

## Tesis de Posgrado

# Aislamiento y elucidación estructural de compuestos orgánicos presentes en raíz de Mandevilla pentlandiana

Cabrera, Gabriela Myriam

1993

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Cabrera, Gabriela Myriam. (1993). Aislamiento y elucidación estructural de compuestos orgánicos presentes en raíz de Mandevilla pentlandiana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2543\\_Cabrera.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2543_Cabrera.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cabrera, Gabriela Myriam. "Aislamiento y elucidación estructural de compuestos orgánicos presentes en raíz de Mandevilla pentlandiana". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2543\\_Cabrera.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2543_Cabrera.pdf)

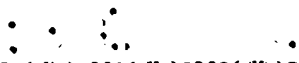
**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS  
ORGÁNICOS PRESENTES EN RAÍZ DE *MANDEVILLA PENTLANDIANA***

Autor

GABRIELA M. CABRERA

Directora de Tesis

Dra. ALICIA M. SELDES

Lugar de Trabajo

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Ciencias Químicas

-1993-

*Tesis.  
2543*

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

*Debes amar el tiempo de los intentos  
debes amar la hora que nunca brilla  
y si no, no pretendas tocar lo cierto  
sólo el amor engendra la maravilla  
sólo el amor consigue encender lo muerto.*

*Silvio Rodriguez*



Agradezco a la Dra. Alicia M. Seldes por su entusiasmo en la dirección de este trabajo de Tesis, por su apoyo constante en mis iniciativas, por haberme dado espacio como para crecer y desarrollarme en mi carrera científica, y lo más importante, por su inagotable calidez humana.

Agradezco además:

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

Sr. Jorge A. Aznárez por los espectros de masa y CGL-EM.

Dr. Jorge A. Palermo por los espectros de RMN.

Al Dr. Juan C. Oberti por su iniciativa en el estudio de plantas productoras de cardenólidos y por la recolección y el envío de raíz de *Mandevilla pentlandiana*.

Al Dr. Eduardo G. Gros por ofrecerme la posibilidad de trabajar con el material vegetal que dió origen a este trabajo y por su colaboración en la impresión de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Burton por sus valiosos consejos y ayuda en los experimentos de RMN.

Al Dr. Michael Gross y MS Janeen Crockett (Universidad de Nebraska, EEUU) por los espectros de masa de alta resolución, FAB<sup>+</sup>/EM y EM/CAD/EM de los compuestos LVI, LVIII, LX y LXI.

Al Dr. Esteban Krolik, de VG Analytical Limited (Manchester, Inglaterra) por los espectros FAB<sup>+</sup>/EM de los compuestos LIII, LIV, LVII y LIX.

Al Sr. Mike Burger (Universidad de Hawaii, EEUU) por el espectro de masa de alta resolución del compuesto LXIII.

Al Sr. Wesley Yoshida (Universidad de Hawaii, EEUU) por los espectros de RMN del compuesto XXX.

A Faith Caplan y Kay Larsen (Universidad de Hawaii, EEUU) por los ensayos de actividad de los glicósidos cardenólidos.

Al Dr. Tatsuo Yamauchi (Universidad de Fukuoka, Japón) y el Dr. Peter Junior (Universidad de Düsseldorf, Alemania) por el envío de muestras de cardenólidos.

A la Dra. Cristina Matulewicz y al Dr. Carlos Stortz por los consejos sobre hidrólisis y derivatización de los productos de hidrólisis de glicósidos.

Al Dr. Luis Díaz por los espectros de masa de los compuestos **XXX**, **XXXI** y **LI**.

A la Dra. Mónica E. Deluca por su guía y ayuda en las primeras etapas de este trabajo.

Al Lic. Adrián Besso y al Lic. Esteban Vladusic por su entusiasmo y colaboración en parte del trabajo experimental.

A mis compañeros de laboratorio: Dra. Marta Maier, Dra. Mónica Deluca, Dr. Jorge Palermo, Dra. Laura Schor, Lic. Enrique Hughes, Lic. Sergio Giacopello, Lic. Alejandro Rocatagliatta, Sr. Juan José Bernardo y Srta. Cecilia D'Alessandro por compartir estos años de trabajo con alegría y demostrar que es posible trabajar con buena onda en las buenas y en las malas.

A Sergio Giacopello, Moni Deluca, Henry Hughes, Juanchi Bernardo y Gustavo Revelli por su afecto y por haber podido contar siempre con ellos.

A Alejandro Nin, Miriana Biondic, Violeta Benedetti, Marta Maier, Alejandro Rocatagliatta, Laura Schor, Alejandra Ponce y a todo el personal del Departamento de Química Orgánica por su colaboración y cordialidad.

A Jorge (Dr Jorge A. Palermo) por transmitirme su entusiasmo permanente, por animarme siempre a seguir adelante, por sus valiosos consejos (aunque se queje de que no le hago caso), por todo lo que aprendí de él y por la felicidad de estar juntos.

A mis padres, a Marce, a Agus, a Meli y a Gustavo por su cariño y apoyo durante estos años.

<u>Indice</u>	<u>pág.</u>
Introducción	1
Cardenólidos	7
Descripción de la labor realizada	22
Discusión de los resultados obtenidos	104
Parte experimental	132
Resumen	203
Bibliografía	210



<u>Indice de compuestos</u>	<u>pág.</u>
Compuesto I	23, 158
Compuesto II	23, 158
Compuesto III	25, 26, 158
Compuesto IV	25-27, 108, 160
Compuesto V	25-27, 108, 160
Compuesto VI	25-27, 108, 160
Compuesto VII	25-27, 108, 160, 161
Compuesto VIII	28-31, 35, 43, 112, 113, 162, 164, 165, 167
Compuesto IX	28-30, 32, 33, 35, 43, 112, 113, 162, 164, 165
Compuesto X	28, 30, 33-35, 43, 112, 113, 162, 164, 165, 167
Compuesto XI	35, 36, 43, 112, 113, 163-165, 167
Compuesto XII	37-39, 43, 112, 113, 163-165
Compuesto XIII	39, 43, 112, 113, 163, 164, 166
Compuesto XIV	40, 112, 113, 164, 166, 168
Compuesto XV	40, 112-114, 164, 166, 168
Compuesto XVI	41, 112, 113, 115, 164, 168
Compuesto XVII	41, 51, 112, 113, 115, 164, 168
Compuesto XVIII	41, 51, 112, 113, 115, 164, 169
Compuesto XIX	41, 51, 112, 113, 115, 164, 169
Compuesto XX	44, 48, 108, 171
Compuesto XXI	44, 48, 108, 171
Compuesto XXII	45, 112, 113, 164, 169
Compuesto XXIII	45-48, 112, 113, 164, 169
Compuesto XXIV	47, 48, 112, 113, 164, 170
Compuesto XXV	47, 48, 112, 113, 164, 170

Compuesto XXVI	47, 48, 112, 113, 164, 170
Compuesto XXVII	49, 172
Compuesto XXVIII	49, 172
Compuesto XXIX	51, 172
Compuesto XXX	51-56, 172
Compuesto XXXI	57, 108, 173
Compuesto XXXII	57, 108, 173
Compuesto XXXIII	57, 58, 117, 118, 174
Compuesto XXXIV	57, 58, 117, 118, 175
Compuesto XXXV	57, 59, 175
Compuesto XXXVI	57, 59, 175
Compuesto XXXVII	59-61, 176
Compuesto XXXVIII	61, 63, 123-126, 182, 185, 186
Compuesto XXXIX	61, 63, 123-126, 183, 185
Compuesto XL	63-65, 123-126, 183, 185, 186
Compuesto XLI	63, 64, 176
Compuesto XLII	54, 177
Compuesto XLIII	65-72, 120-122, 177-179
Compuesto XLIV	67, 179
Compuesto XLV	67, 179
Compuesto XLVI	69-71, 180
Compuesto XLVII	69, 72, 180
Compuesto XLVIII	69, 180
Compuesto XLIX	73, 74, 122-126, 183, 185
Compuesto L	73, 122-126, 184, 185
Compuesto LI	75, 118, 181
Compuesto LII	75, 119, 182

Compuesto LIII	77, 122-126, 184, 188, 189
Compuesto LIV	77, 78, 122-126, 187-189
Compuesto LV	79, 177
Compuesto LVI	80, 89-93, 103, 123-126, 128-131, 190, 191, 198, 200-202
Compuesto LVII	80, 81-89, 102, 103, 123-126, 128, 191, 198, 200-202
Compuesto LVIII	80, 93-97, 103, 123-126, 128, 130, 131, 191,192, 198, 200-202
Compuesto LIX	80-89, 102, 103, 123-126, 128, 130, 131, 193, 198, 200-202
Compuesto LX	80, 93-97, 102, 103, 123-126, 128, 194, 195, 199-202
Compuesto LXI	80, 98-103, 123-126, 128, 130, 131, 195, 196, 199-202
Compuesto LXII	86-88, 194
Compuesto LXIII	86-88
Compuesto LXIV	103, 197
Compuesto LXV	103, 197
Compuesto LXVI	103, 197

Esquema de fraccionamiento del extracto etanólico de raíz de *Mandevilla pentlandiana*.....pág. 42, 50, 62, 76, 204

## Lista de símbolos y abreviaturas utilizados

- $\mu\text{g}$  microgramo
- $\mu\text{l}$  microlitro
- $\mu\text{m}$  micrón
- ABX sistema ABX
- Ac acetilo
- $\text{Ac}_2\text{O/Py}$  anhídrido acético/piridina
- AcOEt acetato de etilo
- CAD disociación por activación colisional
- CC cromatografía en columna
- ccd cromatografía en capa delgada
- CGL cromatografía gas-líquido
- CGL-EM cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa
- cim cimarosa
- CLAR cromatografía de alta resolución
- cm centímetro
- d doblete
- d.a. doblete ancho
- d.d. doble doblete
- d.d.a. doble doblete ancho
- dg digitoxigenina
- dgn diginosa
- dgt digitalosa
- $\text{ED}_{50}$  concentración requerida para inhibir el crecimiento celular en un 50%
- EM espectrometría de masa
- EM/CAD/EM espectrometría de masa tandem con disociación por activación colisional
- EM/EM espectrometría de masa tandem

- Et                    etilo
- Et<sub>2</sub>O                éter etílico
- EtOH                etanol
- eV                    electrón volt
- FAB                  bombardeo con átomos rápidos
- FAB<sup>+</sup>                bombardeo con átomos rápidos, operando en modo de iones positivos
- FAB<sup>+</sup>/EM            espectrometría de masa con ionización por bombardeo con átomos rápidos, operando en modo de iones positivos
- g                      gramo
- glc                    glucosa
- h                      hombro
- Hz                    hertz
- IR                    infrarrojo
- J                      constante de acoplamiento
- keV                  kiloelectrón volt
- kg                    kilogramo
- m                    metro, multiplete
- m/z                  relación masa/carga
- Me                    metilo
- MeOH                metanol
- MHz                  megahertz
- min                  minuto
- ml                    mililitro
- mm                  milímetro
- mseg.                milisegundo
- nm                    nanometro
- olg                    oleandrigenina
- OMe                  metoxilo
- pág.                  página
- pf                    punto de fusión

- ppm            parte por millón
- ram            ramnosa
- Rf             relación frontal
- RI             índice de refracción
- RLC          región libre de campo
- RMN-<sup>13</sup>C    resonancia magnética nuclear de carbono-13
- RMN-<sup>1</sup>H    resonancia magnética nuclear de protón
- s              singulete
- s.a.          singulete ancho
- s.s.          solución saturada
- seg.         segundo
- t              triplete
- t.a.         triplete ancho
- tr             tiempo de retención
- trr          tiempo de retención relativo
- u             masa atómica unificada
- UV          ultravioleta
- V             volumen

Aclaración: Al no existir aún una abreviatura reconocida en castellano para el bombardeo con átomos rápidos, se optó por la terminología inglesa (FAB: "fast atom bombardment").

## ***Introducción***

---

## FAMILIA APOCYNACEAE

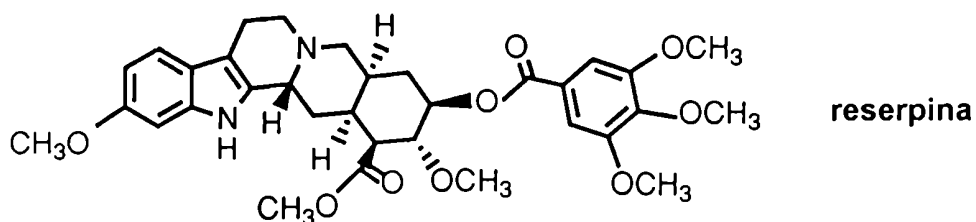
Las Apocináceas poseen gran importancia económica por el valor medicinal, ornamental o forestal de muchas de sus especies, así como también porque incluyen plantas productoras de caucho y toxinas. Esta familia, que tiene unos 150 géneros y 2000 especies de distribución principalmente pantropical, cuenta en Argentina con 16 géneros y 41 especies ampliamente distribuidos [1].

Aún hoy existen discrepancias acerca de la división de la familia en subfamilias, tribus y subtribus. La clasificación más moderna (1964) efectuada por Wagenitz [1] divide a la familia en tres subfamilias: Plumerioideae, Cerberoideae y Apocynoideae (también denominada Echitoideae).

En nuestro país se emplean en escala industrial algunas especies madereras como el *Aspidosperma quebracho-blanco* (quebracho blanco), *A. australe* (guatambú amarillo) y *A. polyneuron* (palo rosa). Entre las especies ornamentales exóticas cultivadas en el país se encuentran algunas especies de *Plumeria* (Jazmín magno), *Allamanda*, *Thevetia*, *Vinca*, *Catharanthus* (Emiliana) y *Nerium* (Adelfa). La única especie autóctona cultivada como ornamental es *Mandevilla laxa* (Jazmín de Chile) [1].

Varias Apocináceas han sido utilizadas desde la antigüedad en medicina popular. Se encontró que muchas de ellas poseen un alto contenido de alcaloides o glicósidos cardiotónicos de utilidad en medicina moderna. Como ejemplo cabe destacar el aislamiento de reserpina (alcaloide con propiedades hipotensoras y sedantes) de varias especies de *Rauvolfia* [1,2].

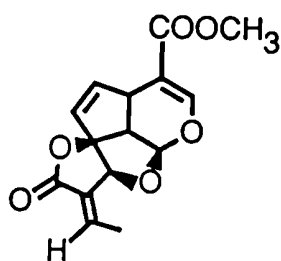




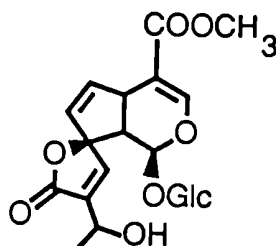
### Metabolitos presentes en Apocináceas

Se han aislado de esta familia una gran variedad de metabolitos. Cada clase de metabolitos (esteroides, alcaloides, etc) es característica de ciertos géneros y especies.

De los géneros *Plumeria* y *Allamanda* se han aislado entre otros, iridoides de esqueleto deformado de 14 carbonos, tanto libres como glicosidados [3].



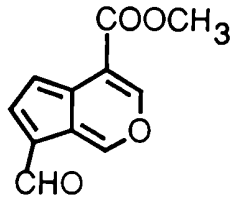
**plumericina**



**plumiérido**

Iridoides aislados en *Plumeria* y *Allamanda*.

También se han encontrado iridooides en el género *Cerbera* que se caracterizan por presentar mayor grado de conjugación [3].

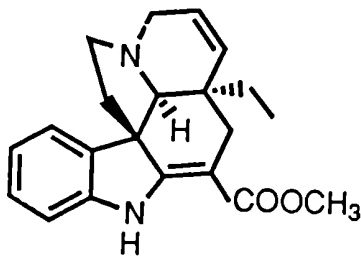


**cervinal**

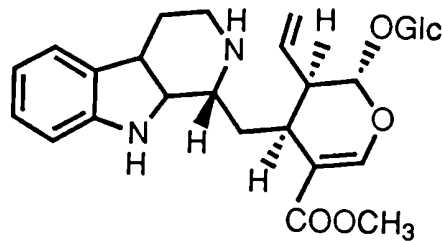
Iridoide aislado

de *Cerbera manghas* L.

Alcaloides indólicos con esqueleto de secologanina han sido aislados de más de 200 especies analizadas pertenecientes a la subfamilia Plumerioideae y no han sido encontrados en ninguna especie de las otras dos subfamilias [4].



**tabersonina**

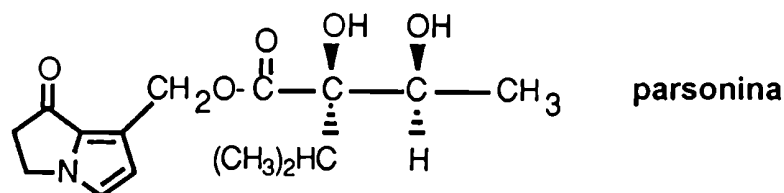


**vincósido**

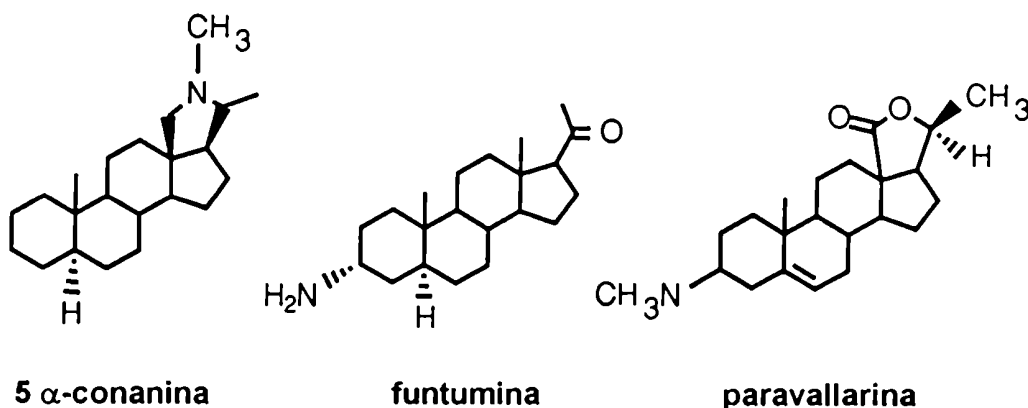
Algunos alcaloides indólicos aislados de Plumerias.

Alcaloides pirrolizidínicos han sido encontrados sólo en algunas especies de *Parsonsia* [5].

La parsonina, aislada de *P. laevigata* Alston es un ejemplo interesante por presentar un sistema con un grupo carbonilo  $\alpha, \beta$  no saturado, hecho inusual en este tipo de alcaloides [6].

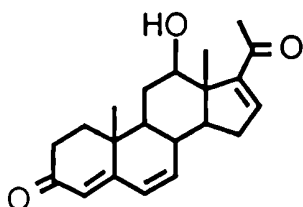


Los alcaloides esteroidales se han hallado principalmente en los géneros *Holarrhena*, *Funtumia* y *Malouetia*. Se han aislado numerosos compuestos pertenecientes al grupo de la conanina, al grupo de los pregnanos y al grupo de la paravallarina [7].



Los géneros productores de cardenólidos más analizados han sido *Nerium*, *Anodendrum*, *Cerbera* y *Strophanthus*. Los distintos tipos de cardenólidos hallados y su distribución será discutido en el capítulo 2.

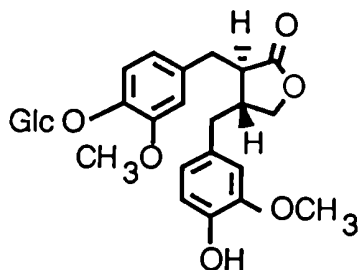
Se encontraron pregnanos en distintos géneros (*Anodendrum*, *Trachelospermum*, *Apocynum*, *Holarrhena*, entre otros) algunos de ellos productores de cardenólidos o alcaloides esteroidales. Los pregnanos de esta familia se caracterizan por ser 3-ceto- $\Delta^4$  derivados,  $\Delta^5$  derivados, 3-ceto- $\Delta^{1,4}$  derivados ó 3-ceto- $\Delta^{4,6}$  derivados y se aislaron en forma libre o glicosidados [3].



**neridienona A**

Pregnano característico de la familia Apocynaceae.

Otros metabolitos tales como lignanos y triterpenos del tipo 19-hidroxiursólico y 19-hidroxioléánico han sido hallados en el género *Trachelospermum* [8-11]. Sin embargo, no hay suficientes informes hasta el momento como para establecer algún tipo de relación quimiotaxonómica.



**matairesinósido**

Lignano aislado de *Trachelospermum asiaticum* [8].

## **Mandevilla pentlandiana**

La *Mandevilla pentlandiana* (A.DC.) Woodson, ha sido también denominada *Parsonsia bracteata*, *Laseguea pentlandiana*, *Laseguea hookeri*, *Echites bracteata*, *Echites tweediana* y *Laseguea bracteata* [1].

Es un sufrútice trepador que pertenece a la familia Apocynaceae, subfamilia Apocynoideae y tribu Ichnocarpeae. Se la encuentra principalmente al sur de Brasil, Bolivia, norte y centro de Argentina, desde Jujuy hasta Corrientes, San Luis y Santa Fe, especialmente en zonas serranas. Florece en primavera y verano [1,12].

## **Objetivos del presente trabajo**

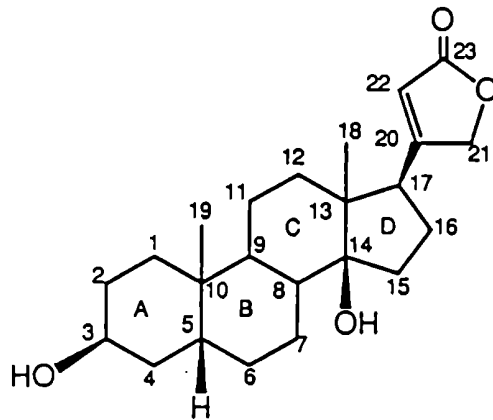
El extracto etanólico de raíz de *Mandevilla pentlandiana* exhibió una fuerte reacción positiva frente al ensayo de Kedde [13], característico para derivados cardenólidos. Estos compuestos presentan una importante actividad farmacológica. En vista de ello, el fin primero de este trabajo fue el aislamiento y elucidación estructural de los cardenólidos presentes en el mismo. Se aislaron y caracterizaron también otros metabolitos presentes en el extracto.

***Cardenólidos***

---

## CARDENOLIDOS

Los cardenólidos, también conocidos como glicósidos cardíacos o cardiotónicos (estas dos últimas denominaciones incluyen a bufadienólidos) son sustancias que se caracterizan por su específica acción sobre el músculo cardíaco. Las agliconas son derivados esteroidales que presentan en común un anillo butenólido en posición  $17\beta$  y un hidroxilo en posición  $14\beta$ .

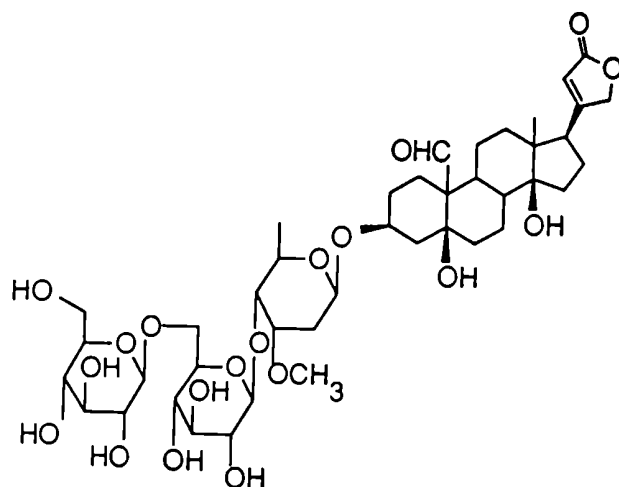


**Fig. 1. Digitoxigenina:** esqueleto típico de aglicona y su numeración.

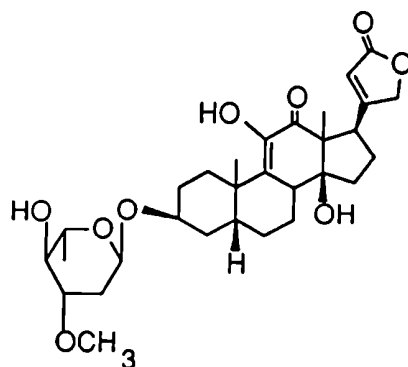
Pueden presentar además las siguientes modificaciones [14]:

- isomería  $3\alpha$  ó  $5\alpha$  ;
- doble enlace en posiciones 4, 5 ó 16;
- hidroxilos en posiciones  $1\beta$ ,  $2\alpha$ ,  $5\beta$ ,  $11\alpha$  y  $\beta$ ,  $12\alpha$  y  $\beta$ ,  $15\beta$ ,  $16\beta$  ó 19, con posible esterificación del hidroxilo de posición 16 con grupos formilo, acetilo o isovalerilo;
- epóxidos en posiciones 7,8  $\beta$ ; 8,14  $\beta$  u 11,12  $\beta$ ;
- carbonilos en posiciones 11, 12 ó 19.

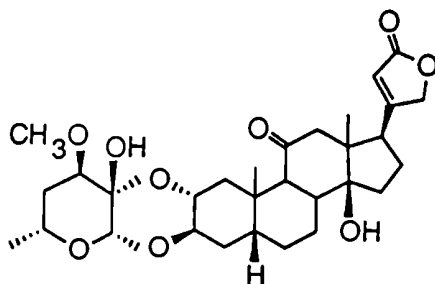
Los azúcares hallados en cardenólidos [15] suelen ser glucosa, algunos de sus O-metilderivados, 6-desoxihexosas y algunos de sus O-metilderivados, 2,6-didesoxiazúcares, sus O-metilderivados (se han encontrado los cuatro posibles 3-O-metilderivados), y algunos de sus O-acetilderivados, desoxihexosulosas y en raras ocasiones xylosa.



**k-strofantósido [16]**



**L-oleandrósido de decogenina [17]**



**afinósido C [18]**

**Fig. 2.** Algunos ejemplos de cardenólidos.



En cuanto a la distribución de los monosacáridos en los glicósidos se observa que cuando se hallan presentes varios azúcares en una misma molécula, éstos se encuentran dispuestos en forma lineal. También se observa que cuando hay presentes hexosas normales y desoxi hexosas, éstas últimas se encuentran unidas a la aglicona [14,15].

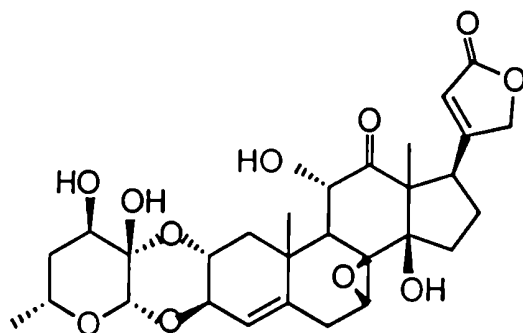
### **Cardenólidos en Apocynáceas**

Los géneros productores de cardenólidos que han sido más analizados son *Strophanthus*, *Thevetia*, *Anodendrum*, *Apocynum*, *Adenium*, *Beaumontia*, *Cerbera* y *Nerium*.

No existe un único patrón de oxigenación ni alguna modificación estructural que caracterice a los cardenólidos de la familia y que la distinga de otras familias productoras de cardenólidos. Existen en cambio algunas variantes características de ciertos géneros.

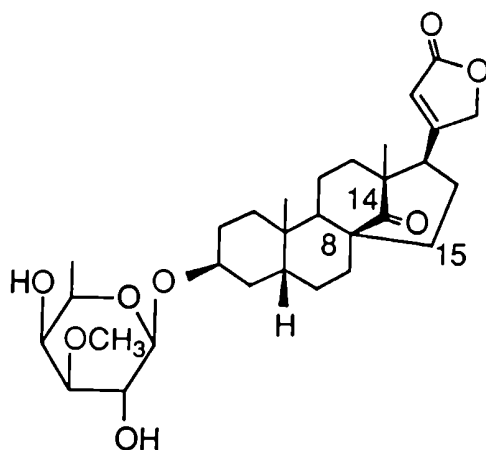
El género *Anodendron* es el único que produce afinósidos, que son cardenólidos en los cuales hay dos puntos de unión entre la aglicona y el monosacárido al que está unido [18,19]. Los afinósidos son característicos de la familia *Asclepiadaceae* [20].

En los géneros *Apocynum*, *Thevetia* y *Strophanthus* es común encontrar cardenólidos que presentan una función aldehído en la posición 19, aunque también producen cardenólidos que no la poseen [21-23]. El género *Strophanthus* es uno de los más ricos en cuanto a variaciones estructurales y ha sido uno de los más estudiados [17].



**Fig. 3. Affinósido K**, aislado de *Anodendron affine* [19].

Los géneros *Nerium* y *Cerbera* además de cardenólidos producen oleásidos, que estrictamente no son cardenólidos, aunque se los denomina de ese modo ya que están relacionados estructuralmente con ellos. Los oleásidos se caracterizan por tener un carbonilo en la posición 14 y por lo tanto presentar una deformación de anillos C y D, los cuales ya no se unen a través de las posiciones 14 y 15 sino que lo hacen a través de las posiciones 8 y 15 [24-26].



**Fig. 4. Oleásido B**, aislado de *Nerium oleander* [24].

Del género *Nerium* también se han aislado neriumósidos, que son cardenólidos con dobles enlaces conjugados [27].

