ácido indol-3-carboxílico (14) \rightarrow CO₂, ya que la recuperación de la velocidad normal de evolución de CO₂ radiactivo se produjo mucho más rápidamente en la experiencia de competencia con 14, (aproximadamente 20 horas), que en los otros dos casos, indicando así una relación más directa entre el ácido y el CO₂; por el contrario, cuando se administró 17, no se recuperó la velocidad de evolución de CO₂ radiactivo normal aún después de las 60 horas. Esta secuencia resultaba además lógica desde el punto de vista estructural.

Para verificar fehacientemente que la disminución en la evolución de CO₂ radiactivo se debía efectivamente a la existencia de los productos ensayados como catabolitos de gramina y no a una perturbación del sistema enzimático por el agregado de una sustancia extraña, se realizó una experiencia idéntica a la anterior en que se suministró indol-3-carboxaldehído excepto que no se midió la evolución de CO₂ radiactivo. A las 24 horas de haber administrado el aldehído, las plantas se cosecharon y se aisló el compuesto ensayado desde el vegetal, utilizando el método de Magnus⁸⁴.

La fracción de elución de la columna cromatográfica que contenía indol-3-carboxaldehído (13), mostró ser activa cuando

se ensayó por radiactividad, permaneciendo la misma en el aldehído cuando éste se recristalizó desde etanol previo agregado de indol-3-carboxaldehído frío. La pequeña incorporación obtenida (2% de la radiactividad suministrada), indicaba una vez más la baja concentración de intermediarios presente normalmente en las plantas. La comprobación de la existencia de indol-3-carboxaldehído como catabolito de gramina utilizando la técnica de "captura" descrita, se realizó sólo con esta sustancia, puesto que su mayor estabilidad comparada con los otros compuestos ensayados, permitía la realización de las determinaciones descriptas.

Los resultados obtenidos en estas experiencias, sumados a los obtenidos por Digenis utilizando tallos aislados en oscuridad⁴⁶, permitirían proponer la secuencia de la Figura 43 para la degradación de la cadena lateral de la gramina (5) en plantas de cebada. (El rol del 3-(hidroximetil)-indol será objeto de una discusión más detallada al final de este Capítulo; página 151).

Dado que se conocía la cinética de degradación del C-2 de la gramina a CO₂, (Sección III.4, página 82), se consideró factible aplicar las mismas técnicas de competencia descriptas más arriba, para la identificación de los catabolitos siguientes en la degradación de la gramina en plantas de cebada intactas en desarrollo.

Como se indicó anteriormente (página 86), la degradación

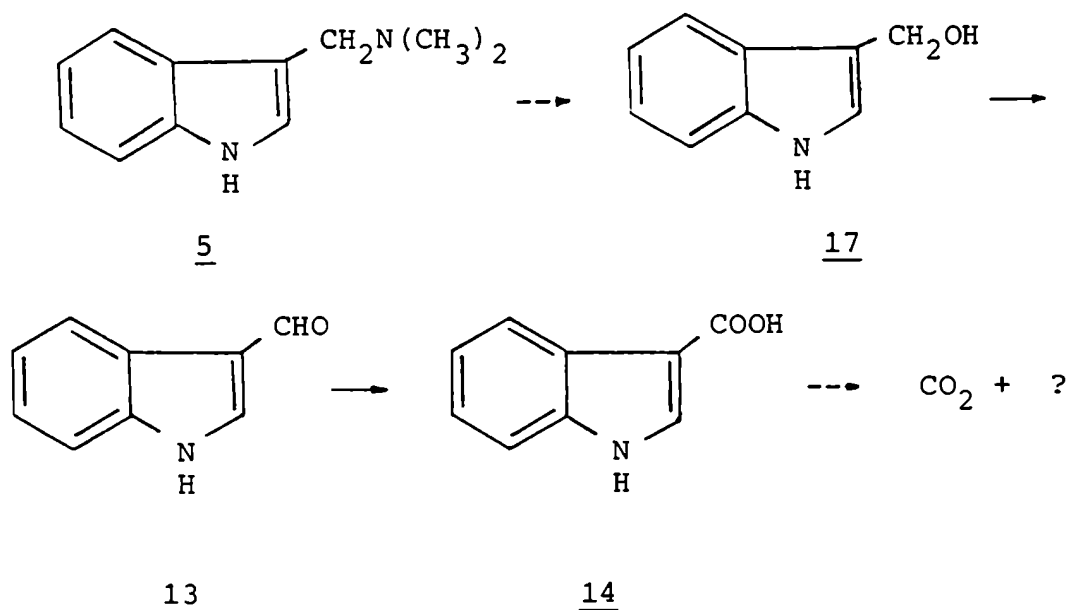


Figura 43: Esquema propuesto para la degradación de la cadena lateral de gramina.

del anillo indólico de la gramina podría seguir diferentes caminos, el más importante de los cuales implicaría su ruptura, con desprendimiento del C-2 como CO_2 . Para explicar este camino de biodegradación se postularon dos posibilidades mecanísticas, las cuales se esquematizan en las Figuras 44 y 45.

Dado que el triptofano (11) se aislaba radiactivo, aunque con muy baja actividad específica, desde las plantas a las que se les había suministrado gramina-2- ^{14}C y como era conocido^{35,87} que dicho aminoácido se degradaba hacia ácido antranílico (30) con pérdida del C-2, se planteó la posibilidad de que la gramina se transformara en triptofano y que las experiencias realizadas para detectarlo fallasen por no haberse determinado con precisión

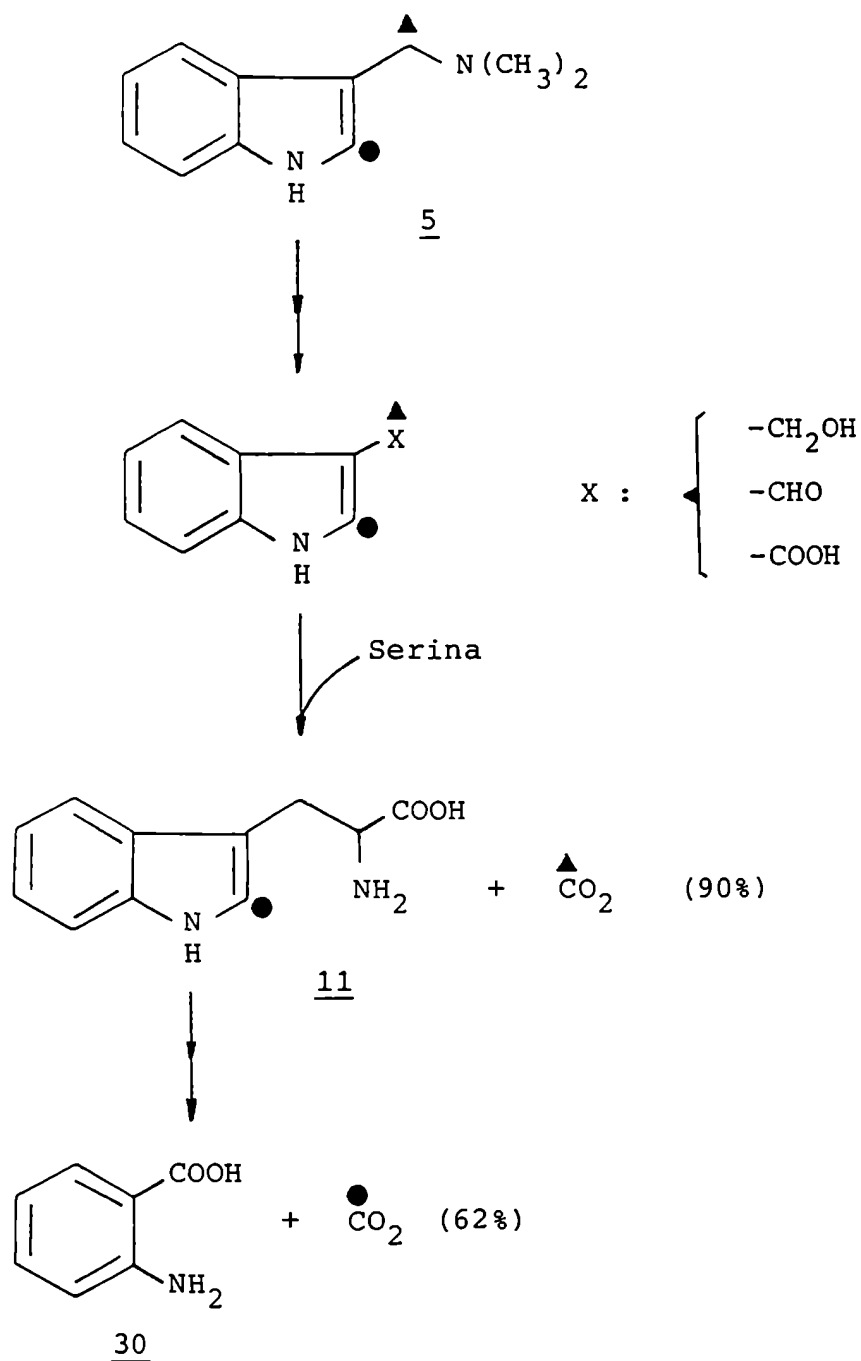


Figura 44: Camino metabólico hipotético para la biodegradación del anillo heterocíclico de la gramina.

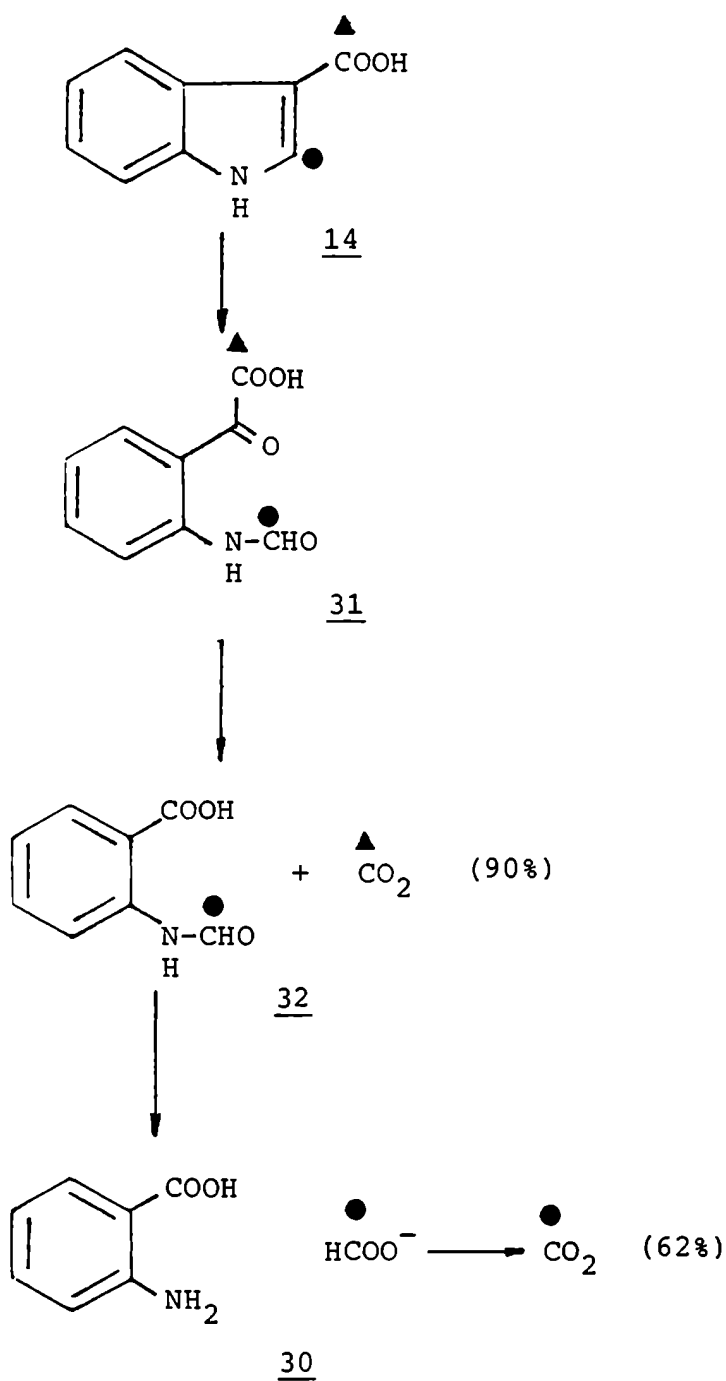


Figura 45: Camino metabólico hipotético para la biodegradación del anillo heterocíclico de la gramina.

el momento en el cual debería buscarse dicho aminoácido, a partir de la administración del alcaloide marcado. Por analogía con la biosíntesis de triptofano³⁵, esta hipótesis planteaba el intercambio de un grupo oxigenado en la posición 3 del indol, probablemente fosforilado, con un resto serina. Si bien la formación de un éster fosfórico como paso previo a la obtención de triptofano, no justificaría la existencia de ácido indol-3-carboxílico (14) como último catabolito en la degradación de la cadena lateral de la gramina, esta posibilidad se analizó igualmente ya que no se conocían los requerimientos que el sistema enzimático necesitaría para realizar la transformación propuesta. Si esta hipótesis (Figura 44) fuera correcta, el triptofano debería detectarse en una experiencia de competencia realizada en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, pero dejando un tiempo de espera algo mayor, ya que este proceso debería ocurrir inmediatamente después de la formación del ácido indol-3-carboxílico.

La otra hipótesis (Figura 45), se planteó considerando un camino degradativo similar al que ocurre con el triptofano^{35,87}; éste implicaría la oxidación directa del ácido 14 con ruptura de la unión 2-3 del anillo indólico y formación del ácido N-formilindolacético (31), (el compuesto análogo a la N-formilkinurenina presente en el catabolismo del triptofano). Este compuesto se descarboxilaría a ácido N-formilantranílico (32), (pérdida del C- α de la gramina como CO₂), el cual en una etapa posterior

perdería el grupo formilo como formiato, el cual se oxidaría subsecuentemente a CO_2 , (pérdida del C-2 de la gramina). El hecho de que el C-2 fuera eliminado como formiato que puede ser incorporado al metabolismo general de C-1 de las plantas^{88,89}, explicaría la menor conversión de C-2 en CO_2 (62%), comparado con el C- α (90%).

Para tratar de encontrar evidencias en favor de uno u otro mecanismo, se realizaron experiencias de competencia ensayando separadamente con triptofano (11), ácido N-formilantranílico (32) y formiato de sodio, y se determinó la evolución de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de la administración de gramina-2- ^{14}C . El triptofano se agregó 54 horas después del alcaloide, mientras que el ácido N-formilantranílico y el formiato se suministraron después de 80 horas, de acuerdo a lo discutido en la Sección III.4.

Como se puede observar en la Figura 46, los resultados obtenidos en estas experiencias no permitieron obtener correlaciones seguras sobre los compuestos ensayados, ya que los valores de radiactividad en CO_2 obtenidos en los casos de competencia, no diferían en forma significativa de aquellos obtenidos cuando sólo se suministró gramina-2- ^{14}C . Sin embargo, una observación más minuciosa indicaría que la adición de formiato (curva c de la Figura 46) produjo cierta dilución isotópica, al igual que el triptofano (curva a), aunque este último en menor proporción, lo que permitiría asignar tentativamente la posible intermediación de ambos compuestos en

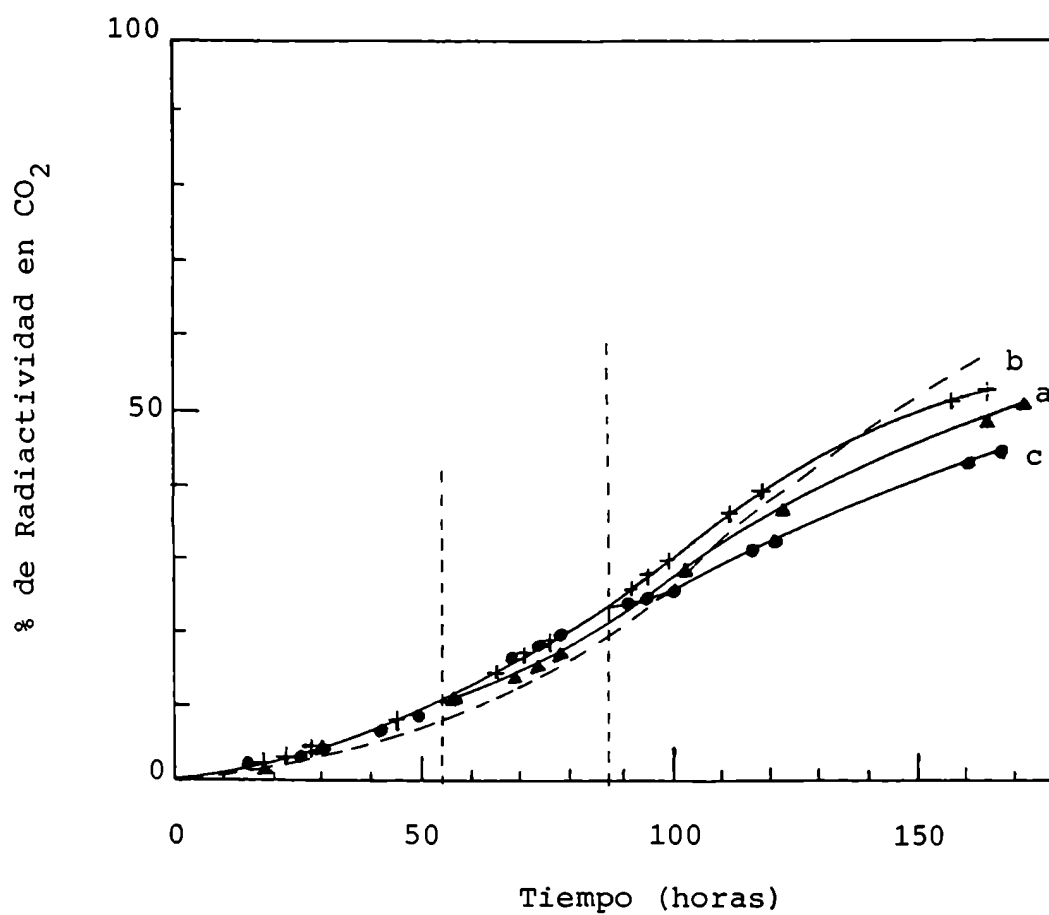


Figura 46: Biodegradación de gramina-2-¹⁴C. Experiencias de competencia con triptofano agregado a las 54 horas (a); ácido N-formilantranílico (b) y formiato de sodio (c) agregados a las 87 horas; (-----: curva normal).

el proceso de ruptura del anillo indólico de la gramina. Esto estaría de acuerdo para el caso del triptofano con lo observado en las experiencias descriptas en III.4.

Si bien el ácido N-formilantranílico no produjo una alteración apreciable de la curva de evolución de $^{14}\text{CO}_2$, (curva b), la extracción de las plantas al final de la experiencia permitió (previa dilución con el compuesto puro), aislar el ácido 32 marcado, aunque en pequeña proporción. Si bien este último dato favorecería la hipótesis de la Figura 45, la degradación del anillo indólico de la gramina no pudo ser elucidada fehacientemente realizando experiencias de competencia.

III.7. Experiencias con indol-3-carboxaldehído-2- ^{14}C y ácido indol-3-carboxílico-2- ^{14}C .

Como se indicó anteriormente, la etapa limitante de la velocidad en el proceso catabólico de la gramina en *Hordeum vulgare* debería ser el primer paso de su degradación. De este modo la concentración de intermediarios en el camino catabólico resultaba insuficiente para su detección. Era probable también que a medida que se alejase del alcaloide en el proceso degradativo la concentración de intermediarios fuera aún menor, razón por la cual las experiencias en que se intentó el aislamiento de catabolitos producidos por la degradación del anillo indólico del alcaloide (aún utilizando técnicas de competencia), fallaban cuando se utilizó gramina radiactiva como

trazador. Se consideró entonces la administración de un intermediario que estuviese más cerca en el camino degradativo de los compuestos que se deseaban identificar, de modo de producir un aumento en la concentración de catabolitos tal que hiciera posible su aislamiento e identificación.

Como se indicó en la Sección III.6, el indol-3-carboxaldehído (13) era efectivamente un catabolito de la gramina en plantas de cebada en desarrollo y dado que este compuesto cumplía con los requerimientos enunciados en el párrafo anterior, se sintetizó indol-3-carboxaldehído-2-¹⁴C según se indicó en la Sección II.2. El aldehído radiactivo se administró a las plantas de cebada de 14 días de desarrollo.

En una primera experiencia, se determinó la evolución de ¹⁴CO₂ expelido por las plantas durante 5 días a partir del momento en que se suministró el trazador, trabajando en las mismas condiciones que las descritas en III.3. La curva de evolución de ¹⁴CO₂ en función del tiempo obtenida en esta experiencia, indicó una mayor velocidad de degradación del anillo indólico que en el caso de la gramina-2-¹⁴C. Este resultado (Figura 48, curva I; página 126), concordaba con el hecho que el aldehído fuera, a su vez, un producto del catabolismo de la gramina y que el mismo no se acumulara en el vegetal.

En esta experiencia se encontró que aproximadamente el 40% de la radiactividad suministrada estaba presente en el

extracto metanólico de la arena y el agua de riego remanente al finalizar la misma. El análisis de ese extracto por CCD preparativa y CLAR, permitió determinar que la actividad se debía a la presencia de indol-3-carboxaldehído-2-¹⁴C que no había sido absorbido por las plantas. Se extrajeron también separadamente los tallos y las raíces con metanol y se determinó la radiactividad presente en cada fracción, la cual fue del 3% y 12%, respectivamente.

Se repitió la experiencia utilizando plantas de 14 días y recogiendo el CO₂ evolucionado durante 48 horas y durante 7 días; en todos los casos se procedió de la misma forma que en la primer experiencia y se encontraron resultados equivalentes en cuanto a la cantidad de radiactividad presente en la arena y agua de riego remanente. Nuevamente ésta fue asignada al aldehído que no había sido absorbido por las plantas, según se determinó por CCD y CLAR.

Los resultados obtenidos en esta experiencia se encuentran resumidos en la Tabla 8. En ella se puede observar que la mayor parte de la radiactividad presente dentro del vegetal se encontraba en las raíces, lo cual sugería una deslocalización del proceso degradativo del alcaloide hacia las raíces a medida que se avanzaba en la secuencia metabólica.

Los extractos metanólicos obtenidos en estas experiencias se analizaron por CCD preparativa en sílicagel utilizando distintos solventes (página 216) y comparándolos con muestras de

Tabla 8: Distribución de la radiactividad presente en las plantas de *Hordeum vulgare* a las que se suministró indol-3-carboxaldehido-2-¹⁴C.

Tiempo	Fracción del vegetal	% de Radiactividad ^a				CO ₂ ^b
		Total	Gramina	Ald. <u>13</u>	Acido <u>14</u>	
48 hs.	Raíces	45	-	12,9	13,9	30
	Tallos	5,5	1,3	1,8	2,5	
166 hs. ^c	Raíces	18	-	6,5	9,1	55
	Tallos	3,5	1,5	0,7	1,1	

a: respecto al indol-3-carboxaldehido-2-¹⁴C(13) absorbido;

b: recogido como CO₃Ba;

c: promedio de dos determinaciones.

indol-3-carboxaldehido (13), ácido indol-3-carboxílico (14) y gramina (5) auténticas. De esta forma se determinó la distribución de la radiactividad en los extractos y en particular, en los compuestos antes mencionados.

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 8; en ella se puede observar que los tres compuestos mencionados se encuentran marcados en todas las experiencias aunque la distribución de la radiactividad era diferente a las 48 horas que a los 7 días de haber suministrado a las plantas el compuesto radiactivo.

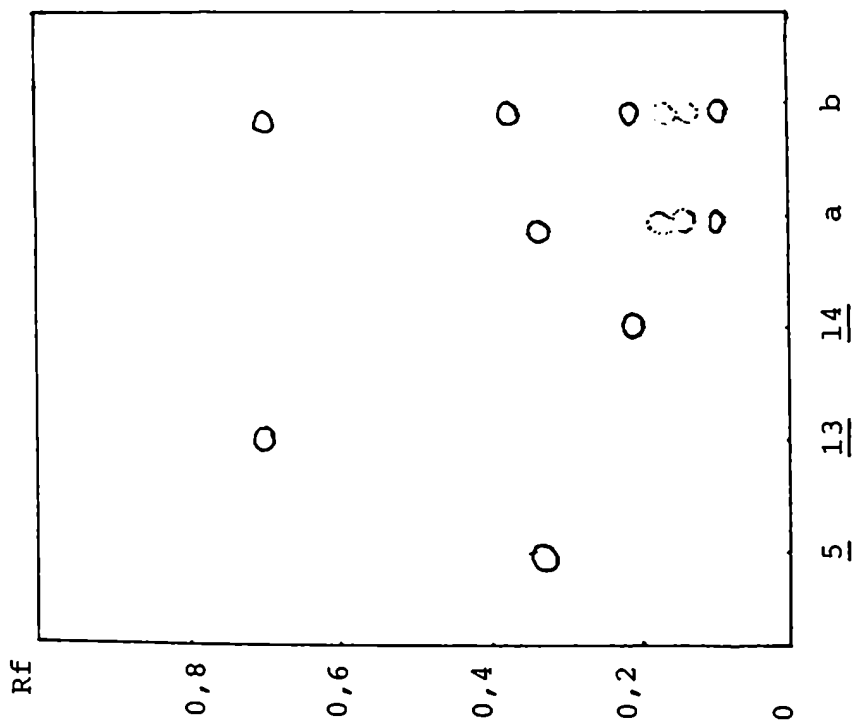
Como era de esperar, el mayor porcentaje de aldehído sin degradar dentro de las plantas se encontró en la experiencia que se finalizó a las 48 horas.

Aunque de estas experiencias se pudieron inferir sólo conclusiones estimativas, resultó otra vez llamativo el hecho que la mayor parte de la radiactividad suministrada se encontraba en las fracciones correspondientes a los tres compuestos analizados, ya que no se encontró ninguna otra zona del cromatograma con actividad comparable a las correspondientes a las sustancias ensayadas. Esto sugería una vez más que la concentración de catabolitos que tuvieran ya degradado el núcleo indólico original del alcaloide debería ser muy baja, aún cuando se utilizaba indol-3-carboxaldehído como trazador.