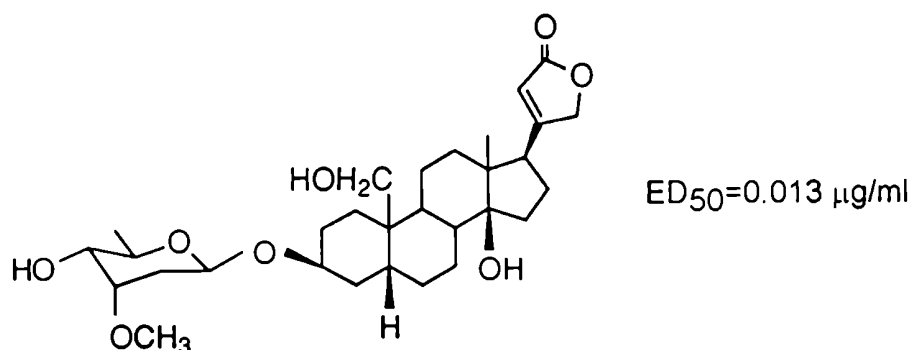
Los géneros *Beaumontia* y *Adenium* producen principalmente cardenólidos con agliconas simples, con pocas variantes funcionales [28,29].

### **Actividad farmacológica**

Los cardenólidos han presentado interés debido a su actividad desde hace miles de años. Inicialmente se utilizaron extractos de plantas de los géneros *Digitalis* (Scrophulareaceae) y *Strophanthus* (Apocynaceae) como venenos y como tónicos cardíacos. En 1785, Withering introdujo el uso de *Digitalis* en medicina en el tratamiento de desórdenes cardíacos. Desde ese momento hasta la actualidad se emplean con dicho fin, no habiendo sido superados por drogas sintéticas [30,31].

Su acción se debe a que incrementan la fuerza contráctil del músculo cardíaco, fuerza que se regula por un mecanismo secundario. Este efecto implica un aumento en la eficiencia cardíaca con el consecuente incremento en el flujo sanguíneo a otros órganos. Debido al incremento del flujo sanguíneo renal, el riñón aumenta su capacidad de excreción de sodio, provocando diuresis y reducción de edema [31]. El inconveniente que presenta su empleo se debe al escaso margen de seguridad de las dosis terapéuticas [30,31].

También se ha informado sobre el aislamiento de cardenólidos con actividad citotóxica contra cultivos de célula KB [32,33].



**Fig. 5.** Cardenólido aislado de *Maquira Calophylla* (Moraceae) con actividad citotóxica.

Los compuestos aislados presentaron ED<sub>50</sub> entre 0.013 y 0.042 µg/ml. Un compuesto se considera activo si su ED<sub>50</sub> es ≤ 4 µg/ml.

### Relación estructura-actividad

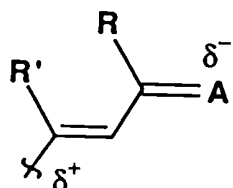
Las agliconas de los cardenólidos son cardiotónicas por sí mismas. Los azúcares contribuyen a potenciar generalmente ese efecto y a facilitar su transporte en el organismo [34,35].

Se acepta en general que es necesario para manifestar actividad cardíaca la presencia de un 14 β-hidroxiesqueleto en el cual los anillos A y B estén en una configuración *cis*, los anillos B y C en una configuración *trans* y los anillos C y D en una configuración *cis* [34]. Se considera también que otros hidroxilos presentes en la molécula no son de relevancia en el efecto cardiotónico, pero que la distancia entre el carbonilo de la lactona y el oxígeno unido al carbono 3 tiene un valor crítico [34].

Se ha comprobado que un cambio en la configuración de C-3 disminuye la actividad cardíaca, y que lo mismo ocurre con un cambio en la configuración de C-5 ó en compuestos  $\Delta^5$  [34-37]. Si bien el hidroxilo de la posición 14 no es esencial, su reemplazo por hidrógeno se vió acompañado por una importante pérdida de actividad. La configuración *cis* de los anillos C y D resulta más importante que el hidroxilo 14  $\beta$ . Al respecto, se observó que 14  $\alpha$ -digitoxigenina resultó inactiva [34].

La introducción de una función oxigenada en C-15 o de un epóxido 14,15  $\beta$  produjo sistemáticamente una disminución de la actividad farmacológica. Si bien los sustituyentes en C-16 produjeron un efecto desfavorable, algunos mostraron un mejoramiento en la relación efecto terapéutico-efecto tóxico [34].

Es indiscutible que la configuración de C-17 debe ser  $\beta$  y que si se cambia esa configuración los compuestos se tornan inactivos. Importantes resultados se han obtenido con compuestos sintéticos que indican que la lactona no constituye un requerimiento indispensable para la actividad y que en cambio si lo es el siguiente elemento estructural (figura 6) en posición 17  $\beta$  [34].



A es un heteroátomo y  
R y usualmente R' son  
hidrógeno o grupos alcoxi

Fig. 6.

## Biosíntesis de cardenólidos

La biosíntesis de cardenólidos ha sido muy estudiada en los géneros *Digitalis* y *Strophanthus* [38,39]. Un gran número de precursores marcados han sido suministrados a plantas de estos géneros con lo cual se han podido postular dos caminos biosintéticos posibles, uno a través de pregnanos como intermediarios, que se ha denominado la ruta de los pregnanos [38] y otro a través de intermediarios norcolánicos, que se ha denominado la ruta de los ácidos norcolánicos [39-42].

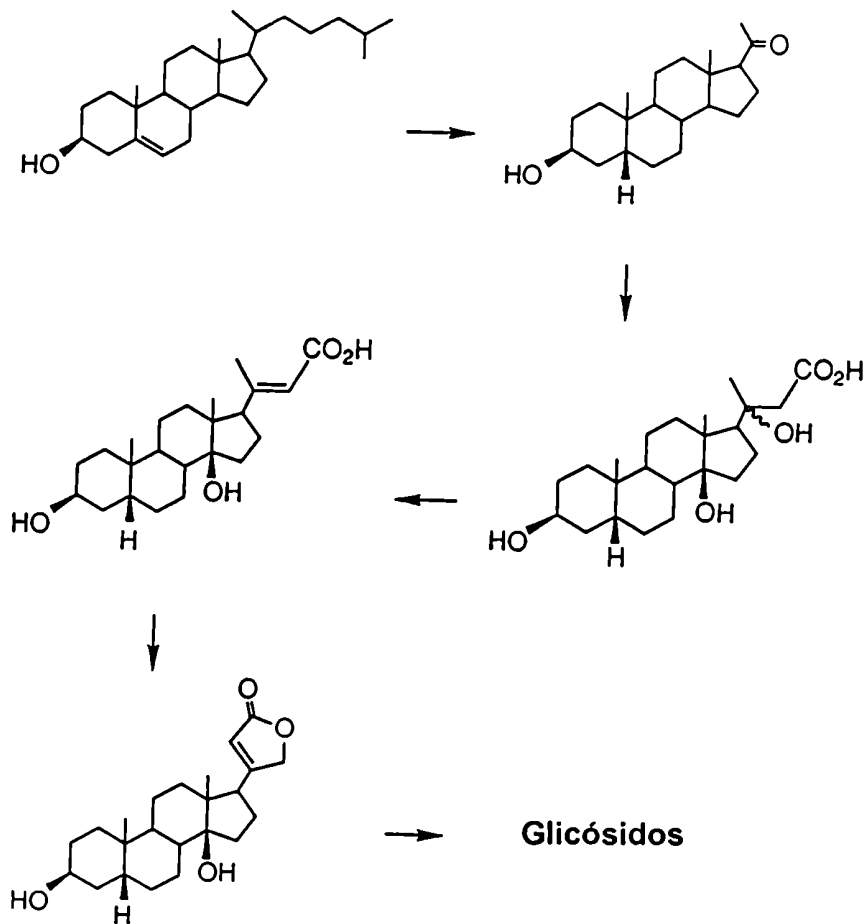


Fig. 7. Biosíntesis de cardenólidos: ruta de los ácidos norcolánicos [42].

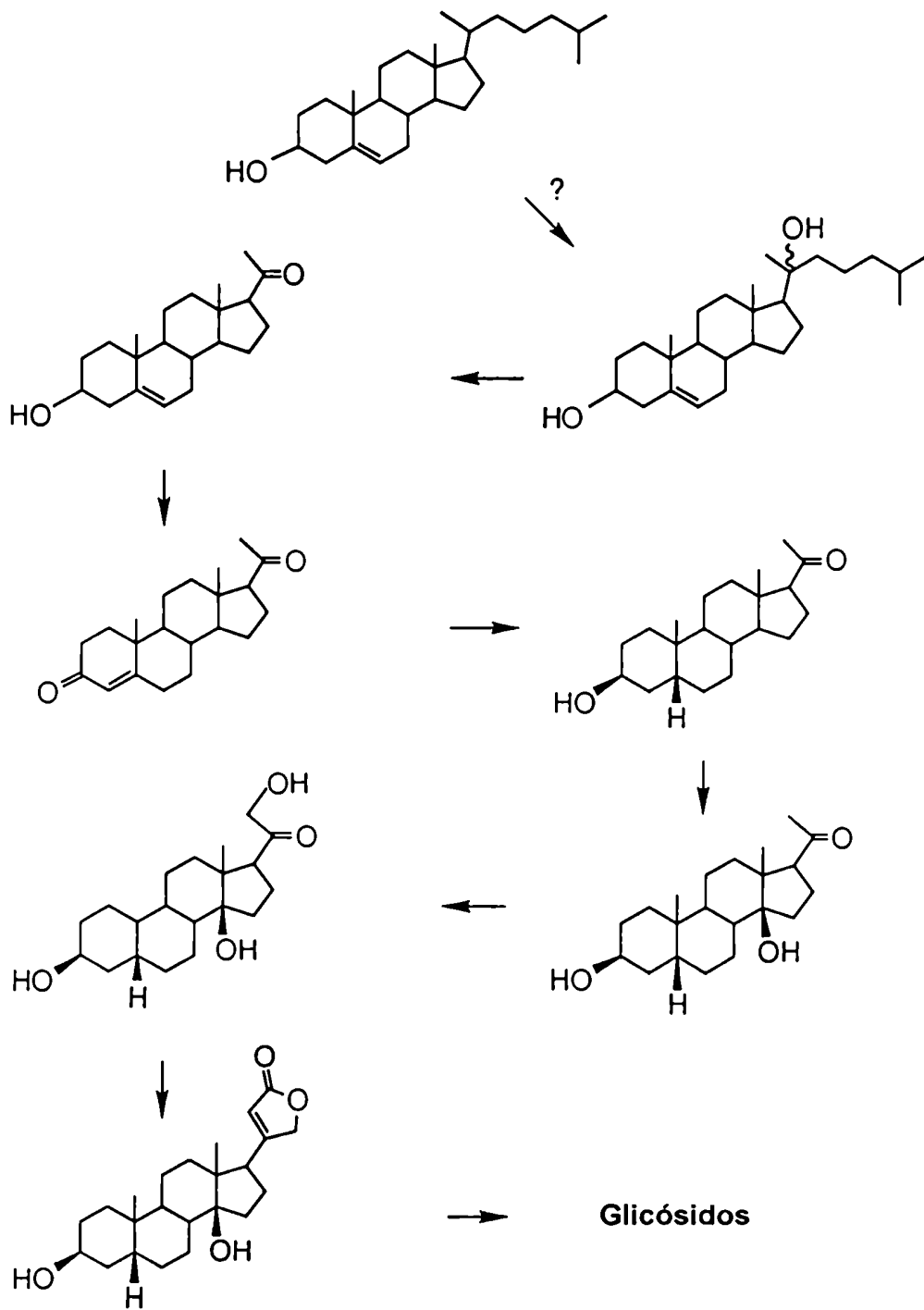


Fig. 8. Biosíntesis de cardenólidos: ruta de los pregnanos [38].

## Elucidación estructural de cardenólidos

La elucidación de la estructura de estos glicósidos comprende tres aspectos fundamentales [14].

Uno de ellos es la determinación de la estructura de la aglicona, la cual se realiza por métodos espectroscópicos sobre la aglicona obtenida por hidrólisis o sobre el glicósido sin hidrolizar.

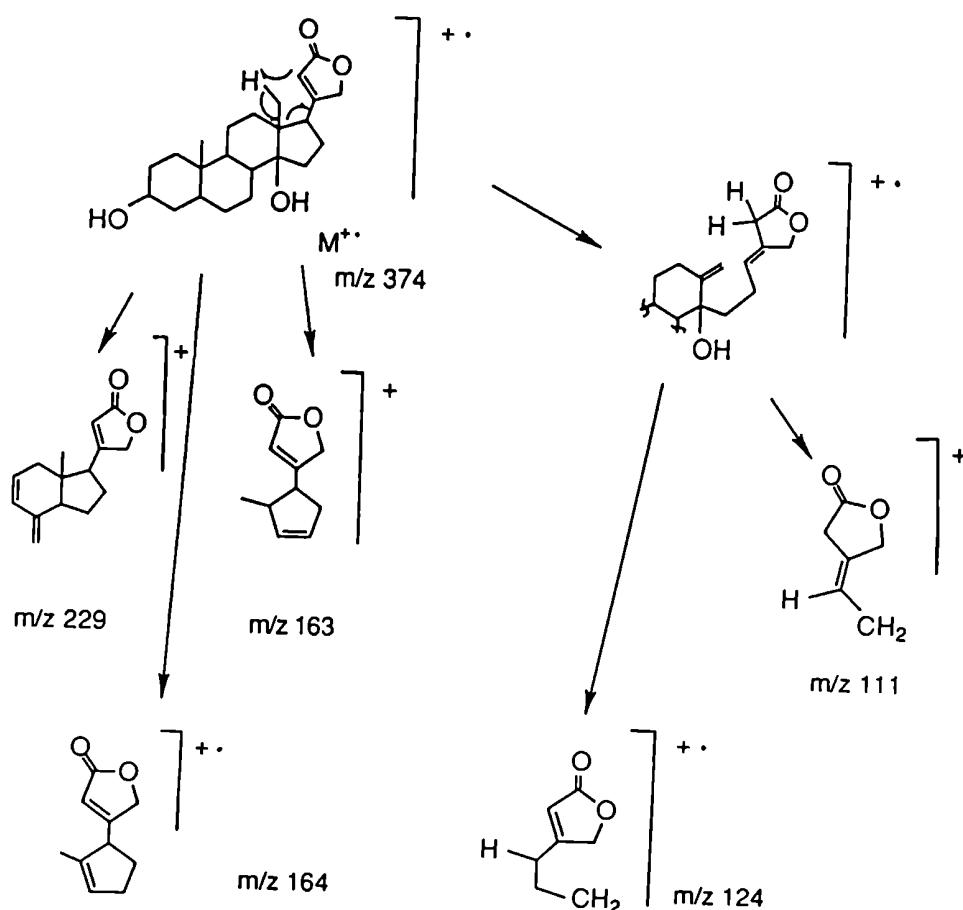
Otro aspecto, sin duda más dificultoso, consiste en la determinación de la estructura de los monosacáridos componentes. Para determinar la configuración de los mismos es necesario proceder a la hidrólisis del glicósido y a la derivatización conveniente de los productos de la misma. Este método, sin embargo, no siempre es efectivo debido a los problemas en la hidrólisis de cardenólidos que poseen en una misma molécula monosacáridos de distinta naturaleza y diferente labilidad frente a los agentes hidrolíticos. Por esta razón, actualmente [28] se opta por la determinación estructural de la porción sacarídica exclusivamente por RMN- $^{13}\text{C}$  y existe muy buena bibliografía al respecto [43-46]. La utilización de técnicas bidimensionales es, sin lugar a dudas, inmejorable para este fin y se ha utilizado en la elucidación estructural de glicósidos de saponinas [47] pero todavía no se ha aplicado a cardenólidos.

El último aspecto a considerar es la determinación de la secuencia en que los monosacáridos se hallan unidos entre sí y con la aglicona. Se han desarrollado varias técnicas en espectrometría de masa que han demostrado ser muy eficientes con ese propósito [48-50]. También es posible determinar la secuencia por RMN realizando mediciones de tiempos de relajación spin-red [51].



## Espectrometría de masa

a) Sobre agliconas: La ionización por impacto electrónico permite obtener además del ión molecular, dos tipos de fragmentos: fragmentos con anillo butenólido (figura 9) y fragmentos sin anillo butenólido (figura 10) [14,52], además del ión molecular. Los mismos se esquematizan en las siguientes figuras:



**Fig. 9.** Fragmentos con anillo butenólido.

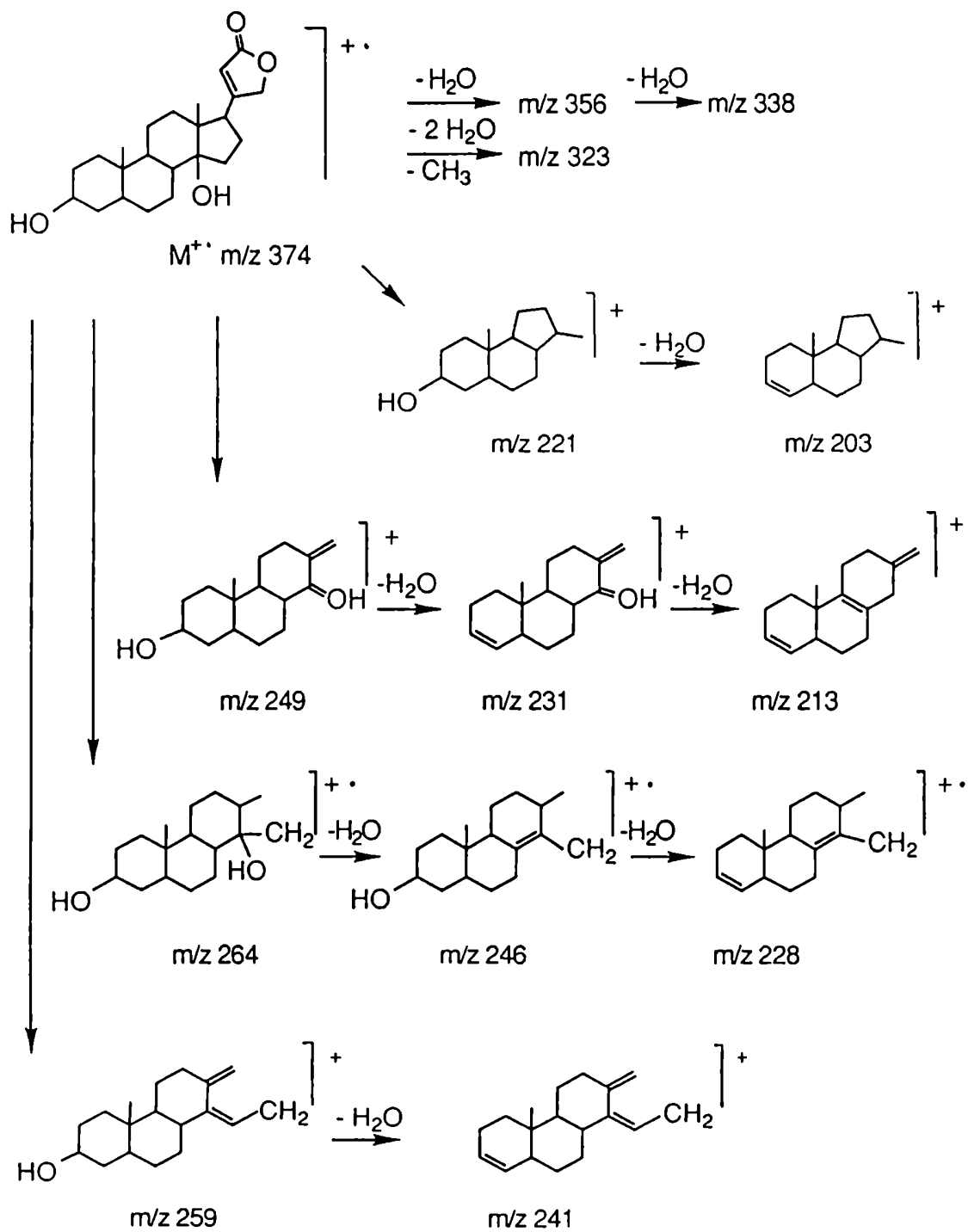


Fig. 10. Fragmentos sin anillo butenólido.

b) Sobre glicósidos: Los glicósidos cardenólidos no presentan el ión molecular en sus espectros de masa obtenidos por impacto electrónico, aún con derivatización previa de la muestra [53]. Sólo se obtuvieron resultados positivos por esta técnica en el análisis de monoglicósidos [14,54]. Se utilizaron otros métodos de análisis en fase gaseosa, empleando ionización química (CI) [55-57] e ionización por el campo (FI) [14,58]. Se emplearon también métodos de análisis partiendo de fase condensada y distintas técnicas de desorción, como desorción por el campo (FD) [49,50], desorción por láser (LD) [59], desorción por ionización química (DCI) [60], y bombardeo por átomos rápidos (FAB) [61,62] en modo positivo y negativo [63].

La información del peso molecular puede obtenerse fácilmente del espectro de FAB. Se observa en estos espectros la falta de fragmentos abundantes y el enmascaramiento de fragmentos debido a los iones producidos por la matriz [62].

La combinación de FAB con disociación por activación colisional (CAD) y espectrometría de masa tandem (EM/EM), permite obtener información estructural no accesible por medio de otras técnicas. El ión de interés (generalmente el ión molecular) se aísla de otros iones interferentes seleccionándolo con un primer analizador. El ión seleccionado se somete a disociación por activación colisional y los fragmentos producidos son separados por el segundo analizador, obteniéndose de esta manera el espectro de masa con información estructural [62].

Es así posible obtener el siguiente esquema de fragmentaciones (figura 11) que contiene información sobre la secuencia de monosacáridos presentes en el glicósido [62].

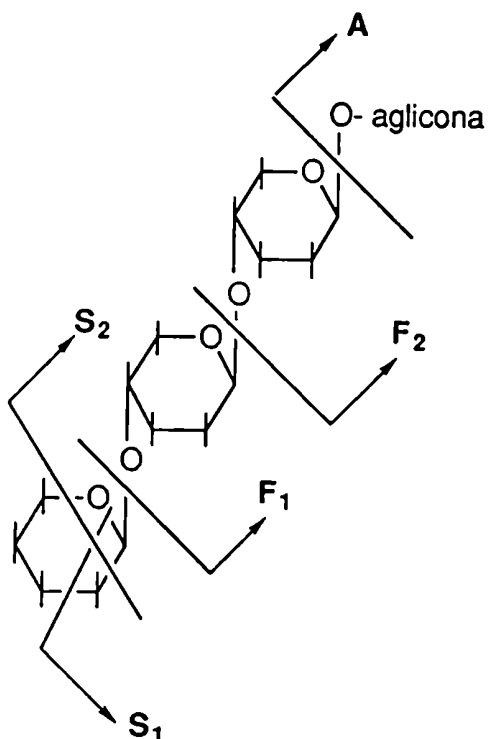


Fig. 11.

### Espectroscopía de RMN-<sup>1</sup>H

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de cardenólidos presentan una serie de señales características:

a) Señales debidas al anillo butenólido: Se observa un singulete correspondiente a H-22 a alrededor de 6 ppm y un multiplete AB correspondiente a H-21 que integra para dos hidrógenos a alrededor de 5 ppm. Son las señales características de estos compuestos.

b) Señales debidas al núcleo esteroidal: Se destacan los metilos angulares (H-18 y H-19) a valores de  $\delta$  característicos para cada aglicona.

c) Señales debidas a la porción glicosídica: A valores de  $\delta$  variables entre 4 y 6 ppm se observan las señales correspondientes a los hidrógenos anoméricos.

También pueden observarse dobletes con constantes de acoplamiento de alrededor de 6 Hz entre 1.2 y 1.4 ppm en el caso de haber en la molécula 6-desoxihexosas y singuletes de metoxilos a alrededor de 3.4 ppm en el caso de haber en la molécula O-metilhexosas, hecho que resulta muy frecuente.

A medida que aumenta el número de monosacáridos en la molécula el aspecto de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H se complica ostensiblemente y es necesario utilizar equipos de RMN de campos altos para obtener información estructural.

### **Espectroscopía de RMN-<sup>13</sup>C**

Los espectros de RMN-<sup>13</sup>C rinden mucha información sobre el núcleo esteroideal (configuración y patrón de sustitución) y sobre el número y tipo de unidades sacarídicas.

Existe una importante recopilación de espectros de RMN-<sup>13</sup>C de cardenólidos realizada por Robien y colaboradores [64], que incluye una gran variedad de compuestos.

El efecto de glicosidación sobre los desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C en glicósidos ha sido muy estudiado [44,65-67] y los valores de los corrimientos son predecibles. En literatura [43] se recopila información acerca de corrimientos de desplazamientos químicos para distintos azúcares, con distintos tipos de uniones y pertenecientes a distintas series. Se introducen parámetros con los cuales es posible calcular en forma teórica corrimientos por efecto de glicosidación en nuevos compuestos.

***Descripción de la labor***  
***realizada***

El material seco y molido fue extraído con EtOH en frío durante tres días. El fraccionamiento rápido del extracto por cromatografía flash en columna seca [68] permitió obtener tres fracciones:

Fracción	Solvente
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> OH (25%)
3	CH <sub>3</sub> OH

#### Análisis de la fracción 1

Esta fracción, eluída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, presentó un aspecto aceitoso. Por cromatografía flash en columna seca se subdividió en cinco subfracciones:

Fracción	Solvente
1a	Hexano-AcOEt (1%)
1b	Hexano-AcOEt (2%)
1c	Hexano-AcOEt (4%)
1d	Hexano-AcOEt (10%)
1e	Hexano-AcOEt (15% hasta 100)

### Subfracción 1a

Se observó por ccd en hexano básicamente una mancha de Rf coincidente con el frente del solvente, que revelaba marrón-anaranjado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%, y unas manchas pequeñas difusas con Rf entre 0.7 y 0.9.

La cromatografía en capa preparativa en el mismo solvente permitió separar el frente del solvente (1a<sub>1</sub>) del resto de la subfracción (1a<sub>2</sub>).

El análisis por CGL y CGL-EM reveló la presencia de hidrocarburos lineales en 1a<sub>1</sub> y de sesquiterpenos hidrocarbonados en 1a<sub>2</sub>. Por comparación con hidrocarburos patrones y sobre la base del cromatograma de CGL-EM fueron identificados los hidrocarburos lineales de 14, 16 a 31 y 34 átomos de carbonos en la subfracción 1a<sub>1</sub>.

El análisis por CGL-EM de la subfracción 1a<sub>2</sub> mostró dos picos mayoritarios, cuyos espectros de masa coincidían según la literatura [69] con  $\alpha$ - y  $\beta$ -curcumeno. La coinyección con muestras auténticas de estos sesquiterpenos confirmó la identidad de los mismos. Así, la subfracción 1a<sub>2</sub> contenía principalmente  $\alpha$ -curcumeno (compuesto I) y  $\beta$ -curcumeno (compuesto II).

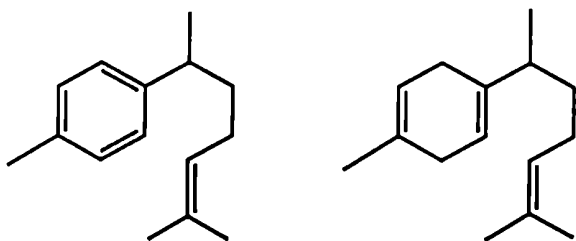


Fig. 12. Compuestos I y II.



### Subfracción 1b

Por ccd de la subfracción 1b se observó una sola mancha, difusa y alargada que revelaba de color gris con borde superior rosado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H presentó además de las señales características de ácidos grasos, otras señales en la zona de δ 4.6-5.0, indicando que se trataba de ésteres de ácidos grasos.

Por saponificación de la subfracción y extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se obtuvieron dos subfracciones: la fase acuosa conteniendo las sales de los ácidos grasos y la fase orgánica, que presentaba por ccd varias manchas.

El tratamiento de la fase acuosa (ver parte experimental) permitió aislar los ésteres metílicos de los ácidos grasos componentes. Su análisis por CGL y CGL-EM y comparación con muestras auténticas permitió obtener el siguiente resultado:

#### Ester metílico /composición porcentual

C	15:1	16:0	17:0	18:0	18:1	18:2	18:3	16:3	no identificados
%	5.6	16.7	0.5	3.8	6.8	23.8	1.0	34.7	7.1

La fase orgánica fue fraccionada por cromatografía flash en columna seca con un sistema de solventes hexano-AcOEt. Se obtuvieron las subfracciones 1b<sub>1</sub> y 1b<sub>2</sub>. El análisis por CGL de estas subfracciones indicó la presencia de mezclas complejas. El análisis por CGL-EM indicó que la subfracción 1b<sub>1</sub> contenía derivados triterpénicos, mientras que la subfracción 1b<sub>2</sub> contenía derivados esteroideos.

## Análisis de la subfracción 1b<sub>1</sub>

El fraccionamiento por CLAR de la subfracción 1b<sub>1</sub> en columna de fase reversa RP-18 de tamaño de partícula de 10 µm rindió tres subfracciones. Las dos de menor tiempo de retención mostraron por CGL que contenían a los compuestos III y IV respectivamente, mientras que la subfracción de tr mayor reveló ser una mezcla. Esta mezcla fue separada por CLAR en una columna RP-18 de tamaño de partícula de 5 µm obteniendo los compuestos V y VI, y en muy pequeña proporción el compuesto VII como contaminante de VI.

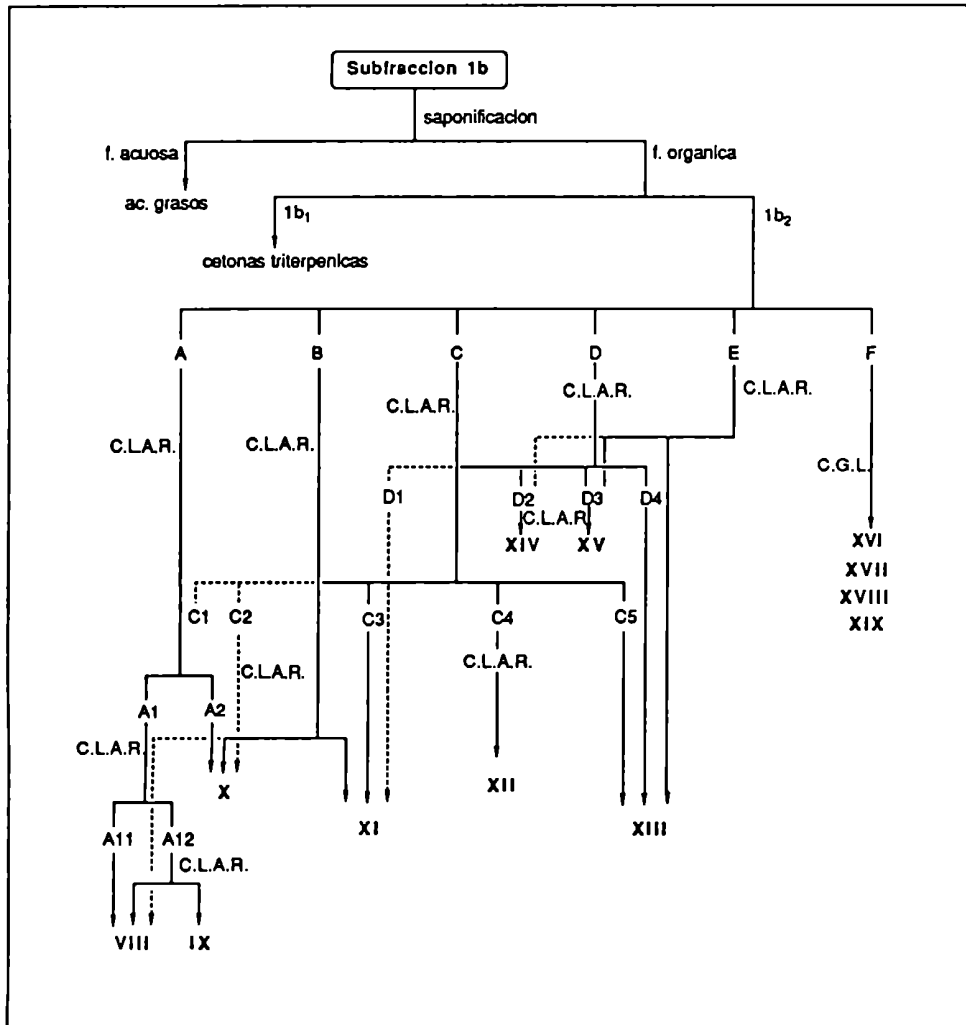


Fig. 13. Esquema de separación de la subfracción 1b

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto III presentaba las señales características de una molécula lineal, además de un singulete ancho a  $\delta$  1.55, otro singulete a  $\delta$  3.32 y un triplete ancho a  $\delta$  4.36. En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observaban señales que avalaban la presencia de un grupo metoxilo y de un carbono terciario unido a dos oxígenos. Sobre la base de estos datos y el espectro de masa, que permitió conocer el largo de la cadena lineal [70], se identificó el compuesto III como el metilhemiacetal de n-hexadecanal.

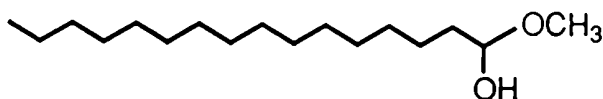
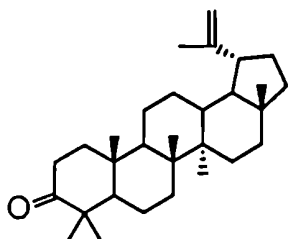


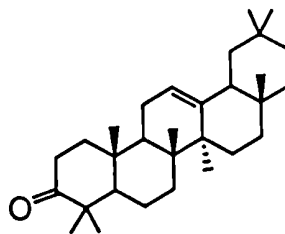
Fig.14. Compuesto III.

Sobre la base de los espectros de masa y RMN-<sup>1</sup>H y comparando con datos de literatura se identificó al compuesto IV como lupenona [71-73] y al compuesto V como  $\beta$ -amirenona [74-76].

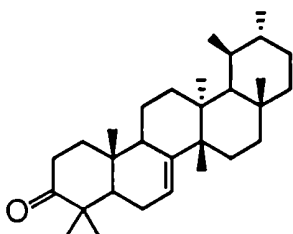
Debido a la poca cantidad aislada del compuesto VI y a su contaminación con VII, sólo pudo ser posible el análisis de ambos compuestos por CGL-EM cuyo resultado permitió identificarlos en forma tentativa como multiflorenona (compuesto VI) [71] y 24-metilencicloartanona (compuesto VII) [77,78].



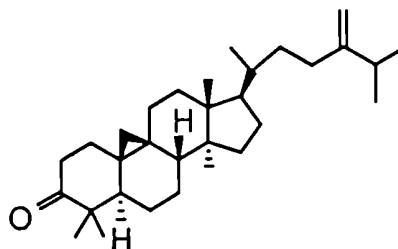
Compuesto IV



Compuesto V



Compuesto VI



Compuesto VII

Fig.15. Compuestos IV a VII.

### Análisis de la subfracción 1b<sub>2</sub>

El análisis por CGL de esta subfracción indicó que era una mezcla compleja. Los cromatogramas mostraban picos con *tr* próximos al de colesterol en importante porcentaje.

La subfracción 1b<sub>2</sub> fue fraccionada por CLAR utilizando una columna RP-18 de tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$  y MeOH como eluyente. De acuerdo al cromatograma obtenido fueron colectadas seis fracciones A a F.

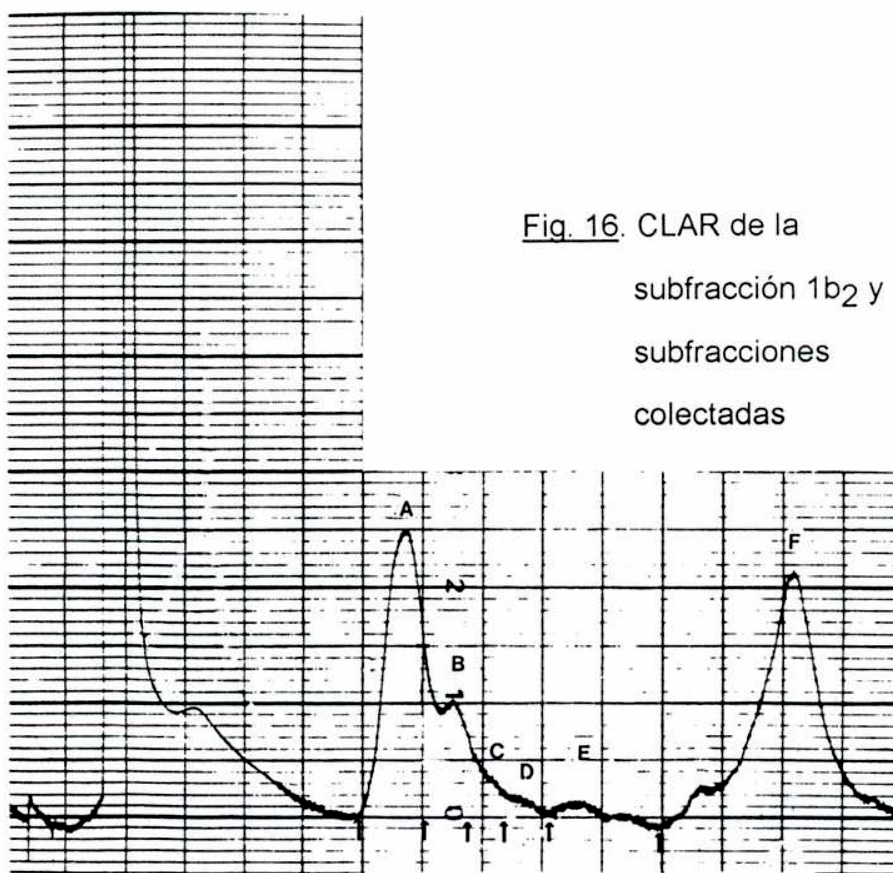


Fig. 16. CLAR de la subfracción 1b<sub>2</sub> y subfracciones colectadas

#### Análisis de la subfracción 1b<sub>2</sub>-A:

El análisis por CGL de la subfracción indicó la presencia de dos compuestos principalmente. Su procesamiento por CLAR utilizando una columna de fase reversa RP-18 permitió coleccionar dos subfracciones A1 y A2. Por CGL y RMN-<sup>1</sup>H A2 mostró contener el compuesto **X** puro, mientras que A1 mostró ser una mezcla 75:25 de dos compuestos (**VIII** y **IX**).

La subfracción A1 fue separada por CLAR en dos subfracciones A11 y A12. Por CGL y RMN-<sup>1</sup>H se pudo comprobar que la subfracción mayoritaria (A11) contenía puro al compuesto **VIII** mientras que la minoritaria (A12) era una mezcla 1:1 de los compuestos **VIII** y **IX**. El compuesto **IX** pudo purificarse a partir de esta fracción por CLAR con excelentes resultados.

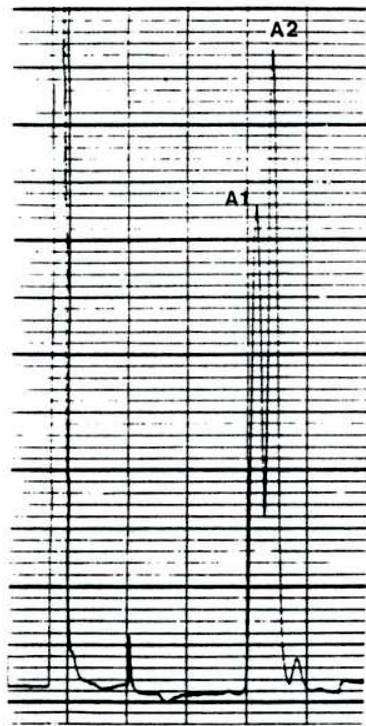


Fig. 17. CLAR de la subfracción A.

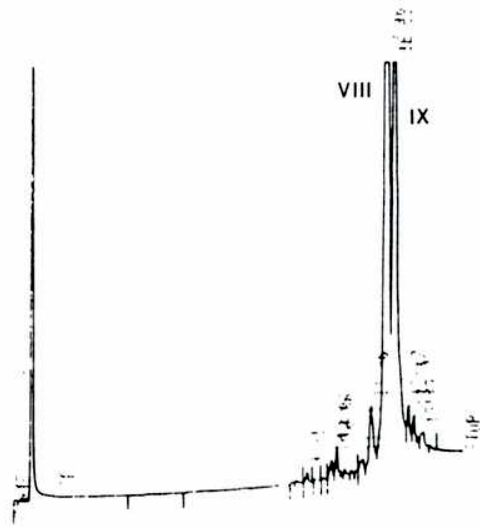


Fig. 18. CGL de la subfracción A1

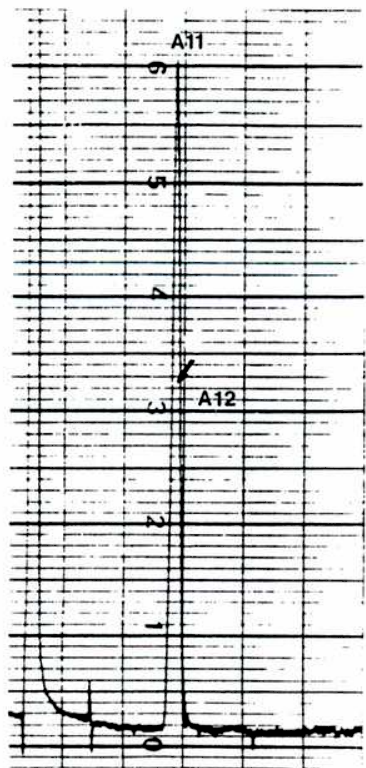


Fig. 19. CLAR de la subfracción A1.

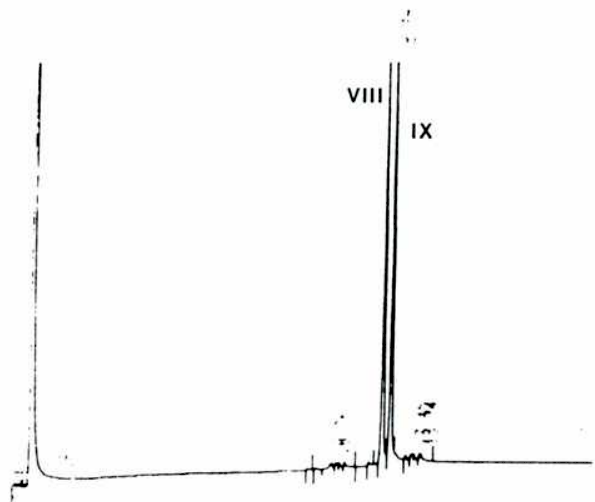


Fig. 20. CGL de la subfracción A12.

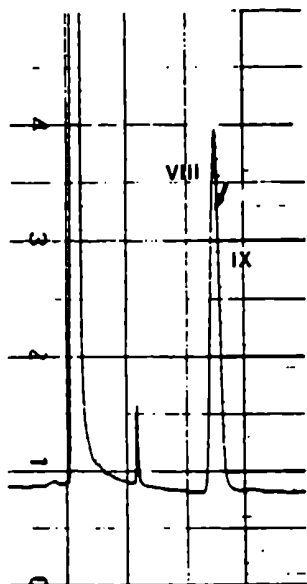


Fig. 21. CLAR de la subfracción A12.

#### Análisis de los compuestos VIII, IX y X.

Los compuestos VIII, IX y X presentaban en común en sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H :

- un multiplete a 5.36 ppm característico del H-6 de un derivado esteroidal con núcleo  $\Delta^5$
- un par de singuletes anchos, que integraban para un hidrógeno cada uno a  $\delta$  4.8 y  $\delta$  4.9 que indicaban la presencia de hidrógenos vinílicos pertenecientes a un grupo metileno  $sp^2$
- un pronunciado corrimiento a campos altos ( $\delta$  0.60) de la señal de Me-18 que sugería que el doble enlace mencionado podría estar dentro de su entorno.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto VIII se observaban además de las señales ya mencionadas un multiplete a 5.12 ppm que indicaba la presencia de un doble enlace adicional y un singulete ancho a  $\delta$  1.61 característico de un grupo metilo sobre doble enlace. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C permitió confirmar los datos obtenidos a partir del espectro de RMN-<sup>1</sup>H.

El espectro de masa del compuesto **VIII** presentó el ión molecular a  $m/z$  382 y el ión  $m/z$  271, pico base del espectro, atribuible a la pérdida de cadena lateral de un esteroide de esqueleto monoinsaturado. En la zona de masas bajas los iones más importantes eran  $m/z$  136 y  $m/z$  93.

Estos datos resultaron ser coincidentes con los informados para colestano-5,20,24-trien-3 $\beta$ -ol sintético [79].

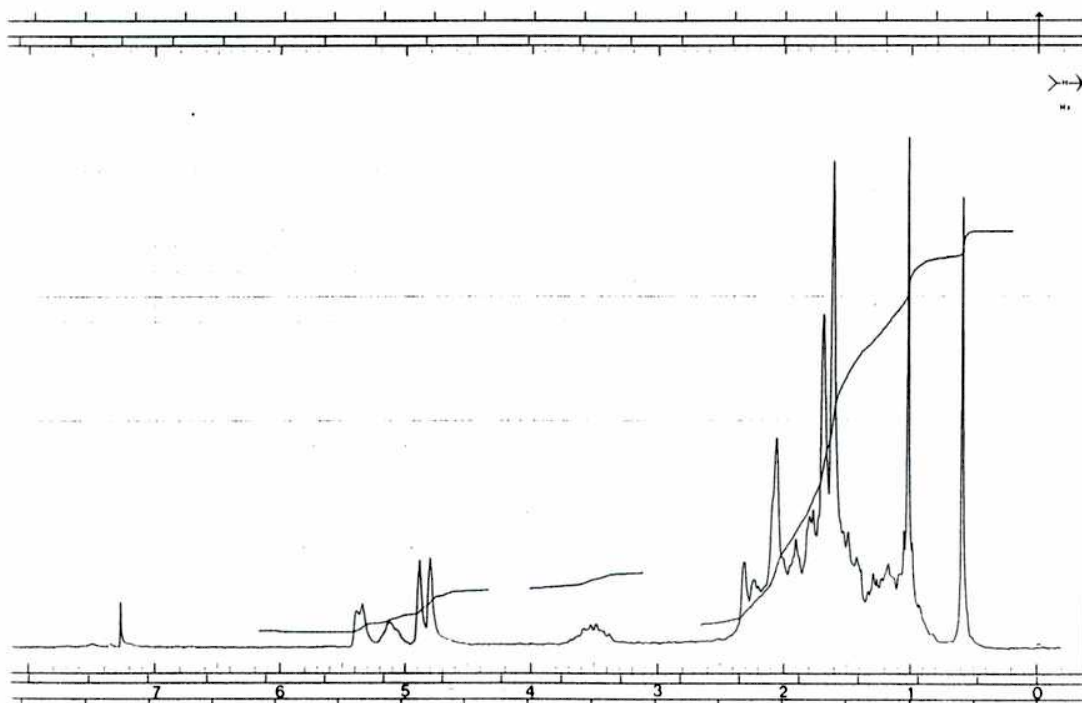


Fig. 22. RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **VIII**.

De acuerdo a lo descrito, el compuesto **VIII** fue identificado como colestano-5,20,24-trien-3 $\beta$ -ol.



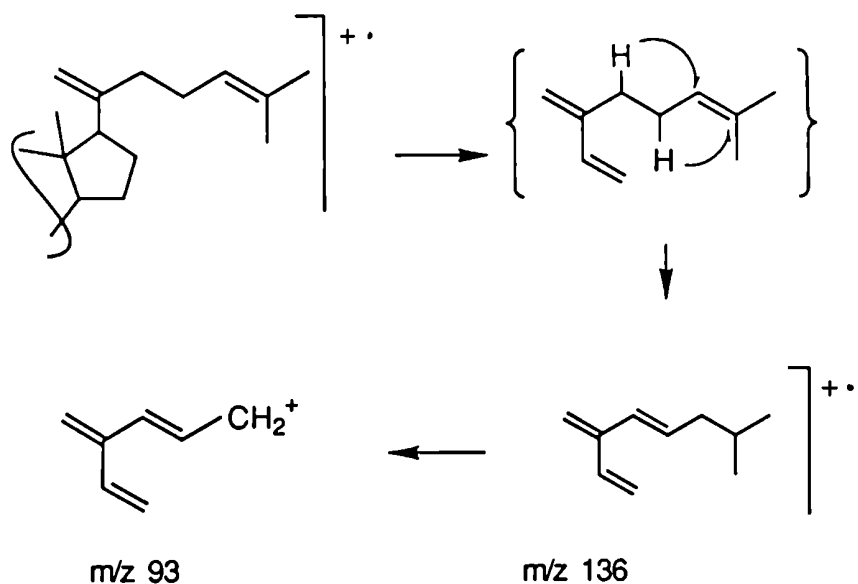


Fig. 23. Origen de los fragmentos  $m/z\ 136$  y  $m/z\ 93$  [79].

El espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto IX presentaba además de las señales comunes con los otros compuestos, otro doble enlace y un metilo sobre doble enlace.

Su espectro de masa presentó el ión molecular a  $m/z\ 396$  y fragmentos iónicos a  $m/z\ 273$ ,  $271$ ,  $255$ ,  $229$  y  $213$  indicativos de un esteroide de 28 átomos de carbono con núcleo monoinsaturado y con cadena lateral con dos insaturaciones. Estos datos estaban de acuerdo [79] con la presencia de un doble enlace  $\Delta^{20}$  en la molécula.

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  indicó la presencia de dos metilenos  $\text{sp}^2$  a  $\delta\ 109.1$  y  $\delta\ 111.3$ . Sobre la base de estos datos y por comparación con datos de literatura para codisterol (24 $\xi$ -metilcolesta-5,25-dien-3 $\beta$ -ol) [80] se identificó el compuesto IX como 24 $\xi$ -metilcolesta-5,20,25-trien-3 $\beta$ -ol.

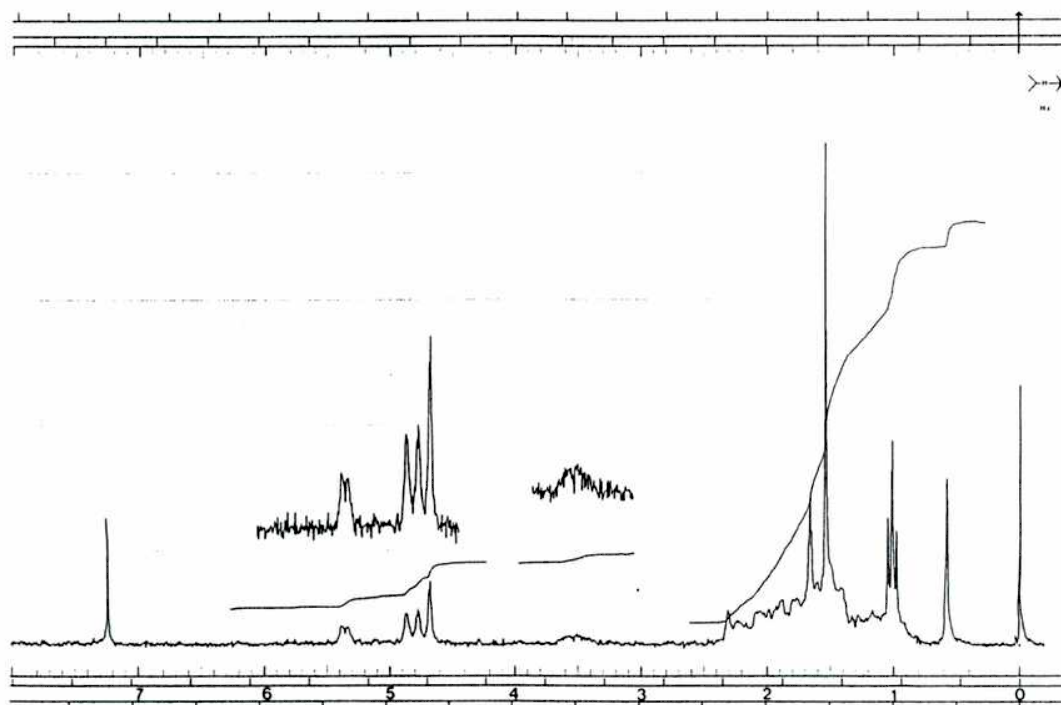


Fig. 24. RMN- $^1\text{H}$  del compuesto IX.

El compuesto X presentó en su EM el ión molecular a  $m/z$  396 e iones a  $m/z$  273, 271 (100%), 255, 229 y 213. Estos datos eran indicativos de que era un isómero del compuesto IX con un núcleo esteroidal monoinsaturado y dos insaturaciones sobre la cadena lateral.

Estos datos y la presencia de un núcleo  $\Delta^{5,20}$  fue confirmado con el espectro de RMN- $^1\text{H}$ . En este espectro además se observaban dos singuletes anchos a  $\delta$  4.70 y  $\delta$  4.77, indicativos de un doble enlace  $\Delta^{24(24^1)}$  y un doblete a  $\delta$  1.05, característico de los metilos 26 y 27 en un derivado esteroidal  $\Delta^{24(24^1)}$  [81,82].

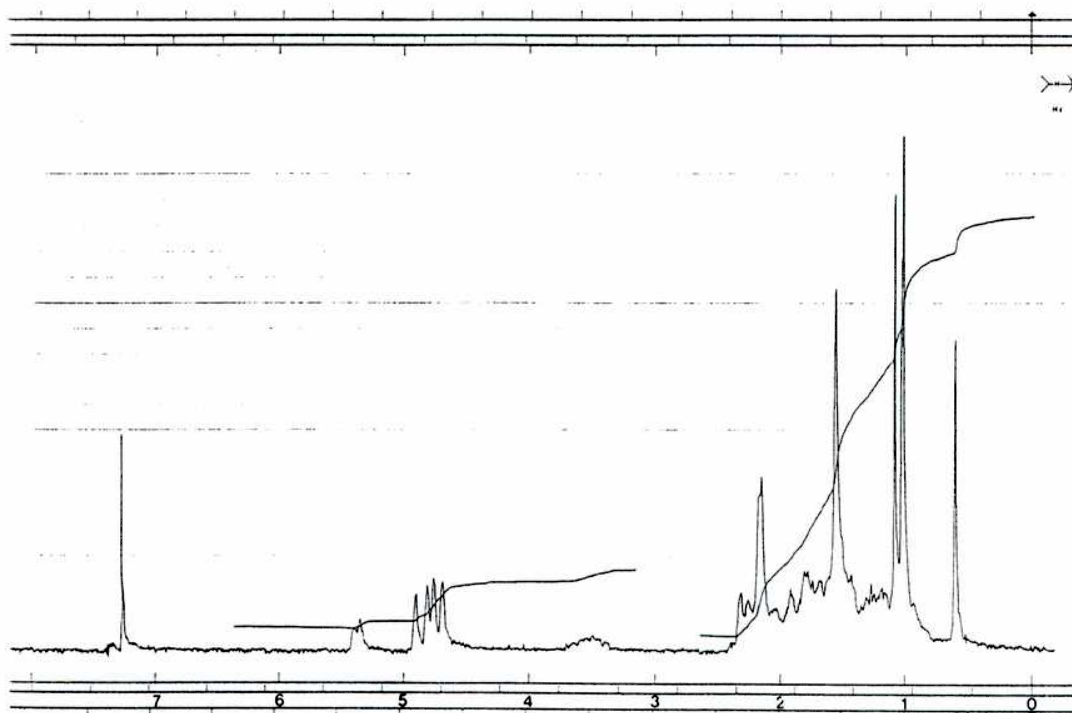
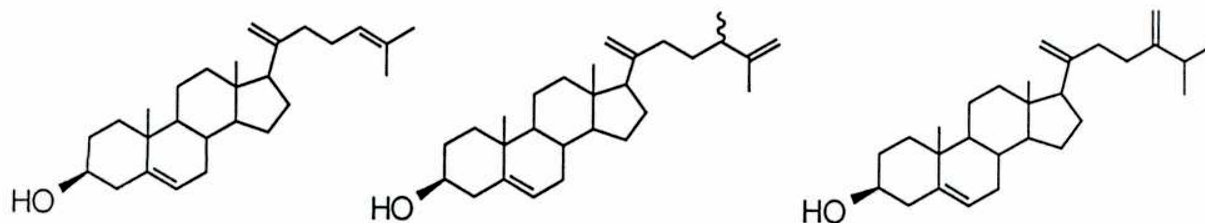


Fig. 25. RMN- $^1\text{H}$  del compuesto X.

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto X mostraba dos carbonos metilénicos  $\text{sp}^2$  (C-21 y C-24 $^1$ ) y dos carbonos cuaternarios  $\text{sp}^2$  (C-20 y C-24). Los desplazamientos químicos para C-25, 26 y 27 eran prácticamente idénticos a los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes de 24-metilencolesterol [82].

Por los motivos expuestos se identificó el compuesto X como 24 $\xi$ -metilcolesta-5,20,24(24 $^1$ )-trien-3 $\beta$ -ol.



Compuesto VIII

Compuesto IX

Compuesto X

Fig. 26. Compuestos VIII-X.

Análisis de la subfracción 1b<sub>2</sub>-B:

Por CGL y RMN-<sup>1</sup>H se observó que esta fracción estaba constituida mayoritariamente por un compuesto (XI) y en menor proporción por los compuestos VIII y X, aislados en la subfracción A.

Por CLAR fue aislado el compuesto mayoritario (XI).

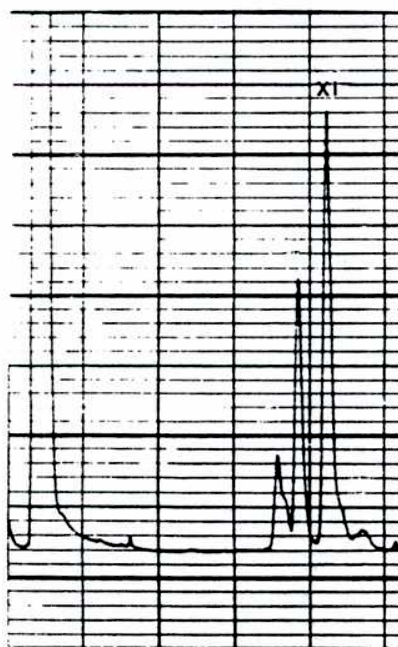


Fig. 27. CLAR de la subfracción 1b<sub>2</sub>-B.

El espectro de masa del compuesto **XI** presentaba el ión molecular con alta abundancia relativa y fragmentos iónicos de menor intensidad generados por pérdida de cadena lateral con transferencia de uno o dos hidrógenos.

El compuesto **XI** mostraba en su espectro de RMN-<sup>1</sup>H las señales correspondientes a dobles enlaces  $\Delta^5$  y  $\Delta^{20}$  y un singulete a 0.60 ppm. Por comparación de estos datos con la literatura [79,80] y en base al espectro de RMN-<sup>13</sup>C, se identificó al compuesto **XI** como colest-5,20-dien-3 $\beta$ -ol.

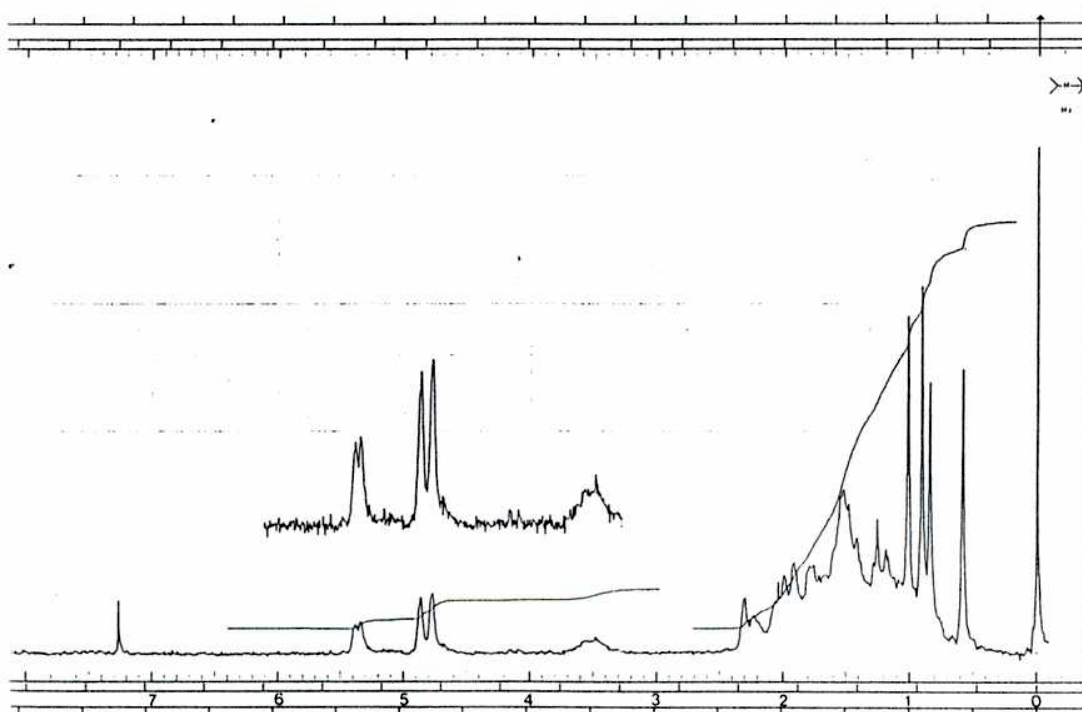


Fig. 28. RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **XI**.