Con el fin de determinar fehacientemente la presencia de los compuestos mencionados en el metabolismo del indol-3-carboxaldehído (13), (y por lo tanto de la gramina) en plantas de cebada en desarrollo, se realizaron dos experiencias simultáneas realizadas en condiciones experimentales idénticas en las que se suministró indol-3-carboxaldehído-2-¹⁴C (20 µg/planta) a plantas de 14 días; en una de ellas, realizada como control, se utilizaron 50 plantas y se recogió el CO₂expelido a partir de la administración del trazador; en la otra experiencia, se utilizaron 500 plantas las cuales se cosecharon a las 78 horas de haberles suministrado

el trazador, se separaron en raíces y parte aérea y se extrajeron separadamente con metanol. Del mismo modo que en las experiencias anteriores, se determinó la radiactividad remanente en la arena y el agua de riego al finalizar la experiencia la cual nuevamente resultó ser debida al aldehido(13) radiactivo que no fue absorbido por las plantas según se determinó por CCD y CLAR.

La reproducibilidad de ambas experiencias pudo determinarse por análisis de los extractos metanólicos obtenidos por CCD. El aspecto de un cromatograma obtenido se presenta en la Figura 47. De este modo, se pudo detectar la presencia de sustancias con propiedades cromatográficas idénticas (en cuanto al valor del Rf y a las características del revelado con el reactivo de Ehrlich) a gramina (5), ácido indol-3-carboxílico (14) e indol-3-carboxaldehido (13). Como se indica en la Figura 47, la distribución de estas sustancias fue diferente en tallos que en raíces lo cual sugería nuevamente la separación de las diferentes etapas del proceso degradativo de la gramina en plantas de cebada. Así, se encontró gramina (5) (en cantidades detectables con las técnicas empleadas) en los tallos pero no en raíces, mientras que la sustancia asignada como ácido indol-3-carboxílico (14) sólo fue detectada en los extractos de raíces. En este último extracto, se pudo observar también la presencia de una sustancia que en el sistema cromatográfico indicado en la Figura 47, presentaba un Rf 0,4 y



Adsorbente: Alugram Sil G
UV 254. Macherey

Solvente de desarrollo:
diclorometano:metanol:amoníaco
comc. (8:2:0,1)

Observación: Fluorescencia a 254 nm
Revelado con el reactivo
de Ehrlich

Figura 47: Aspecto de una cromatografía en capa delgada de los extractos metanólicos de tallos (a) y raíces (b), en la experiencia en que se suministró indol-3-carboxaldehído-²⁻¹⁴C.

que revelaba con el reactivo de Ehrlich; esta sustancia también resultó activa cuando se ensayó por radiactividad, representando aproximadamente el 10% de la radiactividad total del extracto.

La radiactividad evolucionada como CO₂ en la experiencia "control" fue de 39% al cabo de 78 horas (52% considerando sólo el aldehído absorbido por las plantas); este valor resultaba concordante con los obtenidos en las experiencias anteriores, según se puede observar en la Figura 48 (página 126)

Del mismo modo que en las experiencias anteriores, las fracciones mayoritarias de la actividad presente en los extractos metanólicos correspondían a compuestos que mantenían aún intacto el anillo indólico, ya que esas sustancias revelaban con el reactivo de Ehrlich. Así, el destino del núcleo indólico de la gramina en las plantas de cebada quedaba otra vez indeterminado. Sin embargo, resultaba sumamente interesante la posible presencia de gramina marcada producida a partir de indol-3-carboxaldehído-2-¹⁴C, ya que este resultado indicaría la reversibilidad del camino metabólico gramina → indol-3-carboxaldehído.

Como se indicó en el Capítulo I, (página 12) , esta posibilidad había sido descartada por otros autores.

Se procedió entonces a aislar desde los extractos metanólicos de tallos y raíces, indol-3-carboxaldehído (13) ácido indol-3-carboxílico (14) y gramina (5), para lo cual se rea-

lizó una cromatografía en columna utilizando los solventes adecuados (página 216). Las fracciones correspondientes a cada una de las tres sustancias se purificaron posteriormente por CLAR preparativa en fase reversa utilizando una columna Altech RP 18 y como solvente una mezcla de etanol: agua:ácido acético glacial, (20:79:1). Los eluatos obtenidos para las fracciones que presentaban tiempos de retención idénticos a las tres sustancias en cuestión, se ensayaron por radiactividad, encontrándose que todos eran activos. Finalmente, se determinaron los espectros de masa de las sustancias aisladas en cada caso, los cuales resultaron idénticos a los obtenidos con muestras auténticas de indol-3-carboxaldehído, ácido indol-3-carboxílico y gramina.

Por otra parte, la sustancia que revelaba positivo con el reactivo de Ehrlich, indicada en el cromatograma de la Figura 47, se aisló desde el extracto metanólico de raíces por cromatografía en columna. Sin embargo, debido a la escasa masa del producto obtenido no fue posible su posterior caracterización. Este producto, ensayado por radiactividad, demostró poseer el 1,7% de la actividad inicialmente suministrada a las plantas.

Los resultados obtenidos en esta experiencia se resumen en la Tabla 9. Los mismos indican que parte del carbono-2 del aldehído se degradaba a CO₂, siendo el ácido indol-3-carboxílico uno de los intermediarios de ese proceso;

Tabla 9: Productos del metabolismo de indol-3-carboxalde-
hido^(a) en *Hordeum vulgare* luego de 78 horas.

Sustancia	% de incorporación absoluta ^(b)		
	Tallos	Raíces	Total
Gramina (<u>5</u>)	1,5%	-	1,5%
Acido indol-3- carboxílico (<u>14</u>)	-	8,4%	8,4%
Indol-3-carboxal- dehido (<u>13</u>)	0.8%	4,1%	4,9%
Compuesto Ehrlich (+)	-	1,7%	1,7%
<hr/> Experimento control			
CO ₂			52%

(a): se suministró 20 µg/planta ($7,2 \times 10^6$ dpm).

(b): los datos corresponden al porcentaje de incorporación respecto del aldehido (14) absorbido por las plantas.

este resultado fue coincidente con los obtenidos en las ex
periencias de competencia descriptos en la Sección III.6.
Una vez más el hecho de haber encontrado ácido-indol-3-carbox
ílico marcado, sólomente en el extracto proveniente de
raíces y que además, la mayor parte del aldehído recuperado
sin catabolizar desde las plantas se encontraba también en
esa fracción, indicaría la deslocalización del proceso ca-
tabólico desde los tallos (donde sería biosintetizada la
gramina^{90,91}) hacia las raíces, en las etapas posteriores
del catabolismo del alcaloide en *Hordeum vulgare*.

En esta experiencia se pudo confirmar también la exis
tencia del indol-3-carboxaldehído como precursor biosintético
de gramina en plantas de cebada en desarrollo lo cual,
como se indicó anteriormente (página 12), había sido des-
cartado por otros autores. Esta aparente contradicción, po
dría explicarse teniendo en cuenta que la gramina es degradada
rápidamente por las plantas de cebada aún en los primeros
días de la germinación y un tiempo de espera excesivo entre
el momento de suministrar el precursor (el cual es también
rápidamente degradado) y el aislamiento de la gramina podría
conducir a resultados erróneos.

Una vez más, los resultados obtenidos no permitieron in
ferir ninguna secuencia catabólica para la degradación del
anillo indólico del indol-3-carboxaldehído y consecuentemente
de la gramina, ya que, como se indicó anteriormente la

mayor parte de la radiactividad presente en los extractos metanólicos de las plantas se encontró en las sustancias finalmente identificadas las cuales conservaban todavía intacto el sistema indólico. Este resultado sugería nuevamente que la velocidad de degradación del anillo heterocíclico debería ser sumamente rápida y la concentración de metabolitos intermediarios entre el ácido indol-3-carboxílico y el CO_2 (de C-2) consecuentemente pequeña.

Con el mismo criterio seguido en las experiencias anteriores y dado que no se pudieron determinar los productos de degradación del anillo indólico y que el ácido indol-3-carboxílico (14) sería el último catabolito de gramina en que se mantendría intacto el sistema heterocíclico, se llevó a cabo una experiencia utilizando como trazador este compuesto marcado con carbono-14 en la posición 2, para lo cual se lo sintetizó según se describió en II.2.

Se determinó entonces la cinética de degradación del carbono-2 del ácido indol-3-carboxílico a CO_2 utilizando plantas de cebada de 14 días de desarrollo. La Figura 48 muestra la curva de evolución de $^{14}\text{CO}_2$ en función del tiempo obtenida, donde se puede observar que la velocidad en la eliminación de $^{14}\text{CO}_2$ por las plantas resultó mayor en esta experiencia (curva II) que cuando se utilizó indol-3-carboxaldehído-2- ^{14}C , (curva I); (esto estaría de acuerdo con la relación secuencial propuesta para estos dos compuestos en el cata-

bolismo de gramina en *Hordeum vulgare*). En esta experiencia, se obtuvo una conversión del 66% del ácido suministrado en $^{14}\text{CO}_2$ al cabo de 7 días (82% considerando sólo la radiactividad absorbida por las plantas).

La experiencia anterior se repitió en condiciones idénticas pero utilizando un número mayor de plantas y se determinó la radiactividad presente en los extractos metanólicos de raíces y parte aérea. Dichos extractos fueron procesados utilizando las técnicas cromatográficas habituales, no encontrándose ninguna evidencia de la acumulación de intermediarios del camino degradativo que finalizaba en CO_2 en cantidades suficientes para permitir su aislamiento y su identificación.

La radiactividad remanente en la arena y el agua de riego al finalizar la experiencia, se encontró en el ácido indol-3-carboxílico aislado desde esas fracciones el cual fue identificado por CCD y CLAR. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 10.

La fracción mayoritaria de la radiactividad se encontró en el CO_2 expelido por las plantas. En la experiencia indicada como II en la Tabla 10 se determinó que a las 2 horas de haber suministrado a las plantas el ácido indol-3-carboxílico- ^{14}C ya se obtenía CO_2 radiactivo (los valores obtenidos fueron 0,16%, 0,28%, 0,43%, 0,61% y 1,46% de la radiactividad suministrada, a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas respectivamente), lo cual indicaba otra vez la alta velocidad con que se degradaba

Tabla 10: Inoculación de ácido indol-3-carboxílico-2- ^{14}C .

	Tiempo (horas)	Porcentaje de Radiactividad ^(a) (%)			
		Tallos	Raíces	Arena	CO ₂
I.	97	1,8	4,2	15	77
II.	48	5,9	7	29,6	49
III.	123	1,7	1,8	11	78

(a): respecto de la radiactividad absorbida.

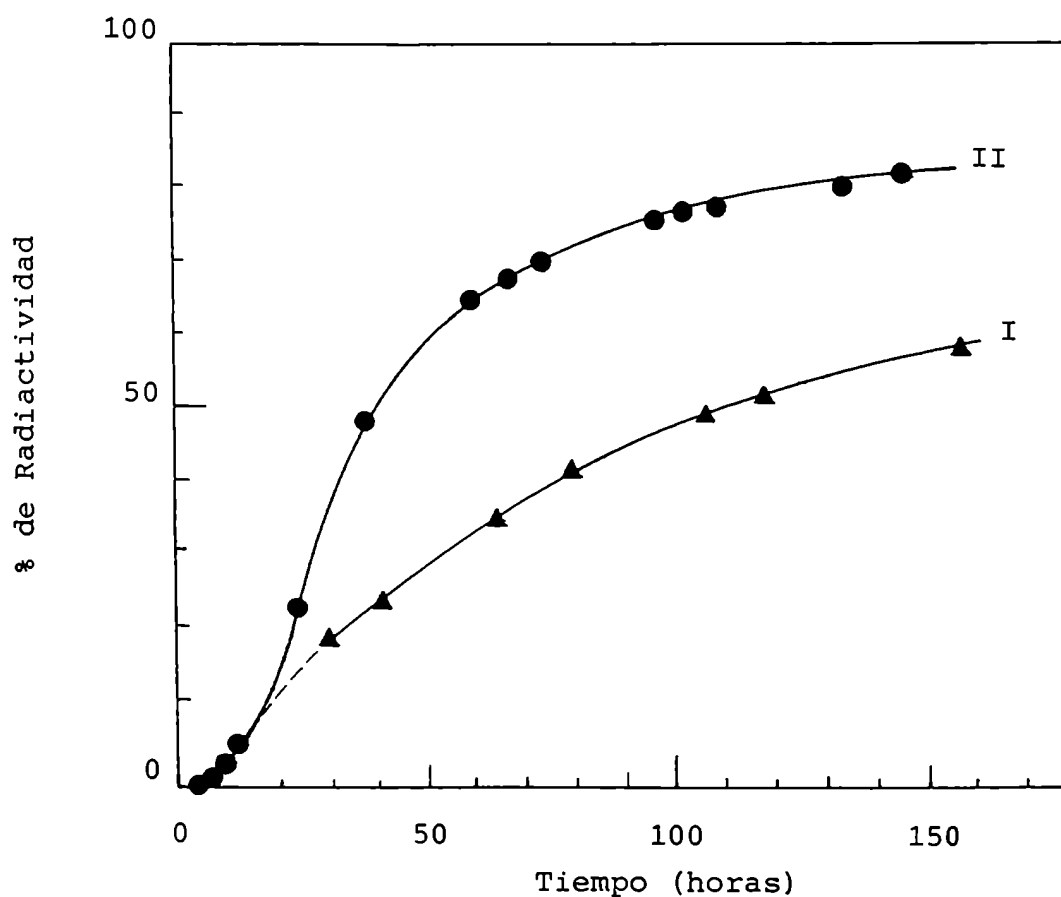


Figura 48: Porcentaje de radiactividad en el CO₂, a partir de indol-3-carboxaldehído-2- ^{14}C (curva I) y ácido indol-3-carboxílico-2- ^{14}C (curva II).

el anillo indólico a partir de los catabolitos de gramina que ya presentaban funciones oxigenadas en la cadena lateral.

Un aspecto interesante de los resultados obtenidos en esta experiencia fue que no se encontró gramina marcada en los extractos metanólicos de las plantas, lo cual indicaría que en el metabolismo de estos compuestos indólicos en *Hordeum vulgare* la formación de ácido indol-3-carboxílico sería un proceso irreversible después del cual se produciría la expulsión del C- α y la ruptura del anillo heterocíclico. Tampoco se detectó el compuesto mencionado en la página 118 como Ehrlich positivo, lo cual indicaría que el mismo no estaría involucrado en el proceso degradativo en estudio sino tal vez en la conversión indol-3-carboxaldehído (13) \longrightarrow gramina (5) o en algún camino secundario del metabolismo de 13. Por esta razón ese compuesto no fue posteriormente investigado.

III.8. Experiencias con tallos de cebada.

Los resultados obtenidos en las experiencias anteriormente descritas sugerían que el proceso degradativo de la gramina en *Hordeum vulgare* comenzaría en los tallos del vegetal donde el alcaloide se encuentra en mayor concentración, pero se desplazaría hacia las raíces a medida que se avanzaba en la secuencia catabólica y que el proceso total, el cual finalizaba mayoritariamente en CO₂ (tanto cuando se utilizaba gramina- α -¹⁴C o gramina-2-¹⁴C) una vez comenzado se produ-

cía en forma continua sin acumulación de ningún intermediario.

Se consideró entonces la posibilidad de "fraccionar" la secuencia degradativa utilizando solamente los tallos en vez de las plantas enteras, ya que, si el alcaloide fuera absorbido por los tallos, el proceso catabólico tendría que llegar sólo hasta la etapa permitida por los sistemas enzimáticos presentes en las partes aéreas produciéndose probablemente la acumulación del último catabolito formado en los tallos. Así, se realizaron experiencias utilizando tallos de plantas de cebada de 14 días de desarrollo, y gramina-2-¹⁴C (en una relación de aproximadamente 20 µgr de alcaloide por tallo).

Las plantas se cosecharon e inmediatamente se separaron los tallos de las semillas y raíces y se colocaron en una solución de buffer fosfato 0,5 M, pH 6,8 , la cual contenía al alcaloide disuelto, de modo que sólo la base de los tallos quedaba sumergida en la solución, lo que permitía la absorción del alcaloide. Se agregó también un fungicida y un antibiótico de amplio espectro para evitar la contaminación por hongos y bacterias, y mercaptoetanol para eliminar el oxígeno disuelto en el buffer, evitando así las oxidaciones que podrían conducir a la desnaturalización de las enzimas actuantes en el catabolismo de la gramina.

En una primera experiencia se determinó la capacidad que tenían los tallos de absorber gramina en esas condiciones, midiendo la radiactividad remanente en la solución tamponizada

Tabla 11: Absorción de gramina-2-¹⁴C por tallos de cebada.

Tiempo (horas)	% Radiactividad	
	Remanente en la solución ^(b)	Absorbida por los tallos ^(a)
0	100%	0
21	48%	52%
39	47%	53%
45	47%	53%
62	45%	55%

(a): suministrada - (b)

a diferentes tiempos a partir del momento en que se ponía en contacto con los tallos. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 11; la velocidad de absorción fue muy alta durante las primeras horas pero ésta disminuyó rápidamente a partir del primer día, alcanzándose un valor prácticamente constante de aproximadamente 50%, a diferencia de lo observado en las experiencias en que se utilizaban plantas enteras en donde la absorción continuó hasta hacerse casi cuantitativa (Figura 34, página 74).

Se decidió entonces realizar estas experiencias dejando a los tallos en la solución tamponizada que contenía gramina-2-¹⁴C durante 40 horas, ya que en ese lapso la absorción del alcaloide alcanzaba prácticamente el valor máximo y los tallos presentaban todavía un excelente aspecto, mientras que los mismos comenzaban a presentar señales de deterioro a partir de las 50 horas aproximadamente. Además, como ya se indicó para las experiencias en que se utilizaron plantas enteras, ese tiempo sería el adecuado para el estudio de los primeros catabolitos de la gramina en *Hordeum vulgare*.

Al finalizar la experiencia los tallos se extrajeron exhaustivamente con metanol y el extracto metanólico se lavó con hexano, determinándose nuevamente que esta fase era inactiva cuando se ensayó por radiactividad. El extracto metanólico se evaporó a sequedad y se lo sometió a una cromatografía de tamiz molecular, utilizando Sephadex LH-20 y metanol como eluyente. Este método se había ensayado previamente con extractos metanólicos de tallos de cebada a los que se les había suministrado gramina fría, en las mismas condiciones que las utilizadas en esta experiencia, demostrando ser eficaz para la separación de los productos de diferente peso molecular presentes en los extractos. Ajustando con precisión los volúmenes de las fracciones recogidas se logró además la separación de la gramina del triptofano libre presentes en los extractos de los tallos.

En estas experiencias se intentaron identificar todos los compuestos indólicos presentes en el extracto ya que, como se indicó anteriormente (página 123), se esperaba que en los tallos no se produciría la degradación del anillo indólico de la gramina. Así, las distintas fracciones eluidas desde la columna de Sephadex se analizaron por cromatografía en capa delgada, utilizando diferentes solventes para la separación de todos los posibles catabolitos de gramina; en especial se utilizaron condiciones que permitieron la separación de gramina (5), triptofano (11), 3-(hidroximetil)-indol (17), indol-3-carboxaldehído (13) y ácido indol-3-carboxílico (14).

La presencia de compuestos indólicos en las fracciones eluidas se determinó por CCD (sílicagel) revelando el cromatograma con el reactivo de Ehrlich⁸¹, y en particular para las sustancias mencionadas arriba por co-cromatografía en diferentes solventes (página 220) y comparación de los R_f y de las características de las manchas obtenidas con distintos reveladores (UV, Ehrlich, I₂) con las obtenidas para los testigos de las muestras auténticas. Sólo se detectó la presencia de gramina y triptofano en una concentración suficiente para poder visualizarlos con reveladores tan sensibles como el reactivo de Ehrlich.

El extracto metanólico total contenía el 90% de la radiactividad absorbida por los tallos y toda la actividad

que se describió en la página 98.

Después de 5 días de exposición se reveló el papel foto-

permanecía en los eluatos obtenidos desde la columna de Sephadex que correspondían a las fracciones de peso molecular menor que 1000; ésta se encontraba mayoritariamente en las fracciones que contenían gramina (80% de la radiactividad del extracto metanólico total) y en un porcentaje mucho menor (aproximadamente 10%), en las que contenían triptofano.

Aunque estas fracciones contenían sólo triptofano (11) o gramina (5) como únicos compuestos indólicos, (según se determinó revelando los cromatogramas obtenidos desde esas fracciones con el reactivo de Ehrlich), se encontraban presentes otras sustancias, las cuales se detectaban cuando se utilizaba un revelador universal. Además, se debía considerar la posibilidad de que una pequeña fracción de gramina (que no llegase a revelar con el reactivo de Ehrlich), podría encontrarse enmascarada en la fracción eluida desde la columna de Sephadex que contenía fundamentalmente triptofano. En consecuencia las fracciones correspondientes a gramina (10000 dpm) y triptofano (5000 dpm), se separaron por CCD (sílicagel) con mezcla de metanol:diclorometano (2:1) como solvente de desarrollo. Se determinó la radiactividad presente en cada zona del cromatograma dejando impresionar una placa fotográfica, en una experiencia de radiocromatografía como la que se describió en la página 98.

Después de 5 días de exposición se reveló el papel fotográfico, determinándose que en la fracción correspondiente al alcaloide, sólo se detectaba radiactividad en la zona correspondiente a gramina, obteniéndose una impresión de intensidad

comparable a la obtenida por el testigo de gramina-2-¹⁴C que se utilizó como referencia; en cambio, no se encontraba impresionada la zona correspondiente a triptofano de la fracción que contenía al aminoácido, sino que la actividad se encontraba distribuida fundamentalmente en dos zonas correspondientes a Rf 0,4 y 0,6 , aunque de baja intensidad y minoritariamente hacia la zona del frente del solvente. En esta última zona cromatografiaban en esas condiciones indol-3-carboxaldehído (13) y 3-(hidroximetil)-indol (17). Dada la escasa masa presente en la fracción analizada no se pudieron identificar los productos radiactivos. La gramina en cambio, se separó del resto de las sustancias con que eluía de la columna de Sephadex, por cromatografía en columna de sílica como se hacía habitualmente, y su identidad fue confirmada por CCD, CLAR y EM. El porcentaje de radiactividad presente en la gramina recuperada fue del 74% con respecto a la radiactividad absorbida por los tallos.

Los resultados obtenidos en esta experiencia permitieron inferir que, contrariamente a lo esperado, no se producía acumulación del último catabolito de gramina formado en los tallos, si no que todo el proceso degradativo se encontraría frenado, probablemente por un mecanismo de retroalimentación producido a lo largo de la secuencia catabólica desarrollada en los tallos, una vez que se alcanzaba la máxima concentración posible de intermediarios dentro del vegetal.

Esto explicaría el alto porcentaje de gramina radiactiva encontrada en los extractos de los tallos al finalizar la experiencia, como así también la cinética de absorción del alcaloide particularmente diferente a las obtenidas en las experiencias en que se utilizaron plantas enteras. Así, mientras que la absorción de gramina fue prácticamente la misma en ambas experiencias durante las primeras 21 horas, (Figura 34, página 74), ésta disminuía bruscamente a partir del primer día y permanecía en un valor máximo de alrededor del 55% aún después de 90 horas cuando se utilizaban solamente tallos. En este mismo período, las plantas enteras habían absorbido casi el 90% de la gramina suministrada.

La alta concentración de gramina dentro de los tallos sugería además que la disminución en la absorción no sería provocada por una disminución de la concentración de la gramina exógena, como sucedería en el caso de las plantas enteras, sino probablemente por una saturación en el contenido del alcaloide endógeno.

De los resultados anteriores se concluyó que la utilización del sistema enzimático fragmentado no permitía estudiar el catabolismo de gramina en *Hordeum vulgare*.

Se intentó entonces utilizar homogenatos libres de células obtenidos a partir de plantas o fracciones de plantas de cebada y tratar de estudiar con ellos el catabolismo de la gramina (5), realizando experiencias de observación directa

por RMN- ^{13}C ⁸². Esta posibilidad se analizó ya que se conocía que homogenatos de raíces de plantas de cebada de 8 días de desarrollo, eran capaces de producir la desmetilación del alcaloide hordenina (4) ⁸³ y que se disponía de gramina- α - ^{13}C y gramina-2- ^{13}C , las cuales se habían sintetizado como se indicó en el Capítulo II.

Los diferentes intentos por lograr homogenatos que mantuvieran la capacidad degradativa de gramina no dieron resultados positivos, aún cuando se modificaron las condiciones experimentales utilizadas en los estudios de degradación de hordenina ⁸³ ya sea trabajando a distintos pH (buffer fosfato, pH 6,8 ,7,2 , 7,4 y buffer TRIS, pH 8,2), distintas temperaturas de incubación (25°, 30°, 37°C), en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, o agregando agentes antioxidantes (mercaptoetanol, sorbitol), cofactores (fosfato de piridoxal) y/o aminoácidos (serina). De este modo, se desechó la utilización de sistemas alternativos para el estudio del catabolismo de la gramina en *Hordeum vulgare*.

III.9. Experiencias con gramina marcada en el anillo bencénico:

Como se indicó anteriormente, no fue posible detectar intermediarios en el proceso degradativo del anillo indólico de la gramina en plantas de cebada en desarrollo, en las diferentes experiencias en que se utilizaron como trazadores compuestos marcados con ^{14}C o ^{13}C en la posición 2 del sistema heterocíclico ya que dicho carbono era eliminado en su mayor parte

como CO_2 . Por lo tanto, fue necesario utilizar gramina marcada en el anillo bencénico para lo cual se sintetizó gramina-6- ^3H , según se indicó en la sección II.3.

Para determinar cómo se distribuía la radiactividad originalmente presente en el anillo bencénico de la gramina, se realizó una primera experiencia utilizando aproximadamente 200 plantas de cebada de 11 días de desarrollo, a las cuales se les suministró gramina-6- ^3H (20 $\mu\text{gr/planta}$) en la misma forma que se describió para las experiencias con gramina- ^{14}C . Al cabo de 7 días desde la administración del alcaloide, las plantas se cosecharon, se separó la arena y el agua de riego y se extrajeron raíces y parte aérea, separadamente y en forma secuencial con metanol y agua.

Se midió la radiactividad presente en cada extracto, como así también, en los residuos sólidos no extraíbles con metanol y agua (disgregando previamente el material insoluble con hidróxido de hiamina); dado que el residuo no extraíble de las raíces mantenía una fracción minoritaria de la radiactividad, se consideró la posibilidad de que ésta se encontrara en el producto de hidrólisis básica de las proteínas presentes en el material vegetal (esta técnica como se indicó anteriormente, página 85, permitía la recuperación del triptofano de proteínas), y en la lignina, ya que existía también la posibilidad de que el resto aromático del alcaloide suministrado pasase a formar parte de ese material.

Los resultados obtenidos en esta experiencia, junto con la secuencia de separación realizada, se esquematizan en la Figura 49. La distribución de la radiactividad obtenida en esta experiencia al cabo de 7 días de haber suministrado a las plantas gramina-6-³H, fue muy diferente a la observada cuando se suministró gramina-2-¹⁴C (Tabla 6, página 84).

Como primera observación, llamó la atención el alto porcentaje de radiactividad encontrado en la arena y el agua de riego remanente (aproximadamente el 32% de la radiactividad suministrada), lo que indicaría que algún catabolito final de la gramina sería excretado por las plantas, ya que, como se había observado en las experiencias en que se utilizó gramina-¹⁴C, sólo el 10% de la radiactividad originalmente presente en el alcaloide (y por lo tanto de la masa de gramina suministrada) se encontraba en esa fracción al cabo de 7 días. Así se determinó qué porcentaje de la radiactividad presente en esas fracciones, provenía efectivamente de la gramina-6-³H que no había sido absorbida por las plantas; lo cual se realizó como en las otras experiencias en que se utilizó gramina-¹⁴C.

Coincidentemente con los resultados anteriores, sólo el 10,9% de la radiactividad presente en los extractos provenientes de la arena y agua de riego, correspondía a la gramina-6-³H no absorbida por las plantas; el 21% de la radiactividad restante permanecía en el extracto metanol-agua alcalino

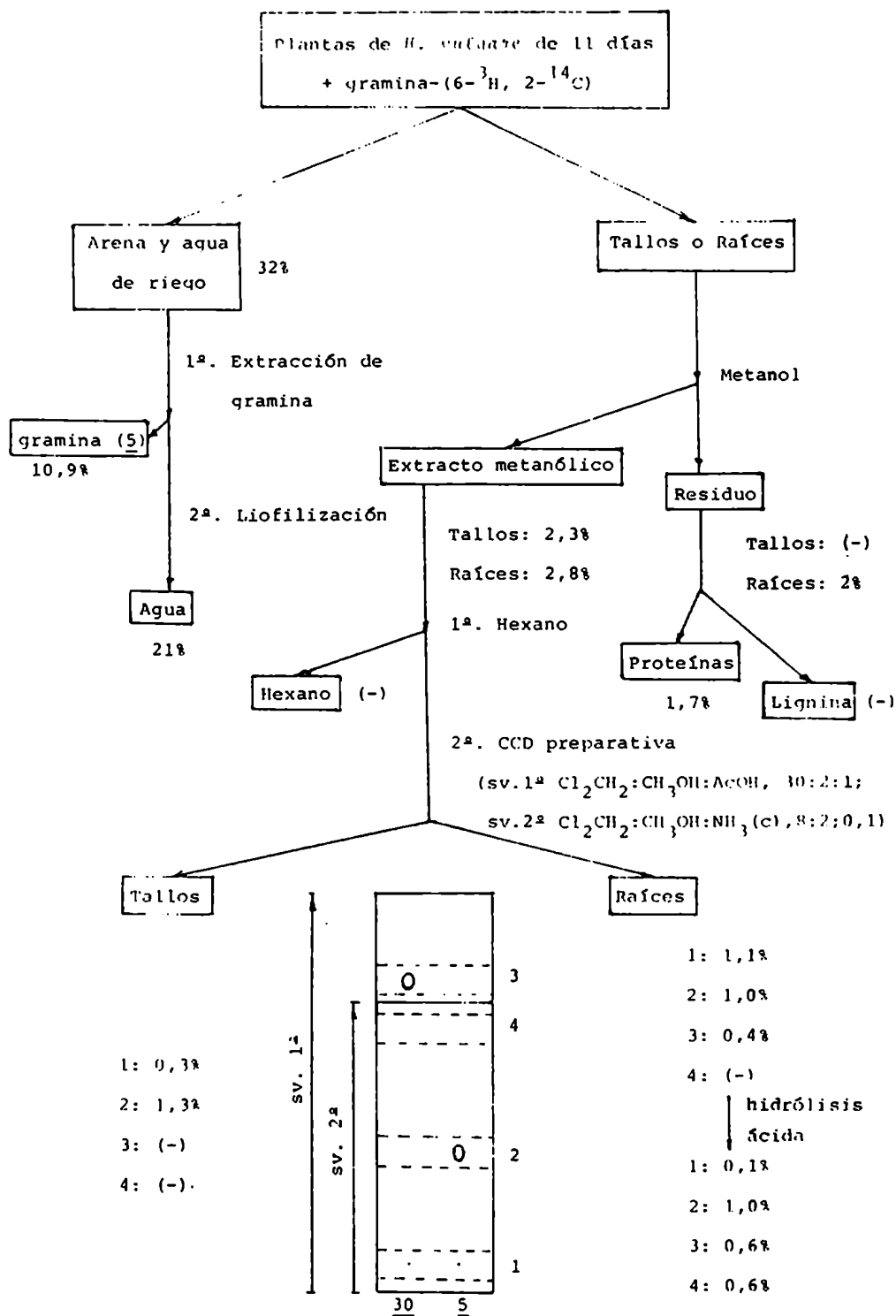


Figura 49: Esquema separativo y resultados obtenidos en la experiencia en que se suministró gramina-6-³H.

después de haber extraído la gramina y no era extraíble con cloruro de metileno en condiciones ácidas o neutras. Este resultado fue sumamente auspicioso ya que confirmaba la hipótesis de que la radiactividad fuera debida a un catabolito excretado por las plantas; además, las características de solubilidad de ese compuesto indicaban que el mismo debería ser sumamente polar.

Como al finalizar esta experiencia se encontró muy poca radiactividad dentro de las plantas, tanto los extractos metanólicos y acuosos como en los residuos sólidos (sólo el 6% de la radiactividad suministrada), cabía la posibilidad que el producto radiactivo excretado por las plantas fuera una sustancia volátil, la cual se evaporaría una vez que era eliminada al exterior. Con este criterio, y considerando también las características de solubilidad discutidas anteriormente, se investigó la presencia de $^3\text{H}_2\text{O}$ en el extracto proveniente de la arena del que se había extraído previamente la gramina y en el agua de riego remanente al finalizar la experiencia, para lo cual, se liofilizaron ambas fracciones separadamente, recogiéndose en ambos casos el agua de liofilización. Los resultados obtenidos (Figura 49 página 138), indicaron no sólo que ese producto era activo, sino que además era la única sustancia radiactiva excretada por las plantas, ya que toda la radiactividad présente en los extractos de la

arena y agua de riego, después de haber separado la gramina- $6-^3\text{H}$ no absorbida por las plantas se encontraba en el agua obtenida en la liofilización de esas fracciones.

El hecho que el hidrógeno de la posición 6 de la gramina fuera excretado como agua planteaba dos posibilidades degradativas: a) que la posición 6 de la gramina fuese hidroxilada en alguna etapa del catabolismo del alcaloide, probablemente posterior a la formación del ácido indol-3-carboxílico, o b) que el anillo bencénico también se degradase, produciéndose la ruptura del sistema aromático. La primera posibilidad resultaba menos probable, ya que, como se indicó en II.3 (página 37) las hidroxilaciones enzimáticas conocidas para los sistemas indólicos ocurrían en las posiciones 5 y/o 7 del heterociclo.

Como se indicó anteriormente, uno de los posibles caminos catabólicos postulados para la gramina en *Hordeum vulgare* implicaría su degradación a ácido antranílico (30) (Figura 45, página 109). El catabolismo del ácido antranílico en vegetales no ha sido todavía completamente elucidado⁹²; sin embargo, se conocía un camino degradativo para este compuesto común a todos los sistemas vivientes, en el cual se producía posteriormente a la formación del ácido 3-hidroxiantranílico (33) la ruptura del enlace C-3—C-4 del anillo aromático. La secuencia posterior no ha sido investigada en vegetales pero sí en bacterias, en donde el camino degradativo

conduce finalmente a acetato⁹³⁻⁹⁵ perdiéndose el H de la posición 4 del ácido antranílico como H₂O. Dado que, si efectivamente el catabolismo de gramina (5) conducía a ácido antranílico (30), como se planteó en la segunda posibilidad en la página 107, el C-4 del aminoácido correspondería al C-6 del núcleo indólico de la gramina, esta secuencia degradativa explicaría la formación de ³H₂O en el catabolismo de gramina-6-³H en las plantas de cebada en desarrollo.

Se investigó entonces la presencia del ácido antranílico (30) en los extractos metanólicos de raíces y parte aérea, lo cual se realizó por CCD utilizando secuencialmente como solventes mezclas de diclorometano:metanol:ácido acético glacial, (30:2:1) (Rf_{gra}=0; Rf_{ant}=0,75) y diclorometano:metanol:amoníaco concentrado (8:2:0,1) (Rf_{gra}=0,45). Las placas se desarrollaron con el primer solvente, se cortó la zona de Rf 0,7, y el resto de la placa se volvió a cromatografiar con el segundo solvente (ver esquema en la Figura 49, página 138); en todos los casos se utilizó como adsorbente sílicagel con indicador fluorescente para determinar la presencia de las sustancias por exposición del cromatograma a la luz UV (254nm) y se agregó a los extractos antes de cromatografiar, 10 mg de gramina y ácido antranílico auténticos para poder localizar las sustancias, dada la baja concentración endógena de las mismas. Las zonas de los cromatogramas correspondientes a gramina (5) y ácido antranílico (30), se desorbieron desde la sí-

licagel y se ensayaron por radiactividad.

En forma tentativa, se pudo determinar la presencia de una pequeña proporción de ácido antranílico radiactivo, en los extractos metanólicos de raíces pero no de tallos, resultado este que concordaba también con la supuesta deslocalización del proceso degradativo de gramina hacia las raíces, en las últimas etapas del catabolismo del alcaloide en *Hordeum vulgare*.

También se determinó la presencia de gramina radiactiva tanto en los extractos de tallos como en los de raíces (en una proporción algo mayor en los tallos).

Por otra parte, se observó que aproximadamente el 40% de la radiactividad presente en el extracto metanólico de raíces, no se eluía desde la zona de siembra del cromatograma, aún después del desarrollo en ambos sistemas cromatográficos, por lo cual se pensó que el o los compuestos responsables de la actividad deberían ser muy polares y relativamente neutros. Se analizó entonces la posibilidad de que uno de esos compuestos fuese algún producto de glicosidación del ácido antranílico, ya que esta sustancia se encontraba descrita en la literatura³⁵. Se realizó entonces la hidrólisis ácida de una alícuota del extracto metanólico de raíces, y se cromatografió el hidrolizado, después de haber ajustado el pH de la solución a aproximadamente 5, en los dos sistemas cromatográficos indicados anteriormente. El análisis del cromatograma obtenido, de

mostró que el porcentaje de radiactividad presente en el origen había disminuido notablemente con respecto al obtenido cuando se cromatografió el mismo extracto sin hidrolizar, lo cual confirmaba la hipótesis con respecto a la presencia de un compuesto glicosidado. Sin embargo, no se produjo un aumento concomitante en el porcentaje de radiactividad presente en la zona del cromatograma correspondiente al ácido antranílico (ésta aumentó pero sólo un 20% con respecto al valor obtenido en el extracto original). La radiactividad remanente se encontraba en la zona del cromatograma correspondiente a $R_f=0,9$, después del desarrollo en el segundo solvente; debido a la pequeña masa de que se disponía, no se pudo determinar la identidad de la/s sustancia/s radiactivas. (Como se indicó anteriormente, los resultados obtenidos en esta experiencia se resumen en la Figura 49, página 138.

Por otra parte no se encontró radiactividad en los residuos sólidos de tallos, y sólo un pequeño porcentaje en el de raíces encontrándose fundamentalmente en la fracción proteica del tejido vegetal, probablemente en el triptofano unido a proteínas, aunque esto último no se analizó; como dato complementario, no se encontró radiactividad incorporada en la lignina.

El bajo porcentaje de radiactividad recuperada desde las plantas al cabo de 7 días de haberles suministrado el alcaloide sugirió además que la degradación total de la gramina en *Hordeum vulgare* sería un proceso extremadamente rápido, ya que estos re-

sultados indicaban que más del 80% de la radiactividad originalmente presente en el anillo bencénico de la gramina absorbida por las plantas habría sido excretada de las mismas durante ese período. De confirmarse el esquema catabólico propuesto, el producto excretado debiera ser únicamente H_2O , la cual en parte (como se observó en esta experiencia) quedaría en la arena y agua de riego, pero mayoritariamente se habría evaporado desde la superficie de la arena en que se desarrollaron las plantas. Aunque en mucha menor medida y diluida con el agua de riego, el 3H_2O habría sido reabsorbida también por las plantas. Estos resultados por otra parte, concordaban nuevamente con la alta velocidad de degradación encontrada para indol-3-carboxaldehído (13) y ácido indol-3-carboxílico (14), cuando se inocularon estos compuestos marcados en el C-2 del núcleo indólico. (Figura 48, I y II, página 126).

Con el fin de determinar fehacientemente si la hipótesis postulada representaba efectivamente lo que ocurría en el catabolismo de gramina en *Hordeum vulgare*, se decidió realizar una experiencia utilizando simultáneamente gramina-6- 3H y gramina-2- ^{14}C , y determinar a diferentes tiempos a partir de la inoculación del alcaloide marcado, la relación $^3H/^{14}C$ en los extractos metanólicos de raíces y tallos, y en la arena y agua de riego remanente al finalizar la experiencia.

De este modo un aumento en la relación $^3H/^{14}C$ indicaría el momento en el cual ocurría la ruptura del anillo pirrólico del alcaloide pero no del bencénico, mientras que la misma variación

y además la presencia de $^3\text{H}_2\text{O}$, indicaría el momento a partir del cual la planta comenzaría a excretar el/los producto/s provenientes de la degradación total de la gramina.

Para realizar esta experiencia fue necesario primero encontrar un método adecuado para el aislamiento del ácido antranílico desde las plantas, ya que este producto debía ser analizado.

En la literatura⁹⁶ se encontraba descripto un método de extracción de ácido antranílico (30) desde vegetales, el cual fue utilizado en esta experiencia. Sin embargo, la pureza del producto obtenido en ese procedimiento no se consideró suficiente para el trabajo con material radiactivo.

Como el ácido antranílico sublimaba en condiciones experimentales sencillas (110°C y 1 atm) se utilizó este método para la purificación del producto obtenido desde las plantas, dado el alto grado de pureza con que se obtenía la sustancia con este procedimiento. La presencia de agua tritiada se determinó por liofilización como se indicó más arriba.

Por último se decidió aislar la gramina no catabolizada presente dentro del vegetal, ya que esta indicaría en que extención se degradaría el alcaloide, a partir de su administración y absorción por las plantas. De este modo se realizó una experiencia utilizando aproximadamente 2000 plantas de cebada de 11 días de desarrollo a las cuales se les suministró gramina- ($6\text{-}^3\text{H}, 2\text{-}^{14}\text{C}$), (relación $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 1,3$), (23 $\mu\text{gr/planta}$); alícuotas

de las mismas se cosecharon a las 50, 72, 96, 120 y 166 horas. En todos los casos se extrajeron separadamente raíces y parte aérea con metanol, se agregó a los extractos entre 15 y 20 mg de gramina y una cantidad equivalente de ácido antranílico, y se guardaron hasta su utilización en oscuridad y a baja temperatura.

Siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, se aislaron desde los diferentes extractos metanólicos gramina (5) y ácido antranílico (30). La separación de los mismos se realizó por CCD preparativa en sílicagel y posteriormente se purificaron por cromatografía en columna de sílicagel y por sublimación, respectivamente. La incorporación absoluta en los productos endógenos se calculó en función de la masa de sustancia recuperada después de la purificación considerando la masa de gramina y ácido antranílico auténticos agregados en cada caso. Se aislaron también desde el agua de riego remanente al procesar cada alícuota y desde los extractos metanol-HCl conc. (100:1,2) de la arena, la gramina (previo agregado de 15mg de gramina fría a la arena antes de la extracción) y el agua presente, la cual, como se indicó anteriormente, se obtenía por liofilización de esos extractos.

Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas 12 y 13; ellos permitieron aclarar en muchos aspectos, el catabolismo de la gramina en las plantas de *Hordeum vulgare*.

En primer lugar, se observó la presencia de $^3\text{H}_2\text{O}$ en la arena

Tabla 12: Degradación de gramina-(6- ^3H , 2- ^{14}C) por plantas de cebada de 11 días de desarrollo^(a).

Tiempo (horas)	Radiactividad en el agua de riego (%)						
	Total			Agua		Resto ^(b)	
	^3H	^{14}C	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	^3H	^3H	^{14}C	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
50	13	4,4	4,3	10	2,2	1,5	1,4
72	17	4,3	4,6	11,5	5,9	4,7	1,5
96	22	4,5	5,9	15	5,2	4,6	1,4
120	23,2	8,2	3,5	13	7,5	4,4	2,1
166	5,5	1,0	6,4	4,6	1,5	0,8	2,2

(a): se suministró gramina-(6- ^3H , 2- ^{14}C) ($7,3 \times 10^5$ dpm/mg de ^3H , $5,6 \times 10^5$ dpm/mg de ^{14}C , relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 1,3; 23 $\mu\text{g/planta}$); (contenido normal de gramina endógena en plantas de cebada de 11 días: 17 $\mu\text{g/planta}$).

(b): residuo obtenido en la liofilización del extracto total.

Tabla 13: Degradación de gramina-(6-³H, 2-¹⁴C). Porcentaje de radiactividad en gramina (5) y ácido antranílico (30) extraídos desde las plantas.

Tiempo (horas)	Total			Gramina (<u>5</u>)			(<u>30</u>) ^(a)
	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C	³ H
I. Extracto metanólico de raíces							
50	10	9,3	1,3	8,9	7,9	1,4	0,59
72	11	8,8	1,5	8,5	7,4	1,3	0,56
96	7,8	6,0	1,6				
120	6,0	5,8	1,3	3,6	3,2	1,3	1,02
166	5,0	4,2	1,5	1,7	1,4	1,4	0,04
II. Extracto metanólico de tallos							
50	38	35	1,4	30	25	1,4	0 ^(b)
72	31	27	1,4	19	18	1,3	0
96	34	26	1,6	14	13	1,3	0
120	25	23	1,2	6,9	5,3	1,4	0
166	6	11	0,6	3,6	3,6	1,3	0

(a): El ácido antranílico no contenía ¹⁴C en proporciones detectables.

(b): El ácido antranílico (30) proveniente de los extractos de tallos no era radiactivo.

y agua de riego, ya a las 50 horas de haber suministrado el alcaloide, lo que indicaba la notable rapidez con que la gramina era degradada hasta sus últimas etapas en las plantas de cebada en desarrollo. Además, en todos los casos analizados, el $^3\text{H}_2\text{O}$ obtenida por liofilización junto a la gramina suministrada que no había sido absorbida por las plantas, eran las únicas sustancias radiactivas presentes en esos extractos.

El hecho que el ácido antranílico radiactivo aislado desde los extractos metanólicos de raíces, estuviera sólo marcado con ^3H pero no con ^{14}C indicaba que este producto no provenía de una síntesis de novo a partir de catabolitos finales de la gramina, sino que era efectivamente un intermediario en el proceso degradativo que producía la ruptura del sistema aromático del alcaloide, en plantas de cebada en desarrollo. Esto explicaba también la presencia de $^3\text{H}_2\text{O}$ como único producto radiactivo excretado por las plantas.

Es interesante notar que el porcentaje de incorporación en el ácido antranílico (30) (del orden del 1% o menor) fue en todos los casos inferior al encontrado en el $^3\text{H}_2\text{O}$ producida por evaporación desde la superficie de siembra.

El análisis de los resultados obtenidos con la gramina aislada desde las plantas avalaron también las conclusiones alcanzadas con el ácido antranílico y el agua tritiada; así, el alto porcentaje de gramina aislada, fundamentalmente desde los tallos y en las alícuotas que se cosecharon a las 50 y 72 horas, indi-

caron claramente que la etapa inicial en la degradación del alcaloide era la que regulaba el proceso catabólico total. Si se compara con los valores de absorción obtenidos en III.3 (Figura 34, página 74) resulta evidente que las plantas de cebada podían absorber una cantidad de gramina mucho mayor que la que podía ser metabolizada en ese período. De este modo, la extremadamente baja concentración de intermediarios del camino catabólico del alcaloide presente dentro de las plantas, explicaba los resultados negativos encontrados en las experiencias descritas en las Secciones III.4 y III.6.

Dos aspectos más de los resultados obtenidos en esta experiencia corroboraron el efecto de "cascada" que se producía en la velocidad de degradación del alcaloide, a partir del momento en que se inicia la secuencia catabólica:

- 1ª. que la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ en los extractos totales permanece prácticamente constante y del mismo orden de la presente en la gramina suministrada;
- 2ª. que el porcentaje de radiactividad encontrado en el $^3\text{H}_2\text{O}$ excretada por las plantas, a las 50 horas de haberle suministrado el alcaloide, (aproximadamente 10%) fue prácticamente el mismo que el obtenido en el $^{14}\text{CO}_2$ expelido por las plantas en el mismo tiempo cuando se les suministró gramina-2- ^{14}C . (Figura 38 página 87).

Así, como la marcación de ^{14}C estaba localizada en el C-2 del alcaloide (anillo pirrólico) mientras la de ^3H en el C-6

(anillo bencénico), la constancia en la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ dentro de las plantas a lo largo de toda la experiencia, indicaba que la ruptura de ambos sistemas aromáticos debía ocurrir casi simultáneamente, dentro de los límites de tiempo utilizados. La similitud entre la radiactividad encontrada en el $^3\text{H}_2\text{O}$ excretada (gramina-6- ^3H) y el $^{14}\text{CO}_2$ evolucionado (gramina-2- ^{14}C) apoya fuertemente esta conclusión.

III.10. Conclusiones finales.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las experiencias anteriormente descritas, fue posible proponer un camino degradativo para la gramina (5) en plantas de *Hordeum vulgare* intactas en desarrollo, el cual se presenta en la Figura 50.

Los fundamentos por los cuales se han delineado las secuencias catabólicas propuestas, se discutieron para cada experiencia particular desde cuyos resultados se inferían los catabolitos propuestos. Sin embargo, es necesario hacer algunas observaciones sobre las secuencias cuya evidencia experimental no aseguraba una asignación inequívoca.

Así, el rol del 3-(hidroximetil)-indol (17) debe ser objeto de una consideración especial.

Si bien otros autores ya habían propuesto a 17 como catabolito de gramina (5) en tallos de cebada en oscuridad (estas experiencias se discutieron en el Capítulo I, página 17), y en las experiencias de competencia descritas en III.6 (página 100) el compuesto 17

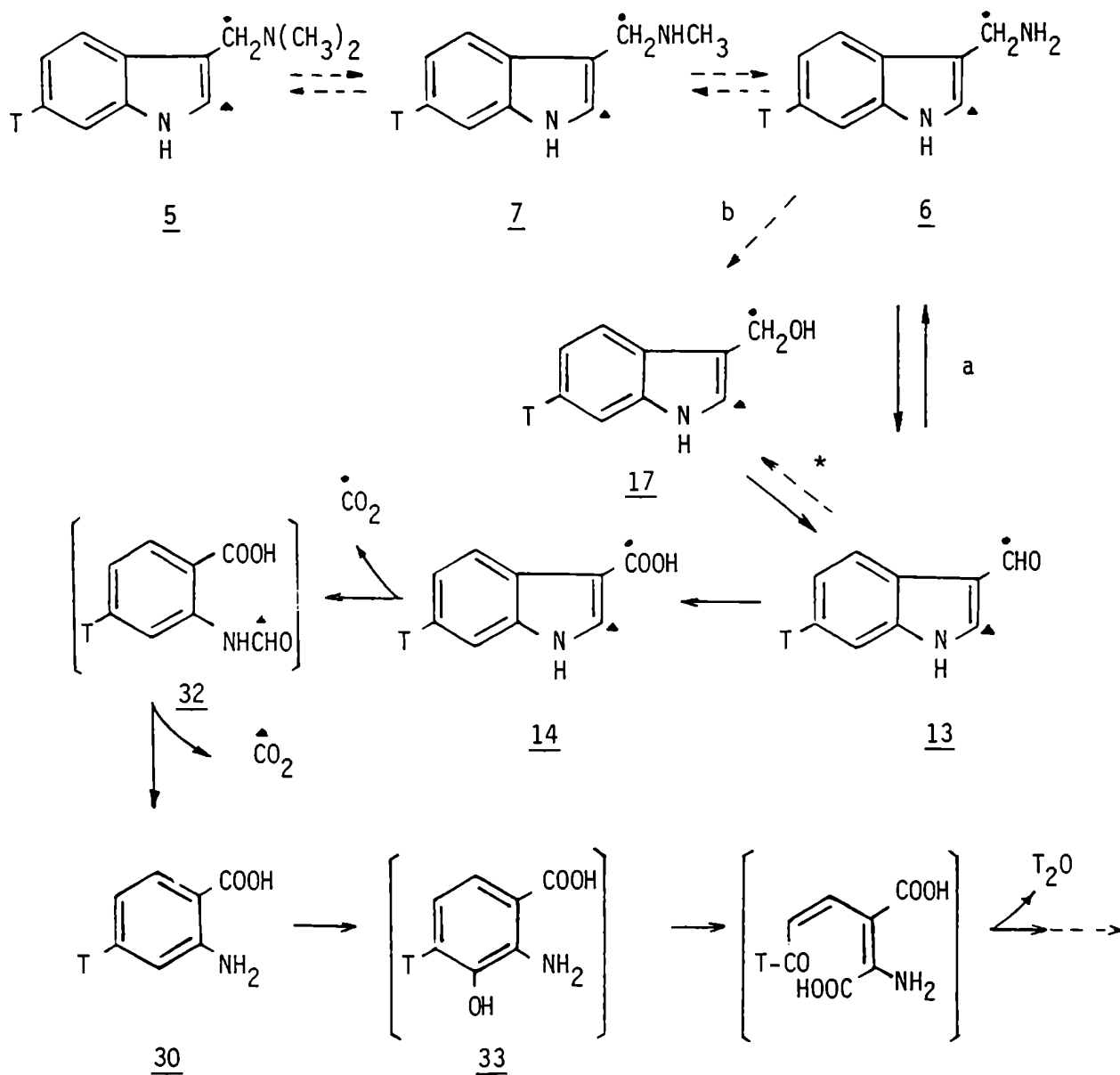


Figura 50: Esquema propuesto para el catabolismo de gramina (5) en *Hordeum vulgare*; (* la conversión 13 \rightarrow 17 sólo ocurriría en magnitud apreciable al utilizar sistemas deficientes en oxígeno).

había provocado una variación notable de la curva de evolución normal de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de gramina- α - ^{14}C (Figura 42, página 104), la transformación de una amina en un alcohol no es un proceso metabólico habitual.