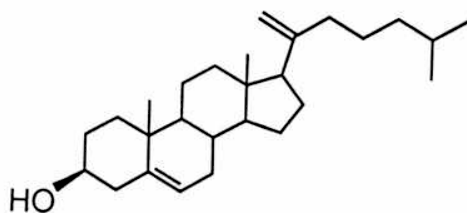


Fig. 29. Compuesto **XI**.

### Análisis de la subfracción 1b<sub>2</sub>-C:

Por CLAR de la subfracción 1b<sub>2</sub>-C fueron colectadas cinco subfracciones C1 a C5.

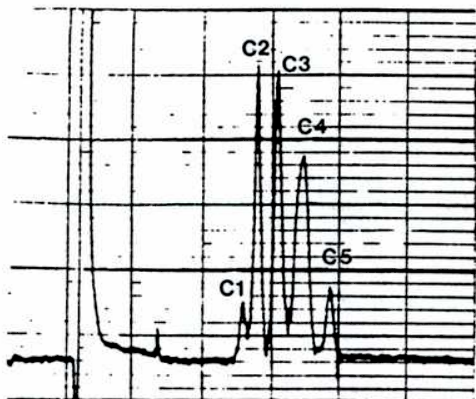


Fig. 30. CLAR de la subfracción C.

La subfracción C1 demostró ser una mezcla compleja al ser analizada por CGL y debido a la baja masa obtenida no pudo ser analizada.

El análisis por CGL y RMN-<sup>1</sup>H de las subfracciones C2 y C3 indicó que estaban constituidas por los compuestos **X** y **XI** respectivamente. El mismo tipo de análisis de la subfracción C4 indicó que estaba constituida principalmente por el compuesto **XII**, el cual fue purificado por CLAR.

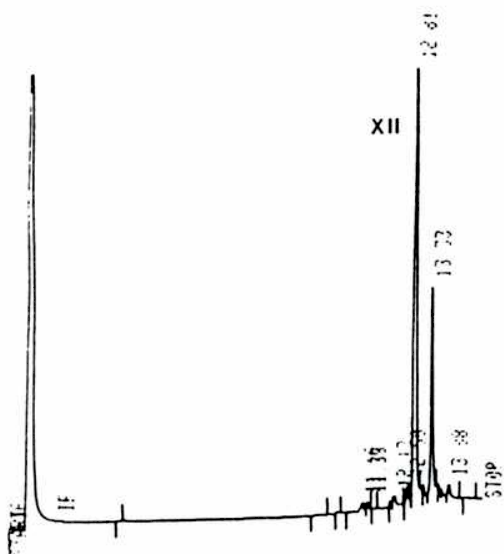


Fig. 31. CGL de la subfracción C4.

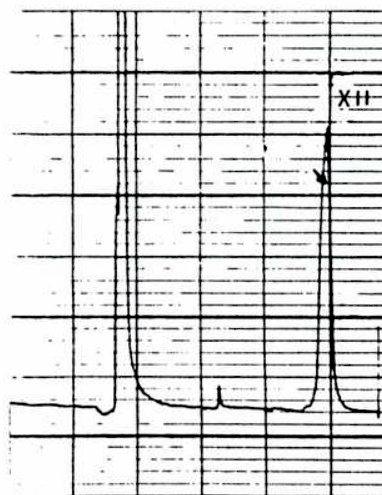


Fig. 32. CLAR de la subfracción C4.

El compuesto responsable del hombro que se observa en el cromatograma de la fig. 32 fue colectado, pero debido a la poca masa obtenida no pudo ser analizado.

El compuesto **XII**, purificado por CLAR, exhibió en su espectro de masa el ión molecular a  $m/z$  398 y fragmentos iónicos a  $m/z$  314 (pico base), 299, 271, 229 y 213, los cuales indicaban la presencia de un derivado esteroideal diinsaturado de 28 carbonos. La presencia de dobles enlaces  $\Delta^5$  y  $\Delta^{20}$  se hizo evidente en su espectro de RMN- $^1\text{H}$ .

El pico base del espectro de masa a  $m/z$  314 podría estar originado en un reordenamiento de Mc Lafferty vía un estado de transición de 6 ó 7 miembros con transferencia del hidrógeno de C-24 ó C-25 a C-21. Este mecanismo fue demostrado por deuteración [79] en el caso de  $5\alpha$ -colest-20-en- $3\beta,6\alpha$ -diol.

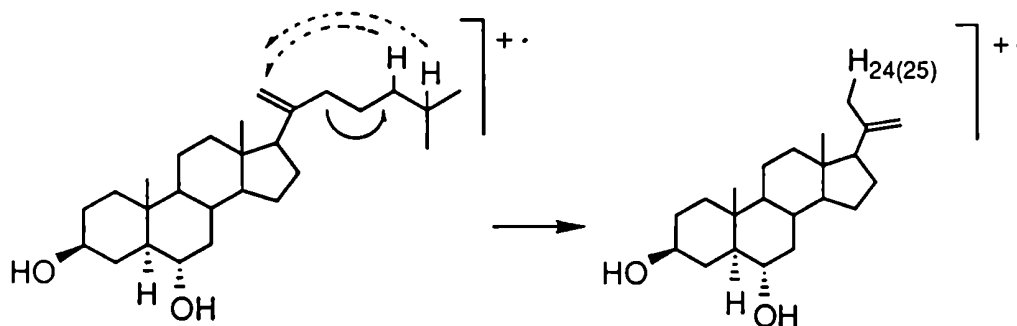


Fig. 33. Origen del fragmento con reordenamiento tipo  
Mc Lafferty.

Este fragmento fue poco abundante en el espectro de masa del compuesto **XI**, concordantemente con los valores publicados por Djerassi [79] para ese compuesto.

Sobre la base de estos datos y por comparación con el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de campesterol [83] el compuesto **XII** fue identificado como 24ξ-metilcolesta-5,20-dien-3β-ol.

En el análisis por CGL y RMN-<sup>1</sup>H, la subfracción C5 mostró estar constituida por un compuesto puro (**XIII**).

El compuesto **XIII** exhibía en su espectro de masa el ión molecular a m/z 412 y fragmentos iónicos característicos de esteroides diinsaturados de 29 carbonos. El pico base del mismo, m/z 314, fue adjudicado como en el caso del compuesto **XII** a un reordenamiento tipo Mc Lafferty.

Las insaturaciones fueron caracterizadas como Δ<sup>5</sup> y Δ<sup>20</sup> sobre la base del espectro de RMN-<sup>1</sup>H, y la presencia de un grupo etilo en posición 24 se hizo evidente por comparación con el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de sitosterol [83].

Se identificó el compuesto **XIII** como 24ξ-etilcolesta-5,20-dien-3β-ol.

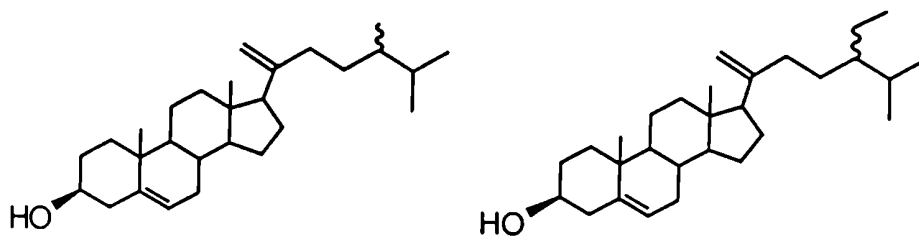


Fig. 34. Compuestos **XII** y **XIII**.



### Análisis de la subfracción 1b<sub>2</sub>-D:

Por CLAR de la subfracción 1b<sub>2</sub>-D fueron colectadas cuatro subfracciones: D1 a D4.

Por CGL de las subfracciones D1 y D4 se observó que estaban constituidas por los compuestos **XI** y **XIII** respectivamente.

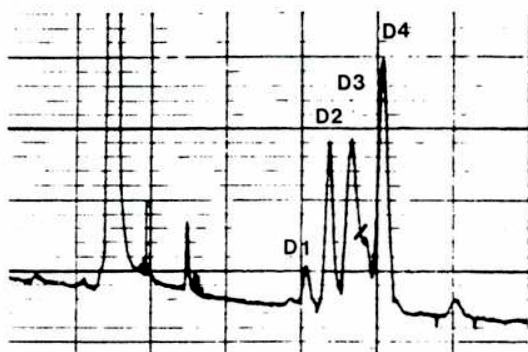


Fig. 35. CLAR de la subfracción 1b<sub>2</sub>-D.

Las subfracciones D2 y D3 mostraron por CGL estar constituidas por mezclas de dos compuestos principalmente, que se purificaron por CLAR, obteniéndose los compuestos **XIV** y **XV**.

Sobre la base de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y EM se identificó el compuesto **XIV** como colest-5,24-dien-3 $\beta$ -ol (desmosterol) y el compuesto **XV** como 24 $\xi$ -metilcolest-5,24(24<sup>1</sup>)-dien-3 $\beta$ -ol (24-metilencolesterol) [81, 82, 84, 85].

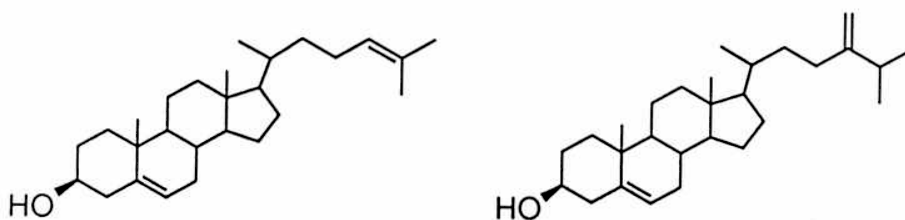


Fig. 36. Compuestos **XIV** y **XV**.

### Análisis de la subfracción 1b<sub>2</sub>-E:

Por CLAR de la subfracción 1b<sub>2</sub>-E fueron colectadas tres subfracciones. Por CGL se observó la presencia del compuesto **XIV** en la primer subfracción, el compuesto **XV** en la segunda y el compuesto **XIII** en la tercera.

### Análisis de la subfracción 1b<sub>2</sub>-F:

El análisis por CGL de la subfracción 1b<sub>2</sub>-F y la comparación con muestras auténticas permitieron identificar en ella los fitoesteros: colest-5-en-3β-ol (colesterol **XVI**), 24ξ-metilcolest-5-en-3β-ol (campesterol **XVII**), 24ξ-etilcolest-5,22-dien-3β-ol (estigmasterol **XVIII**) y 24ξ-etilcolest-5-en-3β-ol (sitosterol **XIX**).

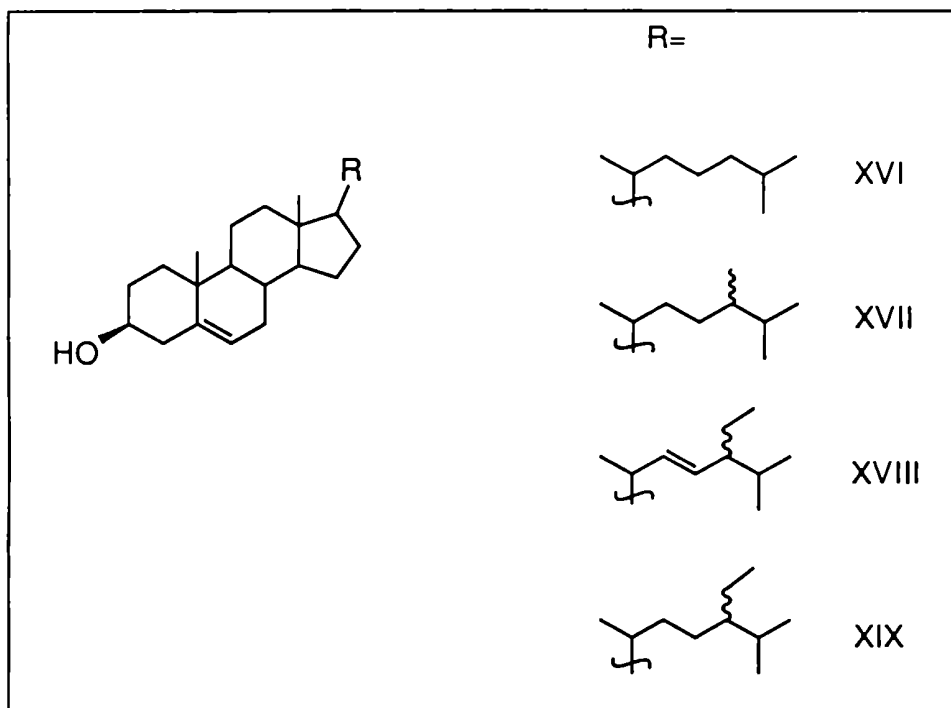
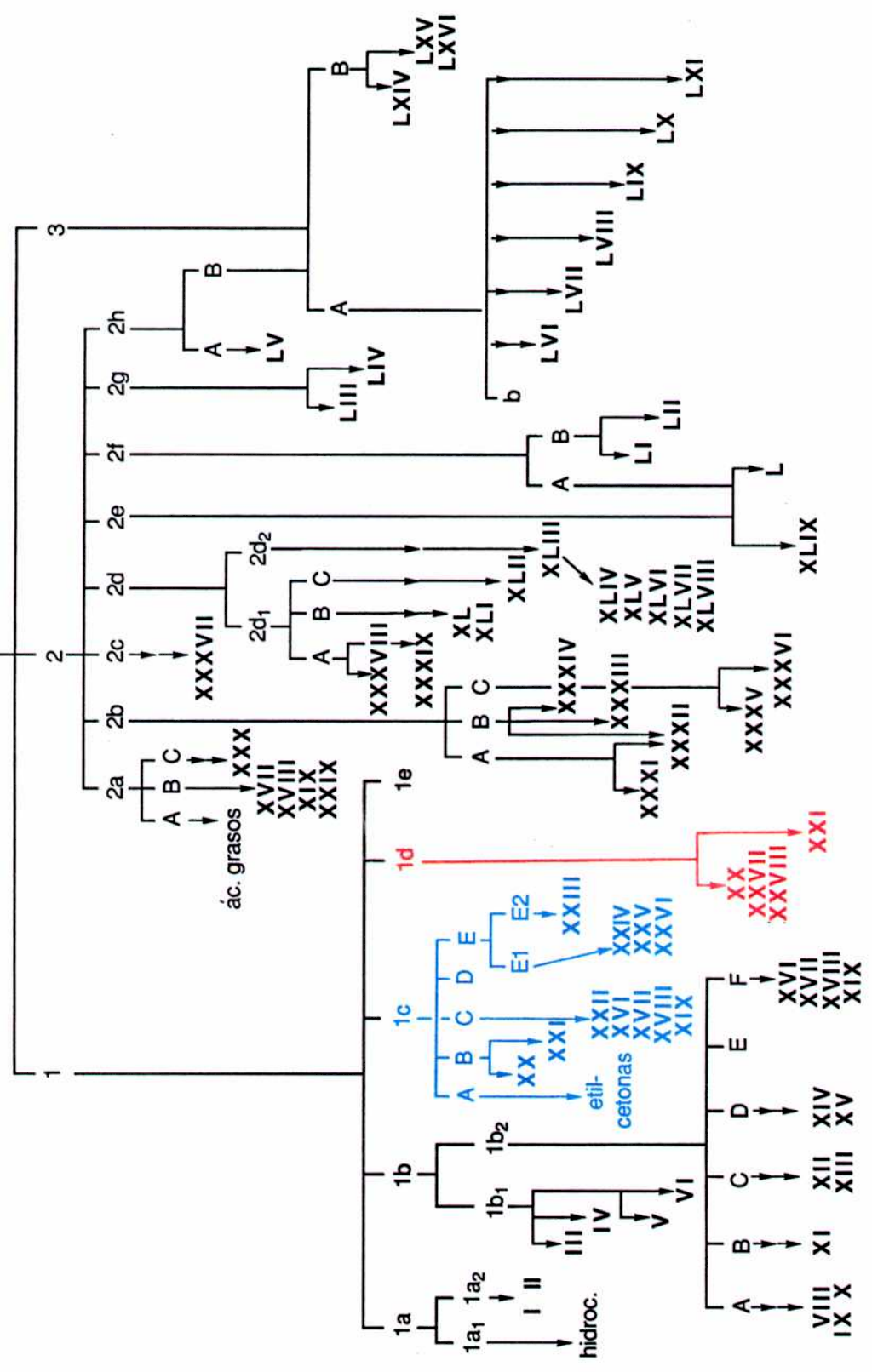


Fig. 37. Compuestos **XVI**, **XVII**, **XVIII** y **XIX**.

Extracto etanólico de *Mandevilla pentlandiana*



Esquema de fraccionamiento del extracto etanólico de raíz de *Mandevilla pentlandiana*.

Cabe destacar que los compuestos VIII a XIX aislados de la subfracción 1b se hallaban presentes en el extracto como ésteres de ácidos grasos. Los compuestos VIII a XIII son nuevos como productos naturales [86].

Subfracción 1c:

La ccd de la subfracción presentó una sola mancha, alargada, que revelaba marrón con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%. Su espectro de RMN-<sup>1</sup>H indicó que estaba constituida por ésteres de ácidos grasos como la subfracción anterior, no presentando el espectro señales características de otro tipo de compuestos.

Por saponificación de la subfracción se obtuvieron, después de la extracción con solvente orgánico, dos subfracciones: la fase acuosa, conteniendo las sales de los ácidos grasos, y la fase orgánica.

La fase acuosa tratada convenientemente (ver parte experimental) rindió los ésteres metílicos de los ácidos grasos componentes. El análisis de los mismos por CGL, CGL-EM y comparación con compuestos patrón indicó la siguiente composición:

Ester metílico / composición porcentual

C	15:1	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	16:3	14:3	no identificados
%	4.9	17.8	3.9	15.3	30.0	5.3	17.1	1.6	4.1

La fase orgánica proveniente de la saponificación fue fraccionada mediante cromatografía flash en columna seca con un sistema de solventes hexano-AcOEt. Se obtuvieron cinco subfracciones A a E.

### Análisis de la subfracción 1c-A:

El análisis por CGL de la subfracción indicó que estaba compuesta por una mezcla muy compleja y debido a la escasa cantidad de la misma se efectuó su análisis sólo por CGL-EM. Este análisis permitió concluir que la fracción estaba compuesta por etilcetonas lineales [70, 87] de 13 y 15 a 19 átomos de carbono.

### Análisis de la subfracción 1c-B:

Utilizando CGL y CGL-EM, y por comparación con muestras auténticas pudieron identificarse  $\beta$ -amirina (**XX**) y lupeol (**XXI**) [88] en esta subfracción.

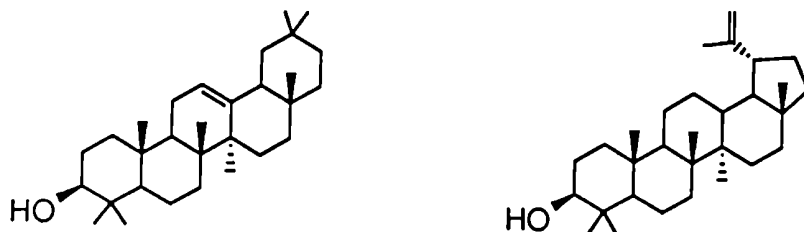


Fig.38. Compuestos **XX** y **XXI**.

### Análisis de la subfracción 1c-C:

Por CGL se observó que esta subfracción era muy compleja y que los componentes mayoritarios eran fitoesteroles comunes. Debido a que se obtuvo poca masa se realizó el análisis de la misma por CGL, CGL-EM y comparación

con muestras auténticas. Fueron identificados los compuestos **XXII** (Colest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol), **XVI** (colesterol), **XVII** (campesterol), **XVIII** (estigmasterol) y **XIX** (sitosterol).

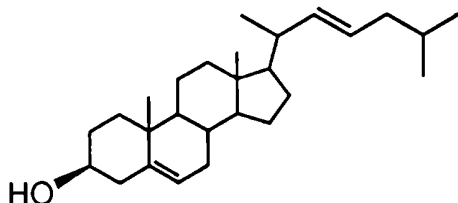


Fig. 39. Compuesto **XXII**.

#### Análisis de la subfracción 1c-D:

Esta subfracción no fue analizada debido a su complejidad y la poca masa obtenida de la misma.

#### Análisis de la subfracción 1c-E:

La subfracción E por CGL mostraba tener un componente mayoritario de tr elevado. La purificación de la misma fue efectuada empleando CLAR en columna de fase reversa RP-18. Se colectaron dos subfracciones E1 y E2 (mayoritaria). E1 fue obtenida en baja cantidad y sólo fue analizada por CGL y CGL-EM. La subfracción E2 contenía un compuesto puro (**XXIII**) que fue identificado de la siguiente forma. El compuesto **XXIII** indicaba por su espectro de RMN-<sup>1</sup>H la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 $\beta$  y la ausencia de

hidrógenos vinílicos. El espectro de masa exhibía el ión molecular a  $m/z$  430 correspondiente a una fórmula molecular  $C_{29}H_{50}O_2$ . Picos diagnóstico resultaron los fragmentos a  $m/z$  359 (pérdida de anillo A de 6-cetoesteroides conteniendo una cadena lateral  $C_{10}H_{11}$ ) y  $m/z$  290 (pérdida de anillos A y B en el mismo tipo de cetoesteroides) [89,90].

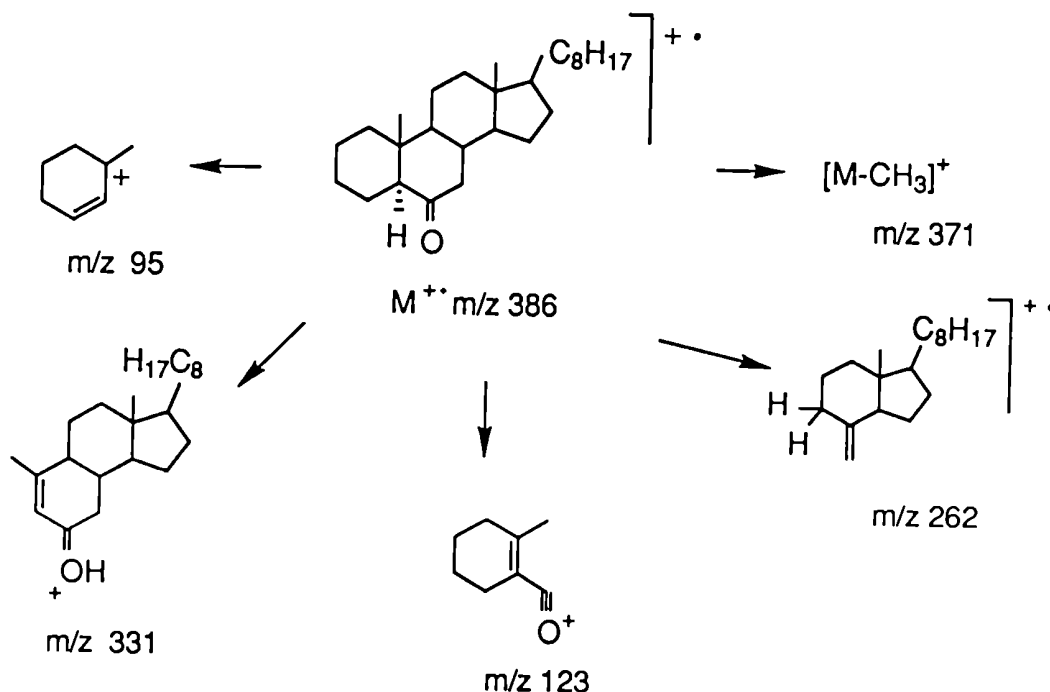


Fig. 40. Fragmentos diagnóstico en EM de 6-cetoesteroides [90].

La estructura fue confirmada por RMN- $^{13}C$ . El espectro mostraba claramente la presencia de 29 señales, un grupo carbonilo y la ausencia de señales olefínicas. Sobre la base de este espectro se pudo elucidar la posición del hidroxilo en  $3\beta$  y por comparación con el espectro de sitosterol [91] pudieron asignarse los carbonos de la cadena lateral. El grupo carbonilo fue confirmado en la posición 6 en vista de los corrimientos de C-5 y C-19 [92]. El espectro resultó similar al informado para colestán-6-ona [93].

Teniendo en cuenta los datos expuestos se identificó el compuesto **XXIII** como 3 $\beta$ -hidroxi-24 $\xi$ -etil-5 $\alpha$ -coleston-6-ona.

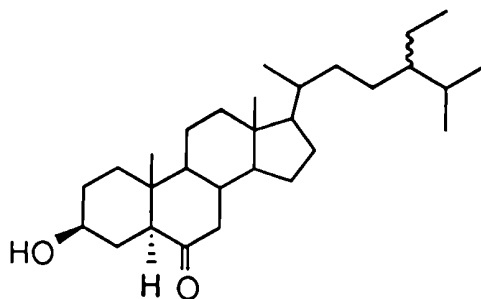


Fig. 41. Compuesto **XXIII**.

En la subfracción E1 pudieron identificarse los compuestos **XXIV**, **XXV** y **XXVI**. Estos compuestos presentaron fragmentaciones similares a las del compuesto **XXIII**, siendo por este motivo caracterizados como 6-cetoestanoles.

El compuesto **XXIV** mostraba en su espectro de masa el ión molecular a  $m/z$  402 y fragmentos a  $m/z$  331, 289 (pérdida de cadena lateral) y 262 indicando la presencia de una cadena lateral  $C_8H_{17}$ . Por lo tanto el compuesto **XXIV** fue identificado como 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -coleston-6-ona.

Análogamente el compuesto **XXV** presentó en EM el ión molecular a  $m/z$  418 y fragmentos a  $m/z$  345, 289 y 276 indicando la presencia de una cadena lateral  $C_9H_{19}$  y fue identificado como 3 $\beta$ -hidroxi-24 $\xi$ -metil-5 $\alpha$ -coleston-6-ona.

El espectro de masa del compuesto **XXVI** exhibía el ión molecular a  $m/z$  428 y fragmentos a  $m/z$  357 y 288 correspondientes a un compuesto de 29 carbonos con cadena lateral monoinsaturada y fue identificado como 3 $\beta$ -hidroxi-24 $\xi$ -etil-5 $\alpha$ -colest-22-en-6-ona. La baja abundancia de los fragmentos a  $m/z$  330 y 287 refuerzan la caracterización de la insaturación  $\Delta^{22}$  [81].



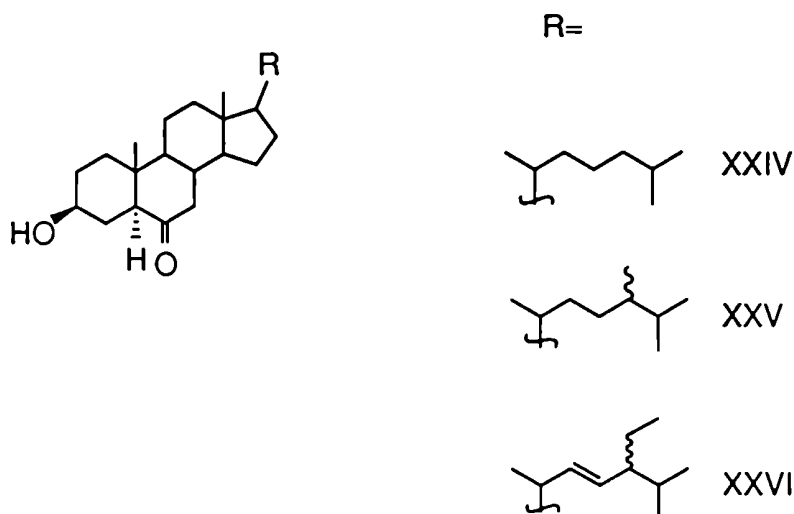


Fig. 42. Compuestos **XXIV**, **XXV** y **XXVI**.

Cabe destacar que los compuestos **XVI** a **XXVI** aislados en la subfracción 1c se encontraban en el extracto original como ésteres de ácidos grasos.

Los compuestos **XXIII** a **XXVI** son nuevos como productos naturales [86].

### Subfracción 1d

Por ccd se observó principalmente una mancha que revelaba de color anaranjado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%. Los componentes de la misma fueron purificados por cromatografía flash en columna seca y posteriormente cromatografía en columna de sílica. El análisis por CGL reveló que se trataba principalmente de dos compuestos **XX** y **XXI**, los cuales fueron separados por CLAR con columna de fase reversa.

Los mismos fueron identificados como β-amirina (**XX**) y lupeol (**XXI**) sobre la base de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM [71-76, 88, 94-97].

Se observó además por CGL que el compuesto **XX** estaba contaminado (5% en total) con otros dos componentes, **XXVII** y **XXVIII**, que fueron identificados por coinyección con muestras auténticas como los alcoholes lineales de 16 y 18 átomos de carbono, hexadecanol (**XXVII**) y octadecanol (**XXVIII**).