Magnus y colaboradores⁸⁴ estudiaron el catabolismo del ácido indol-3-acético (34) en tallos etiolados de *Pisum sativum* (arveja común) y encontraron una relación metabólica entre indol-3-carboxaldehído (13), ácido indol-3-carboxílico (14) y 3-(hidroximetil)-indol (17), (los cuales son productos del catabolismo de 34) diferente a la propuesta en la Sección III.6 (Figura 43, página 107), la cual se esquematiza en la Figura 51.

Una secuencia de este tipo (camino a en la Figura 50) resultaba más atractiva que la inicialmente propuesta para el catabolismo de gramina (5) (camino b) en cuanto a los catabolitos en cuestión, puesto que la conversión directa de 6 en 13 representa el modo usual de degradación de una amina a un compuesto oxigenado en organismos vivos; tales transformaciones son catalizadas por monoaminoxidasas y/o transaminasas³⁵. Además, la relación propuesta entre 13 y 14 fue comprobada para el proceso en estudio (Sección III.7, página 121).

La experiencia de competencia realizada con 17 (página 103) es concordante también con este esquema degradativo, ya que en ese caso el agregado de 17 produciría un aumento en la concentración endógena de 13 (el cual es un catabolito de gramina)

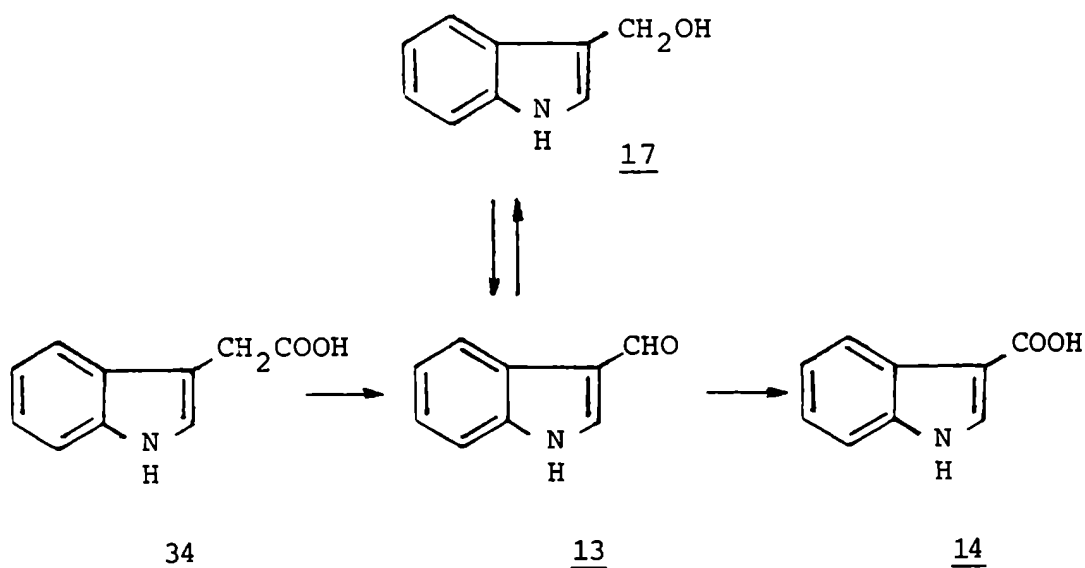


Figura 51: Catabolismo de ácido indol-3-acético en tallos etiolados de *Pisum sativum* en oscuridad⁸⁴.

produciendo de este modo la dilución isotópica observada.

Un análisis más detallado de las observaciones realizadas por Magnus y colaboradores⁸⁴ y de los resultados obtenidos por Digenis⁴⁴⁻⁴⁶ en las experiencias anteriormente mencionadas, permiten obtener algunas conclusiones acerca del metabolismo de estos compuestos en cebada. Así, cuando se suministró ácido indol-3-acético (34) a tallos etiolados de plantas de arveja, el principal producto endógeno encontrado fue 3-(hidroximetil)-indol (17) ; sin embargo, la administración de indol-3-carboxaldehído(13) producía fundamentalmente ácido indol-3-carboxílico (14).

Como era conocido^{97,98} que el primer paso en la degradación del ácido indol-3-acético (34) implicaba la descarboxilación oxidativa a indol-3-carboxaldehído (13), los autores tuvieron que concluir que la acumulación de 17 debía ser una consecuencia del sistema fraccionado que utilizaron en esas experiencias. Magnus y colaboradores, consideraron que en estos sistemas la respiración se hallaba restringida debido a que los espacios intercelulares deberían estar ocupados por la solución acuosa (que contenía al catabolito en estudio) absorbida por los tallos. De este modo, las células sólo dispondrían de una cantidad limitada de "oxígeno" (este término incluía las entidadesceptoras de hidrógeno y los sistemas de transferencia de electrones). En las incubaciones realizadas con indol-3-carboxaldehído (13) ese "oxígeno" podría consumirse en la oxidación a ácido indol-3-carboxílico (14); sin embargo, como el "oxígeno" ya era utilizado para la oxidación del ácido indol-3-acético (34), el compuesto 13 debería ser preferentemente reducido a 17 a fin de retornar el sistema enzimático a su forma oxidada y poder atacar otras moléculas de ácido indol-3-acético.

Como se indicó anteriormente (Capítulo I, página 17) Digenis había encontrado una acumulación similar de 3-(hidroximetil)-indol (17) cuando incubó los tallos etiolados de cebada con gramina- α -¹⁴C; en esas experiencias sólo el 10% de la radiactividad inicialmente localizada en la cadena lateral de la gramina (5) pasaba al CO₂ expelido por los tallos al cabo de 7 días.

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que

el catabolismo de gramina (5) en plantas de cebada intactas constituye un proceso totalmente oxidativo, en el cual la cadena lateral del alcaloide se degrada cuantitativamente a CO_2 (Figuras 35-38, páginas 76, 77, 80 y 87 respectivamente).

La comparación de estos resultados con los obtenidos por Digenis indican que el proceso catabólico normal para la gramina se encuentra impedido en tallos etiolados de cebada en oscuridad. Así, es probable que las observaciones realizadas por Magnus⁸⁴ puedan aplicarse a las condiciones experimentales utilizadas por Digenis, ya que tanto la baja producción de CO_2 radiactivo como la anormal acumulación de 17 parecen indicar una disponibilidad limitada de "oxígeno". Por otra parte el propio Digenis ya había sugerido⁴⁶ que sus resultados podrían no representar el metabolismo normal de estas sustancias en plantas de cebada intactas. Esto pone de manifiesto la inconveniencia de realizar estudios de metabolismo en sistemas altamente perturbados, ya que los resultados obtenidos pueden reflejar, como en ese caso, las condiciones anómalas utilizadas.

Las monoaminoxidasas (MAO) son enzimas que se encuentran sólo en algunas especies, fundamentalmente en el reino animal; de hecho, ellas no fueron detectadas en las plantas de cebada utilizadas durante la presente tesis⁹⁹. Estas enzimas catalizan la transformación irreversible de amina a aldehído³⁵. En cambio, las transaminasas se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos vivos y catalizan dicho intercambio reversiblemente³⁵.

Así, la ausencia de monoaminooxidasas junto a la evidencia obtenida para la reversibilidad del camino gramina (5) \rightleftharpoons indol-3-carboxaldehído (13) (Sección III.7) están de acuerdo con la intervención de una enzima transaminasa. Este hecho, junto con lo discutido más arriba con relación a la existencia de 3-(hidroximetil)-indol (17) como verdadero catabolito de gramina, son consistentes con que la secuencia indicada por la letra a en el esquema de la Figura 50, constituya el camino degradativo normal para la cadena lateral de la gramina en plantas de cebada intactas en desarrollo. No obstante, los resultados experimentales obtenidos no permiten descartar en forma absoluta la secuencia indicada por la letra b en la Figura 50, ya que para esto debería aislarse la transaminasa que cataliza la interconversión 6 \rightleftharpoons 13.

Otro aspecto de consideración en la discusión del esquema metabólico propuesto es la intervención del ácido antranílico (30) y del triptofano (11).

Si bien los resultados obtenidos en los ensayos de competencia descritos en la sección III.6 no permitieron obtener conclusiones certeras (Figura 46; discusión en página 111), los resultados obtenidos en las experiencias en que se suministró gramina-6-³H sugerían que el alcaloide se degradaba directamente a 30, ya que si el triptofano fuese un intermediario en ese proceso debería esperarse una distribución diferente de la radiactividad considerando que 11 es también precursor biosintético de

otros compuestos indólicos en vegetales¹⁰⁰; además, la incorporación de radiactividad en la fracción proteica debería ser también más importante. Del mismo modo, la rapidez con que se producía la eliminación de $^3\text{H}_2\text{O}$ y el alto porcentaje de radiactividad presente en esa sustancia, sugerían la existencia de un camino unívoco para la degradación total del alcaloide, el cual no sería compatible con la presencia de triptofano (11) como destino final del anillo indólico de la gramina (5).

Los resultados ambiguos obtenidos en la experiencia de competencia con ácido N-formilantranílico (32), podrían explicarse teniendo en cuenta que la degradación del anillo pirrólico ocurre casi simultáneamente con la de la cadena lateral del alcaloide, y que por lo tanto, el tiempo de espera entre la administración de gramina-2- ^{14}C y el compuesto ensayado (32) en la experiencia descrita en III.6 habría sido excesivo. Si se tiene en cuenta además que la concentración de intermediarios del camino catabólico de la gramina es muy baja en todo momento, y que la pendiente de la curva de evolución de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de gramina-2- ^{14}C (Figura 38) no es tan pronunciada como la de gramina- α - ^{14}C (Figura 35), de modo que pequeñas variaciones pueden no ser detectadas dentro del error experimental, no es extraño que en esas condiciones el agregado de 32 no haya producido un efecto observable (Figura 46, "b", página 112). La pequeña fracción de radiactividad hallada en el ácido N-formilantranílico extraído desde

las plantas al finalizar la experiencia constituye, no obstante, una evidencia cierta en favor del camino metabólico propuesto.

El resultado obtenido en la experiencia de competencia con formiato (Figura 46, "c") estaría de acuerdo con esta hipótesis; el mismo indicaría que en ese momento la mayor parte de la radiactividad presente dentro de las plantas después de 87 horas de haberles suministrado gramina-2- ^{14}C estaría formando parte del reservorio de C-1, el cual sería subsecuentemente eliminado como dióxido de carbono y/o remetabolizado a aminoácidos, azúcares y otros productos, según las rutas metabólicas conocidas para ese producto en plantas de cebada^{88,89}. Esto justificaría además, la diferencia observada entre la degradación de C-2 y C- α (62% y 90% respectivamente a $^{14}\text{CO}_2$ al cabo de 7 días de suministrar el trazador).

La secuencia catabólica propuesta en la Figura 44 (página 108) podría representar un camino degradativo minoritario y probablemente alternativo, según se podría deducir desde los resultados de incorporación en el triptofano (11) unido a proteínas obtenido en la experiencia en que se suministró gramina-2- ^{14}C (Sección III.4).

Del análisis final de los resultados obtenidos, se pueden obtener dos evidencias más acerca de la baja concentración de intermediarios en el camino catabólico de la gramina en *Hordeum vulgare*. Así, si se comparan las curvas de evolución de $^{14}\text{CO}_2$

obtenidas cuando se suministró a las plantas gramina- α - ^{14}C (Figura 35) o gramina-2- ^{14}C (Figura 38), con las obtenidas en los casos en que se suministró indol-3-carboxaldehído-2- ^{14}C o ácido indol-3-carboxílico-2- ^{14}C (Figura 48, I y II, respectivamente), resulta evidente que la degradación del anillo pirrólico en los compuestos 13 y 14 es aún más rápida que la de la cadena lateral de la gramina (5). Puesto que indol-3-carboxaldehído (13) y ácido indol-3-carboxílico 14 son a su vez catabolitos de gramina en plantas de cebada en desarrollo, esto indica que la etapa determinante de la velocidad de degradación total sería anterior a la formación de 13 y que una vez que se producen los catabolitos que presentan funciones oxigenadas en el C- α la degradación se hace extremadamente rápida. Esto justificaría también los resultados negativos encontrados por Breccia y Marion³⁸ para la incorporación de 13 en 5.

Por otra parte, si se analiza el contenido de gramina radiactiva absorbida por las plantas en las experiencias en que se suministró gramina-(6- ^3H , 2- ^{14}C) (Sección III.9.), y se compara con las curvas de la Figura 39 (página 89), es evidente que la cantidad de radiactividad presente dentro de las plantas no se debió a la acumulación de intermediarios, como se había supuesto inicialmente, sino a la gramina que había sido absorbida por las plantas y que no se había metabolizado. La Figura 52 muestra gráficamente esta aseveración; la diferencia entre las dos curvas presentadas en esta Figura, indicaría la cantidad real de intermediarios y/o

traída desde las plantas (●) a partir de la administración de gramina-(6- ^3H , 2- ^{14}C) a plantas

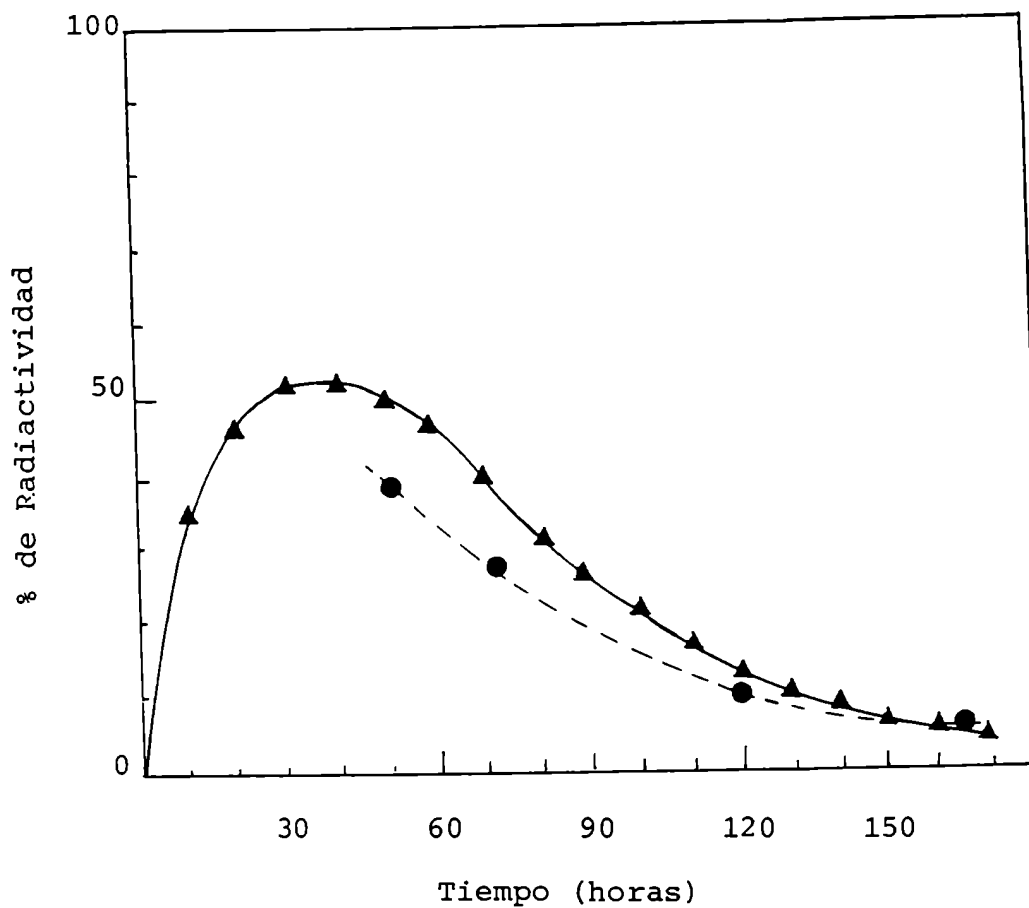


Figura 52: Radiactividad total dentro de las plantas (▲) a partir de la administración de gramina- α - ^{14}C a plantas de cebada de 11 días (de Figura 39.I) comparada con la radiactividad en gramina extraída desde las plantas (●) a partir de la administración de gramina-(6- 3 , 2- ^{14}C) a plantas de cebada de 11 días.

productos finales del catabolismo de gramina presentes dentro del vegetal. Como se puede observar en la Figura 52, dicha concentración es siempre pequeña, sugiriendo que el paso determinante de la velocidad de degradación sería la etapa de desmetilación.

Como se indicó más arriba, la diferencia entre la cantidad de gramina absorbida y la radiactividad presente dentro de las plantas después de las 50-60 horas de haberles suministrado gramina-2-¹⁴C (Figura 39.II), indicaría la posible acumulación de formiato y/o productos del metabolismo de este compuesto, formados con posterioridad a la degradación total de la gramina.

CAPITULO IV

Analisis Espectroscopico

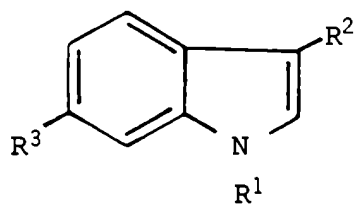
La disponibilidad de compuestos indólicos relacionados estructuralmente que se obtuvieron durante el presente trabajo de tesis y la marcación estereoespecífica que presentaban algunos de ellos, permitió realizar un estudio más detallado de las asignaciones de los desplazamientos químicos de estos compuestos en los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C . (En la Figura 53 se resumen las estructuras de los compuestos estudiados).

IV.1. Espectros de RMN- ^{13}C .

Las asignaciones de los desplazamientos de RMN- ^{13}C de indoles y alcaloides indólicos relacionados están generalmente referidos al trabajo realizado por Parker y Roberts¹⁰¹, quienes asignaron los δ de ^{13}C del indol y los siete monometilindoles derivados. Aún en libros de textos sobre RMN- ^{13}C se mantiene esta asignación para el indol y sus derivados¹⁰².

La necesidad de tener una asignación inequívoca de los carbonos de los compuestos que se iban a utilizar en los estudios catabólicos "in vivo" utilizando precursores marcados con ^{13}C , llevó a estudiar con más detalle estos trabajos.

Parker y Roberts¹⁰¹ asignaron los desplazamientos de los carbonos 5, 6 y 7 del indol en base a parámetros de aditividad que ellos mismos dedujeron utilizando los datos de desplazamientos para los siete monometilindoles, considerando el sustancial efecto α producido por el grupo metilo sobre el



Compuesto	R ¹	R ²	R ³
<u>5</u>	H	CH ₂ N(CH ₃) ₂	H
<u>6</u>	H	CH ₂ NH ₂	H
<u>7</u>	H	CH ₂ NHCH ₃	H
<u>13</u>	H	CHO	H
<u>14</u>	H	COOH	H
<u>17</u>	H	CH ₂ OH	H
<u>18</u>	H	H	H
<u>20</u>	H	H	Br
<u>21</u>	Si(CH ₃) ₃	H	H
<u>25</u>	H	CH ₂ N(CH ₃) ₂	Br
<u>29</u>	H	CH=NCH ₃	H

Figura 53: Compuestos indólicos estudiados en este Capítulo.

carbono ipso. Sin embargo, con los valores de desplazamiento asignados no era posible justificar la diferencia de efectos α que se producía en los carbonos 5 y 6 del indol.

Esta aparente anomalía ya había sido notada por Gribble y colaboradores¹⁰³, quienes observaron en un espectro de RMN-¹³C de un alcaloide indólico al que habían marcado con deuterio en la posición correspondiente al C-5 del indol, que la señal que desaparecía era la que había sido asignada previamente al C-6 del indol. Estos autores sugirieron la posibilidad de que las asignaciones de los carbonos 5 y 6 del indol se encontrasen revertidas. Sin embargo, en las publicaciones posteriores sobre desplazamientos químicos de RMN-¹³C de alcaloides indólicos¹⁰⁴,¹⁰⁵ y hasta aún del triptofano⁶⁵, las asignaciones de esos carbonos no fueron modificadas.

Dado que se disponía de indol-6-²H y gramina-6-²H, se realizaron los espectros de RMN-¹³C de estos compuestos (Figuras 18 y 22, páginas 50 y 55). Como es sabido, el reemplazo por un ²H de un ¹H unido a un carbono produce un aumento en el tiempo de relajación spin-red (T_1) del carbono deuterado, a la vez que aumenta la complejidad de la señal debido al acoplamiento con el deuterio; la intensidad de la señal disminuye además, debido a la desaparición del efecto nuclear de Overhauser. Cuando se trabaja con los tiempos de repetición normales (0,4-0,8 segundos), el resultado neto que se observa en el espectro de RMN-¹³C es la desaparición de la señal del carbono deuterado.

En el caso estudiado se observó la desaparición de las señales a δ 121,7 ppm (para el indol) y δ 121,5 ppm (para la gramina), mientras que permanecían las que habían sido previamente asignadas al C-6 de estos compuestos (δ 119,5 y 119,1 ppm, respectivamente). De este modo, se pudieron asignar inequívocamente los carbonos 5 y 6 de los espectros de RMN- ^{13}C de indol y gramina.

Con respecto al trabajo original de Roberts¹⁰¹, la asignación correcta de los carbonos 5 y 6 permitió ajustar los parámetros de aditividad por la presencia del grupo metilo, de modo que éstos quedaron entre extremos más estrechos (+10,5 ppm para el C-2 y +8,2 ppm para el C-6). Además, los valores corregidos concuerdan mucho mejor con los esperados comparando el mismo efecto para el benceno monosustituido (efecto α del metilo: +8,9 ppm)¹⁰⁶, que resultan de +8,5 y +8,2 ppm para los carbonos 5 y 6 del indol, respectivamente. En la Tabla 14 se pueden apreciar esquemáticamente estas observaciones.

Durante el presente trabajo de tesis se realizaron y asignaron además los espectros de RMN- ^{13}C de otros nueve compuestos indólicos relacionados con los anteriores, los cuales, con sus desplazamientos químicos, se indican en las Tablas 15 y 16. El análisis de estos espectros permite observar que los δ para los carbonos 5 y 6 permanecen prácticamente constantes para la serie de compuestos 5, 6, 7, 17, 18 y 21 (Tabla 15). Estos pudieron entonces asignarse sin dificultad por compara-

Tabla 14: Efecto del grupo metilo sobre el carbono ipso del indol (efecto α).

	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7
a	10,5	8,8	8,9	6,5	11,2	9,1
b	"	"	"	8,5	8,2	"

a: datos calculados por Roberts¹⁰¹.

b: datos obtenidos en esta tesis.

ción con el indol y la gramina. Las asignaciones de las demás resonancias se basaron en correlaciones de desplazamientos químicos, la comparación con datos conocidos de derivados del indol¹⁰⁴ y el análisis de la intensidad de las señales en espectros con desacople de protón fuera de resonancia.

La diferencia observada en los desplazamientos químicos de los carbonos 5 y 6 de los compuestos 20 y 25 respecto de 18 y 5, avalan las asignaciones de estos carbonos, ya que la presencia del bromo en la posición 6 produce desplazamientos en las resonancias de los carbonos del anillo bencénico muy similares a los observados en el bromobenceno (35)¹⁰⁶. (Tabla 17).

Los otros compuestos que difieren en las resonancias de

Tabla 15: Espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos 5, 6, 7, 17, 18, 20, 21 y 25, ($\text{Cl}_3\text{CD-TMS}$). Desplazamientos químicos expresados en δ .

Comp.	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	Otros
<u>5</u>	124,1	111,9	118,7	119,1	121,5	111,1	127,7	135,9	54,1 (CH_2) 44,9 (CH_3)
<u>6</u>	122,0	116,4	118,2	119,1	121,8	111,5	126,2	136,5	36,9 (CH_2)
<u>7</u>	123,2	113,8	118,6	119,4	121,9	111,5	127,1	136,5	46,7 (CH_2) 36,0 (CH_3)
<u>17</u>	123,2	115,5	118,8	119,5	122,0	111,3	126,4	137,0	56,9 (CH_2)
<u>18</u>	123,9	102,5	120,6	119,5	121,7	110,7	127,5	125,5	-
<u>20</u>	124,6	102,6	121,7	122,8	115,2	113,7	126,5	136,3	-
<u>25</u>	125,0	111,3	119,9	122,5	115,2	114,1	126,5	136,8	53,7 (CH_2) 44,6 (CH_3)
<u>21</u>	129,5	104,6	120,8	119,8	121,3	112,7	131,6	140,1	-0,2 (CH_3)

Tabla 16: Espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos 13, 14 y 29 ($\text{Cl}_3\text{CD}:\text{CD}_3\text{OD}$ 2:1 - TMS). Desplazamientos químicos expresados en δ .

Comp.	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	Otros
<u>13</u>	138,5	119,3	121,7	123,1	124,4	112,5	124,9	138,0	186,5 (CHO)
<u>14</u>	133,2	120,2	121,9	122,2	123,4	112,7	127,4	138,0	169,0 (COOH)
<u>29</u> ^(a)	129,0	115,0	120,9	121,2	123,1	111,8	125,5	137,2	157,7 (CH) 48,2 (CH_3)

(a): en Cl_3CD .

Tabla 17: Efecto de sustituyente del bromo en 6-bromoindol (20), 6-bromogramina (25) y bromobenceno (35)

	C-4 (m)	C-5 (o)	C-6 (ipso)	C-7 (o)	C-9 (m)	C-8 (p)
<u>20</u> ^(a)	+1,1	+3,3	-6,5	+3,0	+0,8	-1,0
<u>25</u> ^(b)	+1,2	+3,4	-6,3	+3,0	+0,9	-1,2
<u>35</u> ^(c)	+1,7	+3,4	-5,5	+3,4	+1,7	-1,6

(a): δ (20) - δ (18) ; (b): δ (25) - δ (5) ; (c): δ (35) - δ (benceno).

los carbonos 5 y 6 respecto del indol, son los indicados en la Tabla 16 (compuestos 13, 14 y 29). Estos compuestos muestran como particularidad la presencia de un átomo de carbono sp^2 como sustituyente en la posición 3 del anillo indólico. Esta peculiaridad parece tener una influencia decisiva sobre las resonancias de ^{13}C de los núcleos del anillo distante, ya que los tres compuestos presentan el mismo modelo de desplazamiento para los carbonos 4, 5, 6 y 7, los cuales resuenan a campos más bajos que los compuestos análogos 7 y 17 con hibridización sp^3 en el sustituyente de C-3, (Tabla 15).

El estudio del espectro de RMN- ^{13}C del indol-3-carboxaldehído (13), resultó de mucha utilidad para la asignación correcta de las resonancias de estos compuestos.