### Subfracción 1e

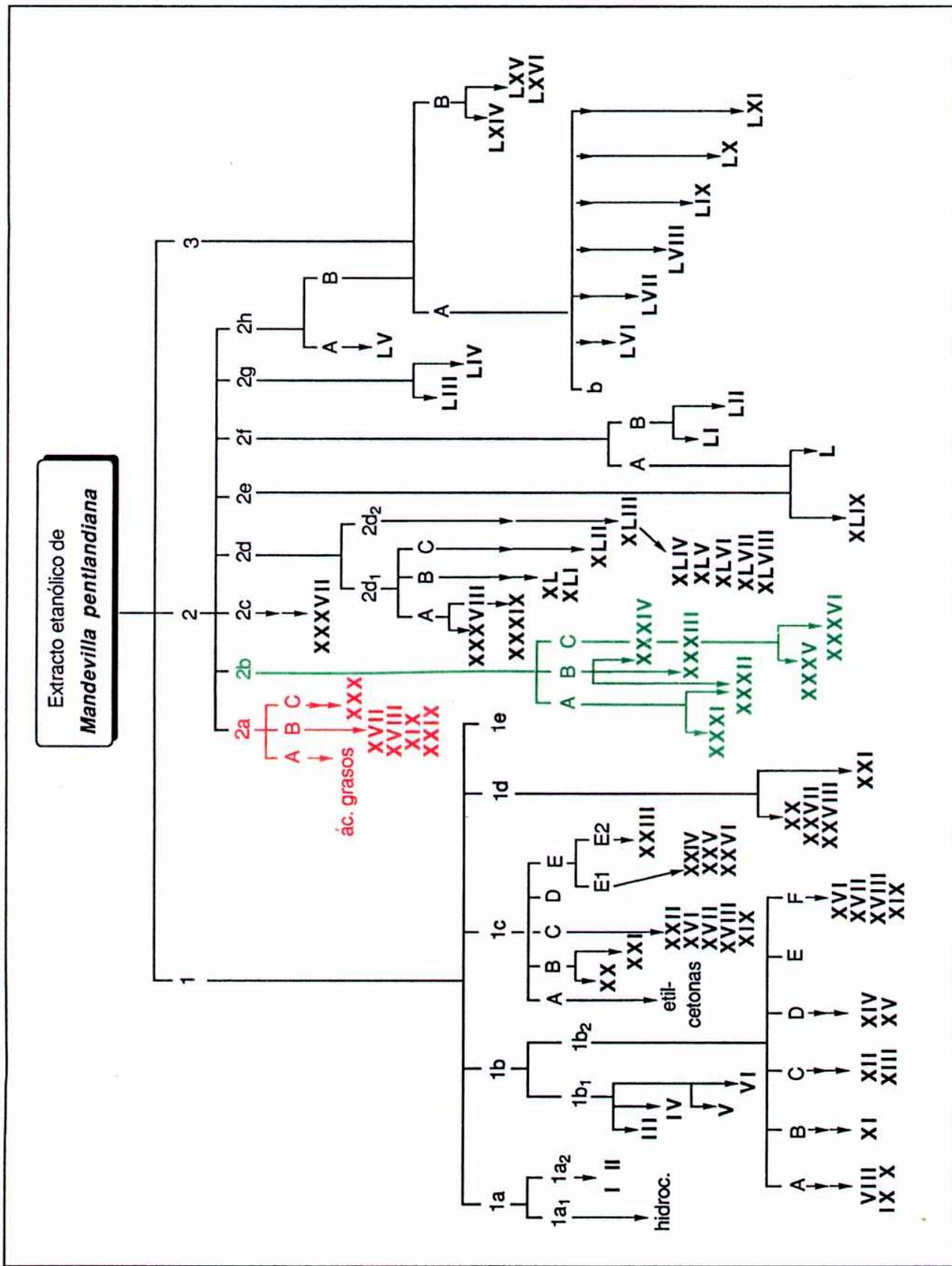
Por ccd se observó que la subfracción estaba compuesta principalmente por ácidos grasos y esteroides. Fue analizada entonces junto con la fracción siguiente, de igual contenido.

### Análisis de la fracción 2

Esta fracción, eluida con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 25% a partir del extracto original, presentó también un aspecto oleoso. Por cromatografía flash en columna seca con un sistema de solventes hexano-acetona fue subdividida en ocho subfracciones 2a-2h.

### Subfracción 2a

Esta subfracción fue cromatografiada en columna de Sephadex LH-20, colectándose las subfracciones A, B y C. Por ccd se observó que la subfracción A se encontraba enriquecida en ácidos grasos, la subfracción B en esteroides y la subfracción C presentaba, además de la mancha correspondiente a esteroides, otra mancha de mayor  $R_f$  que revelaba de color anaranjado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50%.



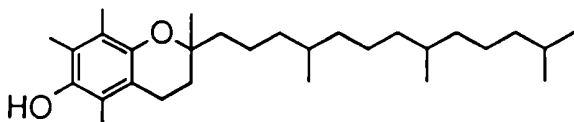
Esquema de fraccionamiento del extracto etanólico de raíz de *Mandevilla pentlandiana*.

Una porción de la subfracción A fue metilada con  $\text{CH}_2\text{N}_2$ . Los ésteres metílicos de los ácidos grasos así obtenidos fueron purificados por cromatografía en capa preparativa y fueron analizados por CGL, CGL-EM y por comparación con muestras auténticas. Se obtuvo el siguiente resultado:

Ester metílico/composición porcentual:

C	16:0	17:0	15:3	18:0	18:1	18:2	no identificados
%	43.2	2.3	1.4	7.4	20.1	18.8	6.8

La subfracción B fue analizada por CGL por comparación con muestras auténticas y por CGL-EM. Fueron identificados los compuestos campesterol, estigmasterol y sitosterol (**XVII-XIX**) y el compuesto **XXIX**, que sobre la base de su espectro de masa característico [98,99] fue identificado como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).



**Fig. 43.** Compuesto **XXIX**.

Por cromatografía en columna de la subfracción C y posterior purificación por cromatografía en capa preparativa se obtuvo el compuesto **XXX**.

El compuesto **XXX** presentaba en su espectro de masa el ión molecular  $m/z$  230, indicando la fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$  y por lo tanto la presencia de 7 insaturaciones. También se observaban en el espectro fragmentos iónicos importantes por pérdida de 29, 42 y 43 u a  $m/z$  201, 188 (pico base) y 187.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se destacaban un singulete a  $\delta$  9.95, indicativo de la presencia de una función aldehído y tres singuletes que integraban para tres hidrógenos cada uno, a 0.92, 1.32 y 1.93 ppm.

Su espectro de RMN-<sup>13</sup>C indicaba la presencia en la molécula de dos grupos carbonilo  $\alpha,\beta$  no saturados a 202.2 y 191.6 ppm, y cuatro carbonos cuaternarios  $sp^2$ . El espectro UV confirmó la presencia de sistemas conjugados.

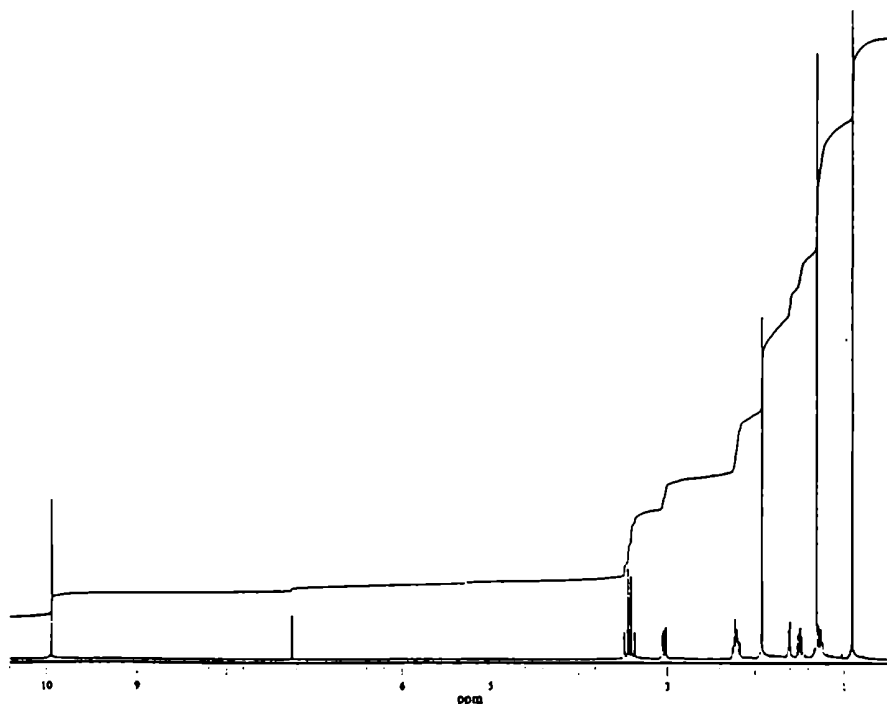


Fig. 44. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **XXX**.

Comparando con datos de literatura [100, 101] sobre distintos esqueletos de sesquiterpenos, se dedujo que el único esqueleto conocido que cumplía con los requisitos exigidos por los datos espectroscópicos era el esqueleto aromadendrano.

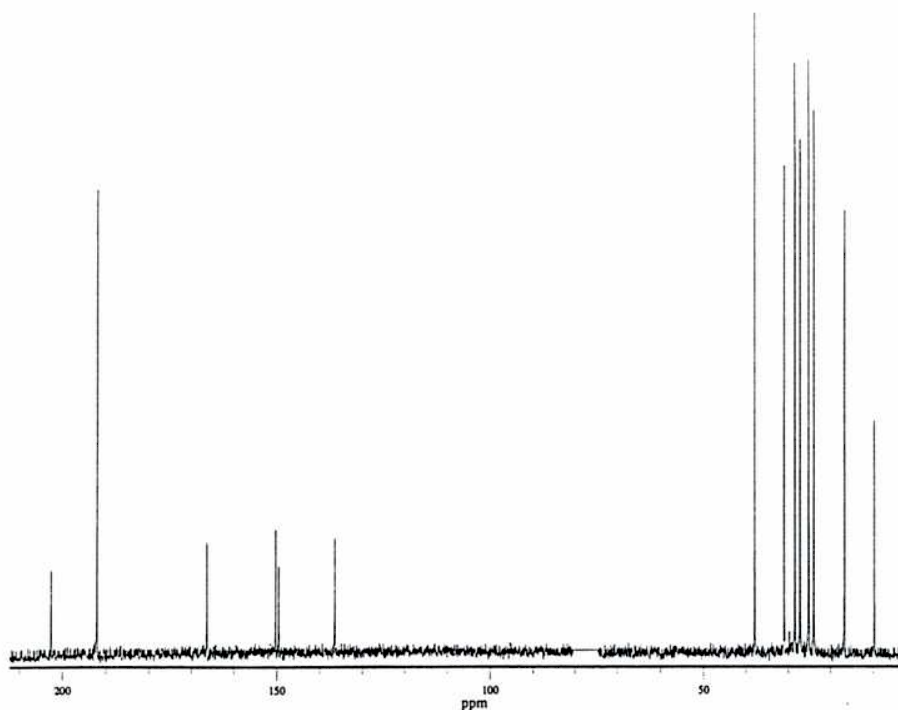


Fig. 45. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto **XXX**.

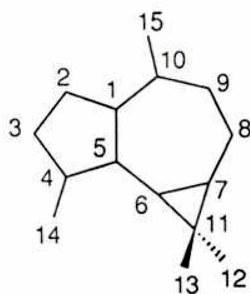


Fig. 46. Esqueleto aromadendrano y su numeración.

Uno de los grupos carbonilo fue ubicado en la posición 3, teniendo en cuenta el desplazamiento químico del grupo metilo en posición 14 a  $\delta$  9.6 en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  por comparación con los espectros de otras moléculas

con sistemas similares [102]. El otro grupo carbonilo correspondiente a un aldehído se ubicó en la posición 15.

Para confirmar la estructura planteada y asignar unívocamente las señales de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizaron los siguientes experimentos: COSY H,H, para determinar las conexiones entre H vecinos; HMQC [103], para correlacionar H y C directamente unidos y HMBC [104] (figura 48), para correlacionar C e H conectados a más de un enlace y hasta cuatro enlaces. Estos datos se encuentran en la tabla 1.

El compuesto **XXX** fue identificado como (+)-aromadendra-1(10),4-dien-15-al-3-ona. Este compuesto no había sido informado previamente en la literatura.

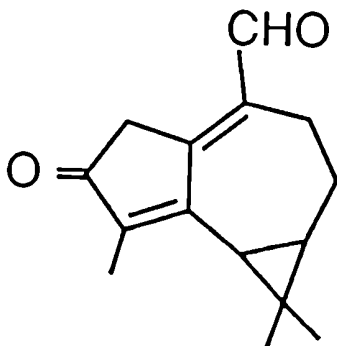


Fig. 47. Compuesto **XXX**.

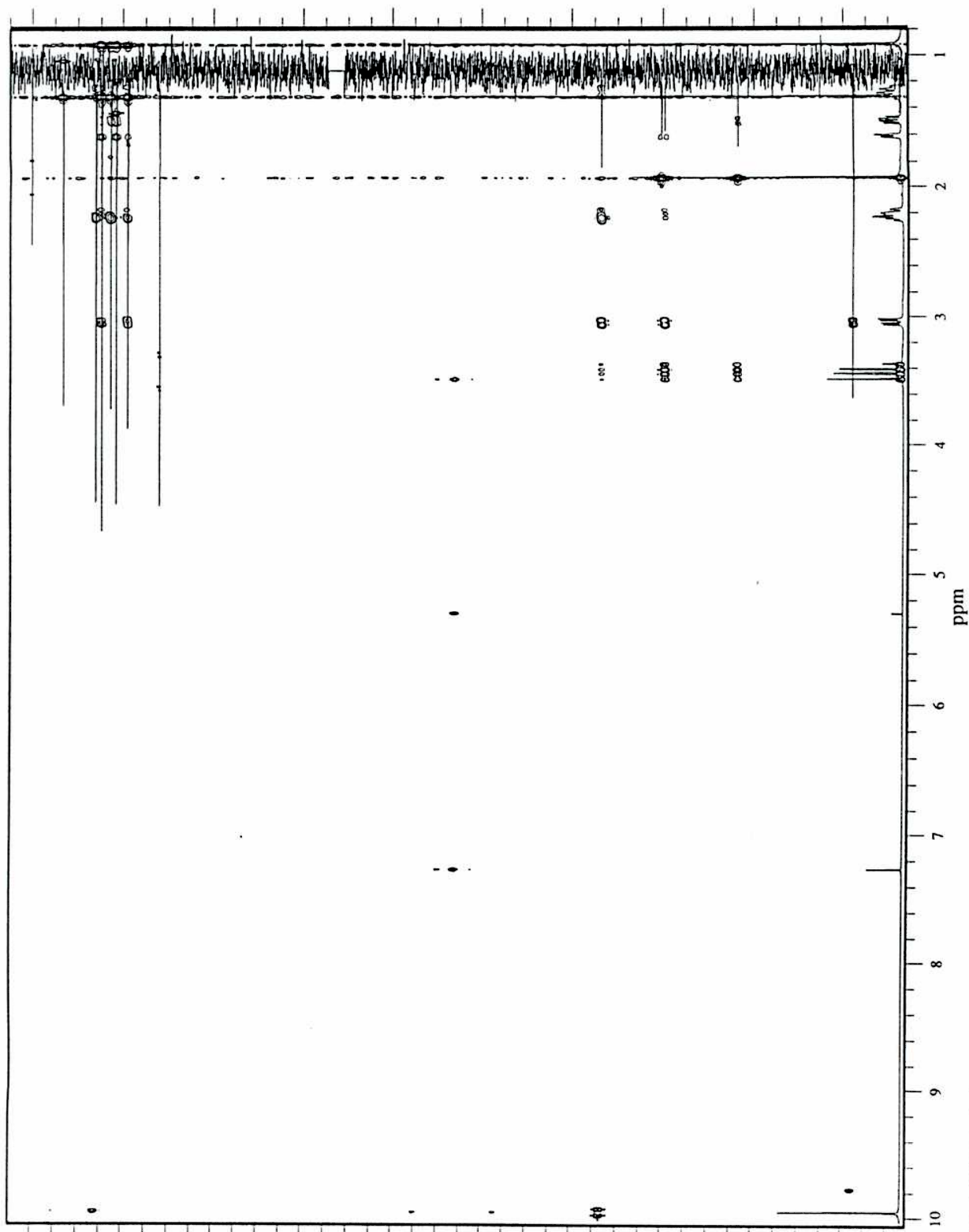


Fig. 48. HMBC del compuesto XXX.



	RMN- <sup>13</sup> C	RMN- <sup>1</sup> H	COSY	HMBC
C-1	150.15			
C-2	37.86	3.42 (2H, m AB)	H-6, H-9b, H-15	H-2, H-6, H-9a, H-9b
C-3	202.49			H-2, H-14
C-4	149.42			H-6, H-14
C-5	166.18			H-2, H-7, H-14
C-6	27.10	1.62 (1H, br d, J= 8.5 Hz)	H-2, H-7, H-14	H-7, H-8a
C-7	30.87	1.50 (1H, ddd, J= 10.1, 8.5 and 7.3 Hz)	H-6, H-8a, H-8b	H-6, H-8a, H-8b, H-9a, H-9b, H-12, H-13
C-8	25.12	a 2.23 (1H, m) b 1.26 (1H, m)	H-7, H-8b, H-9a H-7, H-8a, H-9a, H-9b	H-6, H-9a, H-9b
C-9	23.84	a 3.04 (1H, ddd, J= 17.4, 7.0 and 1.2 Hz) b 2.20 (1H, m)	H-2, H-8b, H-9a	H-8a, H-8b, H-9b
C-10	136.26			H-8a, H-8b
C-11	25.02			H-7, H-8b, H-12, H-13
C-12	28.33	1.31 (3H, s)		H-6, H-7, H-13
C-13	16.63	0.91 (3H, s)		H-12
C-14	9.63	1.93 (3H, s)	H-6, H-15	
C-15	191.90	9.95 (1H, s)	H-2, H-14	H-9a

**Tabla 1.** Datos espectroscópicos del compuesto **XXX**

### Subfracción 2b

La subfracción 2b presentaba en ccd una mancha indefinida y alargada, que revelaba marrón con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%. La subfracción fue cromatografiada en columna de Sephadex LH-20 y se observó por ccd que la misma estaba compuesta principalmente por tres manchas.

Por cromatografía flash en columna seca fue dividida en tres subfracciones A, B y C, cada una enriquecida en una mancha por ccd.

Por CLAR, la subfracción A rindió dos compuestos **XXXI** y **XXXII**, la subfracción B rindió además del compuesto **XXXII** los compuestos **XXXIII** y **XXXIV** y de la subfracción C se obtuvieron los compuestos **XXXV** y **XXXVI**.

Los compuestos **XXXI** y **XXXII** fueron purificados por CLAR con columna de fase reversa RP-18 de tamaño de partícula de 5 μm.

Sobre la base de su espectro de masa, sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de su derivado metilado (**XXXIa**) y por comparación con datos de literatura [74, 76, 105], el compuesto **XXXI** fue identificado como ácido oleanoico.

El compuesto **XXXII** fue identificado como ácido ursólico sobre la base de los datos de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM y por comparación con datos de literatura [74, 76, 95].

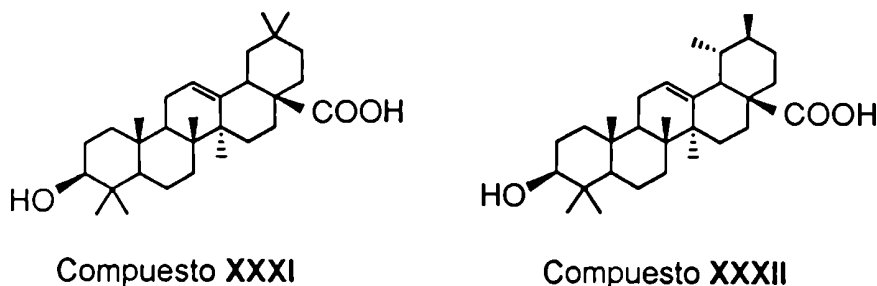


Fig. 49. Compuestos **XXXI** y **XXXII**.

Los compuestos **XXXIII** y **XXXIV** fueron identificados como los peróxidos de esteroides  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-(22E)- $5\alpha$ -ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (**XXXIII**) y  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-(22E)- $5\alpha$ -ergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (**XXXIV**), sobre la base de sus datos espectroscópicos por comparación con datos informados en la literatura [106-110].

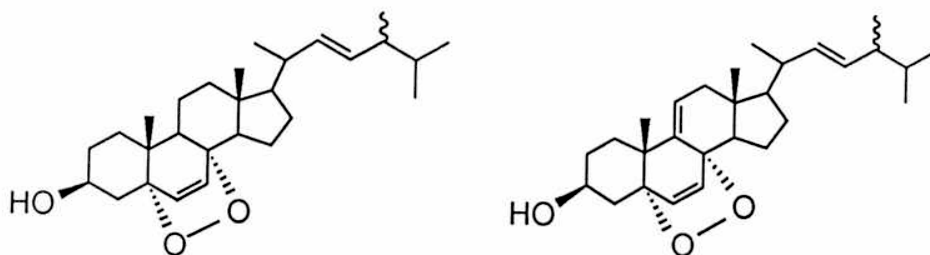


Fig. 50. Compuestos **XXXIII** y **XXXIV**.

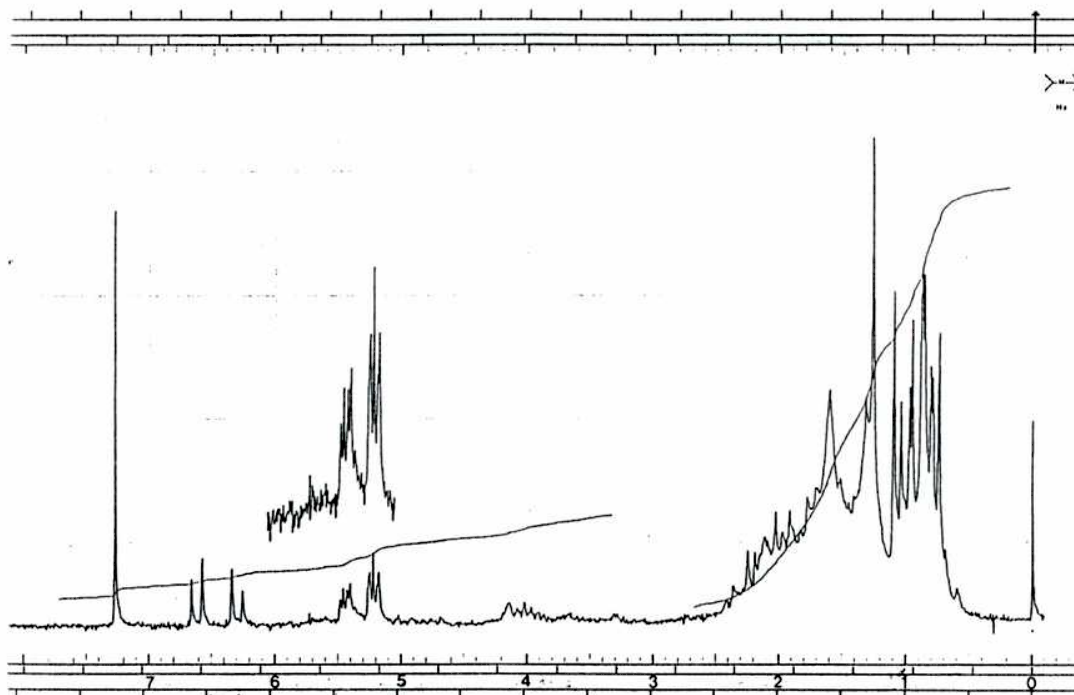


Fig. 51. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto **XXXIV**.

Los compuestos **XXXV** y **XXXVI** fueron identificados sobre la base de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y EM como los monoglicéridos de los ácidos grasos C 16:0 y C 18:1, 1-O-[hexadecanoil]-*sn*-glicerol (**XXXV**) y 1-O-[(9Z)-octadeca-9-enoil]-*sn*-glicerol (**XXXVI**).

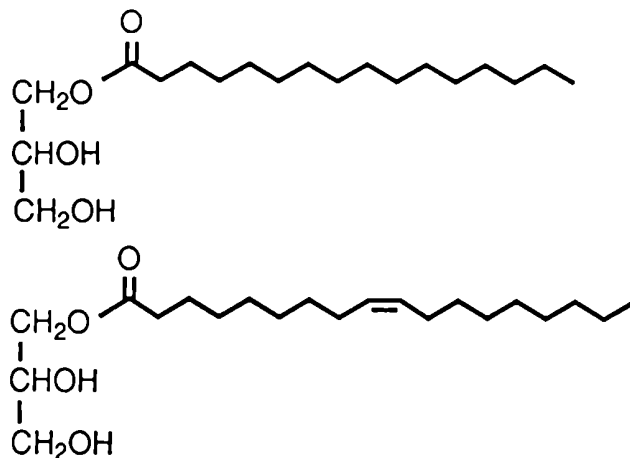


Fig. 52. Compuestos **XXXV** y **XXXVI**.

### Subfracción 2c

Esta subfracción presentaba por ccd un aspecto muy complejo. Por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 de la misma se obtuvieron sólo dos subfracciones factibles de ser analizadas teniendo en cuenta su masa y composición por ccd.

Una de esas subfracciones contenía los compuestos **XXXI** y **XXXII**, aislados en la subfracción anterior, mientras que de la otra precipitó en el solvente utilizado para la cromatografía en Sephadex LH-20 (MeOH) un sólido blanco insoluble en solventes orgánicos. En vista de ello la sustancia **XXXVII** fue acetilada con Ac<sub>2</sub>O-Py y purificada por cromatografía en capa preparativa.

Sobre la base de los datos de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de **XXXVIIa**, derivado acetilado de **XXXVII**, ésta última fue identificada como 6-O-acilglucósido de sitosterol donde los grupos acilo eran ésteres de ácidos grasos [111-114].

Para analizar la composición de los ácidos grasos presentes y la posible presencia de otros esteroides minoritarios, el derivado **XXXVIIa** fue saponificado. Los ácidos grasos libres obtenidos de esta manera fueron metilados y analizados por CGL por comparación con muestras auténticas, pudiéndose confirmar la presencia de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de C 16:0, C 18:0, C 18:1 y C 18:2 en relación 5:1:1:3.

La fase orgánica proveniente de la saponificación de **XXXVIIa** fue hidrolizada con MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y extraída convenientemente de modo de obtener los α- y β-metilglucósidos por un lado y los esteroides por otro.

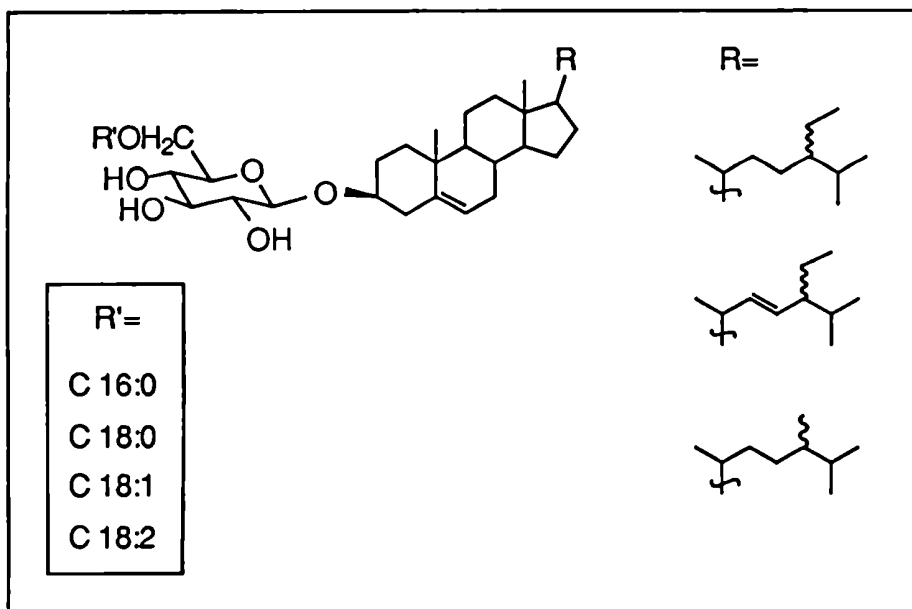


Fig. 53. Sustancia **XXXVII**.

Los metilglucósidos fueron acetilados y comparados por CGL con muestras auténticas. Los esteroides fueron analizados por CGL observándose la presencia de los fitoesteroides comunes sitosterol (XIX) 76.1%, estigmasterol (XVIII) 14.9% y campesterol (XVII) 7.6%.

Sobre la base de estos datos se concluyó que la sustancia XXXVII era fitoesterol 3-O-[6-O-acil- $\beta$ -D-glucopiranosido] como se indica en la figura 53.

### Subfracción 2d

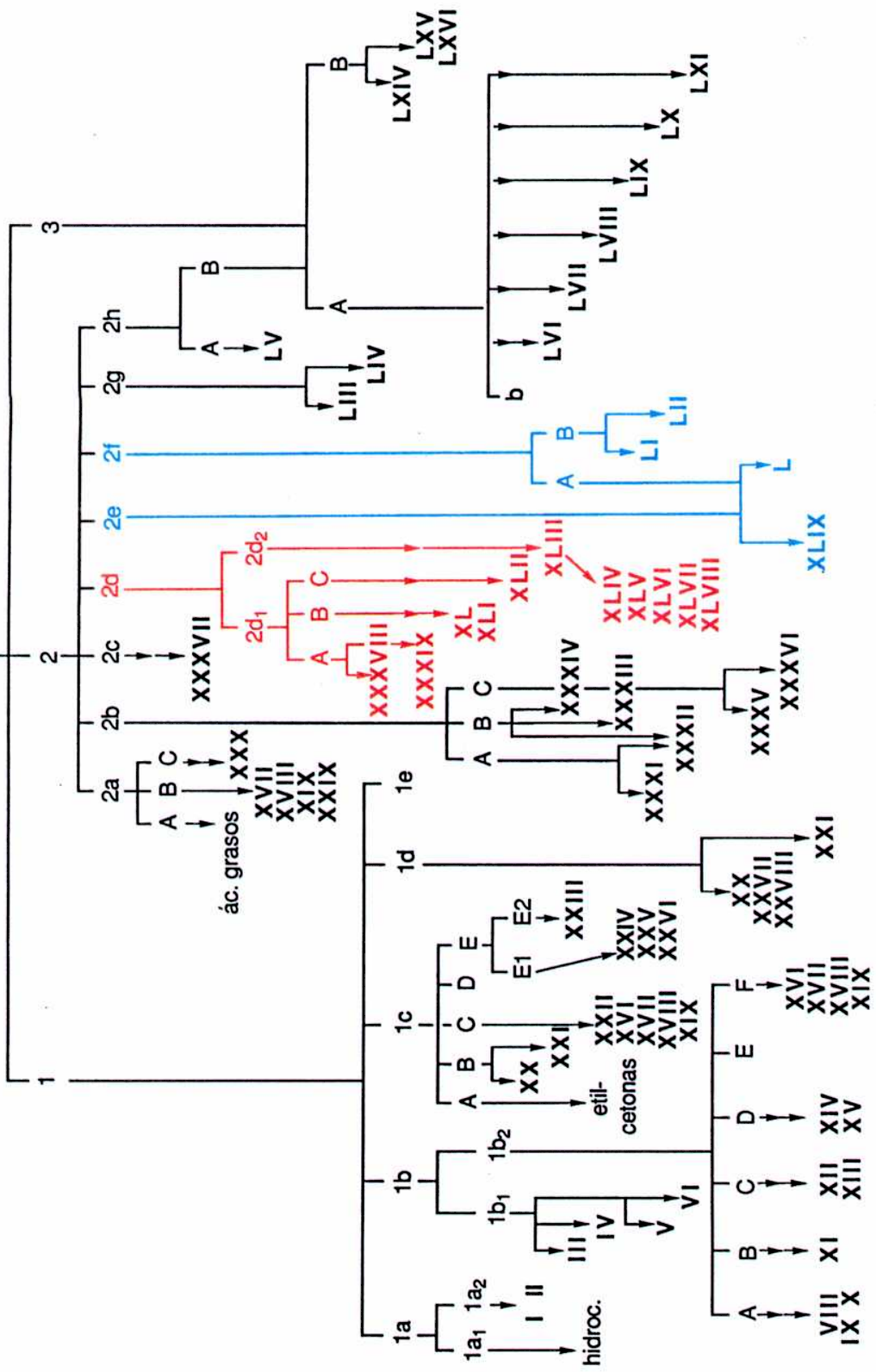
Por ccd se observaban en esta subfracción principalmente dos grupos de sustancias con diferente Rf. Aprovechando esta característica la misma fue subdividida en 2d<sub>1</sub> y 2d<sub>2</sub> por cromatografía flash en columna seca.

### Análisis de la subfracción 2d<sub>1</sub>

Esta subfracción fue cromatografiada en columna de Sephadex LH-20, colectándose las subfracciones A, B y C.

La subfracción A por ccd mostró estar constituida por más de un compuesto y por ello fue separada por CLAR en columna de fase reversa RP-18. Se obtuvieron los compuestos XXXVIII y XXXIX. El compuesto XXXVIII fue purificado por la misma técnica.

Extracto etanólico de *Mandevilla pentlandiana*



Esquema de fraccionamiento del extracto etanólico de raíz de *Mandevilla pentlandiana*.

Sobre la base de los datos espectroscópicos de los compuestos **XXXVIII** y **XXXIX** y del derivado acetilado de **XXXVIII** (**XXXVIIIa**) y por comparación con muestras auténticas de digitoxigenina y oleandrigenina acetilada y con datos de literatura [64, 115, 116], el compuesto **XXXVIII** fue identificado como 16 $\beta$ -O-acetil-3 $\beta$ ,14 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -card-20(22)-enólido (oleandrigenina) y el compuesto **XXXIX** como 3 $\beta$ ,14 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -card-20(22)-enólido (digitoxigenina).

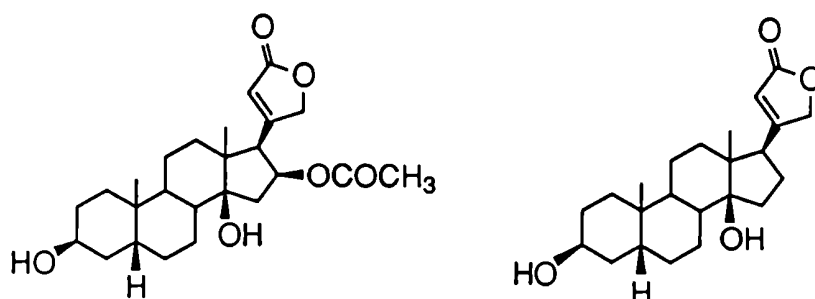


Fig. 54. Compuestos **XXXVIII** y **XXXIX**.

Por cromatografía en capa preparativa de la subfracción B se obtuvo el compuesto **XL** y una mezcla compleja de moléculas lineales hidroxiladas e insaturadas tal como lo indicó su espectro de RMN-<sup>1</sup>H. Por CLAR de dicha mezcla se obtuvo el compuesto **XLI** y otros componentes que debido a la poca masa obtenida de cada uno y a que no se encontraban puros, no pudieron ser identificados. El compuesto **XLI** fue purificado por CLAR y sobre la base de sus espectros RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C fue identificado [117, 118] como ácido (9Z,11E)-13-hidroxi-octadeca-9,11-dienoico.



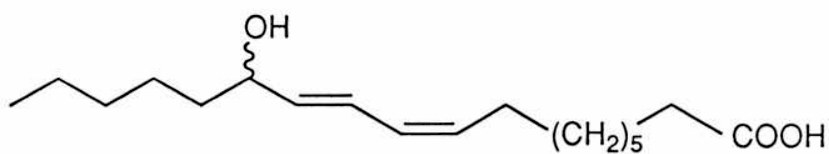


Fig. 55. Compuesto **XLI**.

El compuesto **XL** fue identificado por métodos espectroscópicos y por comparación con datos de literatura [119] como digitoxigenina 3-O-β-D-cimaropiranósido.

Para confirmar la estructura del compuesto **XL**, éste fue hidrolizado y el monosacárido obtenido fue derivatizado como su alditol acetilado (ver parte experimental). La coinyección con una muestra auténtica por CGL permitió identificarlo como cimarosa.

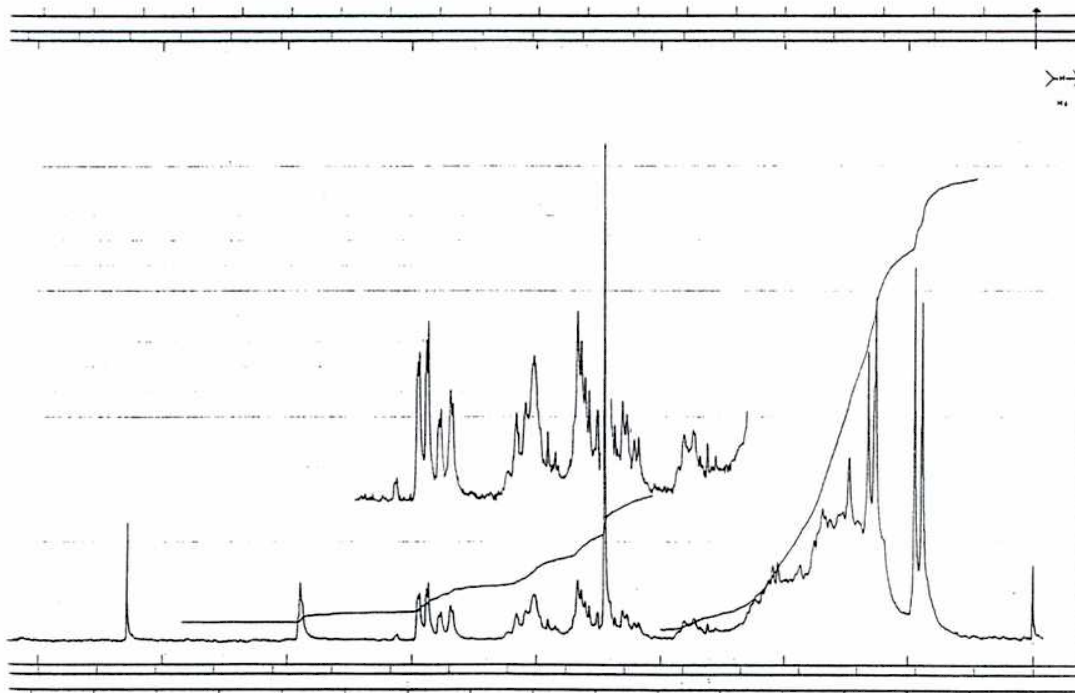


Fig. 56. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **XL**.

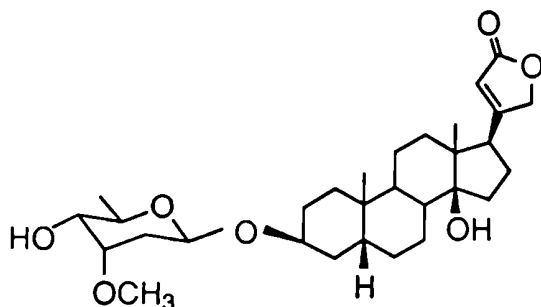


Fig. 57. Compuesto **XL**.

Por cromatografía en capa preparativa de la subfracción C se obtuvo el compuesto **XLII**. Sobre la base de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y EM fue identificado como 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-benzaldehído (siringaldehído) [120].

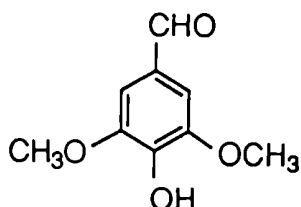
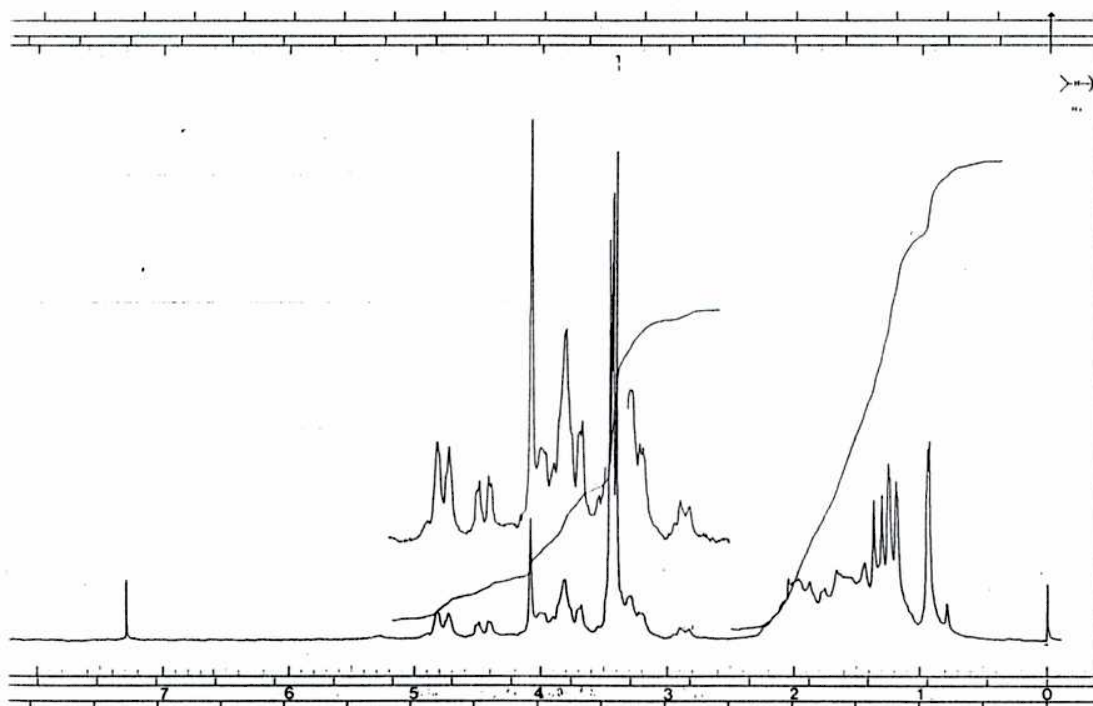


Fig. 58. Compuesto **XLII**.

### Análisis de la subfracción 2d<sub>2</sub>

La subfracción 2d<sub>2</sub> demostró por ccd estar constituida por un componente mayoritario. El mismo fue purificado por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 y posteriormente de sílica. Se obtuvo así el compuesto **XLIII** puro. Su espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostró tres señales correspondientes a hidrógenos

anoméricos a 4.45 (1H) y 4.77 (2H) ppm; tres dobletes con constantes de acoplamiento de 6 Hz a 1.22 (6H) y 1.34 (3H) ppm y varias señales de grupos metoxilo alrededor de 3.4 ppm, indicativas de la presencia de tres azúcares, probablemente 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosas [121] en **XLIII**. Los valores de las constantes de acoplamiento de los hidrógenos anoméricos eran típicos para configuraciones  $\beta$  de esos desoxiazúcares presentes en una conformación  ${}^4C_1$  (D) [121].



**Fig. 59.** Espectro de RMN- ${}^1\text{H}$  del compuesto **XLIII**.

El espectro de RMN- ${}^{13}\text{C}$  del compuesto **XLIII** confirmó los datos y dió información sobre la identidad de los desoxiazúcares y sobre su secuenciación. Indicó la presencia de  $\beta$ -D-cimarosa unida a la aglicona, otra  $\beta$ -D-cimarosa y

una  $\beta$ -D-diginosa. Los desplazamientos químicos de las unidades glicosídicas fueron comparados con los de los correspondientes metilglicósidos [122,123], con otros glicósidos [32, 64,122-126] y con los valores para azúcares libres [127].

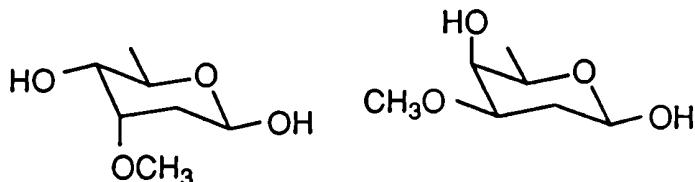


Fig. 60.  $\beta$ -D-cimarosa (XLIV) y  $\beta$ -D-diginosa (XLV).

La presencia de una señal doble a  $\delta$  82.4 correspondiente a C-4 de cimarosa indicaba que las dos cimarosas estaban 4-O-unidas y por lo tanto sugería la siguiente secuencia:

**$\beta$ -D-dgn-(1-4)- $\beta$ -D-cim-(1-4)- $\beta$ -D-cim-aglicona**

Más aún, la señal de carbono 4 de la diginosa aparecía a 66.8 ppm, valor característico para ese carbono con el hidroxilo libre [128]. Un experimento de tiempos de relajación spin-red (T<sub>1</sub>) [51] confirmó esta secuencia y permitió una mejor asignación del espectro de RMN-<sup>13</sup>C. La asignación se completó con irradiaciones selectivas (ver parte experimental).

Por hidrólisis del compuesto XLIII en MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 N, se obtuvieron por ccd dos grupos de manchas, los cuales fueron separados por cromatografía en capa preparativa. En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H pudo observarse la presencia de metilglicósidos en una de las fracciones y de un compuesto mayoritario (XLVI) en la otra fracción.

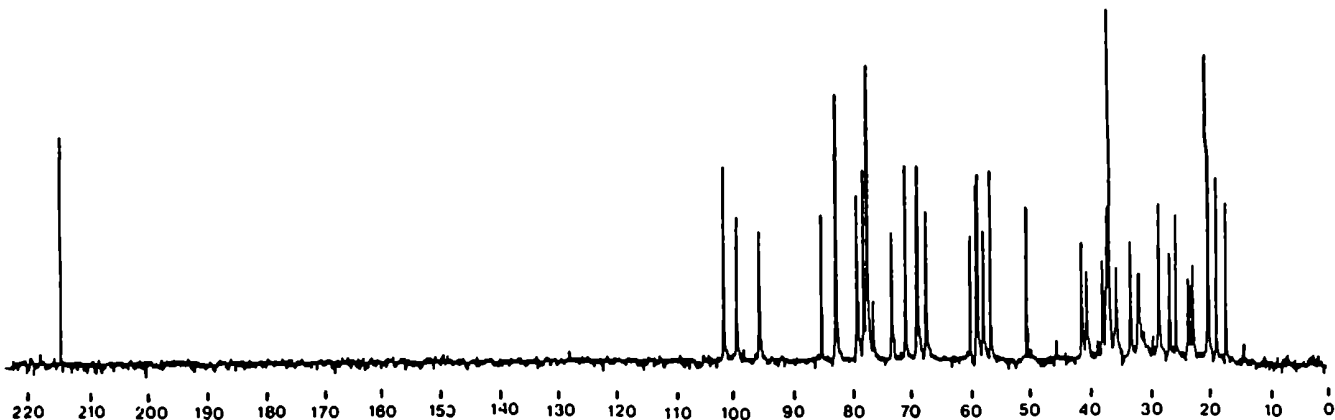


Fig. 61. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto XLIII.

La mezcla de metilglicósidos fue hidrolizada y los glicósidos libres fueron comparados por ccd con muestras auténticas de D-cimarosa y D-diginosa. Una porción de la mezcla de monosacáridos libres fue derivatizada para obtener los alditoles acetilados, que fueron analizados por CGL. Se observaron dos picos en relación 2:1, correspondientes a los alditoles de cimarosa y diginosa (ver figura 62), lo cual fue determinado por coinyección con muestras auténticas de dichos compuestos.

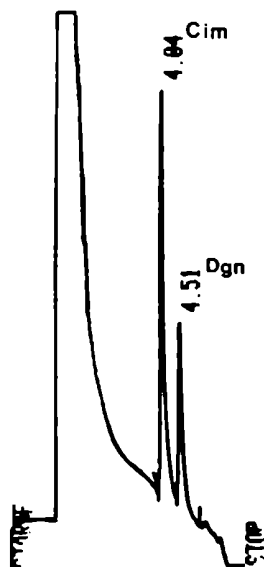


Fig. 62. CGL de los alditoles de los azúcares componentes de XLIII.

El resto de la mezcla de azúcares libres fue fraccionada por cromatografía en capa preparativa. Se obtuvieron cimarosa (XLIV) y diginosa (XLV), cuyos poderes rotatorios confirmaron que ambos pertenecían a la serie D.

El compuesto XLVI (obtenido en la hidrólisis de XLIII) fue purificado por CLAR. Se obtuvieron además del compuesto XLVI puro, los compuestos XLVII y XLVIII.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto XLVIII parecía indicar la presencia de un 1-O-metildisacárido compuesto por β-D-cimarosa unida a otra desoxihexosa [128, 129]. La hidrólisis del mismo y el análisis por CGL de los productos derivatizados como sus alditoles acetilados indicó únicamente la presencia del derivado de cimarosa. Por lo tanto la estructura del compuesto XLVIII resultó:

**β-D-cim-(1-4)-D-cim-1-OMe**

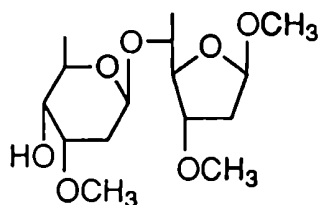


Fig. 63. Compuesto XLVIII.

El valor de desplazamiento químico de uno de los hidrógenos anoméricos en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto XLVIII indicaba que la cimarosa 1-O-metilada se encontraría en forma furanósica [130,131]. En literatura no hay

datos correspondientes a los otros hidrógenos en  $\text{CDCl}_3$  como para confirmarlo y debido a la baja cantidad aislada no se pudo efectuar otro tipo de análisis.

El compuesto **XLVI** era similar por RMN- $^{13}\text{C}$  a 3 $\beta$ -acetil-14 $\beta$ ,21-dihidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (**XLVIa**) [41]. El espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto **XLVI** difería del de **XLVIa**, además de la ausencia de la señal del grupo acetilo, en la presencia de un metoxilo a  $\delta$  3.43 y en que en el espectro de **XLVI** la señal del H-21 estaba desplazada a campos más altos. Ello sugería la posibilidad de que el grupo metoxilo estuviera ubicado en la posición 21.

Para confirmar esta suposición se prepararon derivados 21-O-metilados por tratamiento de **XLVIa** y de 3 $\beta$ ,21-dihidroxi-pregn-5-en-20-ona (**XLVIb**) con  $\text{CH}_2\text{N}_2/\text{silica}$  [132]. El análisis de los mismos por RMN- $^1\text{H}$  dió los resultados indicados en la tabla 2.

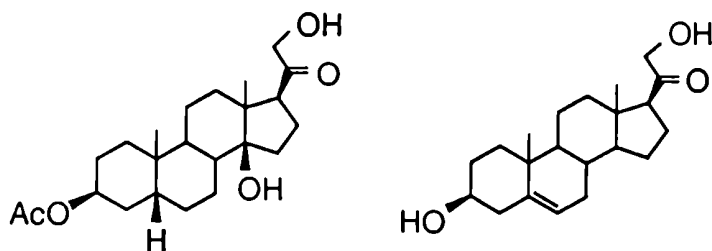


Fig. 64. Compuestos **XLVIa** y **XLVIb**.

Compuesto	<b>XLVI</b>	<b>XLVIa</b>	<b>XLVIa'</b>	<b>XLVIb</b>	<b>XLVIb'</b>
H-21	4.07s	4.30sa	4.08s	4.18sa	4.00sa
OCH <sub>3</sub>	3.43s		3.44s		3.42s

Tabla 2. Desplazamientos químicos de H-21 y  $\text{CH}_3\text{O}$ - en **XLVI**, **XLVIa**, **XLVIa'**, **XLVIb** y **XLVIb'**. **XLVIa'** y **XLVIb'** son los correspondientes 21-OMe-derivados de **XLVIa** y **XLVIb**.

Sobre la base de estos datos, la estructura de la aglicona **XLVI** quedó confirmada como 3 $\beta$ ,14 $\beta$ -dihidroxi-21-metoxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona.

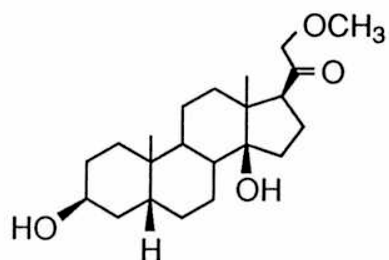


Fig. 65. Compuesto **XLVI**.

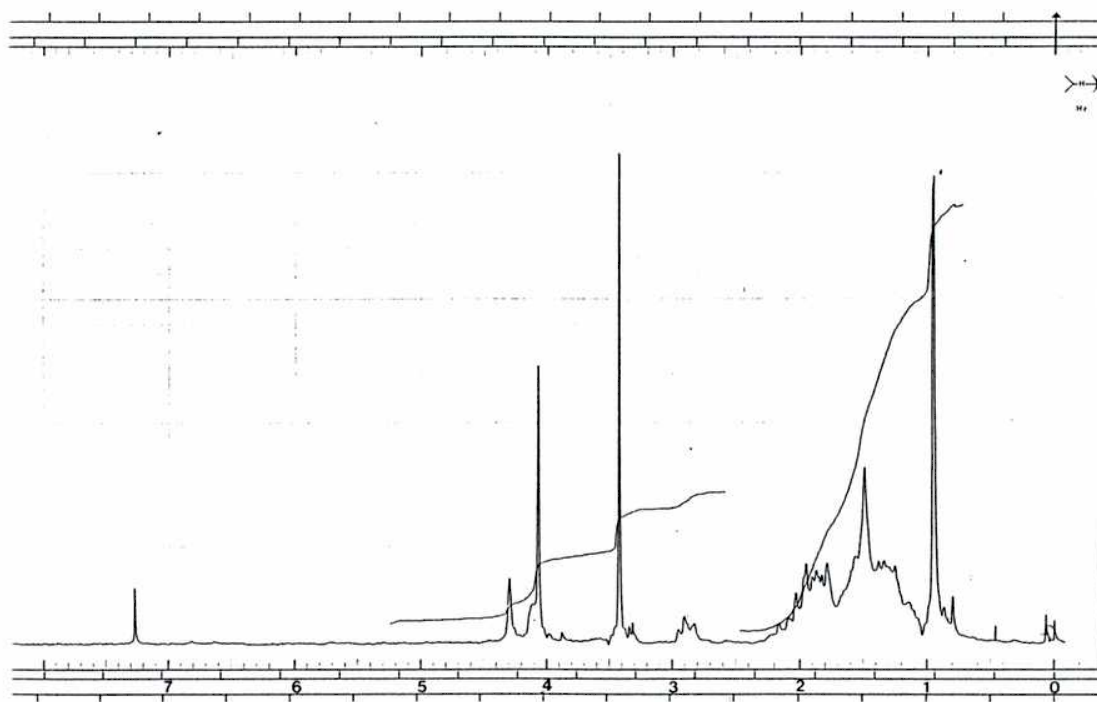


Fig. 66. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **XLVI**.



El compuesto **XLVII** fue identificado sobre la base de su espectro de RMN-<sup>1</sup>H y por comparación con los correspondientes espectros de los compuestos **XL** y **XLVI** como 3 $\beta$ ,14 $\beta$ -hidroxi-21-metoxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona-3-O- $\beta$ -D-cimaropiranósido.

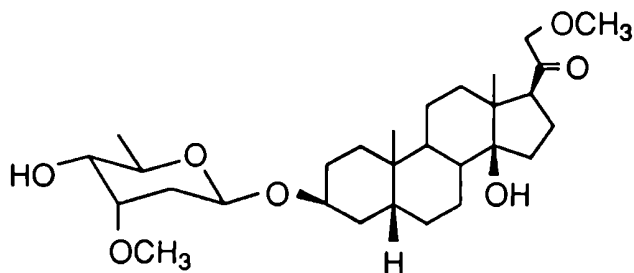


Fig. 67. Compuesto **XLVII**.

Teniendo en cuenta los argumentos hasta aquí expuestos se concluyó que el compuesto **XLIII** era 3 $\beta$ ,14 $\beta$ -hidroxi-21-metoxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona 3-O-[ $\beta$ -D-diginopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranósido], producto natural no descrito hasta el momento en literatura.

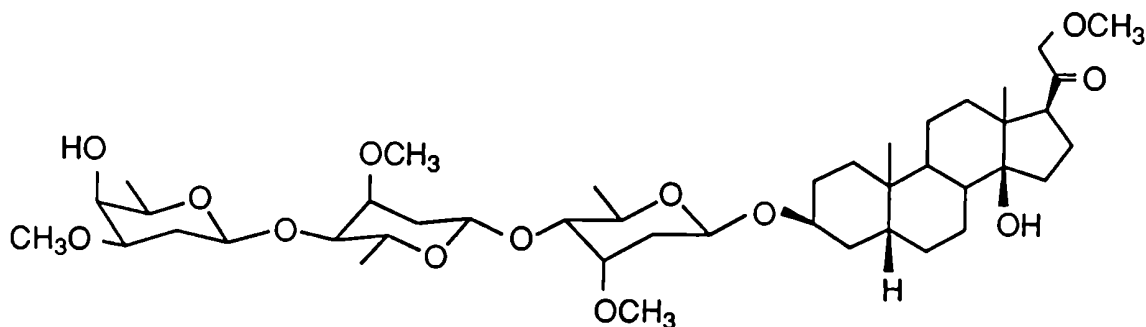


Fig. 68. Compuesto **XLIII**.

### Subfracción 2e

Esta subfracción daba reacción positiva frente al ensayo de Kedde y mostraba por ccd estar constituida principalmente por dos componentes de R<sub>f</sub> similares. Por cromatografía en columna de sílica flash fue enriquecida en esos componentes.

Empleando CLAR en columna de fase reversa se obtuvieron los compuestos XLIX y L.

El compuesto XLIX fue identificado sobre la base de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM [63, 64] como oleandrigenina 3-O-β-D-diginopiranósido. Esta identificación se confirmó por análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H del producto acetilado y de los productos de formilación acetilados.

Del mismo modo, sobre la base de sus datos espectroscópicos [63, 64], el compuesto L fue identificado como digitoxigenina 3-O-β-D-diginopiranósido. El análisis de los productos de hidrólisis y acetilación confirmaron la identificación.

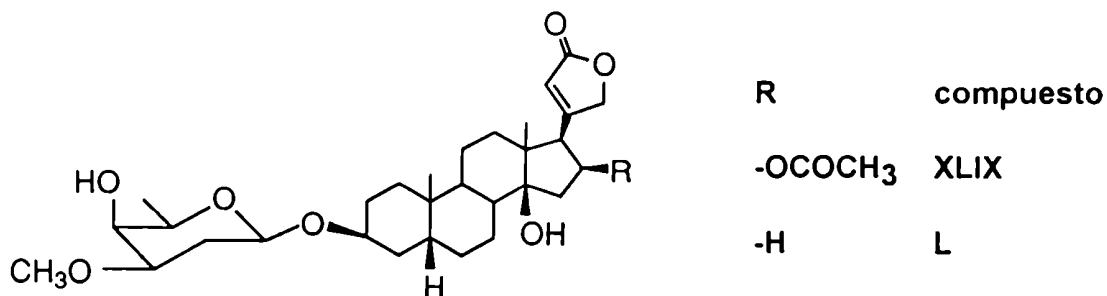


Fig. 69. Compuestos XLIX y L.