Dado que el espectro de RMN- ^1H de 13 presenta la resonancia del H-4 bien definida a 8,24 ppm y separada de las demás señales¹⁰⁷, se pudo obtener el espectro de RMN- ^{13}C del indol-3-carboxaldehído con desacople selectivo del H-4 y de este modo correlacionar la línea espectral perfectamente definida en el espectro de RMN- ^1H , con la correspondiente al carbono unido a ese hidrógeno (C-4). El espectro obtenido en este experimento, presentaba como singulete la señal a δ 121,7 ppm la cual fue asignada entonces al C-4 del aldehído. Como este resultado no coincidía con los valores informados en literatura¹⁰¹, se decidió estudiar con mayor profundidad el espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 13, para lo cual se sintetizó indol-3-carboxaldehído-6- ^2H . (Capítulo II, página 53).

El espectro de RMN- ^{13}C del indol-3-carboxaldehído-6- ^2H (Figura 26, página 59), permitió asignar la resonancia del C-6 a δ 124,4 ppm, puesto que esta señal era la que desaparecía en el espectro comparado con el obtenido para 13, mientras que la señal a δ 123,1 ppm, que permanecía en el compuesto deuterado, fue asignada al C-5.

La comparación de estos resultados con los datos de literatura¹⁰¹ indicaron que, en este caso, los carbonos 4 y 6

estaban asignados en forma invertida, mientras que la asignación para el C-5 era correcta. En base a los resultados obtenidos con indol-3-carboxaldehído (13), fueron asignados los espectros de RMN-¹³C de los compuestos 14 y 29. De este modo, el estudio exhaustivo de los espectros de RMN-¹³C de los compuestos con que se trabajó en la presente tesis, permitió reasignar las resonancias que estaban equivocadas en indol (18), gramina (5) e indol-3-carboxaldehído (13). El caso del indol es particularmente importante no sólo por el compuesto "per se" sino además, porque su espectro de RMN-¹³C constituye la base para la asignación de los numerosos e importantes productos naturales y/o sintéticos que así, arrastraban el error original.

IV.2. Espectros de RMN-¹H.

La disponibilidad de compuestos indólicos sustituidos en la posición 6 con bromo o deuterio, permitió estudiar los espectros de RMN-¹H de estos compuestos y aplicar las conclusiones obtenidas sobre sus resonancias a los compuestos análogos no sustituidos en C-6.

Los hidrógenos del anillo bencénico del indol constituyen "a grosso modo" un sistema de cuatro spins al cual no se puede aplicar un tratamiento de primer orden, trabajando en equipos de bajo campo magnético. En el caso del espectrómetro Varian XL-100, que fue el utilizado en la presente tesis, las

resonancias de los hidrógenos 5 y 6 se encuentran en una zona de desplazamientos químicos de aproximadamente 30 Hz, en donde resuena además el H-2 (este último no está acoplado a los otros dos), de modo que es extremadamente difícil, si no imposible, asignar las resonancias de los hidrógenos correspondientes sin la ayuda del cálculo matemático y del método iterativo.

Black y Hefferman¹⁰⁸ estudiaron el espectro de RMN-¹H del indol (18) a 100 MHz utilizando como solvente acetona, y obtuvieron los parámetros espectrales utilizando técnicas de doble resonancia y haciendo el análisis iterativo. Sin embargo, los desplazamientos informados en acetona difieren mucho de los observados en otros solventes, ya que, como es conocido¹⁰⁹, el indol forma complejos de asociación consigo mismo y con el solvente, los cuales dependen no sólo del solvente sino también de la concentración. Los mismos autores encontraron que en el espectro del indol en tetracloruro de carbono los hidrógenos aromáticos se solapan, impidiendo su análisis.

La sustitución del hidrógeno en posición 6 por deuterio produce una simplificación notable en el espectro, ya que como el acoplamiento ¹H-²H es muy pequeño (aproximadamente 1 Hz) sólo produce un ensanchamiento de las señales en el espectro protónico pudiendo considerarse al sistema como de tres spins en una primera aproximación. Una simplificación

similar se observa en los 6-bromo derivados. Para la asignación de los espectros de RMN- ^1H de estos compuestos se tomaron en cuenta las constantes de acoplamiento ^1H - ^1H informadas por Black¹⁰⁸, ya que si bien el desplazamiento químico varía considerablemente con el solvente, es razonable pensar que las constantes de acoplamiento no deberían modificarse apreciablemente. Los parámetros obtenidos para todos los compuestos estudiados se encuentran resumidos en la Tabla 18.

De este modo, se analizaron los espectros de 6-bromoindol (20) (Figura 54) e indol-6- ^2H (Figura 17). En ambos se distinguen las resonancias de H-3 (a campos más altos), H-4 (d, $J = 8$ Hz) e H-7; este último en estos compuestos colapsa a singulete. En el caso del 6-bromoindol, debido al efecto del bromo, el H-7 aparece a campos más bajos y se superpone en parte con la rama de campos más bajos del doblete del H-4. Como se indicó más arriba, el acoplamiento con el deuterio provoca un ensanchamiento de las líneas de resonancia de los hidrógenos 4, 5 y 7 en el espectro del indol-6- ^2H . De los datos de literatura¹⁰⁸ para los $J_{2,1}$ y $J_{2,3}$ (2,5 y 3,1 Hz respectivamente) y la posición relativa de los hidrógenos 5 y 2 en el indol, se asignó el H-5 en el indol-6- ^2H a δ 7.11 ppm (d, $J_{5,4} = 8$ Hz) y el H-2 a δ 7,19 ppm, el cual aparece casi como un triplete dada la semejanza de los $J_{2,1}$ y $J_{2,3}$; la rama a campos más altos de la resonancia

Tabla 18: Espectros de RMN-¹H correspondientes a los compuestos 5, 6, 13, 14, 17, 18, 20, 25 y 29. (Cl₃CD-TMS). Desplazamientos químicos expresados en δ.

	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>20</u>	<u>25</u>	<u>29</u>
H-2	7,04 ba	7,12 ba	7,90 s	8,08 ba	7,15 ba	7,19 t J=3Hz	7,17 t J=3Hz	7,04 ba	8,21 dd
H-3					5,56 ba	5,56 ba	6,52 ba		
H-4	7,69 da J=8Hz	7,65 dd J=6 y 3Hz	8,24 dd J=6 y 3Hz	8,17 dd J=6 y 3Hz	7,64 dd J=6 y 3Hz	7,64 dd J=8 y 3 Hz	7,50 d J=8Hz	7,50 d J=8Hz	8,21 dd J=6 y 3Hz
H-5					7,11 t J=8Hz	7,11 t J=8Hz	7,21 dd J=8 y 2Hz	7,21 dd J=8 y 2Hz	
H-6	7,15 ^a		7,29 ^a		7,16 t J=8Hz				
H-7			7,55 ^b	7,52 dt J=6 y 3Hz		7,37 dd J=8 y 2Hz	7,54 ba	7,45 d J=2Hz	
N-H	8,60 ba	8,02 ba			8,14 ba	8,1 ba	8,08 ba	8,82 ba	
Otros	2,31 s CH ₃ 3,65 s CH ₂	1,70 ba MH ₂ 4,07 s CH ₂	9,97 s CHO 10,98 ba COOH	1,64 ba OH 4,89 s CH ₂				2,30 s CH ₃ 3,65 s CH ₂	3,51 s CH ₃ 8,46 sa CH=N

a. Obtenido del espectro de RMN-²F: b. en acetona-d₆ ; en Cl₃CD:CD₃OD (95:5).

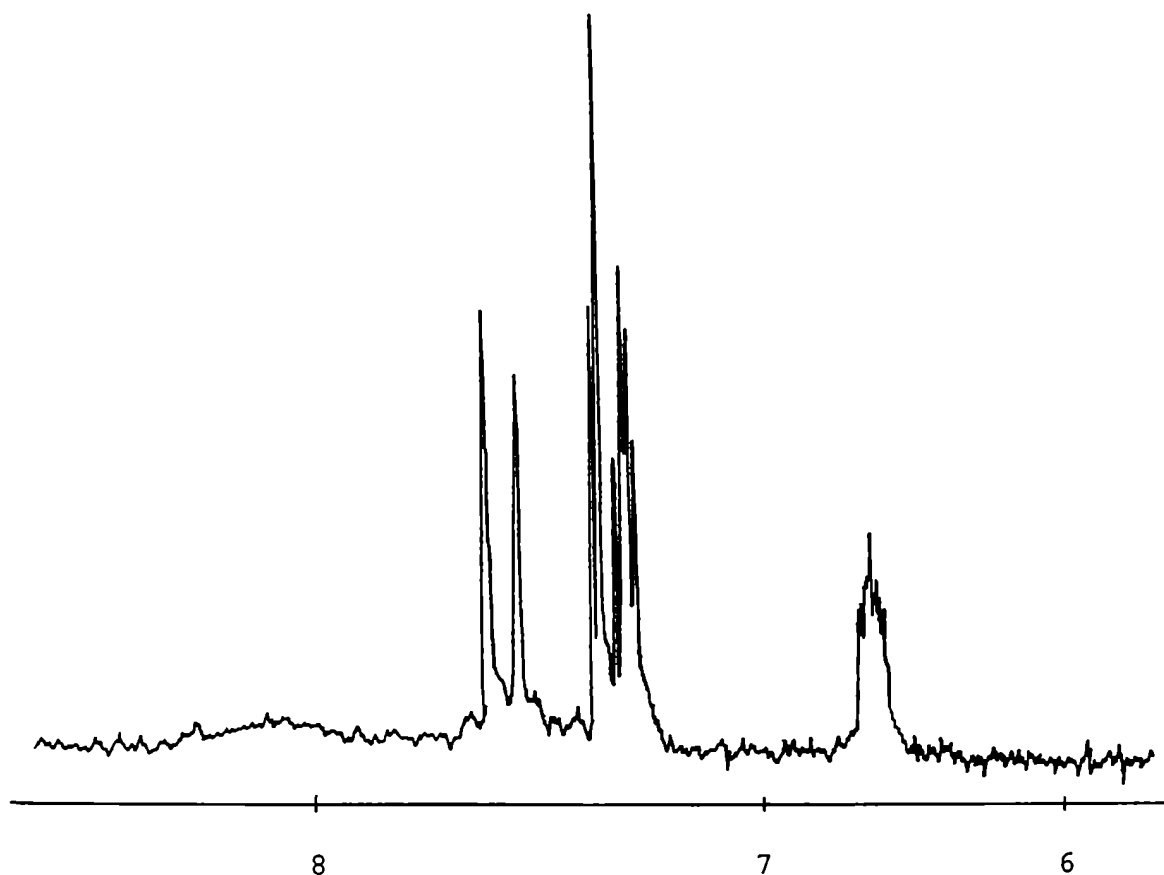


Figura 54: Espectro de RMN- ^1H de 6-bromoindol.

de este hidrógeno está solapada con la de campos más bajos para el H-5.

En el espectro del 6-bromoindol el H-5 aparece a campos más bajos y en este caso se puede observar el acoplamiento meta con el H-7 ($J = 2 \text{ Hz}$), por lo cual el H-5 aparece como un doble doblete ($J_{5,4} = 8 \text{ Hz}$). El efecto del bromo sobre la resonancia del H-5 es menor del esperado (y que se observa para el H-7), apareciendo este hidrógeno a $\delta 7,21 \text{ ppm}$. El H-2, a $\delta 7,17 \text{ ppm}$, aparece otra vez como un triplete ($J = 3 \text{ Hz}$) solapado con las resonancias de campos más altos del H-5.

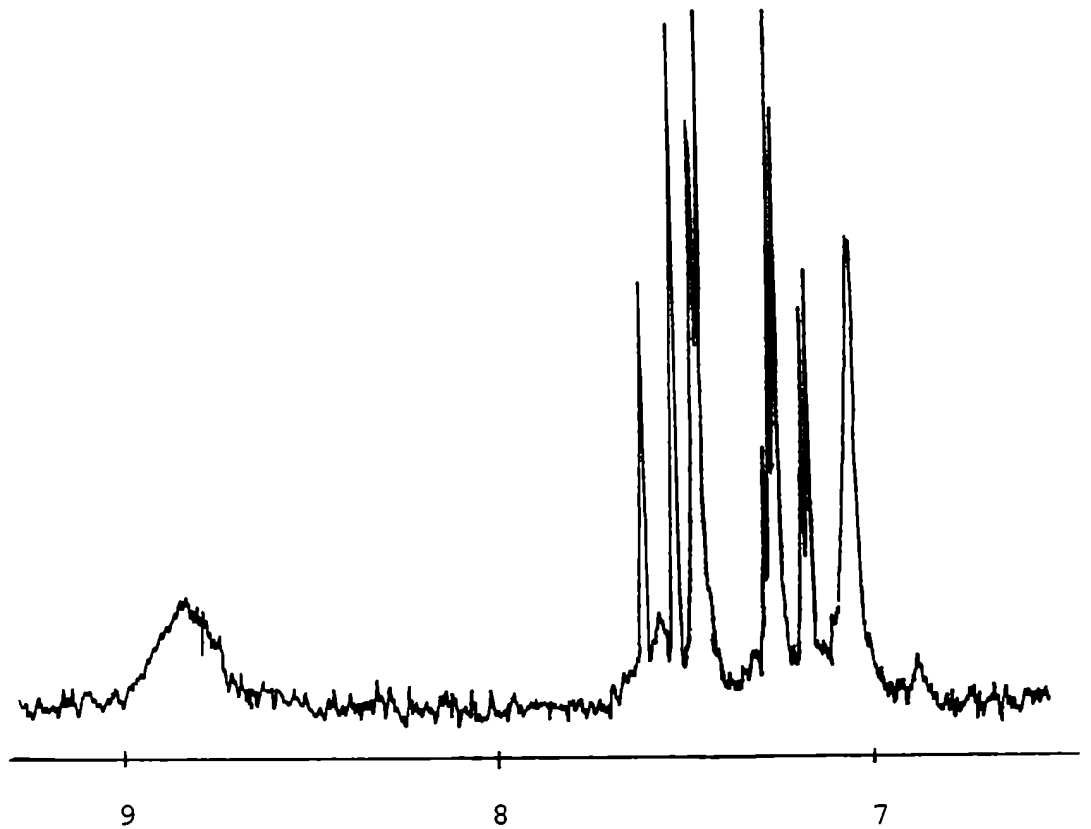


Figura 55: Espectro de RMN-¹H de 6-bromogramina, (campos bajos).

De este modo, se pudieron asignar todas las resonancias de los espectros de RMN-¹H del indol-6-²H y 6-bromoindol. Considerando además que en el espectro de RMN-²H del indol-6-²H pudo asignarse la resonancia del ²H-6 a 7,17 ppm, con estos datos se pudo asignar completamente el espectro de RMN-¹H del indol en cloroformo deuterado.

Para el análisis de los espectros de RMN-¹H de gramina-6-²H y 6-bromogramina (Figuras 21 y 55, respectivamente), se siguió el mismo procedimiento que el discutido más arriba para los correspondientes indoles. Sin embargo, la utilización de

estos valores no permitió asignar completamente las resonancias de los hidrógenos de la gramina, ya que algunas de ellas se encontraban totalmente solapadas. Así, se pudo identificar la resonancia del H-4 a δ 7,69 ppm ya que es el hidrógeno que resuena a campos más bajos (doblete ancho, $J_{4,5} = 8$ Hz). La resonancia del H-6 se determinó por el espectro de RMN- ^2H de la gramina-6- ^2H a δ 7,15 ppm, en una zona totalmente solapada donde además resuenan los otros hidrógenos aromáticos. El H-2 se asignó a δ 7,04 ppm como una banda ancha, por analogía con la resonancia del H-2 de la gramina-6- ^2H y 6-bromogramina. El resto de los hidrógenos aromáticos no pudieron asignarse.

Se analizó también el espectro de RMN- ^1H de indol-3-carboxaldehído-6- ^2H en acetona deuterada (Figura 25); en este solvente las resonancias de los hidrógenos aromáticos se separaron suficientemente de modo que pudieron asignarse todas las señales. Al no estar el H-6 se pudo identificar la señal del H-5, cuya resonancia en el espectro de RMN- ^1H aparece a δ 7,23 ppm (dd, $J_{5,4} = 6$ Hz; $J_{5,7} = 2$ Hz). La resonancia del H-2 se asignó a la señal a δ 8,18 ppm en base al espectro del indol-3-carboxaldehído-2- ^{13}C obtenido a partir de indol-2- ^{13}C (60%- ^{13}C) por un procedimiento análogo al descrito en la página 33, ($J_{^{13}\text{C}-^1\text{H}} = 180$ Hz). La señal del H-6 en el espectro del indol-3-carboxaldehído

en acetona- d_6 se asignó según el espectro de RMN- 2H del compuesto 6-deuterado a δ 7,29 ppm (Figura 24).

El espectro de RMN- 1H del ácido indol-3-carboxílico (14) se asignó comparándolo con el del indol-3-carboxaldehído (13). El aspecto general de estos dos espectros es muy similar, pudiéndose distinguir las resonancias de los hidrógenos 4, 2 y 7 para el ácido en acetona- d_6 a δ 8,17 ppm (dd, $J_{4,5} = 8$ Hz; $J_{4,6} = 4$ Hz); δ 8,08 ppm (ba) y δ 7,52 ppm (dt, $J = 6$ y 3 Hz), respectivamente. Las resonancias de los hidrógenos 5 y 6 aparecen también solapadas a δ 7,15-7,25 ppm.

El espectro del N-metil-3-iminometilindol (29) que presenta como los dos casos anteriores un carbono sp^2 en la posición 3 del indol, se analizó por comparación con aquéllos, pudiéndose asignar sólo el H-4 a δ 8,21 ppm (dd, $J = 6$ y 3 Hz), mientras que los espectros de los compuestos 3-(hidroximetil)-indol (17) y 3-(aminometil)-indol (6) se asignaron por comparación con los espectros de gramina y gramina-6- 2H .

CAPITULO V

Parte Experimental

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

Los espectros de absorción en el ultravioleta (UV) se realizaron en metanol o metanol:ácido clorhídrico (100:1,2) en un espectrofotómetro Beckman DK-2A.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN- ^1H) y de ^{13}C (RMN- ^{13}C) se realizaron a 100 y 25,2 MHz respectivamente en un espectrómetro Varian XL-100-15, operando por pulsos y transformada de Fourier, con una computadora 620/L-100 y una unidad de discos magnéticos Sykes-7000.

Los solventes deuterados utilizados se indican en cada caso. En todas las determinaciones se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto del TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Las señales de RMN- ^1H se indican en cada caso como: s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuarteto), m (multiplete) y ba (banda ancha).

Los espectros de RMN- ^1H se obtuvieron en tubos de 5 mm aplicando pulsos de 90° y un tiempo de repetición de 4,7 segundos sobre un ancho espectral de 1500 Hz. Los espectros de RMN- ^{13}C se midieron en tubos de 12 mm aplicando pulsos de 60° con un tiempo de repetición de 2,2 segundos, o en tubos de 5mm aplicando pulsos de 35° con un tiempo de repetición de 0,75

segundos sobre un ancho espectral de 5400 Hz.

Los espectros de RMN- ^{13}C totalmente desacoplados de ^1H se obtuvieron por irradiación de los protones a una frecuencia central correspondiente a 5 ppm modulada por un barrido de onda cuadrada. Los espectros de RMN- ^{13}C con irradiación selectiva fuera de resonancia (SFORD) se obtuvieron por irradiación de los protones a una frecuencia única correspondiente a 0 ppm. Los espectros con desacople selectivo se obtuvieron de igual forma pero irradiando la señal de ^1H deseada con una frecuencia única de baja potencia (0,5 watt).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^2H (RMN- ^2H) se realizaron a 15,4 MHz en el espectrómetro Varian XL-100-15 utilizando el canal de enclavamiento pulsado ("lock") como canal de observación. Dicho canal fue modificado de modo de controlar la duración de los pulsos y el tiempo de repetición a través de la lógica del canal de observación normal. La señal de absorción resultante (audio) fue procesada a través del canal de observación y dirigida a la computadora del espectrómetro mientras que la señal de dispersión (audio) fue utilizada en forma normal para el enclavamiento campo-frecuencia. Se utilizó 5% de acetona- d_6 para proveer una señal en resonancia de enclavamiento homonuclear de intensidad suficiente. Los espectros se obtuvieron en solución de diclorometano con un ancho espectral de 410 Hz, un tiempo de repetición de 2,666 segundos y pulsos de 1 mseg de duración a la máxima potencia

del transmisor (aproximadamente 2 watt).

Los espectros de masas (EM) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masas Varian-Mat-CH-7A, comandado por una computadora Varian-Mat-Data-System 160 usando un teletipo Tektronix 4010-1 y un impresor Tektronix 4631, por inserción directa de la muestra.

Las cromatografías líquidas de alta resolución (CLAR) analíticas se realizaron en un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1084 con detector de UV operando a 280 nm e inyector automático de volumen variable. Las condiciones utilizadas se indican para cada caso en particular.

Las cromatografías líquidas de alta resolución (CLAR) preparativas se realizaron en un cromatógrafo líquido Meritics equipado con un inyector manual (modelo 730) y detector de índice de refracción.

Las cromatografías en capa delgada (CCD) analíticas se realizaron utilizando como fase fija sílicagel Alugram Nano-SIL G/UV₂₅₄ y Alugram SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel Duren). Las cromatografías en capa delgada (CCD) preparativas se realizaron utilizando como fase fija sílicagel+G (Merk) sobre placas de vidrio. Los reveladores utilizados se describen para cada caso en particular.

Los solventes de desarrollo utilizados en CCD, tanto analítica como preparativa, fueron: 1) cloruro de metileno:

metanol:amoníaco conc. (8:2:0,1), 2) acetona:amoníaco conc. (100:1), 3) n-butanol:ác. acético glacial:agua (8:2:2), 4) butanona:piridina:agua:ác. acético glacial (70:15:15:2), 5) diclorometano:metanol:amoníaco (17%) (4:4:2), 6) diclorometano:metanol (98:2), 7) diclorometano:metanol:amoníaco (25%) (93:7:1), 8) diclorometano:metanol:amoníaco conc. (93:7:0,8), 9) diclorometano, 10) diclorometano:tetracloruro de carbono:metanol (5:4:1), 11) n-butanol:ác. acético glacial:agua (3:1:1), 12) diclorometano:metanol (2:1), 13) diclorometano:metanol:ácido acético glacial (30:2:1) y 14) benceno:hexano (1:1). Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes.

Las cromatografías en columna (CC) se realizaron utilizando como adsorbente sílicagel grado 923, malla 100-200 (Davison Chemical).

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

El Protosol (marca registrada de New England Nuclear)

empleado en la disolución de tejidos vegetales es una solución 0,5 M de una sal de amonio cuaternaria.

El hidróxido de Hyamine (marca registrada de Rohm & Haas) es una solución 1 M de hidróxido de p-(diisobutil)-cresoxietoxietildimetilbencilamonio en metanol.

El paraformaldehido-¹⁴C fue adquirido a The Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra.

El indol-2-¹⁴C fue adquirido al Commissariat a l'Energie Atomique, Francia.

El ácido fórmico-¹³C y el formaldehido-¹³C fueron comprados a Merk, Sharp & Dohme Canada Limited, Montreal, Canadá.

El agua tritiada fue provista por la Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina.

Los solventes fueron purificados por destilación y evaporados a presión reducida a menos de 50°C en Rotavapor-R (Buchi).

Síntesis de indoles
isotópicamente marcados

V.1. Obtención de N-formil-2-aminotolueno-(formilo- ^{13}C) (19).

Una mezcla de 2-aminotolueno (o-toluidina) recientemente destilado (1,31 ml) y ácido fórmico- ^{13}C (90% de ^{13}C) (0,5 ml), se calentó con agitación a 110°C por 3 horas y se dejó luego a temperatura ambiente. Al cabo de 16 horas, la mezcla de reacción se volcó sobre agua (2 ml) y el sólido se separó por filtración y se lavó con solución de ácido clorhídrico 1%. El producto se recristalizó de una mezcla benceno:hexano (1:1), obteniéndose N-formil-2-aminotolueno-(formilo- ^{13}C homogéneo por CCD (solvente 9, sílicagel) (980 mg; Pf = 58-59°C, literatura: 55-58°C⁵⁵; 90% de ^{13}C según se determinó por RMN- ^1H). RMN- ^1H ($\text{Cl}_3\text{CD-TMS}$): δ 2,3 ppm (3H, s, CH_3); δ 7,1-7,3 ppm (4H, m, protones aromáticos); δ 7,5 ppm (1H, ba, NH); δ 8,70 y 8,78 ppm (dos dobletes, $^1\text{J}_{^{13}\text{C}-^1\text{H}} = 160$ Hz, ^{13}CHO).

V.2. Obtención de indol-2- ^{13}C (18- ^{13}C).

Una suspensión de hidruro de sodio (0,6 g) y 2-aminotolueno recientemente destilado (4 ml), fue calentada bajo atmósfera de nitrógeno a 160°C durante 30 minutos. Se agregó formiato de potasio (2 g) y N-formil-2-aminotolueno-(formilo- ^{13}C) (19) (90% de ^{13}C ; 0,450 g) y la mezcla resultante se calentó bajo reflujo a 250°C por 45 minutos. Los gases despedidos (principalmente monóxido de carbono) se recogieron sobre aceite de parafina. La mezcla se dejó enfriar, y el exceso de 2-aminotolueno fue destilado al vacío (1 Torr).

El residuo se suspendió en agua y el indol marcado se obtuvo por destilación por arrastre con vapor y posterior extracción exhaustiva de la capa acuosa con diclorometano. La cromatografía en columna de sílicagel (solvente de desarrollo hexano:benceno, 7:4) rindió indol-2-¹³C puro por CCD (solvente 14), (150 mg; 60% de ¹³C según se determinó por EM y RMN-¹H).

EM (m/z, %): 119 (9); 118 (100); 117 (70); 116 (7); 90 (76);
89 (33); 63 (20).

RMN-¹H (Cl₃CD-TMS): δ 6,5-7,7 ppm (5H, m, H-3, H-4, H-5, H-6 e H-7); δ 7,2 ppm (1H, d, ¹J_{13C-1H} = 184 Hz, H-2); δ 8,1 ppm (1H, ba, NH).

V.3. Obtención de gramina (5).

Procedimiento general.

Indol (58,5 mg), dimetilamina (0,074 ml de una solución acuosa 28% p/v) y ácido acético glacial (0,1 ml), fueron agregados en ese orden a formaldehído (15,4 mg, como una solución acuosa 34% o como paraformaldehído) contenido en el vial de reacción. La mezcla se calentó a 100°C durante 10 minutos con agitación vigorosa y luego se mantuvo a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora.

La mezcla se volcó sobre agua (10 ml), se llevó a pH 9 con solución diluida de hidróxido de sodio y se extrajo exhaustivamente con diclorometano:metanol (4:1). El producto crudo

se obtuvo por evaporación del solvente a presión reducida, y éste fue purificado por cromatografía en columna (CC) de sílicagel utilizando como solventes diclorometano y mezclas de diclorometano:metanol de polaridad creciente.

El producto obtenido era idéntico en comportamiento cromatográfico y espectroscópico a muestras de gramina auténticas.

Gramina- α - ^{13}C .

Indol, dimetilamina y ácido acético glacial fueron agregados como se indica en el procedimiento general a formaldehído- ^{13}C (90% de ^{13}C) (0,1 ml de una solución acuosa 14,6% p/v). La reacción se realizó como se describió arriba; se obtuvo gramina- α - ^{13}C (93% de ^{13}C) (72 mg).

EM: en Tabla 2, página 26.

RMN- ^1H ($\text{Cl}_3\text{CD}:\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1; TMS): δ 2,28 ppm (d, $^3\text{J}_{^{13}\text{C}-^1\text{H}} = 5$ Hz, $^{13}\text{CH}_3\text{-N}$; s, N- $^{12}\text{CH}_3$); δ 3,7 ppm (d, $^1\text{J}_{^{13}\text{C}-^1\text{H}} = 134$ Hz, $^{13}\text{CH}_2$; s, $^{12}\text{CH}_2$); δ 7,3-7,7 ppm (5H, m, protones aromáticos).

RMN- ^{13}C ($\text{Cl}_3\text{CD}:\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1; TMS): δ 53,15 ppm ($^{13}\text{C}-\alpha$).

Gramina-2- ^{13}C .

Indol-2- ^{13}C (60% de ^{13}C) (obtenido en V.2), dimetilamina y ácido acético glacial se agregaron a una solución de formaldehído, siguiendo el procedimiento general. Se obtuvo gramina-2- ^{13}C (60% de ^{13}C), (70 mg).

RMN- ^1H ($\text{Cl}_3\text{CD}:\text{CD}_3\text{OD}$, 9:1): δ 2,28 ppm (3H, s, CH_3); δ 3,78 ppm (d, $^3\text{J}_{^{13}\text{C}-^1\text{H}} = 5$ Hz, $^{13}\text{CH}_2$; s, $^{12}\text{CH}_2$); δ 7,23 ppm

(d, $^1J_{13C-1H} = 178$ Hz, H-2); δ 7,3-7,7 ppm (4H, m, protones aromáticos excepto H-2); δ 8,14 ppm (1H, ba, N-H).

RMN- ^{13}C ($Cl_3CD:CD_3OD$ 9:1; TMS): δ 129,9 ppm (^{13}C -2).

EM: en Tabla 2, página 26.

Gramina- α - ^{14}C .

Siguiendo el procedimiento general pero usando paraformaldehído- ^{14}C (0,5 mCi; 0,673 mCi/mmol), se obtuvo gramina- α - ^{14}C (65 mg; 0,455 mCi/mmol) homogénea por CCD (solvente 1).

Gramina-2- ^{14}C .

Se agregó una solución de indol-2- ^{14}C en pentano (0,5 ml; 0,5 mCi/mmol) a indol (58,5 mg) y el solvente fue evaporado bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregó formaldehído, dimetilamina y ácido acético glacial en ese orden, y la reacción se continuó como se indica en el procedimiento general. Se obtuvo gramina-2- ^{14}C (72 mg; 0,540 mCi/mmol) homogénea por CCD (solvente 1).

V.4. Obtención de indol-6- 2H (18 - 2H).

2-nitro-4-aminotolueno.

4-aminotolueno (3,21 mg) se agregó lentamente a ácido sulfúrico conc. (13 ml) con agitación continua y en baño de hielo-agua, cuidando que la temperatura en el seno de la reacción no superase los 10°C. Se agregó luego lentamente una mezcla de ácido sulfúrico conc. (2 ml) y ácido nítrico conc. (2 ml)

y se dejó 1 hora agitando a 0°C.

La mezcla de reacción se alcalinizó agregando amoníaco conc. hasta pH 8-9 manteniendo siempre la temperatura por debajo de 10°C. El precipitado obtenido se filtró, recristalizó desde etanol y se dejó en desecador al vacío durante una noche. Se obtuvo 2-nitro-4-aminotolueno (3,3 g) homogéneo por CCD (solvente 10), (rendimiento: 73%). Pf = 77-78°C; literatura: 78-79°C¹¹⁰.

2-nitro-4-bromotolueno.

Una suspensión de 2-nitro-4-aminotolueno (1 g) en ácido bromhídrico (1 ml de HBr conc. en 2 ml de agua) se mantuvo a temperatura inferior a 0°C mientras se agregaba lentamente una solución de nitrito de sodio (0,470 g en 0,8 ml de agua). La suspensión resultante se filtró y el filtrado se volcó rápidamente y sin enfriamiento externo sobre una solución de bromuro cuproso recién preparada.

Se dejó agitando unos minutos y posteriormente se calentó durante 30 minutos a 90°C. Se agregó agua (25 ml) y se adaptó un equipo para destilación. El destilado obtenido se extrajo con éter etílico y se lavó primero con solución diluida de hidróxido de sodio, luego con agua y finalmente con solución saturada de cloruro de sodio. La fase etérea se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad a presión reducida.

Se obtuvo 2-nitro-4-bromotolueno (0,85 g), el cual se recristalizó desde etanol y se identificó por EM y RMN-¹H. Pf = 47-48°C (literatura: 47-48°C¹¹⁰).

EM (m/z, %): 215-7 (39, M+); 169-171 (M-NO₂, 28); 90 (M-NO₂-Br, 100); 198-200 (M-OH, 99); 119 (M-OH-Br, 47); 89 (119-NO, 93); 78 (M-CO-Br, 39); 63 (78-CH₃, 73).

RMN-¹H (Cl₃CD-TMS): δ 2,57 (3H, s, CH₃); 7,23 (1H, d, J=8 Hz, H-6); 8,12 (1H, d, J=2 Hz, H-3).

6-bromoindol (20).

Se agregó dietilacetal de dimetilformamida (1,7 ml) a 2-nitro-4-bromotolueno (0,85 g) bajo atmósfera de nitrógeno y se calentó en recipiente cerrado a 114°C durante 24 horas. Se evaporó el exceso de acetal a presión reducida, se agregó etanol absoluto (20 ml) y Ni Raney W-2¹¹¹ y se hidrogenó 24 horas a 1 atm y temperatura ambiente.

La mezcla de reacción se filtró y se evaporó el solvente a sequedad. Se obtuvo 6-bromoindol como producto único por CCD (solvente 14), el cual se purificó por CC (sílicagel, solvente de desarrollo hexano:benceno, 7:4). El producto obtenido (220 g, rendimiento: 30%) fue identificado por EM y RMN de ¹H y de ¹³C.

EM (m/z): 195-197 (M+,90); 116 (M-Br, 100); 89 (M-Br-HCN, 66)
88 (M-Br-H₂CN, 19); 63 (89-C₂H₂, 34); 62 (88-C₂H₂, 25).

RMN-¹H: en Tabla 18, página 174.

RMN-¹³C: en Tabla 16, página 169.

Indol-6-²H (18-²H).

6-bromoindol (20) (24,3 mg) se disolvió en éter etílico (3 ml) y THF (1 ml) en atmósfera de nitrógeno y se enfrió a -78°C en un baño de hielo seco-acetona. Se agregó una solución 1,55 M de n-BuLi en hexano (0.09 ml) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta 0°C y se mantuvo a esa temperatura con agitación durante 30 minutos.

La solución obtenida fue otra vez enfriada a -78°C y se agregó rápidamente t-BuLi en pentano (2,6 M; 0,11 ml); la solución amarillo-verdosa se dejó calentar hasta -30°C y se mantuvo a esa temperatura con agitación durante 1 hora. Se agregó entonces ²H₂O (0,006 ml) y la solución incolora resultante se volcó sobre H₂O y se extrajo con diclorometano.

La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto obtenido mostraba por CCD (fase reversa, solvente metanol:agua 3:1) una cantidad minoritaria de 6-bromoindol que no había reaccionado. Este se separó por CLAR (fase reversa) utilizando una columna Altex Ultrasphere ODS 5 μm (250 x 10 mm) y metanol:agua (9:1) como eluyente. Se obtuvo indol-6-²H (12 mg) puro, según se determinó por CCD y CLAR, el cual fue identificado por EM y RMN de ¹H y de ¹³C.

EM (m/z): 118 (M+, 100); 91 (M-HCN, 27); 90 (M-HCNH, 18).

RMN-¹H (Cl₃CD-TMS): δ 6,55 (1H, ba, H-3), 7,16 (2H, m, H-2 e

H-5, 7,38 (1H, s, H-7), 7,65 (1H, d, J=8 Hz, H-4),
8,08 (1H, ba, N-H).

RMN-¹³C (Cl₃CD-TMS): no presentaba señal δ 121,7 ppm.

V.5. Obtención de gramina-6-²H y gramina-6-³H.

6-bromogramina (25).

6-bromoindol (20) (50 mg) se disolvió en ácido acético glacial (0,1 ml) y se trató con solución acuosa de formaldehído 36% p/v (0,02 ml) y solución acuosa de dimetilamina 28% p/v (0,04 ml). La mezcla de reacción se calentó a 105°C durante 10 minutos; se dejó 1 hora a temperatura ambiente y finalmente se volcó sobre agua. La suspensión resultante se llevó a pH 9 con solución de hidróxido de sodio 2 N y se extrajo con diclorometano:metanol (4:1). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad a presión reducida.

Se obtuvo 6-bromogramina (25), la cual se purificó por CC del mismo modo que se indicó para la gramina (página 187) y se identificó por EM y RMN de ¹H y de ¹³C. Pf = 130-131°C, (61 mg).

EM (m/z, %): 252-254 (M+, 65); 208-210 (M-NMe₂, 100); 129 (208-Br, 66).

RMN-¹H: en Tabla 18, página 174.

RMN-¹³C: en Tabla 16, página 169.

RMN-¹³C (Cl₂CD₂): 0,13 ppm (0-π).

Gramina-6-³H (5-³H).

Gramina-6-²H (5-²H).

Se suspendió 6-bromogramina (25) (48 mg) en éter etílico (3 ml) y THF (1 ml) bajo atmósfera de nitrógeno y se enfrió a -78°C. Se agregó n-BuLi 1,55 M en hexano (0,15 ml) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta 0°C. La solución rojo púrpura resultante se enfrió otra vez a -78°C y se agregó una solución de t-BuLi 2,6 M en pentano (0,18 ml). Se dejó que la temperatura alcance los -30°C y se mantuvo con agitación a esa temperatura durante 1 hora. Se agregó ²H₂O (0,01 ml) y se volcó sobre H₂O. Se extrajo con diclorometano y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro; se evaporó el solvente a presión reducida. Se obtuvo gramina-6-²H (30 mg) idéntica por CCD (solvente 1) a una muestra de gramina auténtica, la cual fue identificada por EM y RMN de ¹H, ²H y ¹³C.

EM (m/z, %): 175 (M+, 28); 131 (M- NMe₂, 100).

RMN-¹H (Cl₃CD-TMS): δ 2,30 (6H, s, NMe₂), 3,65 (2H, s, CH₂-N), 7,04 (1H, ba, H-2), 7,11 (1H, d, J=8 Hz, H-5), 7,30 (1H, s, H-7), 7,69 (1H, d, J=8 Hz, H-4), 8,80 (1H, ba, N-H).

RMN-¹³C (Cl₃CD-TMS): no presentó señal a δ 121,5 ppm.

RMN-²H (Cl₂CH₂): δ 7,15 ppm (6-²H).

Gramina-6-³H (5-³H).

6-bromogramina (25) (48 mg) se hizo reaccionar de la misma forma que se indicó para la obtención de 5-²H, excepto que

la reacción se finalizó agregando $^3\text{H}_2\text{O}$ (30 mCi/ml; 0,008 ml). Se obtuvo gramina-6- ^3H (0,42 mCi/mmol; 29 mg) con propiedades cromatográficas idénticas a las de una muestra auténtica.

V.6. Obtención de indol-3-carboxaldehído-2- ^{14}C (13- ^{14}C).

Indol (70 mg) e indol-2- ^{14}C en solución de pentano (0,5 mCi; 48 mCi/mmol) se disolvieron en hexano: diclorometano (1:1; 5 ml) en un tubo de hemólisis; se evaporó el solvente a temperatura ambiente con corriente de nitrógeno. El indol así obtenido se disolvió en dimetilformamida recientemente destilada (0,4 ml).

A un balón que contenía dimetilformamida fresca (1 ml) se agregó lentamente (aproximadamente 30 minutos) con agitación en atmósfera de nitrógeno y refrigerado mediante un baño de hielo-sal, oxiclóruo de fósforo (0,6 ml). Se formó el complejo de formilación de color rosado.

Se cambió el baño de hielo-sal por otro de hielo-agua (aproximadamente 5°C) y se agregó lentamente (30 minutos) la solución de indol radiactivo en dimetilformamida. Se calentó a 35°C y se mantuvo a esa temperatura durante 1 hora, siempre bajo atmósfera de nitrógeno; se formó una pasta amarilla. Se volvió a enfriar en baño de hielo-agua y se agregó a la mezcla de reacción hielo molido (1 g), con lo cual el color de la solución se tornó rojo cereza. Se agregó secuencialmente agua (0,3 ml), hielo (1 g) y una solución que contenía 2,625 g de

hidróxido de sodio en 7 ml de agua, primero lentamente (hasta que la mezcla de reacción se puso color verde) y luego rápidamente.

Se calentó hasta ebullición y luego se dejó enfriar en el mismo baño de aceite hasta temperatura ambiente. Se dejó toda la noche a 4°C; el precipitado obtenido se filtró y el filtrado se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó el solvente. El sólido se juntó con el obtenido en la filtración y se purificó por CC (sílicagel), eluyendo primero con diclorometano y luego con diclorometano:metanol (98:2).

Se obtuvo indol-3-carboxaldehído-2-¹⁴C (60 mg; 0,145 mCi/mmol), idéntico por CCD (solvente 6) a una muestra auténtica.

Indol-3-carboxaldehído-2-¹³C (13-¹³C).

Indol-2-¹³C (60% de ¹³C, obtenido en V-2; 50 mg) se trató con oxiclóruo de fósforo/dimetilformamida en la misma forma que se indicó para la obtención de 13-¹⁴C, obteniéndose indol-3-carboxaldehído-2-¹³C (43 mg) idéntico a una muestra auténtica por CCD (solvente 6), el cual fue identificado por EM y RMN-¹H.

EM (m/z, %): 147 (M+1, 10); 146 (M, 93); 145 (M-H, 100); 144 (M-H del compuesto sin marcar, 85).

RMN-¹H (acetona-d₆; TMS): δ 8,20 (1H, d, ¹J_{13C-¹H} = 180 Hz, H-2 del producto marcado; s, H-2 del compuesto sin marcar).

Indol-3-carboxaldehído-6-²H (13-²H).

Indol-6-²H (18-²H) (30 mg) se trató con oxiclóruo de fósforo/dimetilformamida en la misma forma que se indicó para la obtención de 13-¹⁴C, obteniéndose indol-3-carboxaldehído-6-²H (25 mg) idéntico a una muestra auténtica por CCD sobre sílicagel (solvente 6) y en fase reversa RP-18 (solvente etanol:agua, 1:1).

El producto crudo se purificó por CC de sílicagel utilizando como solventes de desarrollo diclorometano y diclorometano:metanol (98:2). Se obtuvo indol-3-carboxaldehído-6-²H puro (22 mg) el cual fue caracterizado por RMN de ¹H, ²H y ¹³C y por EM.

EM: en Figura 27, página 60.

RMN-¹H (acetona-d₆): δ 7,23 (1H, dd, J=6 y 2 Hz, H-5), 7,59 (1H, ba, H-7), 8,18 (1H, ba, H-2), 8,24 (1H, dd, J=6 y 3 Hz, H-4), 10,04 (1H, s, CHO).

RMN-²H (Cl₂CH₂): δ 7,29 ppm (6-²H).

RMN-¹³C (Cl₃CD:CD₃OD, 2:1): no se observó señal a δ 124,4 ppm.

V.7. Obtención de ácido indol-3-carboxílico-2-¹⁴C (14-¹⁴C).

Indol-3-carboxaldehído-2-¹⁴C (13-¹⁴C) (0,04 mCi; 0,145 mCi/mmol) (40 mg) se disolvió en etanol (4 ml) a 55°C con agitación; se agregó una solución de hidróxido de potasio 0,25 N (0,5 ml) y luego una solución acuosa de permanganato de potasio (80 mg en 6 ml). La mezcla de reacción se mantuvo

a 55°C durante 10 minutos y se filtró el precipitado de dióxido de manganeso formado; la solución alcohólica se evaporó a sequedad a presión reducida. El producto deseado se obtuvo puro por cromatografía en columna de sílicagel eluyendo primero con cloroformo saturado con amoníaco concentrado (con lo cual se eluyó el indol-3-carboxaldehido-2-¹⁴C que no había reaccionado) y luego con cloroformo.

Se obtuvo ácido indol-3-carboxílico-2-¹⁴C (14-¹⁴C) (0,035 mCi; 0,16 mCi/mmol) (35 mg), idéntico por CCD (sílicagel; solvente 12) a una muestra auténtica.

V.8. Obtención de posibles catabolitos de gramina.

3-(hidroximetil)-indol (17).

Indol-3-carboxaldehído (13) (50 mg) se disolvió con agitación en etanol absoluto (1,5 ml) a temperatura de ebullición; se agregó borohidruro de sodio (30 mg) lentamente y en caliente hasta completa disolución del reactivo y se dejó 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Al cabo de ese tiempo, se evaporó el solvente hasta sequedad con corriente de nitrógeno; se agregó una solución de hidróxido de sodio 0,1 N (0,5 ml) y se extrajo con éter etílico; la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por CC de sílicagel eluyendo con diclorometano y diclorometano:metanol (99:1) sucesivamente. Se obtuvo 3-(hidroximetil)-indol (17)

(45 mg) puro por CCD (sílicagel; solvente 10), Pf = 100-101°C (literatura 96-99°C¹¹²), el cual se identificó por EM y RMN de ¹H y de ¹³C.

EM (m/z, %): 147 (M+, 93); 146 (M-H, 30); 130 (M-OH, 100);
129 (M-H-OH, 34); 103 (130-HCN, 17); 102 (129-HCN, 19); 77 (103-C₂H₂, 22); 51 (77-C₂H₂, 19).

RMN-¹H: en Tabla 18, página 174.

RMN-¹³C: en Tabla 16, página 168.

3-(aminometil)-indol (6).

Indol-3-carboxaldehído (13) (200 mg) se disolvió en la cantidad necesaria de etanol (aproximadamente 20 ml); se agregó clorhidrato de hidroxilamina (0,35 g) y una solución acuosa de carbonato de sodio (0,25 g en 1 ml); la mezcla se calentó con agitación durante 60-90 minutos a 50-60°C; (el tiempo exacto de reacción se determinó por CCD, solvente 7). Una vez completada la reacción, se filtró para separar las sales inorgánicas y el filtrado se extrajo con diclorometano, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se evaporó a presión reducida.

Se obtuvo la mezcla de oximas sin y anti de 13 (240 mg), según se observó por CCD (sílicagel; solvente 7; Rf = 0,4 y 0,5; Rf₁₃ = 0,65).

El producto obtenido se disolvió en metanol (8 ml); se agregó una solución de hidróxido de sodio 1 N (28 ml) y aleación de Devarda (0,8 g), la cual estaba constituida por 50%

de Cu, 45% de Al y 5% de Zn. Se agitó durante 15 minutos; en ese período la temperatura aumentó debido a que la reacción es exotérmica. La mezcla de reacción se filtró y el producto se extrajo con éter etílico; la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a temperatura ambiente. El producto se recristalizó desde benceno.

Se obtuvo 3-(aminometil)-indol (6) (150 mg) homogéneo por CCD (sílicagel, solvente 7), el cual se identificó por EM y RMN de ^1H y de ^{13}C . Pf = 104-106° (literatura: 103-105° C⁶²).

EM (m/z, %): 146 (M+, 93); 130 (M-NH₂, 100); 103 (130-HCN, 13); 77 (103-C₂H₂, 23); 51 (77-C₂H₂, 21).

RMN- ^1H : en Tabla 18, página 174.

RMN- ^{13}C : en Tabla 16, página 168.

3-(metiliminometil)-indol (29).

Una mezcla de indol-3-carboxaldehído (13) (200 mg) y solución acuosa de metilamina 25% p/v (4 ml), se calentó con agitación a 45°C y se dejó luego 4 horas a temperatura ambiente con agitación. El producto se extrajo directamente desde el balón de reacción con benceno; la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo un aceite marrón del cual precipitó el producto dejándolo en desecador al vacío sobre sulfato de calcio durante una noche.

Se obtuvo 3-(metiliminometil)-indol (29) (190 mg) el cual fue caracterizado por EM y RMN de ^1H y de ^{13}C .

EM (m/z, %): 160 (M+, 18); 130 (M-HNCH₃, 100); 103 (130-HCN, 18); 77 (103-C₂H₂, 39); 51 (77-C₂H₂, 9).

RMN- ^1H : en Tabla 18, página 174.

RMN- ^{13}C : en Tabla 17, página 168.

3-(metilaminometil)-indol (7).

Método A: (con aleación de Devarda).

Se ensayó la reducción de 29 con aleación de Devarda del mismo modo que se realizó la reducción de las oximas intermedias en la síntesis de 6 (página 197). No se obtuvo el producto deseado sino una mezcla de indol-3-carboxaldehído (13) y el producto de reducción de éste, 3-(hidroximetil)-indol (17), según se determinó por CCD (solventes 7 y 10).

Método B: (por hidrogenación catalítica).

Se disolvió la imina (29) (180 mg) en metanol (50 ml) y se agregó catalizador de Pd/C (10% de Pd) (15 mg); se hidrogenó 48 horas a 1 atm y temperatura ambiente. Se filtró el catalizador y se evaporó el solvente a temperatura ambiente. Se obtuvo 3-(metilaminometil)-indol (7) homogéneo por CCD (solvente 2) (80 mg), el cual fue caracterizado por RMN- ^{13}C . Pf = 96-102°C (literatura 99-102°C⁶²).

RMN- ^{13}C : en Tabla 16, página 169.

V.9. Ensayos de protección del grupo NH de indol y 6-bromoindol.

Obtención de 1-trimetilsililindol (21).

Indol (117 mg) se disolvió en THF (5 ml) a -20°C ; se agregó una solución 1,6 M de n-BuLi en hexano (0,7 ml) y se llevó hasta temperatura ambiente; se agregó entonces nuevamente solución de n-BuLi (1,6 M; 0,3 ml).

La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se agregó una solución de cloruro de trimetilsililo (0,3 ml) en THF (1 ml). Se dejó toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Se evaporó el solvente, obteniéndose 1-trimetilsililindol (21) homogéneo por CCD (solvente 14) el cual fue caracterizado por RMN- ^{13}C .

RMN- ^{13}C : en Tabla 16, página 168.

Ensayo de obtención de 1-trimetilsilil-6-bromoindol (22).

6-bromoindol (146 mg; 0,8 mmoles) se disolvió en THF (4 ml) en atmósfera de nitrógeno a -10°C ; se agregó una solución de n-BuLi en hexano (1,6 M; 1 ml) y se llevó hasta temperatura ambiente, con agitación. Se enfrió nuevamente hasta -10°C y se agregó una solución de cloruro de trimetilsililo (0,3 ml) en THF (1 ml); se dejó toda la noche a temperatura ambiente con agitación.

El producto se extrajo del medio de reacción agregando agua y luego éter etílico. La fase etérea se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por CC (sílicagel, solvente de desarrollo hexano:benceno, 7:4)

recuperándose el reactivo.

La reacción se repitió trabajando a -78°C determinándose por CCD (solvente 14) que el producto deseado ($R_f=0,8$) se formaba en el seno de la reacción, pero que éste se descomponía a 6-bromoindol (20) ($R_f=0,5$) en la etapa de aislamiento, aún cuando se evaporó directamente el solvente desde el balón de reacción a presión reducida o bajo corriente de nitrógeno.

Reacción de 1-trimetilsilil-6-bromoindol (22) con n-butil-litio.

6-bromoindol (20) (35 mg) se disolvió en éter etílico anhidro (2 ml) en atmósfera de nitrógeno a -78°C , se agregó n-BuLi (1,6 M; 0,5 ml) y se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Se enfrió nuevamente a -78°C y se agregó una solución de cloruro de trimetilsililo (0.150 ml) en éter etílico (0,5 ml) y se dejó que la temperatura llegue a 25°C . Se volvió a enfriar a -78°C y se agregó la solución de n-BuLi (1,6 M; 0,5 ml) y se mantuvo a esa temperatura durante 30 minutos. Se agregó entonces agua destilada (1 ml) y se extrajo con diclorometano. Se secó el solvente sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida. Se obtuvo un producto (20 mg) que fue identificado tentativamente por EM como 2-trimetilsilil-6-bromoindol (23).

EM: en Figura 13, página 42.

Experiencias con plantas
de cebada enteras

V.10. Material vegetal.

Se utilizaron semillas de *Hordeum vulgare* (cebada) de la variedad MAGNIF 102 INTA cosechadas durante 1978 y 1979, para los primeros experimentos, y en 1982 y 1984 para los últimos. Esta variedad de cebada cervecera fue desarrollada por el INTA y proviene del cruzamiento de la variedad nacional MATERIA HEDA con la variedad norteamericana QUINN, realizada en 1954.

Luego de realizadas durante varios años las pruebas de resistencia a enfermedades, pureza varietal, rendimiento y calidad industrial, se decidió inscribir a esta variedad en los registros del Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación, en 1968, con el nombre de MAGNIF 102 INTA¹¹³.

V.11. Germinación de cebada.

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

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

Las semillas se esterilizaron por inmersión en una solución acuosa al 1 % de hipoclorito de calcio durante 40 minutos y se sembraron en arena lavada y calcinada, humedecida con agua destilada. A partir del cuarto día de desarrollo, las plántulas se regaron con una solución salina nutriente cuya composición se indicó en la Tabla 4, página 64¹¹⁴⁻¹¹⁵.

Las plántulas se mantuvieron en bandejas de plástico en arena hasta 3-5 días antes de realizar los experimentos de recolección de $^{14}\text{CO}_2$ en que se pasaban a los frascos correspondientes. Cuando el objetivo del experimento fue aislar intermediarios, éste se realizaba directamente en las bandejas, teniendo previamente la precaución de sacar las plantas que no habían desarrollado bien y las semillas no germinadas, las cuales podían resultar fuentes de contaminación.