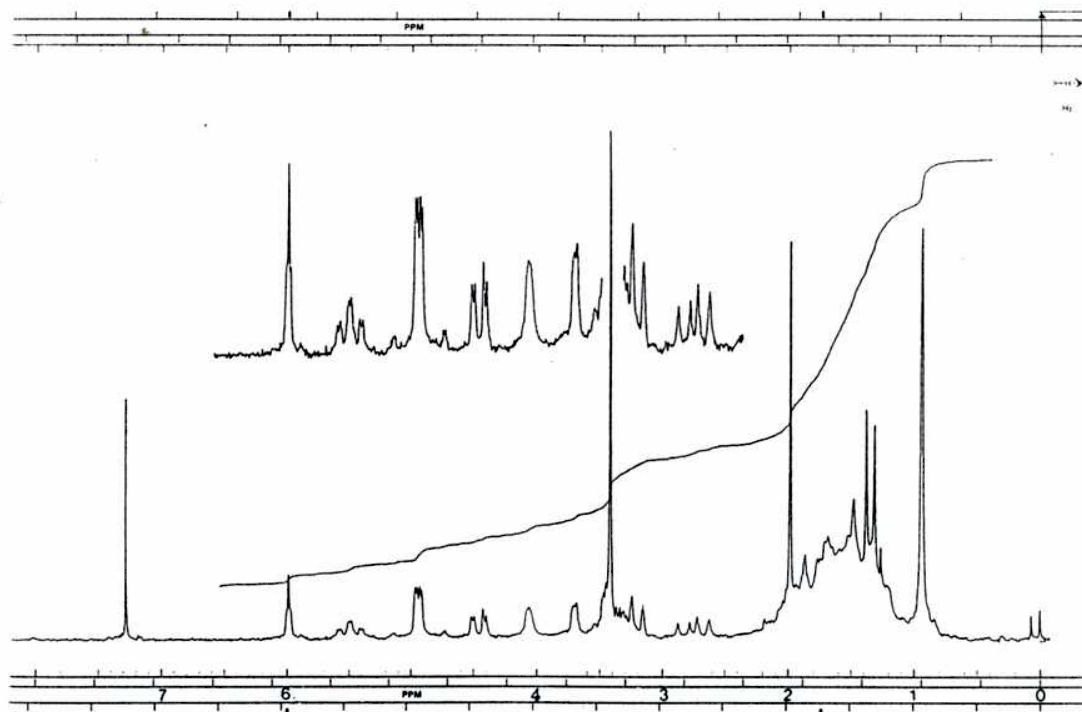


Fig. 70. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto XLIX.

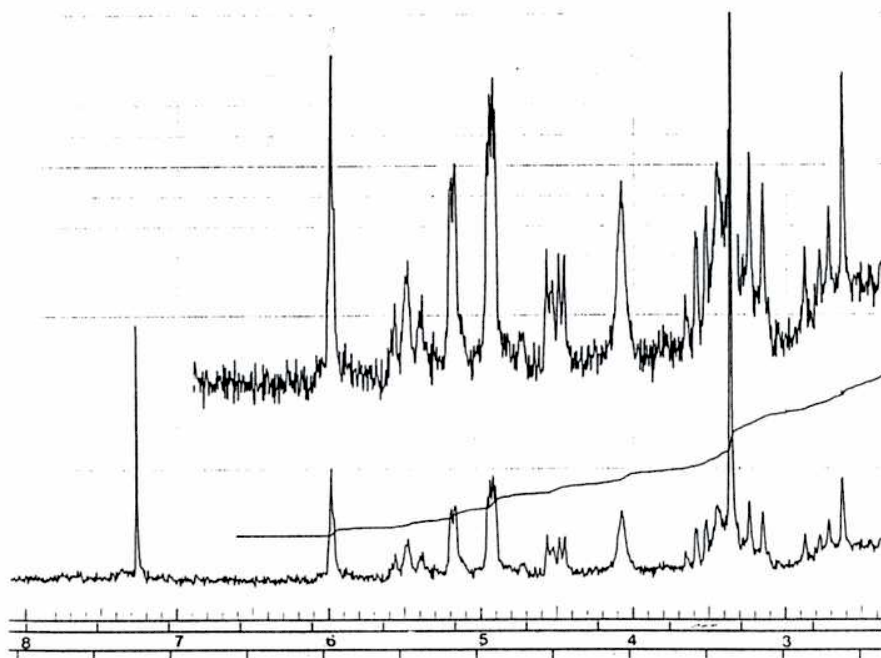


Fig. 71. Espectro parcial de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto XLIX acetilado.

### Subfracción 2f

Por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 de esta subfracción se obtuvieron dos subfracciones, A y B.

La subfracción A contenía los compuestos XLIX y L, aislados de la fracción anterior, mientras que la subfracción B contenía dos componentes, que fueron separados entre sí por cromatografía en capa preparativa. Se obtuvieron así los compuestos LI y LII.

Sobre la base de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM y su rotación óptica, el compuesto LI fue identificado como (+)-pinoresinol y el compuesto LII como (+)-8- $\alpha$ -hidroxipinoresinol [133-136].

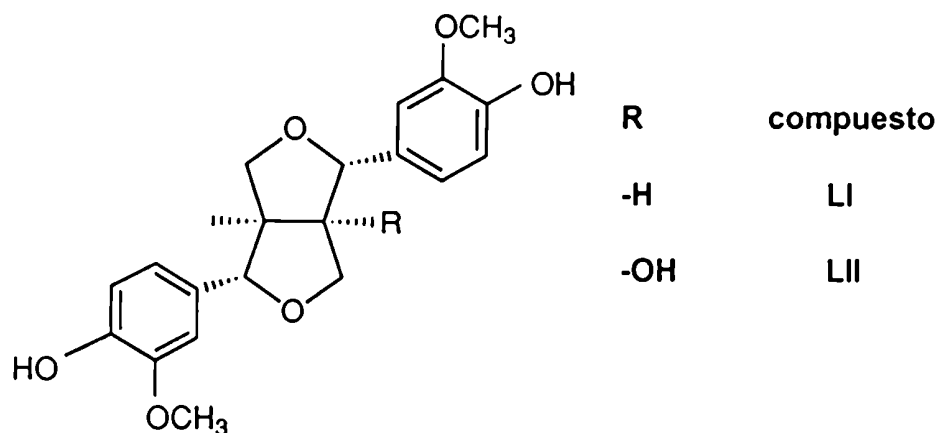
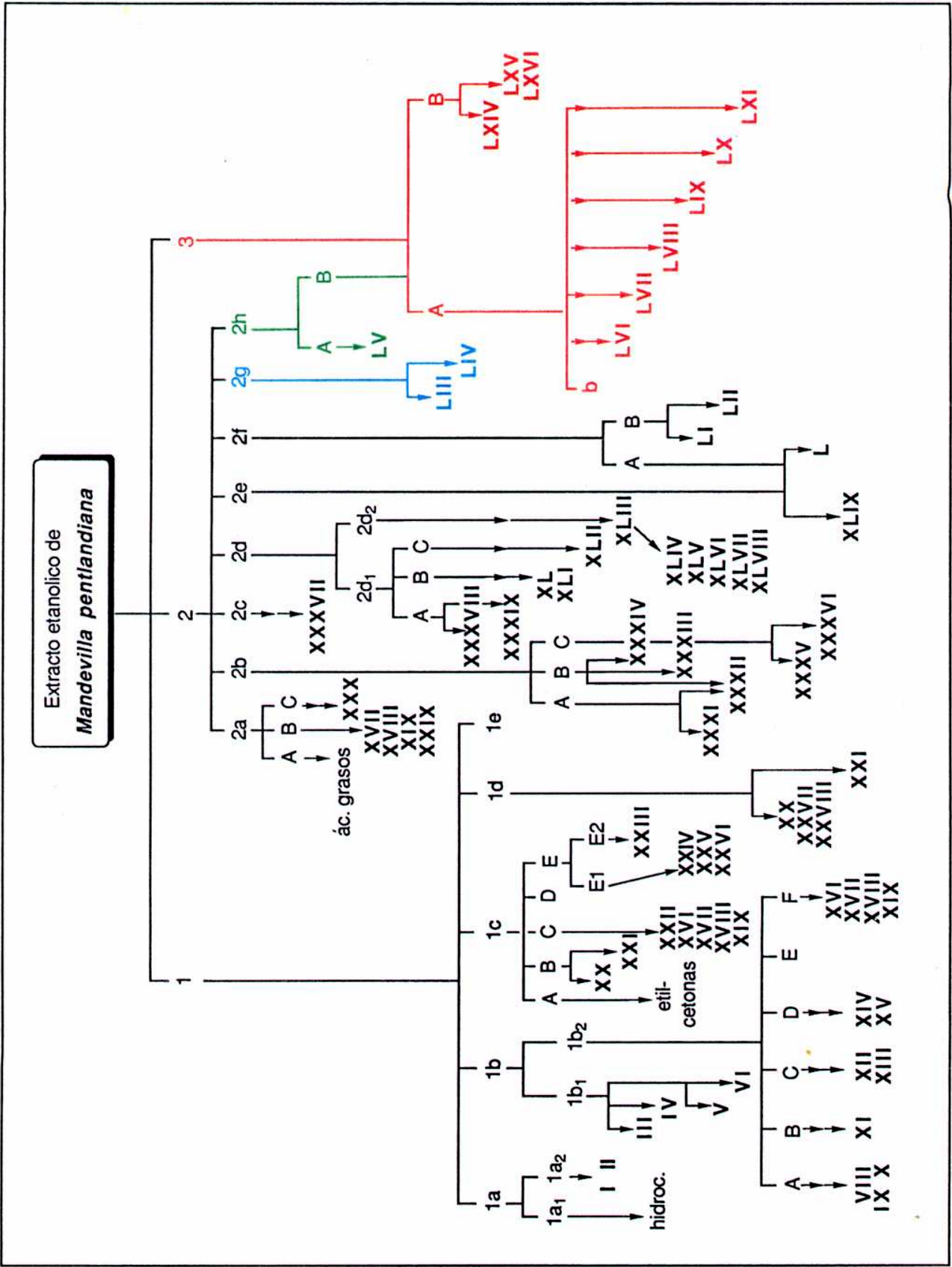


Fig. 72. Compuestos LI y LII.



Esquema de fraccionamiento del extracto etanolico de raiz de *Mandevilla pentlandiana*.

### Subfracción 2g

Esta subfracción, que exhibía reacción positiva frente al ensayo de Kedde, presentaba por ccd una mancha, que fue purificada por cromatografía con columna de sílica. El procesamiento por CLAR en columna de fase reversa RP-18 permitió aislar los compuestos LIII y LIV. Sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y FAB<sup>+</sup>/EM, los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de sus derivados acetilados y la hidrólisis e identificación de los productos de la misma indicaron que el compuesto LIII era oleandrigenina 3-O-β-D-digitalopiranosido y el compuesto LIV, digitoxigenina 3-O-β-D-digitalopiranosido [63, 64, 116, 137].

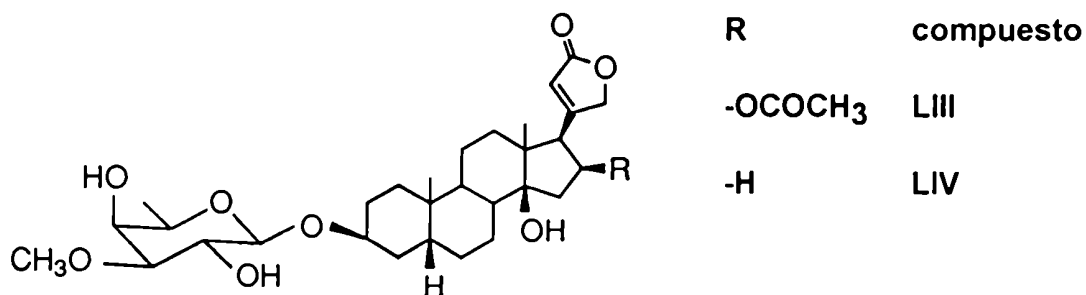


Fig. 73. Compuestos LIII y LIV.

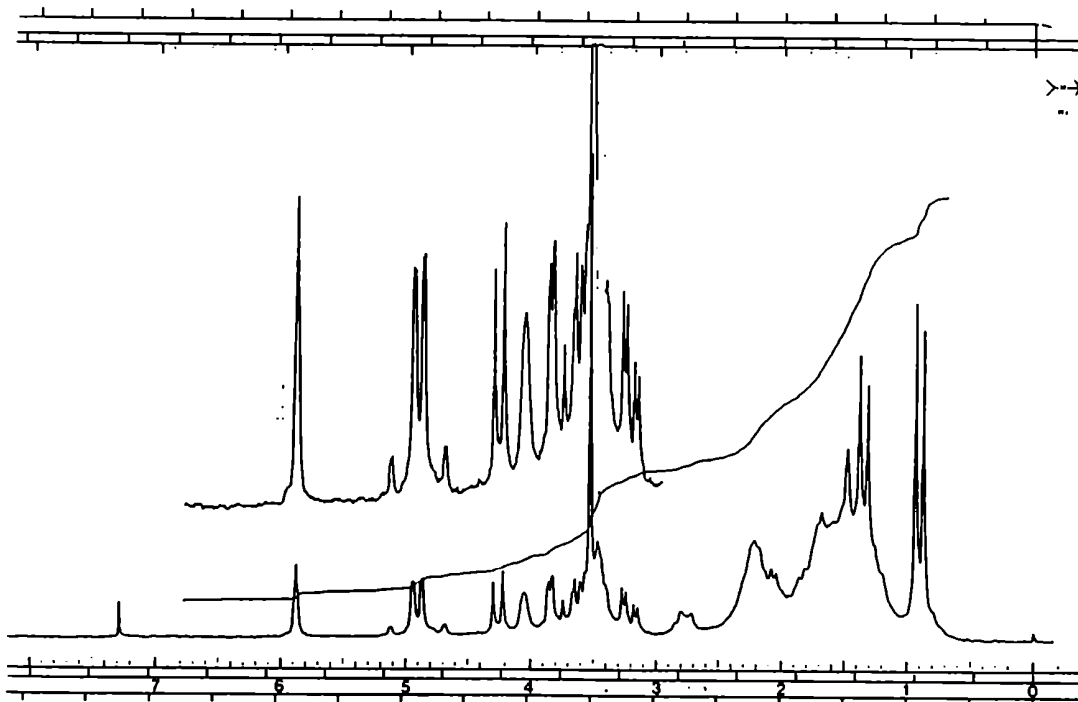


Fig. 74. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto LIV.

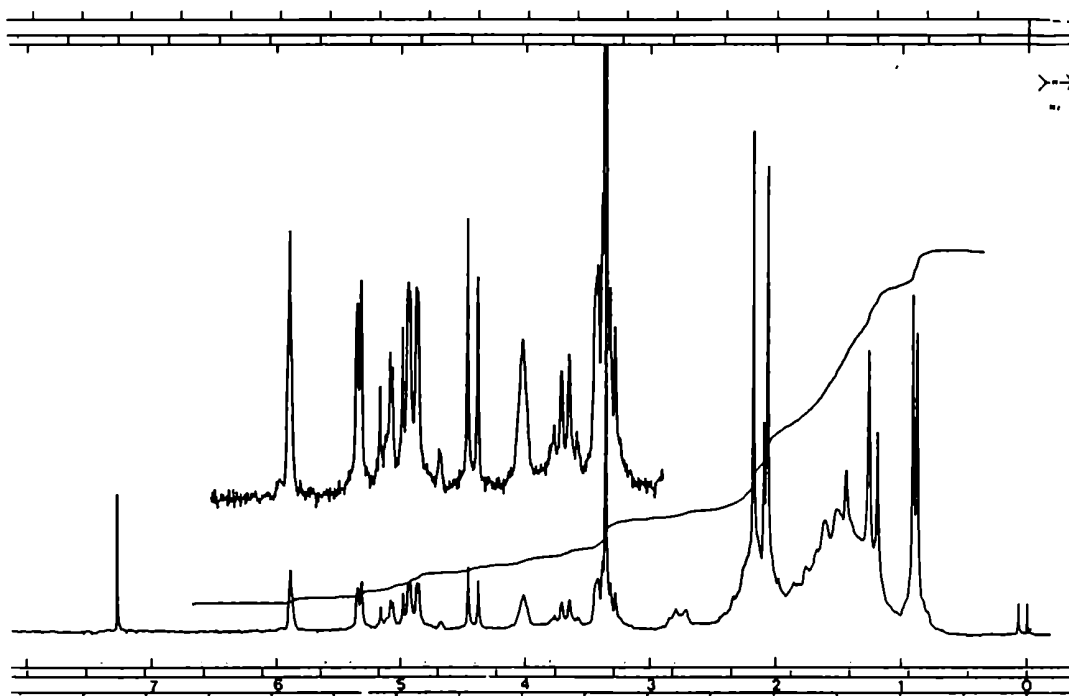


Fig. 75. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto LIV acetilado.

### Subfracción 2h

Por cromatografía flash en columna seca esta subfracción fue dividida en dos subfracciones, A y B. La subfracción B presentaba reacción positiva frente al ensayo de Kedde y por ccd mostraba una composición semejante a la fracción 3, por lo tanto, se reunieron las subfracciones 2h-B y 3 para su análisis conjunto.

El análisis por ccd de la subfracción A indicó que estaba constituida por un componente mayoritario. Por tratamiento de la misma con MeOH precipitó un sólido blanco, muy poco soluble en solventes orgánicos. El sólido (LV), fue acetilado y purificado por cromatografía en capa preparativa. El análisis por RMN-<sup>1</sup>H del acetil derivado del mismo permitió caracterizarlo como  $\beta$ -D-glucósido de fitoesterol [138].

Por hidrólisis y análisis por CGL de la fracción lipídica se pudo observar que LV contenía sitosterol (esterol mayoritario), estigmasterol y campesterol.

Por lo tanto se identificó al sólido LV como  $\beta$ -D-glucósidos de los fitoesteroles XVII, XVIII y XIX.

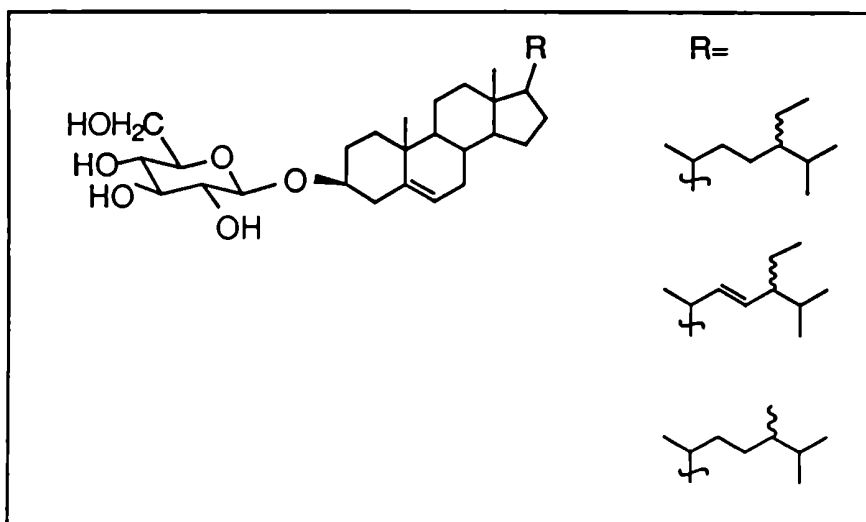


Fig. 74. Sólido LV.



### Análisis de la fracción 3

La fracción 3 fue obtenida por elución con MeOH en el fraccionamiento inicial del extracto. Daba una intensa reacción positiva en el test de Kedde y presentaba aspecto de jarabe. Por tratamiento por cromatografía flash en columna seca y posterior procesamiento por columna de Sephadex LH-20 se separó en dos subfracciones A y B.

#### Subfracción A

Esta subfracción, de aspecto muy complejo por ccd, fue separada por CLAR en columna de fase reversa, colectándose la subfracción b y los compuestos LVI-LXI.

Los compuestos LVI a LXI fueron purificados por la misma técnica, empleándose mezclas MeOH-H<sub>2</sub>O de distinta composición.

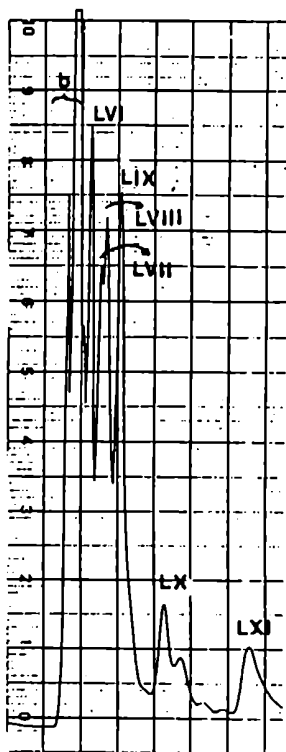


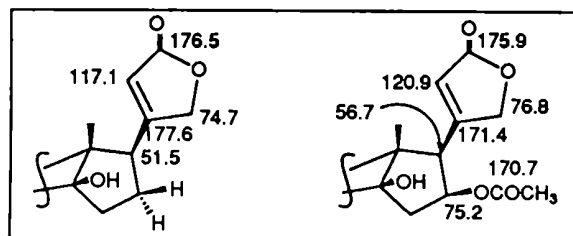
Fig.77. CLAR de la subfracción A.

La subfracción b, colectada por CLAR de la subfracción A, presentaba por ccd igual composición que la subfracción B, por lo tanto fue analizada conjuntamente con dicha subfracción.

Debido a algunas similitudes estructurales y/o a diferencias en la forma de encarar el análisis de los compuestos **LVI-LXI**, no se discutirá el análisis de los mismos en forma secuencial.

### Análisis de los compuestos **LVII** y **LIX**.

Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  de los compuestos **LVII** y **LIX** presentaban una gran similitud. Podían observarse en ellos las señales características del anillo butenólido de cardenólidos y señales correspondientes a azúcares. Tres señales a 96.5, 101.5 y 105.5 ppm eran indicativas de que ambos compuestos eran triglicósidos de cardenólidos. Las únicas diferencias apreciables en los dos espectros consistían en las señales a campos más bajos, señales que eran fácilmente asignables [64] a los anillos butenólidos de dos agliconas distintas, oleandrigenina (**XXXVIII**) en el caso del compuesto **LVII** y digitoxigenina (**XXXIX**) en el caso del compuesto **LIX**.



**Fig.78.** Desplazamientos químicos en RMN- $^{13}\text{C}$  de los anillos butenólidos de oleandrigenina y digitoxigenina.

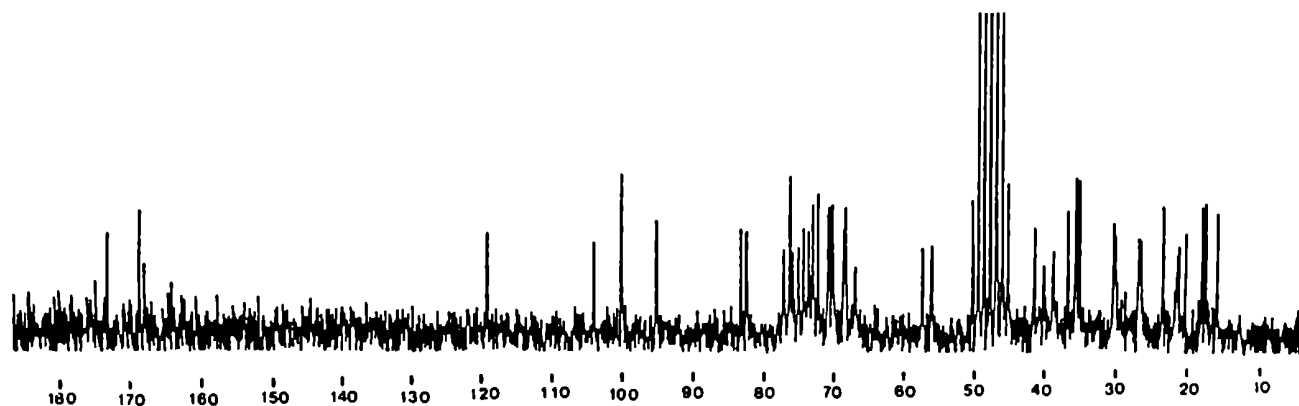


Fig. 79. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto LVII.

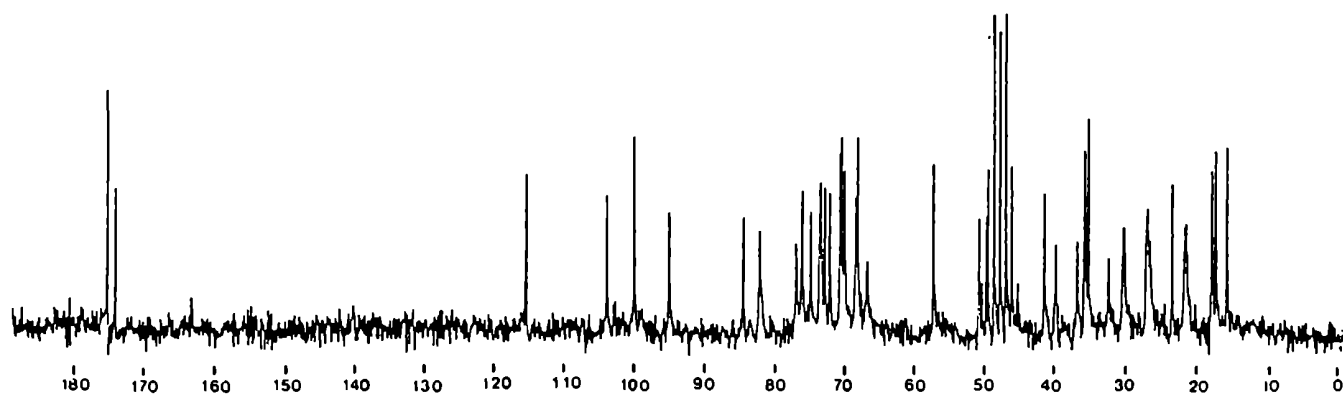


Fig. 80. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto LIX.

Los espectros  $\text{FAB}^+$  de ambos compuestos exhibían iones moleculares  $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  908 y 850, confirmando la diferencia de 58 u existente entre las dos agliconas e idéntica porción glicosídica correspondiente a  $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{O}_{12}$ .

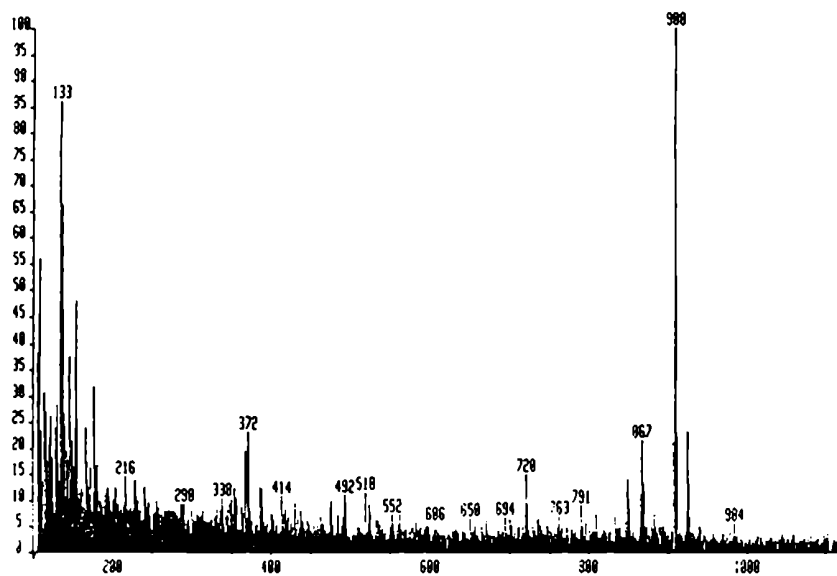


Fig. 81. Espectro FAB<sup>+</sup> del compuesto LVII.

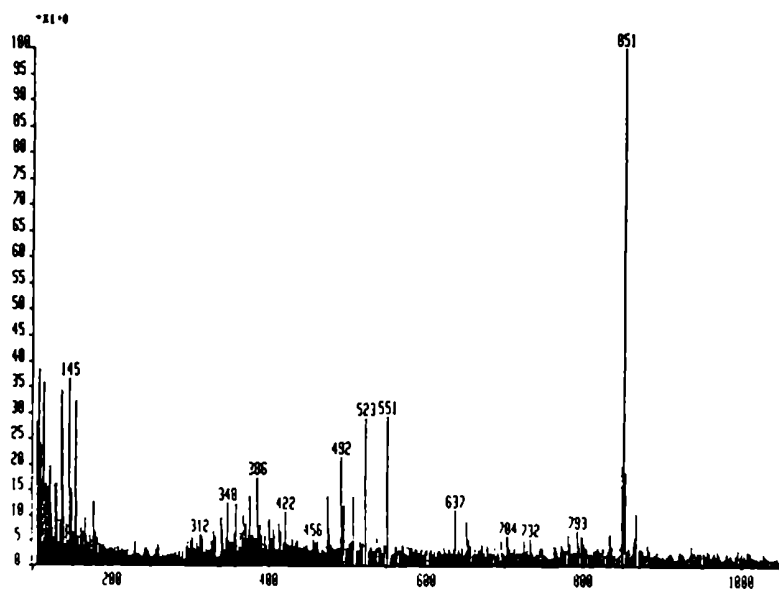
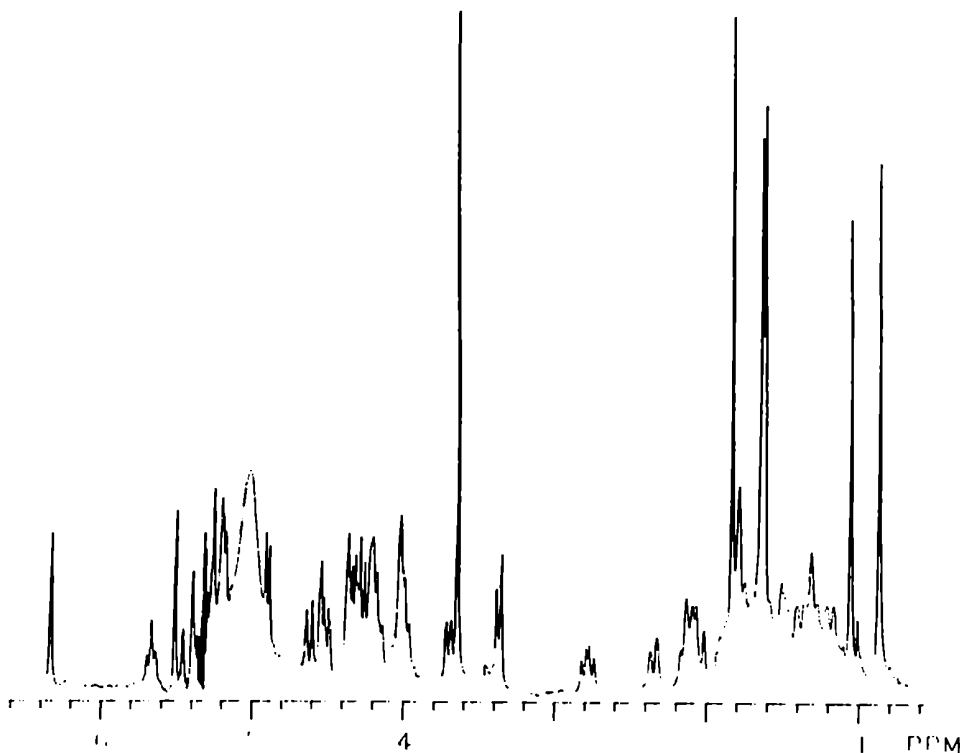


Fig. 82. Espectro FAB<sup>+</sup> del compuesto LIX.