V.12. Dosaje de gramina en plantas de cebada en desarrollo.

Se hizo germinar en la cámara de crecimiento en las condiciones anteriormente descritas, aproximadamente 3000 semillas, las cuales se distribuyeron uniformemente sobre una capa de arena calcinada y lavada con agua destilada, (aproximadamente 2 cm de espesor), manteniendo una relación de aproximadamente 1,6 g de arena por semilla.

Para determinar el contenido del alcaloide en las raíces se retiraron 100-200 plantas (según la determinación), a los 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 19 y 26 días de germinación, y para determinarlo en plantas enteras se utilizaron plantas de cebada de 4, 7, 9, 11, 13, 15, 18, 21 y 24 días de germinación (30-40 plantas).

Las plantas o raíces fueron maceradas con metanol: ácido clorhídrico (100:1,2) en mortero, la mezcla de extracción se dejó 24 horas en reposo a 4°C y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida hasta aproximadamente 70 ml y se alcalinizó hasta pH 9 con solución de hidróxido de sodio 0,1 N. La solución alcalina se extrajo exhaustivamente con diclorometano; la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó a sequedad obteniéndose la mezcla cruda de bases nitrogenadas.

El residuo seco se disolvió en 0,5-1 ml de metanol según la determinación y la gramina se separó realizando una CCD bidimensional, utilizando sucesivamente los solventes de cromatografía 1 y 2. En todos los casos se desarrollaron 4 placas de 0,25 mm de espesor y se sembró 100 μ l de la solución del extracto crudo en cada una; para determinar la zona del cromatograma correspondiente a gramina (5), se sembró una quinta placa en condiciones idénticas a las anteriores, la cual se reveló con vapores de yodo.

Para aislar la gramina (5) se separó la sílicagel correspondiente a la zona de desarrollo del alcaloide y se extrajo con metanol:ácido clorhídrico (100:1,2; 2 x 2,5 ml). La solución de gramina obtenida se utilizó para determinar su espectro de absorción ultravioleta en el rango de 320-230 nm, midiendo en todos los casos la absorbancia en el máximo a 276 nm. Como blanco se utilizó una solución obtenida por el mismo procedimiento de extracción, pero de zonas de igual área de la placa donde no se registró la presencia de ningún compuesto.

Las soluciones de gramina para determinar la curva de calibración se prepararon por diluciones adecuadas de una solución patrón que contenía $0,1310 \pm 0,0002$ g de gramina disueltos en 10 ml de metanol; 100 μ l de cada solución se sembraron en placas preparativas en condiciones idénticas a las descritas para la determinación de gramina presente en las plantas. Los valores de concentración de gramina (5) y de absorbancia en el máximo a 276 nm, se detallan en la Figura 30, página 67.

V.13. Determinación de la cinética de absorción de gramina.

Se transfirieron 100 plantas de cebada de 6 días de desarrollo a vasos de precipitados de 50 ml (2 plantas en cada vaso), los cuales contenían cada uno 10 g de arena calcinada y lavada, manteniéndolos siempre dentro de la cámara de cre-

cimiento.

En el momento adecuado (11 o 14 días de desarrollo), se agregó (cuidando de no tocar los tallos de las pántulas) una solución de gramina- α - ^{14}C ($5,8 \times 10^6$ dpm/mg; 33,6 μg) en la mínima cantidad de metanol (8 μl) y llevada a volumen (10 ml) en un matraz, con agua destilada. Para determinar la recuperación de la gramina desde la arena a diferentes tiempos, se utilizaron 3 vasos conteniendo sólo arena (10 g) y gramina- α - ^{14}C (33,6 μg), los cuales se utilizaron como control.

En el momento adecuado, las plantas fueron removidas y la arena se extrajo con metanol:ácido clorhídrico (100:1,2). Los extractos fueron concentrados a presión reducida, se diluyeron con agua, se ajustó el pH a 9 con una solución de hidróxido de sodio 10% p/v y se extrajeron repetidamente con diclorometano:metanol (4:1). El residuo obtenido en cada caso se mezcló con gramina fría (1 mg) se disolvió en metanol (0,1 ml) y se purificó por CCD preparativa (sílicagel; solvente 1).

La zona del cromatograma correspondiente a gramina, se extrajo con metanol:ácido clorhídrico y se determinó la radiactividad en una alícuota de la solución de gramina obtenida.

V.14. Obtención de las curvas de degradación de C- α y C-2 de graminina a CO₂

Plantas de cebada de 6 días de desarrollo, fueron transplantadas a un recipiente de vidrio con tapa hermética con dos conductos que permitían respectivamente la entrada y la salida de aire. En todos los casos, se utilizaron 50 plantas y 250 g de arena. La graminina- α -¹⁴C o graminina-2-¹⁴C se disolvió en metanol y agua, como se indicó en la página 207.

La solución de graminina se suministró a las plantas por medio de una jeringa y un tubo delgado de plástico que se introdujo por el conducto de entrada de aire hasta la arena en que estaban sembradas las plantas. De esta misma forma se regaron las plantas una vez por día con solución salina de riego. El orificio de entrada de aire se conectó a un bombeador de diafragma (500 ml/min.) y el tubo de salida se conectó a cuatro trampas para dióxido de carbono en serie, cada una de las cuales contenía una solución saturada de hidróxido de bario, recientemente preparada.

La cantidad exacta de radiactividad suministrada se determinó en cada caso midiendo una alícuota de 50 μ l de la solución de graminina-¹⁴C que se utilizaba en la experiencia.

Las soluciones de hidróxido de bario se cambiaron a intervalos de tiempo adecuado y el carbonato de bario formado se filtró y se secó en desecador al vacío durante 24 horas. Alícuotas del carbonato de bario obtenido en cada determina-

ción (3-6 mg) se suspendieron en 1 ml de agua y 14 ml de solución centelleadora de dioxano (por exposición a ultrasonido) y se agregó gelificante Cab-O-Sil (Cabot Inc) (200 mg), para evitar la decantación del sólido. La radiactividad se determinó directamente sobre las suspensiones, obteniéndose de este modo una eficiencia del 78%, según se determinó con muestras standard de $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$ procesadas en condiciones idénticas.

V.15. Degradación de gramina-2- ^{14}C por plantas de *H. vulgare*.
Inoculación de gramina-2- ^{14}C .

Plántulas de cebada de 11 días de desarrollo (230) crecidas sobre arena en bandejas de plástico, fueron inoculadas con una solución de gramina-2- ^{14}C ($5,2 \times 10^6$ dpm/mg) (5,17 mg) en agua (10 ml); (la cantidad exacta de radiactividad se determinó en una alícuota de la solución).

Recuperación de gramina-2- ^{14}C no absorbida.

Las plantas se retiraron al cabo de 7 días, mojando la arena con agua destilada y con ayuda de una espátula para evitar la ruptura de las raíces. Estas fueron lavadas también con agua directamente sobre las bandejas. La arena se extrajo con metanol:ácido clorhídrico (100:1,2) y este extracto se juntó con el agua remanente en la arena y la agregada durante la separación de las plantas. Se evaporó a sequedad y se procesó como se indicó en la página 206 para el análisis de la gramina presente en la arena.

Extracción del material vegetal.

El material vegetal, sin secar, fue separado en raíces y parte aérea y ambas fracciones fueron disgregadas en un mortero con ayuda de arena lavada y extraídas en Soxhlet con metanol, renovando el solvente cada 24 horas; se controló la finalización de la extracción por medición de la radiactividad extraída. Los extractos se lavaron con hexano hasta no más decoloración de la fase metanólica; el metanol se evaporó a presión reducida y se guardó hasta su uso a 4°C en oscuridad y atmósfera de nitrógeno.

El material vegetal no extraíble con metanol se extrajo con agua en forma similar, y los extractos acuosos se liofilizaron y guardaron hasta su uso en oscuridad, a 4°C. En todos los casos, se determinó la radiactividad sobre alícuotas de los extractos, y la extracción se finalizó cuando la radiactividad encontrada era despreciable respecto a la del extracto anterior.

Disgregación del material vegetal insoluble.

Alícuotas del material vegetal de raíces (10 mg) y tallos (13 mg) no extraíbles con metanol ni agua se trataron con protosol (1 ml) durante 3 horas a 50°C, con agitación ocasional; se agregaron 15 ml de solución centelleadora de tolueno y se guardó en oscuridad a 4°C durante 2 días (para evitar la fotoluminiscencia) antes de medir la radiactividad.

Aislamiento del triptofano de proteínas.

El material vegetal insoluble en metanol y agua fue liofilizado; el residuo obtenido de raíces y tallos, separadamente (0,15 g) se trató con hidróxido de bario hidratado (1,87 g) y agua destilada (21 ml) y se calentó en un tubo cerrado a 125°C durante 24 horas. La suspensión resultante se llevó a pH 5-6 con ácido sulfúrico 2 N y se separó el precipitado de sulfato de bario por centrifugación. El sobrenadante se liofilizó durante 24 horas, obteniéndose un precipitado blanco que contenía los aminoácidos (aproximadamente 20 mg).

El extracto de aminoácidos se disolvió en agua alcalinizada con amoníaco (0,3 ml) y se sembró en cada caso una alícuota (0,1 ml) para la separación por CCD preparativa (solvente 3). Otra alícuota (0,1 ml) se utilizó para los ensayos de radiactividad. El cromatograma obtenido se separó en tres zonas: la que contenía triptofano (R_f 0,8), la parte superior y la parte inferior.

Los aminoácidos presentes en la sílica se eluyeron con agua (3 x 2 ml), la solución se liofilizó y se determinó la radiactividad.

Antes de realizar la CCD preparativa, se ensayaron para la separación de aminoácidos los solventes 4 y 5, los cuales no fueron utilizados posteriormente.

Procesamiento de los extractos.

Los extractos metanólicos de raíces y tallos se cromato-

grafiaron separadamente en columna de sílicagel, eluyendo con diclorometano y mezclas de diclorometano:metanol de polaridad creciente. Los eluatos se analizaron por CCD (solventes 1, 6, 8 y 10) y las fracciones que contenían las mismas sustancias se juntaron y ensayaron por radiactividad.

V.16. Experiencias con gramina- α -¹³C.

Experiencia control.

Plantas de cebada de 11 días de desarrollo (410) distribuidas en bandejas de plástico (360) y en el frasco descrito en V.14 para la determinación del ¹⁴CO₂ expelido por las mismas (50), fueron inoculadas con una solución que contenía gramina- α -¹⁴C (5,8 x 10⁶ dpm/mg; 1,5 mg) y gramina fría (6,5 mg) en la cantidad mínima de metanol y solución salina de riego (25 ml). Con las plantas colocadas en el frasco se determinó la radiactividad evolucionada en el CO₂ expelido en la misma forma que se describió en V.14.

Después de 40 horas las plantas se cosecharon en la forma habitual, se cortaron en pequeños trozos y se extrajeron con metanol a 10°C en atmósfera de nitrógeno, utilizando una licuadora y centrifugando después de cada extracción a 0°C, hasta que las fracciones obtenidas presentaban un valor de radiactividad despreciable. Los extractos metanólicos se juntaron, evaporaron a presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 50 ml y se lavaron con hexano hasta no más

decoloración. Se determinó la radiactividad en cada extracto; el metanol fue evaporado a presión reducida y el residuo sólido se guardó en oscuridad y atmósfera de nitrógeno a 4°C.

El material vegetal insoluble en metanol, se extrajo en forma similar con agua y el agua se eliminó por liofilización. La arena y el agua de riego remanente se procesaron en la forma habitual, descripta en V.13.

El extracto metanólico se disolvió en $\text{Cl}_3\text{CD}:\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1) (4 ml) y se determinó el espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$; el insoluble se disolvió en agua (3 ml) (con ayuda de ultrasonido) y se juntó con el extracto acuoso obtenido desde las plantas; se agregó D_2O (1 ml), se volvió a aplicar ultrasonido para completar la disolución y se determinó el espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de esa fracción. Se tomó una alícuota (50 μl) de cada extracto para ensayar la radiactividad. (Los espectros obtenidos se utilizaron como blancos para su comparación con los obtenidos con $\text{gramina-}\alpha\text{-}^{13}\text{C}$).

El extracto $\text{Cl}_3\text{CD}:\text{CD}_3\text{OD}$ sobre el que se determinó el espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ se evaporó a sequedad a presión reducida; se agregó metanol (50 ml) y se dejó una noche a -10°C. El precipitado se descartó y el filtrado se concentró al vacío, se llevó a 10 ml con metanol y se extrajo dos veces con benceno (30 y 15 ml). Los extractos combinados se evaporaron a sequedad y el residuo se extrajo con benceno:metanol (20:1)

(5 x 0,5 ml).

La muestra prepurificada obtenida se concentró hasta 0,5-1 ml y se cromatografió en una columna de sílica gel eluyendo con benceno:metanol (20:1) (30 ml), (fracción I); luego con benceno:metanol (15:1) (30 ml), (fracción II), y finalmente con éter etílico:metanol:agua (30:10:1) (35 ml) (fracción III)⁸⁴. Se tomaron alícuotas de cada fracción para determinar radiactividad.

El extracto metanólico no extraíble con benceno se evaporó a sequedad, se disolvió en n-butanol (5 ml) y se extrajo con agua saturada con n-butanol (10 ml); se tomó una alícuota de cada fracción para ensayar radiactividad.

Los extractos se evaporaron a sequedad a presión reducida. El residuo de la fase butanólica se cromatografió en columna de sílicagel en la forma descrita en la página 210 para la purificación de gramina (5).

El extracto acuoso se tomó con 1 ml de agua y se sembraron tres placas de CCD (0,25 mm) (solvente 11) (0,1 ml en cada una) con testigos de aminoácidos (arginina, glicina, ácido aspártico y triptofano) y azúcares (glucosa y rafinosa); una de las cromatoplasmas se dejó que impresionara un papel fotográfico (165-1454-X-OMAT XAR-5 Film, 8" x 10", Kodak) durante 7 días, a temperatura de 4°C. Las otras dos placas se utilizaron con fines de identificación; fueron reveladas con ninhidrina y con anisaldehído/sulfúrico

respectivamente.

Experiencia con gramina- α -¹³C.

Plantas de 11 días de desarrollo (380) distribuidas en bandejas de plástico, fueron inoculadas con una solución que contenía gramina- α -¹³C (8 mg) en la cantidad mínima de metanol y solución salina de riego (25 ml). Las mismas fueron procesadas en la forma que se describió para la experiencia control (página 211) para la determinación de los espectros de RMN-¹³C de los extractos de Cl₃CD:CD₃OD y H₂O:D₂O.

V.17. Experiencias de competencia y captura.

Para la realización de estas experiencias se procedió en forma similar a la determinación de la radiactividad en el CO₂ expelido por las plantas a partir de la administración de gramina radiactiva (sección V.14).

Los compuestos 3-(hidroximetil)-indol (17), indol-3-carboxaldehído (13) y ácido indol-3-carboxílico (14) (1 mg de cada uno) se disolvieron en la mínima cantidad de metanol y agua (4 ml) conteniendo Tween 20. Las soluciones de estos compuestos se agregaron en la misma forma que la solución de gramina- α -¹⁴C, 48 horas después del agregado del trazador. Los compuestos L-triptofano (11), formiato de sodio y ácido N-formilantranfílico (32) se agregaron disueltos en agua (1 mg en 4 ml, cada vez), a las 54 horas (11) o a

las 80 horas (32 y formiato) de haberles suministrado a las plantas gramina-2-¹⁴C.

En la experiencia en que se recuperó indol-3-carboxaldehido (13) desde las plantas, éstas se extrajeron con metanol y la fase metanólica se procesó como se indicó en V.16 (página 212). Cada fracción de la columna cromatográfica (indicadas con los números I, II y III en la página 213) se ensayó por radiactividad. Se agregó indol-3-carboxaldehido frío a la fracción I (20 mg) se evaporó el solvente a sequedad a presión reducida y el residuo obtenido (fundamentalmente 13) se recristalizó desde etanol hasta actividad constante (5600 dpm/mg).

Al finalizar la experiencia en que se ensayó el ácido N-formilantranílico (32), las plantas se extrajeron con metanol, se agregó el compuesto 32 frío (20 mg), se evaporó el solvente a presión reducida y el residuo (fundamentalmente 32) se recristalizó tres veces desde agua. El producto obtenido presentó una actividad de 1450 dpm/mg.

V.18. Experiencias con indol-3-carboxaldehido-2-¹⁴C y ácido indol-3-carboxílico-2-¹⁴C.

Determinación de la velocidad de degradación del C-2 de indol-3-carboxaldehido (13) y ácido indol-3-carboxílico (14) a CO₂.

La determinación de la curva de evolución de ¹⁴CO₂ a partir de indol-3-carboxaldehido-2-¹⁴C o ácido indol-3-carboxíl

lico-2-¹⁴C, se realizaron en la misma forma que las descritas para gramina-¹⁴C (página 207). En todos los casos se utilizaron plantas de cebada de 14 días de desarrollo (50), y el aldehído (13) (1 mg; $1,7 \times 10^6$ dpm/mg) o el ácido (14) (1 mg; $2,1 \times 10^6$ dpm/mg) se suministraron disueltos en la cantidad mínima de metanol y agua (1 ml) conteniendo Tween 20. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 48, página 126.

Extracción del material vegetal y la arena.

Al finalizar las experiencias anteriores, las plantas fueron separadas en raíces y parte aérea, y extraídas separadamente con metanol en una licuadora, bajo atmósfera de nitrógeno. El extracto metanólico se lavó con hexano. La arena se extrajo con metanol y el extracto obtenido se juntó con el agua de riego remanente. Se tomaron alícuotas de cada fracción para los ensayos de radiactividad (Tablas 8 y 10, páginas 116 y 126, respectivamente).

Los extractos se concentraron a presión reducida hasta un volumen de 3-5 ml y se tomaron alícuotas para realizar CCD (sílicagel; solventes 1 y 10). Las diferentes zonas del cromatograma donde se detectaron sustancias (reveladas al UV

254 nm, y/o con reactivo de Ehrlich) fueron cortadas y eluidas con metanol, determinándose la radiactividad. Las zonas de los cromatogramas correspondientes a gramina (5), indol-

3-carboxaldehído (13) y ácido indol-3-carboxílico (14) se determinaron por comparación con muestras auténticas. La radiactividad presente en cada uno de estos compuestos se indica en la Tabla 8, página 116.

Aislamiento e identificación de gramina y ácido indol-3-carboxílico a partir de indol-3-carboxaldehído-2-¹⁴C.

Se utilizaron 800 plantas de cebada de 14 días de desarrollo, 50 de las cuales se colocaron en un frasco adecuado para la determinación del ¹⁴CO₂ expelido, (página 207). Se suministró una solución que contenía indol-3-carboxaldehído-2-¹⁴C (5,5 mg; 1,7 x 10⁶ dpm/mg) e indol-3-carboxaldehído (15 mg) en la mínima cantidad de metanol y agua (10 ml).

A las 78 horas de administrar el trazador las plantas se procesaron como se indicó en la página 217. El extracto metanólico obtenido se procesó siguiendo el procedimiento de Magnus⁸⁴ descrito en la página 213, y el extracto metanólico remanente se cromatografió en columna de sílicagel utilizando como solventes diclorometano y mezclas de diclorometano:metanol de polaridad creciente. Los eluatos obtenidos en las dos CC se ensayaron por radiactividad; alícuotas de los mismos se cromatografiaron en CCD (sílicagel; solventes 1 y 10) y las cromatoplasas se revelaron por exposición a la luz UV (254 nm) y/o con el reactivo de Ehrlich,

contra testigos de gramina (5), indol-3-carboxaldehido (13) y ácido indol-3-carboxílico (14) auténticos.

Las fracciones que contenían estos compuestos fueron evaporadas a sequedad, tomadas con metanol (0,5 ml) y analizadas por CLAR preparativa (columna Alltech R-Sil 18 HL 10 μ m, 500 x 10 mm DI; 1 ml/min.; solvente agua:etanol:ácido acético glacial, 79:20:1; tr₅: 4,5 min., tr₁₃:20,4 min., tr₁₄:12 min.). Las fracciones obtenidas en CLAR cuyos tiempos de retención (tr) coincidían con los de los compuestos 5, 13 y 14, se evaporaron a presión reducida, liofilizaron y analizaron por espectrometría de masas. Los EM obtenidos eran coincidentes con los de gramina (5), indol-3-carboxaldehido (13) y ácido indol-3-carboxílico.

La radiactividad presente en cada una de estas sustancias fue de: gramina: 140250 dpm (tallos); indol-3-carboxaldehido: 74800 dpm (tallos) y 383350 dpm (raíces) y ácido indol-3-carboxílico: 785400 dpm (raíces). Las incorporaciones absolutas en cada uno de los compuestos aislados se resumen en la Tabla 9, página 122.

V.19. Experiencias con tallos de cebada.

Determinación de la velocidad de absorción.

Plantas de cebada de 14 días de desarrollo (200) se retiraron desde la arena en que crecieron, se cortaron las semillas

con la raíz, y los tallos se colocaron en un cristizador de 500 ml, el cual contenía una solución de gramina-2-¹⁴C (5,2 x 10⁶ dpm/mg; 3,9 mg) en buffer fosfato 0,5 M, pH 6,8 (80 ml), sorbato de potasio (0,3% p/v), ampicilina (100 unidades por ml) y mercaptoetanol (10 mM), de modo que sólo la base de los tallos quedaba dentro de la solución tamponizada.

Se tomaron alícuotas (100 µl) del buffer al momento de colocar los tallos (tiempo 0), a las 21, 39, 54 y 71 horas.

Extracción de los tallos.

Ensayos con material inactivo.

Plantas de cebada de 14 días de desarrollo (300) se procesaron como se indicó más arriba; el buffer contenía gramina (6 mg). A las 40 horas, los tallos se cortaron en trozos y se extrajeron con metanol en una licuadora (5 x 20 ml). El extracto metanólico se evaporó a sequedad a presión reducida, se tomó con metanol (2 ml) y se cromatografió en una columna de Sephadex LH 20 (solvente: metanol), recogiendo fracciones de 2 ml cada vez (volumen muerto: 10 ml).

A partir de la quinta fracción comenzaron a eluir productos coloreados; a partir de la fracción 14 comenzó a eluir gramina (5) como único compuesto indólico hasta la fracción 18; entre las fracciones 19 y 23 eluían juntos gramina y triptofano (11) y a partir de la 24 hasta la 28, eluía sólo triptofano como compuesto indólico (según se determinaba revelando las CCD obtenidas desde las fracciones, solvente 12, con

el reactivo de Ehrlich). Las mezclas obtenidas en las fracciones 19 a 23 se separaron por sucesivos pasajes a través de la columna de Sephadex LH 20.

Procesamiento del material radiactivo.

Se utilizaron plantas de cebada de 14 días de desarrollo (700) y una solución tamponizada que contenía gramina- $2-^{14}\text{C}$ ($5,2 \times 10^6$ dpm/mg; 3,3 mg) y gramina fría (11 mg), en las mismas condiciones que las descritas para la determinación de la velocidad de absorción del alcaloide (página 218). Al cabo de 40 horas, los tallos fueron extraídos con metanol, el extracto metanólico se lavó con hexano (la fase de hexano resultó inactiva) y se procesó en la misma forma que se indicó para el ensayo con material inactivo.

Las fracciones obtenidas se analizaron por CCD (sílica-gel; solventes 1, 10 y 12) y se revelaron por exposición a la luz UV (254 nm), con vapores de iodo o con el reactivo de Ehrlich; las fracciones radiactivas que resultaron idénticas por CCD se juntaron. Las fracciones que contenían gramina (5) (10000 dpm; 120 μl) y las que contenían triptofano (11) (5000 dpm; 120 μl), se sembraron en una cromatoplaaca (sílicagel, 10 x 10 cm; solvente 12) junto a testigos de gramina- $2-^{14}\text{C}$ (10000 dpm) diluida con gramina fría y triptofano ($Rf_{\text{gra}}=0,2$; $Rf_{\text{tri}}=0,7$); el cromatograma obtenido se adhirió a una placa fotográfica y se dejó impresionar durante 5 días, al cabo de los

cuales se reveló el papel fotográfico (165-1454-X-OMAT XAR-5 Film, 8" x 10", Kodak).

El extracto metanólico que contenía gramina (5) se evaporó a sequedad a presión reducida y se purificó por CC, como se indicó en la sección V.15, página 210. La fracción de elución correspondiente a gramina ($5,8 \times 10^6$ dpm) fue analizada por CCD (sílicagel; solvente 1) , CLAR y EM, en las mismas condiciones que se describieron en la sección V.18 (página 218)

V.20. Experiencias con gramina marcada en el anillo bencénico.

Experiencia piloto con gramina-6-³H.

Plantas de cebada de 11 días de desarrollo (130) colocadas en un cristizador de 1000 ml en arena lavada y calcinada, fueron suplementadas con una solución que contenía gramina-6-³H ($5,4 \times 10^6$ dpm/mg; 2,2 mg) en la mínima cantidad de metanol y agua (10 ml), en la misma forma que se indicó en V.13 (página 206).

Al cabo de 7 días las plantas se cosecharon, se separaron en raíces y parte aérea, y las fracciones se extrajeron separadamente con metanol (primero en frío, en un mortero, y posteriormente a temperatura de ebullición en un extractor Soxhlet). El solvente se cambió cada 24 horas y en las frac-

ciones obtenidas se determinó radiactividad; la extracción se finalizó cuando la fracción obtenida contenía radiactividad despreciable frente a la inmediata anterior. La arena se extrajo sucesivamente con metanol y metanol:ácido clorhídrico (100:1,2); los extractos obtenidos y el agua de riego remanente al finalizar la experiencia se ensayaron por radiactividad.

Una fracción del extracto metanol:ácido clorhídrico se neutralizó con bicarbonato de sodio y se analizó por CCD (sílicagel) realizando dos desarrollos sucesivos con los solventes 13 y 1. El cromatograma obtenido se reveló por exposición a la luz UV (254 nm); las zonas correspondientes a gramina (5) y ácido antranílico (30) se cortaron y desorbieron desde la sílica con metanol; los extractos obtenidos se ensayaron por radiactividad.

Los extractos metanólicos de tallos y raíces, se lavaron separadamente con hexano hasta no más decoloración, y los extractos obtenidos se ensayaron por radiactividad.

Los extractos metanólicos se concentraron a presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 5 ml; alícuotas de los mismos se cromatografiaron en la forma indicada anteriormente para el extracto proveniente de la arena, excepto que se cortó el cromatograma desde la zona de desarrollo del ácido antranílico (30) ($R_f=0,7$) después del desarrollo en el solvente 13.

Los extractos provenientes de la arena y el agua de riego remanente, se juntaron, se agregó gramina fría (30 mg), se ajustó a pH 9 con solución de hidróxido de sodio 0,1 N y se extrajo con diclorometano. La fase de diclorometano se procesó en la forma indicada en V.13 para la recuperación de la gramina desde la arena.

El extracto metanólico acuoso se llevó a pH 5 con ácido clorhídrico diluido y se extrajo nuevamente con diclorometano; se tomaron alícuotas de cada extracto para ensayar radiactividad. Una fracción del extracto acuoso resultante se llevó a pH 7 con bicarbonato de sodio y se liofilizó recogiendo el agua de liofilización en un balón, a -20°C . El agua obtenida se ensayó por radiactividad.

Los resultados obtenidos se indican en la Figura 49, página 138.

Hidrólisis ácida del extracto de raíces.

Una alícuota del extracto metanólico de raíces (0,2 ml) y ácido clorhídrico concentrado (0.02 ml) se calentó 3 horas a 70°C en tubo cerrado. El líquido obtenido se ajustó a pH 5 con bicarbonato de sodio y se separó por CCD de la misma forma que se indicó anteriormente para los extractos metanólicos de tallos y raíces (página 222). Se cortó el cromatograma en diferentes zonas, se desorbieron las sustancias desde la sílicagel con metanol y se ensayaron por radiactividad. Los resultados se resumen en la Figura 49.

Análisis del material vegetal insoluble.

Determinación de la radiactividad en los extractos.

El material vegetal no extraíble con metanol proveniente de raíces (25 mg) o de tallos (23 mg) se trató con hidróxido de hyamine (1 ml) y se dejó durante 3 horas a 60°C, con agitación ocasional. Se agregó solución centelleadora de tolueno (14 ml), se guardó durante 2 días a 4°C en oscuridad y se midió la radiactividad. (Figura 49, página 138).

Hidrólisis alcalina.

Material vegetal insoluble de raíces o tallos (0,15 g) se procesaron como se indicó en V.15 para el aislamiento de triptofano (11). Una alícuota del producto de hidrólisis crudo se ensayó por radiactividad. (Figura 49).

Aislamiento de la lignina de raíces.

Material vegetal insoluble de raíces (0,8 g) y solución de hidróxido de sodio 0,5 N (20 ml), se calentaron durante 12 horas con agitación a 80°C. Al cabo de ese tiempo la mezcla se filtró y el residuo insoluble se lavó con agua. Este tratamiento se repitió dos veces más sobre el residuo insoluble. La solución básica proveniente de estos tratamientos se concentró hasta unos 15 ml y luego se acidificó con ácido sulfúrico 5 N. El precipitado de color pardo producido fue separado por centrifugación y posteriormente lavado tres veces con agua. Este precipitado se disolvió en la mínima cantidad de hidróxido de sodio 1,25 N (aproximadamente 4 ml) y

se agregaron etanol (16 ml) y ácido sulfúrico 5 N hasta ligera acidez.

La suspensión producida se separó por centrifugación y a la solución límpida, de color pardo, resultante, se eliminó la mayor parte del etanol por evaporación. En este punto precipitó la lignina, la cual fue separada por centrifugación y posteriormente purificada por redisolución en hidróxido de sodio 1,25 N y precipitada por adición de ácido sulfúrico 5 N hasta ligera acidez. Esta suspensión se calentó a ebullición con lo que la lignina coaguló y fue más fácil de separar por centrifugación. Se obtuvo lignina (87 mg) la cual fue disuelta en hidróxido de hyamine (1 ml) para determinar radiactividad, como se indicó anteriormente para la determinación de la radiactividad en el material vegetal no extraíble con metanol. Los resultados obtenidos se indican en la Figura 49, página 138).

Experiencia con gramina-(6-³H, 2-¹⁴C).

Plantas de cebada de 11 días de desarrollo (aproximadamente 2000) distribuidas en tres grupos de 50 plantas cada uno, uno de 250 plantas y otro de aproximadamente 1600 plantas, cultivadas en las condiciones habituales, fueron suplementadas homogéneamente (50 μ l/planta) con una solución que contenía gramina-6-³H (5,4 x 10⁶ dpm/mg; 7,2 mg), gramina-2-¹⁴C (5,2 x 10⁶ dpm/mg; 5,0 mg) y gramina (34 mg) en

metanol (5 ml) y solución salina de riego, hasta un volumen final de 100 ml (relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 1,3 determinada en una alícuota de 100 μl).

A las 50, 96 y 120 horas se procesaron los grupos de 50 plantas; a las 72 horas, el grupo de 250 plantas y el resto a las 166 horas de haberles suministrado la gramina radiactiva. En todos los casos, las plantas se procesaron como se indicó para la experiencia con gramina-6- ^3H (página 221) hasta la obtención de los extractos metanólicos, salvo que la arena fue extraída primeramente con agua y este extracto se juntó con el agua de riego remanente y se liofilizó como se indicó en la experiencia piloto (página 223). Se determinó la radiactividad sobre alícuotas de cada uno de los extractos.

Se agregó a los extractos metanólicos de raíces y tallos (previamente lavados con hexano hasta no más decoloración), gramina (5) y ácido antranílico (30) auténticos (entre 15 y 20 mg de cada uno). La solución metanólica se llevó a pH 9 con solución de hidróxido de sodio 10% p/v y se extrajo con diclorometano; la fase de diclorometano se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó hasta sequedad a presión reducida. El extracto obtenido se disolvió en metanol (0,2 ml) y se sembró en CCD preparativa (sílicagel; solvente 1), contra testigo de gramina (5) auténtica. La zona del cromatograma correspondiente a gramina (revelada al UV, 254 nm)

se desorbió desde la sílicagel con metanol y el extracto obtenido se evaporó a sequedad a presión reducida y se cromatografió en columna de sílicagel (solventes de desarrollo: diclorometano y mezclas de diclorometano:metanol de polaridad creciente). La fracción de elución de la columna que contenía gramina (5) (CCD, solvente 1, $R_f=0,45$), fue evaporada a sequedad para determinar la masa y se tomó una alícuota para los ensayos de radiactividad.

El extracto metanólico acuoso alcalino remanente, se llevó a pH 5 con solución de ácido clorhídrico 1%, y se extrajo nuevamente con diclorometano. La fase de diclorometano se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en metanol (0,2 ml) y se cromatografió en capa delgada preparativa (sílicagel; solvente 13) contra testigo de ácido antranílico (30). La zona del cromatograma correspondiente a 30 (revelado al UV; $R_f=0,75$), se desorbió desde la sílicagel con metanol; el solvente se evaporó a presión reducida hasta unos pocos mililitros, y se transvasó a un recipiente adecuado para realizar la sublimación (110°C, 1 atm, 16-24 horas). El ácido antranílico así obtenido se pesó y tomó una alícuota para determinar la radiactividad.

Los resultados obtenidos en esta experiencia se resumen en las Tablas 12 y 13, páginas 147 y 148 , respectivamente.

Resumen

Resumen.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el catabolismo del alcaloide gramina en plantas de *Hordeum vulgare* (cebada). Dicho estudio implicó la síntesis de gramina marcada en distintas posiciones con isótopos de carbono e hidrógeno, y de otros compuestos indólicos relacionados, los cuales fueron utilizados en experiencias "in vivo" con plantas de cebada en desarrollo.

Los productos sintetizados permitieron realizar un estudio detallado de los espectros de RMN-¹H y particularmente RMN-¹³C de indoles sustituidos.

En esta tesis se desarrollaron los siguientes temas:

1. Introducción: donde se resumen las características que le confieren a ciertas moléculas el carácter de alcaloide; se describen las características de las plantas de cebada utilizadas, los alcaloides presentes en las mismas y en particular, la presencia de gramina y los estudios realizados por otros autores sobre su biosíntesis y catabolismo. Se mencionan además las propiedades biológicas de la gramina y se hace referencia a su posible función en el vegetal.
2. Síntesis de indoles isotópicamente marcados: Se describe la síntesis de los distintos trazadores, radiactivos o no, y de otros compuestos indólicos empleados en la elucidación del camino catabólico de gramins y en estudios espectroscópicos. Ellos fueron: gramina- α -¹⁴C, gramina- α -¹³C, gramina-2-¹⁴C,

gramina-2-¹³C, gramina-6-²H, gramina-6-³H, indol-2-¹³C, indol-6-²H, indol-3-carboxaldehído-2-¹⁴C, indol-3-carboxaldehído-2-¹³C, indol-3-carboxaldehído-6-²H, ácido indol-3-carboxílico-2-¹⁴C, 3-(hidroximetil)-indol, 3-(aminometil)-indol, 3-(metilaminometil)-indol, 6-bromoindol, 6-bromogramina y 1-trimetilsililindol.

En especial, se desarrolló una síntesis novedosa para la obtención de indoles marcados con deuterio o tritio en el anillo bencénico, la cual resultó superior en especificidad y rendimiento químico e isotópico, a las anteriormente conocidas.

Se aclararon además algunas contradicciones halladas en la literatura sobre la aplicabilidad de modificaciones de la reacción de Madelung para la síntesis de indol isotópicamente marcado.

3. Experiencias con plantas de cebada: En este Capítulo se describen:

a) Las condiciones utilizadas para el desarrollo de las plantas y el método de inoculación de trazadores en plantas de cebada intactas en desarrollo.

b) Experiencias de degradación de gramina- α -¹⁴C, donde se determinó la degradación del C- α a CO₂.

c) Experiencias de degradación de gramina-2-¹⁴C, donde se determinó la degradación del C-2 a CO₂.

d) Experiencias de degradación de gramina- α -¹³C y su segui-

miento por RMN- ^{13}C .

e) Experiencias de competencia y captura utilizando gramina- α - ^{14}C y gramina-2- ^{14}C en conjunto con posibles catabolitos como indol-3-carboxaldehído, ácido indol-3-carboxílico o 3-(hidroximetil)-indol y triptofano, ácido N-formilantranílico o formiato, respectivamente.

f) Experiencias de degradación de indol-3-carboxaldehído-2- ^{14}C y ácido indol-3-carboxílico-2- ^{14}C , donde se determinó la reversibilidad de la conversión gramina indol-3-carboxaldehído.

g) Experiencias realizadas con tallos aislados de cebada.

h) Experiencias de degradación de gramina-6- ^3H y de gramina-(6- ^3H , 2- ^{14}C), donde se determinó la degradación total del sistema aromático.

En base a estos estudios se concluyó que el C- α de la cadena lateral de la gramina es degradado cuantitativamente a CO_2 , mientras que el C-2 sería eliminado como formiato que en gran parte se oxidaría a CO_2 mientras el resto pasaría al reservorio de C-1 del organismo donde sería posteriormente metabolizado a una variedad de compuestos.

Los pasos en esta degradación serían la desmetilación secuencial del grupo dimetilamino y transformación a indol-3-carboxaldehído a través de una transaminasa, siendo esta parte de la secuencia reversible y probablemente común con el proceso biosintético de la gramina. Posteriormente se produ-

circía la oxidación irreversible a ácido indol-3-carboxílico, descarboxilación con pérdida de la cadena lateral y ruptura oxidativa del anillo pirrólico para dar ácido N-formilantranílico y finalmente ácido antranílico y formiato. Las experiencias con gramina-6-³H permitieron además determinar que el ácido antranílico intermediario era también rápidamente degradado oxidativamente, con eliminación del ³H de la posición 6 de la gramina como ³H₂O.

La reversibilidad de la conversión gramina indol-3-carboxaldehído es analizada desde el punto de vista de su implicancia en la biosíntesis de gramina, la cual no se encontraba completamente elucidada.

4. Análisis espectroscópico: Los distintos compuestos indólicos sintetizados, y en particular la marcación con ²H y ¹³C, permitió estudiar exhaustivamente los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C de estos compuestos. En especial se reasignaron las resonancias de los carbonos 5 y 6 de indol y gramina y 4 y 6 de indol-3-carboxaldehído en sus espectros de RMN-¹³C, los cuales estaban mal asignados en literatura. Además, se determinaron los espectros de RMN-²H de los compuestos deuterados, los cuales permitieron también asignar inequívocamente las resonancias del H-6 en los espectros de RMN-¹H de los compuestos sintetizados.

Se asignaron completamente los espectros de RMN-¹H de indol, indol-6-²H, 6-bromoindol, gramina-6-²H, 6-bromogramina

e indol-3-carboxaldehído-6-²H.

5. Parte experimental: Se describe la parte experimental de la labor realizada, donde se detallan las síntesis realizadas, las técnicas extractivas, cromatográficas y espectroscópicas empleadas, las condiciones de crecimiento de las plantas y de administración de trazadores.



Parte de este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones:

- "Metabolism of gramine in *Hordeum vulgare* plants. A time course study".
A.A.Ghini, G.Burton y E.G.Gros.
Phytochemistry, 21, 605 (1982).
- "Synthesis of /2-¹⁴C/ and /2-¹³C/ 3-(N,N-dimethylaminomethyl)-indole and of 3-(N,N-dimethylamino/¹⁴C/methyl)indole and 3-(N,N-dimethylamino-/¹³C/methyl)indole".
A.A.Ghini, G.Burton y E.G.Gros.
An. Asoc. Quím. Argent., 70, 1079 (1982).
- "Synthesis of /6-²H/-indole, /6-²H/-gramine and /6-³H/-gramine"
A.A.Ghini, G.Burton y E.G.Gros.
J. Lab. Compds. Radiopharm., 23, nº 8, 857 (1986).
- "¹³C NMR spectra of substituted indoles".
G.Burton, A.A.Ghini y E.G.Gros.
Mag. Res. Chem., 24, 829 (1986).
- "Catabolismo de alcaloides en la planta *Hordeum vulgare*".
E.G.Gros, G.Burton, A.A.Ghini y C.A.Russo.
An. Acad. Nac. Cs. Ex. Fis. y Nat., en prensa.

Bibliografia

- 1- S.W.Pelletier, "Chemistry of the Alkaloids", Van Nostrand, Nueva York, 1971.
- 2- T.Robinson, Science, 184, 430 (1974).
- 3- D.F.Dowing, "Psychopharmacological Agents", Vol. 4, I, 574, Editor M.Gordon, Academic Press Inc., NY. 1964.
- 4- T.A.Henry, "The Plants Alkaloids", 418. J. y A. Churchill Ltd., Londres. 1949.
- 5- Theophrastos, "History of Plants", A.Horto, Transl.Loeb. Clasical Library. (Citado en Ref. 2).
- 6- J.W.Fairbairn y G.M.Wassel, J. Chem. United Arab. Repub., 10, 275 (1967).
- 7- A.W.Frank y L.Marion, Can. J. Chem., 34, 161 (1956).
- 8- "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería", dirigida por L.R.Parodi, ACME. 1959.
- 9- A.L.Montes, "Bromatología", EUDEBA. 1966.
- 10- Y.Raoul, Ann. Fermentation, 3, 129 (1937) y referencias allí citadas.
- 11- E.Leger, Bull. Soc. Chim. France, 35, 235, 706 y 868 (1906).
- 12- E.Leger, Compt. Rend., 143, 234 y 912 (1906).
- 13- E.Leger, Compt. Rend., 144, 208 y 488 (1907).
- 14- E.Leger, J.Pharm. Chim., 25, 5 y 273 (1907).
- 15- E.Leger, Bull. Soc. Chim. France, 1, 148 (1907).
- 16- H. von Euler, H.Hellstrom y N.Lofgren, Z. Physiol. Chem., 234, 151 (1935).
- 17- A.Orekhov y S.Norkina, Ber., 68, 436 (1935).

- 18- K.Brandt, H. von Euler, H.Hellstrom y N.Lofgren,
Z. Physiol. Chem., 235, 37 (1935).
- 19- S.H.Mudd, Nature, 489 (1961).
- 20- B.G.Grower y E.Leete, J. Am. Chem. Soc., 85, 3683 (1963).
- 21- G.Rabitzsch, Planta Med., 6, 103 (1958).
- 22- G.Rabitzsch, Planta Med., 7, 268 (1959).
- 23- S.Ghosal, R.K.Chaudhuri y S.K.Dutta, Phytochemistry, 10,
2852 (1971).
- 24- H.von Euler y H?Erdtman, Ann. ,520, 1 (1935).
- 25- C.C.J.Culvenor, R.D.Bon y L.W.Smith, Aust.J. Chem., 17,
1310 (1964).
- 26- R.F.Barnes, A.B.Simons y G.C.Marten, Agron. J., 63,
507 (1971).
- 27- I.J.Patcher, D.E.Zacharius y O.Ribeiro, J. Org. Chem.,
24, 1285 (1959).
- 28- I.J.Patcher, J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 48, 670
(1959).
- 29- M.Wiewiorowski y H. Podkowinska, Bull. Acad. Pol. Sci.
Cl. II. Ser. Sci. Biol., 10, 357 (1962).
- 30- I.Ribas-Marques y M.Rugueiro-García, An. Quim., 67, 93
(1971).
- 31- V.Ersparmer y G.Falconieri, Naturwiss., 39, 431 (1952).
- 32- E.Meyer y W.Barz, Planta Med. Supl. 140 (1975).
- 33- V.E.tYler, J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 47, 97 (1958).
- 34- K.Bowden y L.Marion, Can. J. Chem., 29, 1037 (1951).

- 35- D.E.Metzler, "Biochemistry. The chemical reactions of living cells", Academic Press. 1977.
- 36- E.Leete y L.Marion, Can. J. Chem., 31, 1195 (1953).
- 37- D.O'Donovan y E.Leete, J. Am. Chem. Soc., 85, 461 (1953).
- 38- A.Breccia y L.Marion, Can. J. Chem., 37, 1066 (1959).
- 39- F.Wightman, M.D.Chisholm y A.C.Neish, Phytochemistry, 1, 30 (1961).
- 40- E.Wenkert, J. Am. Chem. Soc., 84, 98 (1962).
- 41- Referencia 1, página 710.
- 42- E.Leete y M.L.Minich, Phytochemistry, 16, 149 (1977).
- 43- E.Leete, Phytochemistry, 14, 471 (1975).
- 44- G.A.Digenis, J. Pharm. Sci., 58, 39 (1969).
- 45- G.A.Digenis y B.A.Faraj, Experientia, 23, 774 (1967).
- 46- G.A.Digenis, J. Pharm. Sci., 58, 42 (1969).
- 47- G.E.Zúñiga, M.S.Salgado y L.J.Corcuera, Phytochemistry, 24, 945 (1985).
- 48- M.Williams, R.F.Barnes y J.M.Cassady, Crop. Sci., 11, 213 (1971).
- 49- C.H.Gallagher, J.H.Koch, R.M.Moore y J.D.Stell, Nature, 204, 542 (1964).
- 50- T.A.Slotkin, T.R.Anderson, F.J.Seider y C.Lau, Biochem. Pharmacol., 24, 1413 (1975).
- 51- C.S.Andreo, E.G.Orellano y H.M.Niemeyer, Z. Naturforsch., 39c, 746 (1984) y referencias allí citadas.

- 52- H.Kuhn y O.Stein, Chem. Ber., 70, 567 (1937).
- 53- M.Tramontini, Synthesis, 703 (1973).
- 54- "Heterocyclic Compounds" Vol. III, Cap. I, Editor: Elderfield. J.Willey & Sons Inc., Nueva York, (1952).
- 55- F.T.Tyson, Organic Synthesis, Vol. Col. III, 479 (1955).
- 56- A.I.Vogel, "A text-book of Practical Organic Chemistry", 3ª Edición, Longmans. 1962.
- 57- A.Murray y D.L.Williams, "Organic Synthesis with isotopes", Part I, 780, Interscience, Nueva York, 1958.
- 58- L.Pichat, M.Andinot y J.Monoret, Bull. Soc. Chem. France, 5, 21 y 85 (1954).
- 59- F.T.Tyson, J. Am. Chem. Soc., 72, 2801 (1950) y referencias allí citadas.
- 60- W.J.Houlihan, V.A.Parrino y Y.Uike, J. Org. Chem., 46, 4511 (1981).
- 61- P.N.James y H.R.Snyder, Organic Synthesis, Vol. Col. IV, 539 (1963).
- 62- J.Schallenger y E.Meyer, Z. Naturforsch., 38b, 108 (1983).
- 63- M.F.Lautié, J. Lab. Compds. Radiopharm., 16, 735 (1978).
- 64- T.R.Bosin, M.G.Raimond y A.R.Buckpitt, Tetrahedron Letters, 44, 4699 (1973).
- 65- I.Saito, H.Sugiyama, A.Yamamoto, S.Muramatsu y T.Matsuura, J. Am. Chem. Soc., 106, 4286 (1984).
- 66- E.I.Nigishi, "Organometallics in Organic Synthesis",

- Vol. I, J.Wiley & Sons, Nueva York. 1980.
- 67- J.Thesing, G.Semler y G.Mohr, Chem Ber., 95, 2205
(1962).
- 68- D.Lloyd y D.E.Nichols, Tetrahedron Letters, 24, 4561
(1983).
- 69- G.Dellar, P.Djura y M.V.Sargent, J. Chem. Soc. Perkin
Trans. I, 1679 (1981).
- 70- H.M.Fitch, Organic Synthesis, Vol. Col. III, 658 (1955).
- 71- T.W.Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis",
279, J.Wiley & Sons Inc., Nueva York. 1981.
- 72- A.G.M.Barret, D.Dauzone, I.A.O'Neil y A.Renand, J. Org.
Chem., 49, 4409 (1984).
- 73- R.J.Sundberg y H.F.Russell, J. Org. Chem., 38, 3324
(1973).
- 74- A.Wright, D.Ling, P.Boudjouk y R.West, J. Am. Chem. Soc.,
94, 4784 (1972).
- 75- J.Thesing, Chem. Ber., 87, 692 (1954).
- 76- W.Majak, R.E.Mc Diarmid, A.L. van Ryswyk, K.Broersma y
S.G.Bonin, Journal of Range Management, 32, n^o 4, 322
(1979).
- 77- W.Majak, R.E.Mc Diarmid, T.W.Powell, A.L.van Ryswyk,D.G.
Stout, R.J.Williams y R.E.Tucker, Plant, Cell and Envi-
ronment, 2, 335 (1979).
- 78- J.M.Brewer, A.J.Pesce y R.B.Ashworth, "Experimental

- techniques in Biochemistry", Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, Nueva Jersey. 1974.
- 79- "Thin-Layer Chromatography", Editor: E.Stahl, Springer-Verlag, Nueva York Inc. 1969.
- 80- Referencia 79, página 740.
- 81- R.A.Heacock y M.E.Mahon, J. Chromat. 17, 338 (1965).
- 82- G.Burton, R.L.Baxter, M.Gunn, P.J.Sidebottom, P.E. Fagerness, K.Shishido, J.Y.Lee y A.I.Scott, Can. J. Chem., 58, 1839 (1980).
- 83- C.A.Russo, G.Burton y E.G.Gros, Phytochemistry, 22, 71 (1983).
- 84- V.Magnus, S.Iskric y S.Kveder, Planta (Berl.), 97, 116, (1971).
- 85- M.Bonner y J.D.Skalman, Analytical Biochemistry, 89, 247 (1978).
- 86- S.A.Brown, "Biosynthesis". Editor: T.A.Geissman, Vol. I, The Chemical Society, Londres. 1972.
- 87- C.E.Dalgliesh, Quart. Revs., 5, 227 (1951).
- 88- D.J.Gifford y E.A.Cossins, Phytochemistry, 21, n^o 7, 1479 (1982).
- 89- D.J.Gifford y E.A.Cossins, Phytochemistry, 21, n^o 7, 1485 (1982).
- 90- K.Bowden y L.Marion, Can. J. Chem., 29, 1043 (1951).
- 91- E.Leete y L.Marion, Can. J. Chem., 32, 646 (1954).
- 92- J.Man, "Secondary Metabolism", Oxford Chemistry Series

- nº 27. Editores: P.W.Atkins, J.S.E.Holker y A.K.Holli
day. Clarendon Press, Oxford. 1980.
- 93- L.V.Hankes y L.M.Henderson, J. Biol. Chem., 225, 349
(1957).
- 94- H.S.Mason, "Advances in Enzymol.", Vol. 29, 79 (1957).
- 95- O.Wiss y G.Bettendorf, Z. Physiol. Chem., 306, 145
(1957).
- 96- R.Hansel, G.Schopflin y H.Rimpler, Planta Medica, 14,
261 (1966).
- 97- R.E.Stutz, Plant Physiol., 33, 207 (1958).
- 98- R.L.Hinman y J.Lang, Biochemistry (Wash.), 4, 144 (1965).
- 99- C.A.Russo, "Tesis Doctoral", pág. 58, Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1982.
- 100- V.Magnus, S.Simaga, S.Iskrik y S.Kveder, Plant Physiol.,
69, 853 (1982).
- 101- R.G.Parker y J.D.Roberts, J. Org. Chem., 35, nº 4, 996
(1970).
- 102- J.B.Stothers, "Carbon-13 NMR Spectroscopy", Academic
Press, Nueva York. 1972.
- 103- G.W.Gribble, R.B.Nelson, J.L.Johnson y G.C.Levy, J. Org.
Chem., 40, 3720 (1975).
- 104- M.Shamma y D.M.Hindenlang, Carbon-13 NMR shift assignments
of amines and alkaloids. Plenum Press, Nueva York. 1979.
- 105- E.Rosenberg, K.L.Williamson y J.D.Roberts, Org. Magn.
Reson., 8, 117 (1976).

- 106- G.C.Levy, R.B.Nelson y J.D.Cargioli, Chemical Communications, 506 (1971).
- 107- "The Aldrich Library of NMR Spectra", II Edición, 2, 533 A.
- 108- P.J.Black y M.L.Heffernan, Australian J. Chem., 18, 353 (1965).
- 109- M.G.Reinecke, H.W.Johnson, Jr. y J.F.Sebastian, J. Am. Chem. Soc., 91, 3817 (1969).
- 110- Handbook of Chemistry and Physics, 57ª Edición, Chemical Rubber Company Press, Editor: R.C.Weast, Ohio, EEUU. 1977.
- 111- R.Mozingo, Organic Synthesis, Vol. Col. III, 181 (1955).
- 112- Catalog Handbook of Fine Chemistry, Aldrich Chemical Company Inc., 781, Wisconsin, EEUU. 1986.
- 113- Información correspondiente a la nueva cebada cervecera MAGNIF 120 INTA. Dirección General de Producción y Fomento Agrícola. Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación. 1968.
114. J.E.Dale y G.M.Felippe, Ann. Bot., 36, 397 (1972).
115. C.Marriott y J.E.Dale, Z. Pflanzphysiol., 81, 377 (1977).