En los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  se observaban además de las señales ya mencionadas, dos metilos a 17.5 y 18.1 ppm indicativos de la presencia de dos 6-desoxihexosas; un metileno a  $\delta$  67.8 característico de C-6 de una hexosa normal O-unida a una  $\alpha$ -hexosa [45] y la ausencia de señales alrededor de 62 ppm, característica de C-6 de hexosa normal [45]. Más aún, la presencia de un carbono anomérico a  $\delta$  96.5, un metilo a  $\delta$  18.1 y un metoxilo a 58.1 ppm sugerían que una de las dos 6-desoxihexosas podía ser en realidad una 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosa, específicamente  $\beta$ -D-cimarosa (**XLIV**) unida directamente a la aglicona [46].

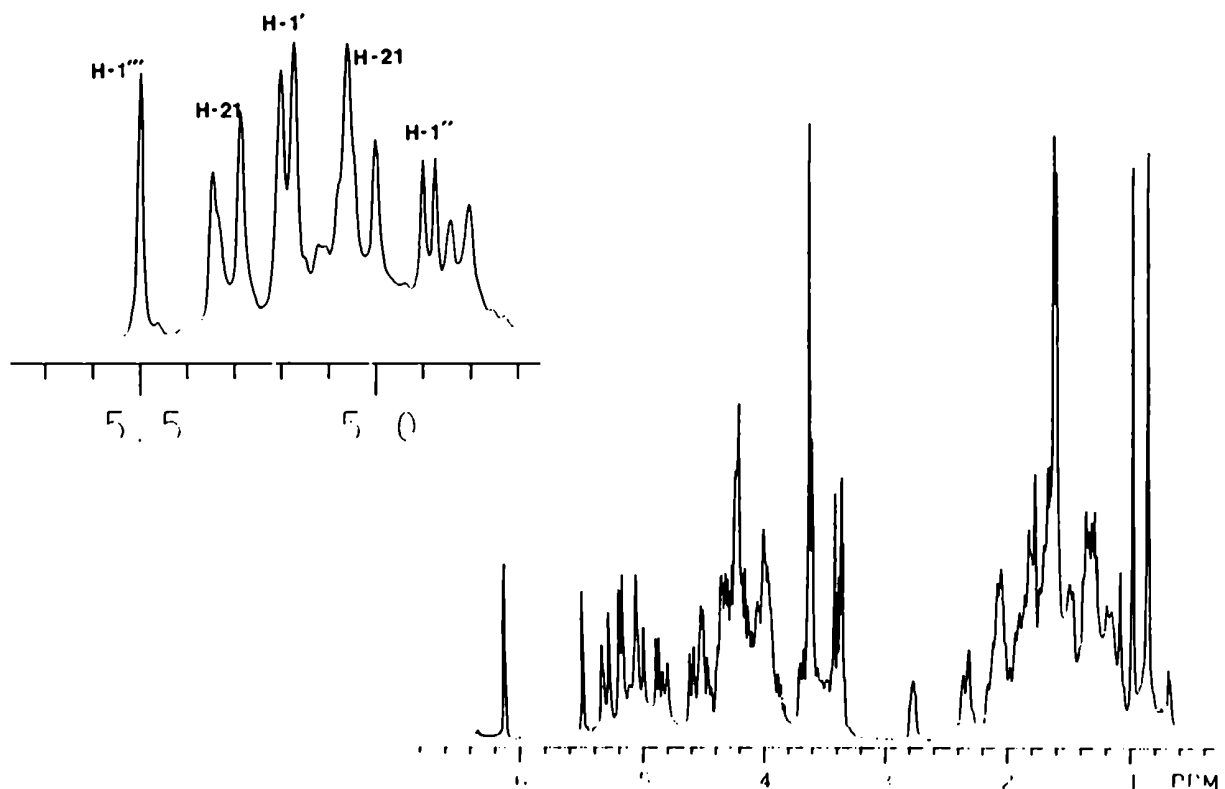
Todos estos datos aportaban una valiosa información acerca de la secuencia en que estaban unidos los monosacáridos entre sí: la única hexosa normal presente en los compuestos **LVII** y **LIX** debía encontrarse entre las desoxihexosas, unida por la posición 1 a la posición 4 de la cimarosa (única posición glicosidable) y por la posición 6 a la  $\alpha$ -6-desoxihexosa.



**Fig. 83.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto **LVII**.

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de ambos compuestos permitieron confirmar la naturaleza de las agliconas presentes y la configuración β de la cimarosa unida a la aglicona por comparación con datos de literatura [121].

Por acetilación de los compuestos LVII y LIX y análisis por RMN-<sup>1</sup>H de los productos acetilados se confirmó la presencia de sólo seis hidroxilos libres acetilables en ambos compuestos.



**Fig. 84.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto LIX.

Para determinar la identidad de la hexosa normal y de la 6-desoxihexosa los compuestos LVII y LIX fueron hidrolizados hasta observar por ccd la ausencia de producto de partida. La técnica de hidrólisis fue seleccionada

teniendo en cuenta la labilidad de las 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosas en medio ácido [15]. Concluida la hidrólisis se observó por ccd una mancha de Rf coincidente con la aglicona y otras dos manchas con Rf similares a una hexosa normal y a una 6-desoxihexosa. Sin embargo, numerosos intentos de preparación de alditoles y/o aldononitrilos acetilados con los productos de la hidrólisis fracasaron. Fueron probadas otras técnicas de hidrólisis con iguales resultados.

Se analizaron los productos de la hidrólisis sin derivatizar. Después de la hidrólisis del compuesto **LIX** y neutralización de la mezcla de hidrólisis con una resina de intercambio iónico se efectuó una cromatografía en capa preparativa obteniéndose las fracciones 1, 2 y 3.

La fracción 3 fue purificada por cromatografía en capa preparativa obteniéndose digitoxigenina (**XXXIX**), identificada por ccd y RMN-<sup>1</sup>H.

La fracción 2, mayoritaria, contenía el compuesto **LXII**. Este compuesto presentaba en sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C señales correspondientes a un trisacárido.

El análisis del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 1 indicó la presencia de un componente principal (**LXIII**) de naturaleza disacarídica. Debido a la escasa cantidad obtenida, el mismo no pudo ser analizado.

El compuesto **LXII** fue hidrolizado en condiciones suaves. Se observó por ccd finalizada la hidrólisis, una mancha de Rf coincidente con cimarosa y otra de igual Rf que el componente (**LXIII**) obtenido en la fracción 1.

Por cromatografía en capa preparativa fueron aislados los dos componentes y determinado el poder rotatorio de la cimarosa cuyo valor indicó que se trataba de D-cimarosa, tal como se había estimado por los datos del espectro de RMN-<sup>13</sup>C del glicósido **LIX**.

El compuesto **LXIII** obtenido por hidrólisis de **LXII** fue hidrolizado en condiciones más energéticas y los productos de la hidrólisis fueron derivatizados de modo de obtener los alditoles acetilados. El análisis por CGL de los mismos determinó la presencia de glucosa y ramnosa en **LXIII**.

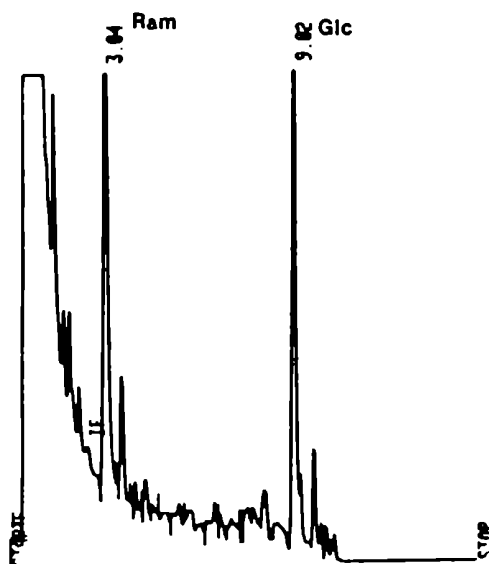


Fig. 85. CGL de los alditoles acetilados obtenidos a partir de **LXIII**.

Se comparó por ccd el compuesto **LXIII** con rutinosa ( $\alpha$ -L-ramnopiranosil-6-O- $\beta$ -D-glucopiranososa) presentando ambos compuestos idéntico Rf.

Estos datos indicaban que el glicósido **LIX** estaba compuesto además de cimarosa, por glucosa y ramnosa.

Para confirmar la serie a la que pertenecían la glucosa y la ramnosa fue efectuada una nueva hidrólisis del compuesto **LIX** en condiciones energéticas y los productos de la hidrólisis fueron separados por cromatografía en capa preparativa. Por medición de sus rotaciones ópticas se determinó la presencia de D-glucosa y L-ramnosa.



Sobre la base de los datos expuestos, el compuesto **LXIII** fue identificado como rutinosa, el compuesto **LXII** como  $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)-D-cimaropiranososa y los compuestos **LVII** y **LIX** como oleandrigenina 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosido] (**LVII**) y digitoxigenina 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosido] (**LIX**).

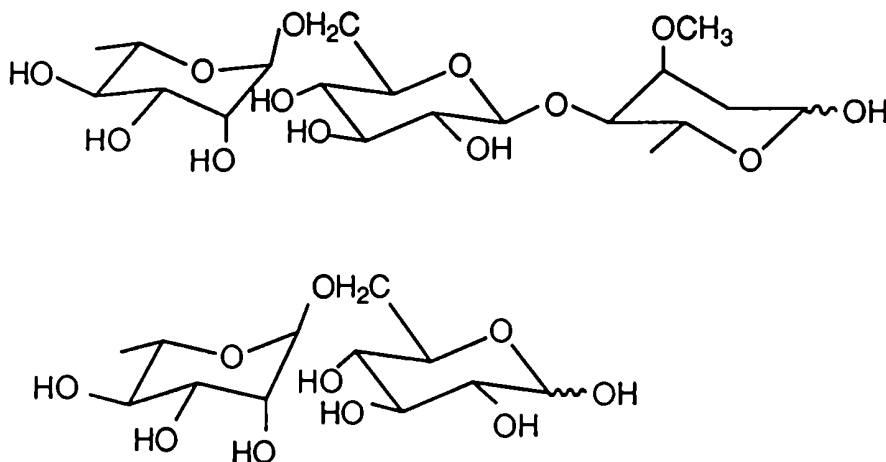


Fig. 86. Compuestos **LXII** y **LXIII**.

Las asignaciones de los espectros de RMN-<sup>13</sup>C fueron realizadas sobre la base de datos de literatura, tanto de compuestos similares [45, 46, 64] como de metilglicósidos [139-141]. También fueron calculados los valores de desplazamiento químico esperados por efectos de glicosidación [43].

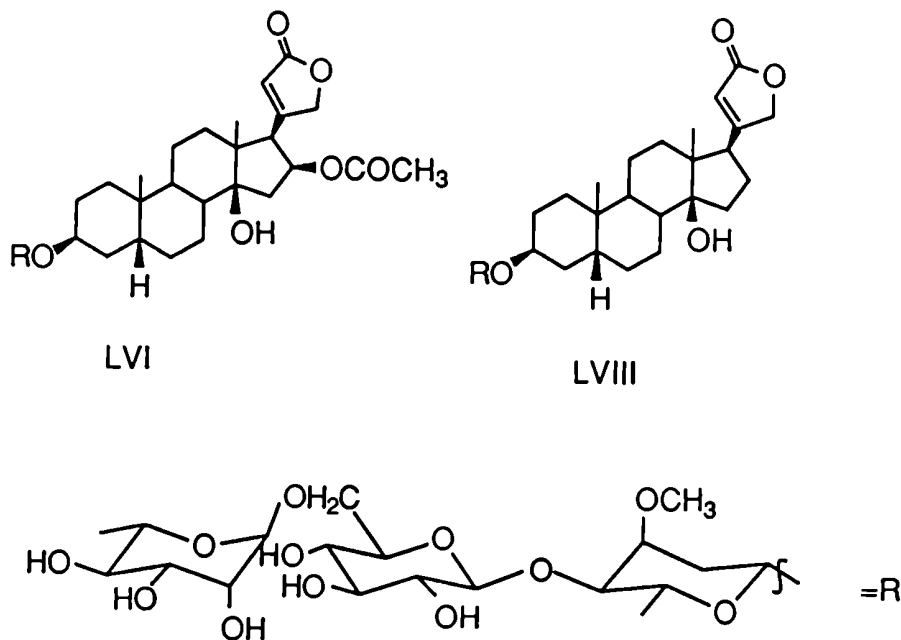


Fig. 87. Compuestos LVII y LIX.

### Análisis del compuesto LVI

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C de este compuesto indicaba que era un triglicósido de oleandrigenina (**XXXVIII**) ya que presentaba las señales correspondientes a tres carbonos anoméricos a  $\delta$  98.6, 104.0 y 103.4 y las señales del anillo butenólido. La presencia de oleandrigenina también era evidente a partir de los desplazamientos químicos de los metilos angulares 18 y 19 y de la presencia de un grupo acetato en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del glicósido.

El peso molecular del mismo fue determinado por FAB<sup>+</sup>/EM de la muestra desorbida de una matriz de alcohol m-nitrobencílico con 15% de glicerol y corroborado por agregado a la matriz de 1) LiI, 2) NaI ó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 3) KI sucesivamente. Se obtuvieron de esta manera los iones [M+H]<sup>+</sup>, [M+Li]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup> y [M+K]<sup>+</sup>. Por espectrometría de masa de alta resolución sobre la especie cationizada con potasio [M+K]<sup>+</sup> la masa exacta del compuesto LVI fue determinada y a partir de ese dato fue calculada la fórmula molecular del mismo.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

ión	(m/z)	masa exacta	fórmula molecular
[M+H] <sup>+</sup>	901		
[M+Li] <sup>+</sup>	907		
[M+Na] <sup>+</sup>	923		
[M+K] <sup>+</sup>	939	939.3984	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>19</sub> K

La determinación de la secuencia de unión de los azúcares presentes en el glicósido fue efectuada por EM/EM utilizando activación colisional (CAD) (ver parte experimental) sobre el precursor iónico protonado [M+H]<sup>+</sup>, desprotonado [M-H]<sup>-</sup>, litiado [M+Li]<sup>+</sup> ó potásico [M+K]<sup>+</sup>. Sobre la denominación de los fragmentos iónicos obtenidos en estos espectros ver pág. 20.

En el espectro EM/CAD/EM de la especie [M+H]<sup>+</sup> se observaron además del ión AH<sub>2</sub><sup>+</sup> a m/z 433 correspondiente a la aglicona oleandrogenina, los fragmentos iónicos F<sub>2</sub>H<sub>2</sub><sup>+</sup> (M-2x 162) y F<sub>1</sub>H<sub>2</sub><sup>+</sup> (M-162) a m/z 577 y 739 respectivamente. Estos fragmentos indicaban la pérdida de dos y una hexosas normales.

Por lo tanto, teniendo en cuenta el peso molecular del glicósido, se dedujo que estaba integrado por una didesoxihexosa de 7 carbonos directamente unida a la aglicona y dos hexosas normales.

Los espectros EM/CAD/EM de los iones  $[M+Li]^+$  y  $[M+K]^+$  confirmaron la secuencia obtenida a partir del espectro del ión  $[M+H]^+$ .

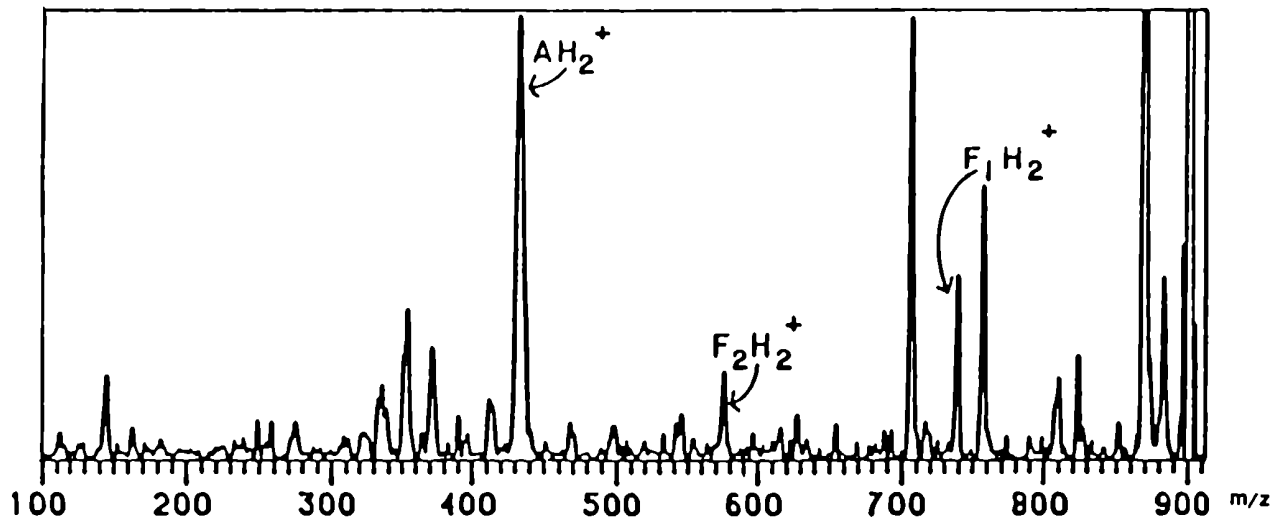


Fig. 89. Espectro EM/CAD/EM del ión  $[M+H]^+$  del compuesto LVI.

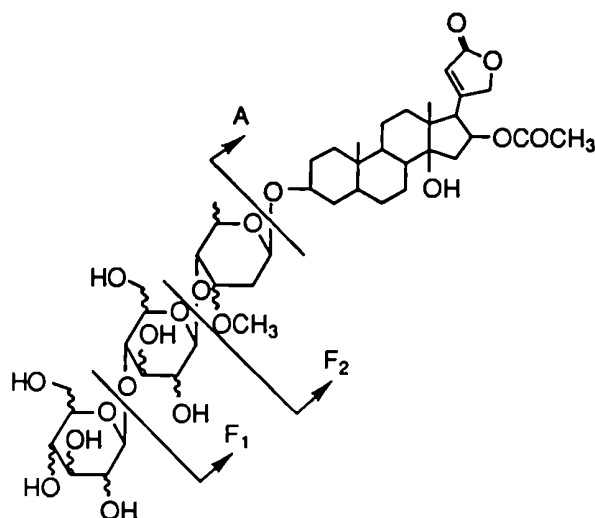


Fig. 90. Esquema con los fragmentos obtenidos en el espectro de la fig. 89.

Restaba determinar la identidad de las hexosas y el tipo de unión entre las mismas. En este sentido el espectro de RMN-<sup>13</sup>C resultó especialmente útil ya que teniendo en cuenta las señales a  $\delta$  98.6, 33.0, 17.3 y 56.3 fue establecida la identidad de la hexosa unida directamente a la aglicona como  $\beta$ -D-diginosa [46].

Por hidrólisis del compuesto **LVI** y análisis de los productos obtenidos por ccid se observaron manchas de R<sub>f</sub> similar a oleandrigenina, diginosa y glucosa. Los monosacáridos fueron derivatizados de modo de obtener los correspondientes alditoles y aldononitrilos acetilados. En los cromatogramas GL pudo observarse la presencia de glucosa y en menor proporción de lo esperado, diginosa.

En virtud de que el espectro de RMN-<sup>13</sup>C presentaba sólo una señal simple a  $\delta$  62.0 correspondiente al carbono con hidroxilo libre de la posición 6 de una glucosa fue establecida la unión entre las glucosas a través de la posición 6 de una de ellas. Esto además era consistente con el espectro de RMN-<sup>13</sup>C para las otras señales de ambas glucosas.

Se asumió que las glucosas pertenecían a la serie D teniendo en cuenta el espectro de RMN-<sup>13</sup>C y los cálculos de corrimientos de desplazamientos químicos producidos por efecto de glicosidación [43], los resultados obtenidos con el compuesto **LIX** en este sentido, y el hecho de que es la única configuración en que se la ha encontrado en plantas superiores. Sobre la base de los argumentos expuestos fue identificado el compuesto **LVI** como oleandrigenina 3-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-diginopiranosido].

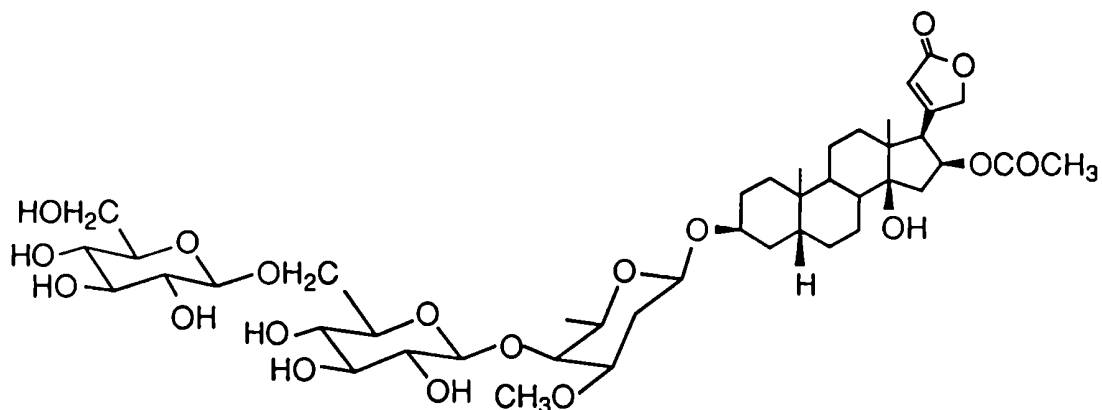


Fig. 91. Compuesto LVI.

### Análisis de los compuestos LVIII y LX

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos LVIII y LX indicaban que estos compuestos eran glicósidos de digitoxigenina con tres y cuatro unidades de monosacárido respectivamente.

La determinación de sus pesos moleculares por EM de las especies protonadas y cationizadas dió los siguientes resultados:

	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Li] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
Compuesto LVIII	843	n/o	865	881
Compuesto LX	987	993	1009	1025

n/o: no observado

	masa exacta del ión $[M+K]^+$	fórmula molecular
Compuesto LVIII	881.3915	$C_{42}H_{66}O_{17}K$
Compuesto LX	1025.4675	$C_{49}H_{78}O_{20}K$

En los espectros EM/CAD/EM de los iones  $[M+H]^+$  se observaron los iones  $AH_2^+$  (aglicona+H),  $F_1H_2^+$  (M-hexosa normal),  $F_2H_2^+$  (M-2 hexosas normales) y otros fragmentos iónicos consistentes con la secuencia hexosa normal-hexosa normal-(didesoxi-OMe-hexosa) $_n$ -digitoxigenina, con  $n=1$  en el caso del compuesto LVIII y  $n=2$  en el caso del compuesto LX.

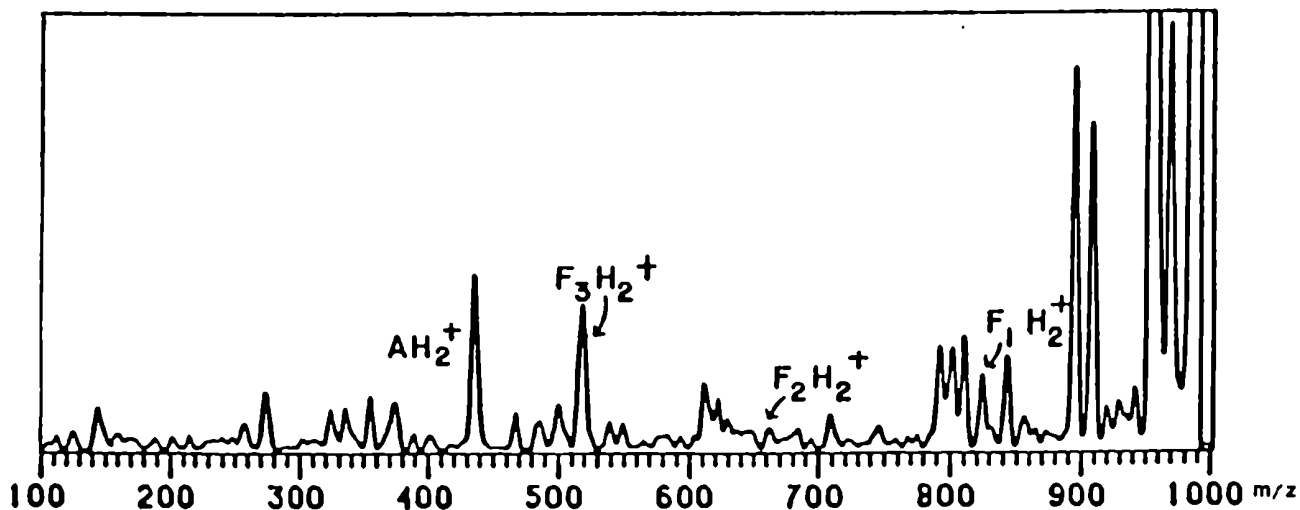


Fig. 92. Espectro EM/CAD/EM del ión  $[M+H]^+$  del compuesto LX.

El espectro de RMN- $^{13}C$  de ambos compuestos confirmó la secuencia planteada y permitió deducir que las OMe-didesoxihexosas eran  $\beta$ -D-cimarosa.

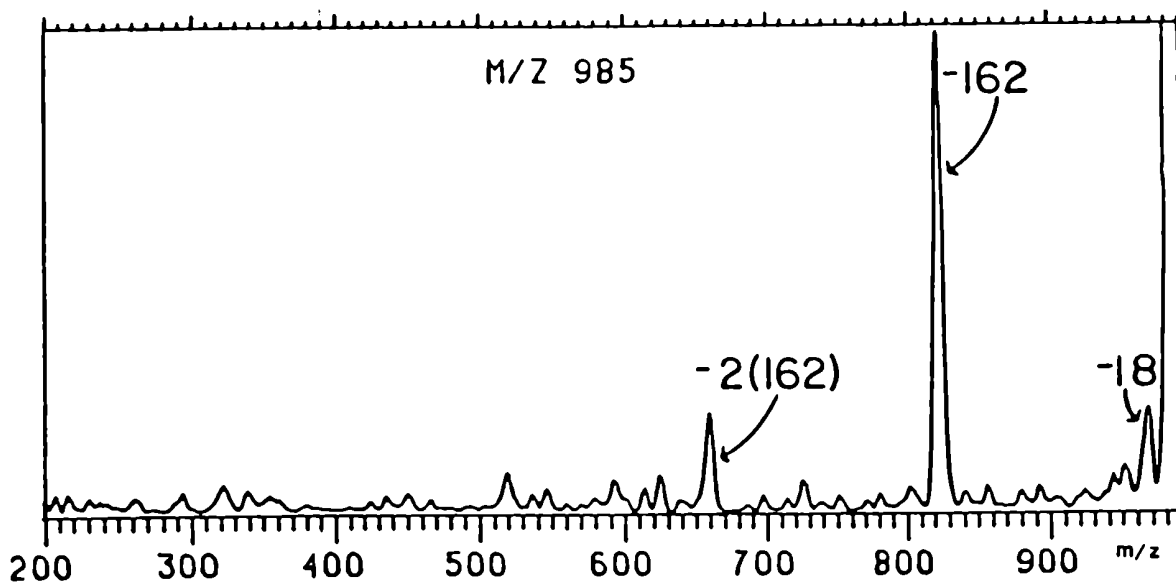


Fig. 93. Espectro EM/CAD/EM del ión  $[M-H]^-$  del compuesto LX.

Los compuestos LVIII y LX fueron hidrolizados observándose por ccd, después de la hidrólisis, manchas con Rf coincidentes con digitoxigenina, glucosa y 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosa. Los monosacáridos fueron derivatizados de modo de obtener los correspondientes alditoles y aldononitrilos acetilados, y éstos fueron analizados por CGL y por coinyección con muestras auténticas. Se determinó así la presencia de cimarosa y glucosa en los dos compuestos.

El valor de las constantes de acoplamiento de los protones anoméricos en los espectros de RMN- $^1H$  permitió confirmar la configuración de dichos hidrógenos como  $\beta$  ( $\beta$ -cimarosa y  $\beta$ -glucosa), lo cual se había estimado a partir de los espectros de RMN- $^{13}C$ .

Debido a la presencia en el espectro de RMN- $^{13}C$  de una señal única y simple a 62.1 ppm correspondiente al carbono de la posición 6 con hidroxilo libre de glucosa se estableció la unión Glc-(1-6)-Glc en ambos compuestos. Esta determinación fue avalada por las demás señales de ambas glucosas en dichos espectros.



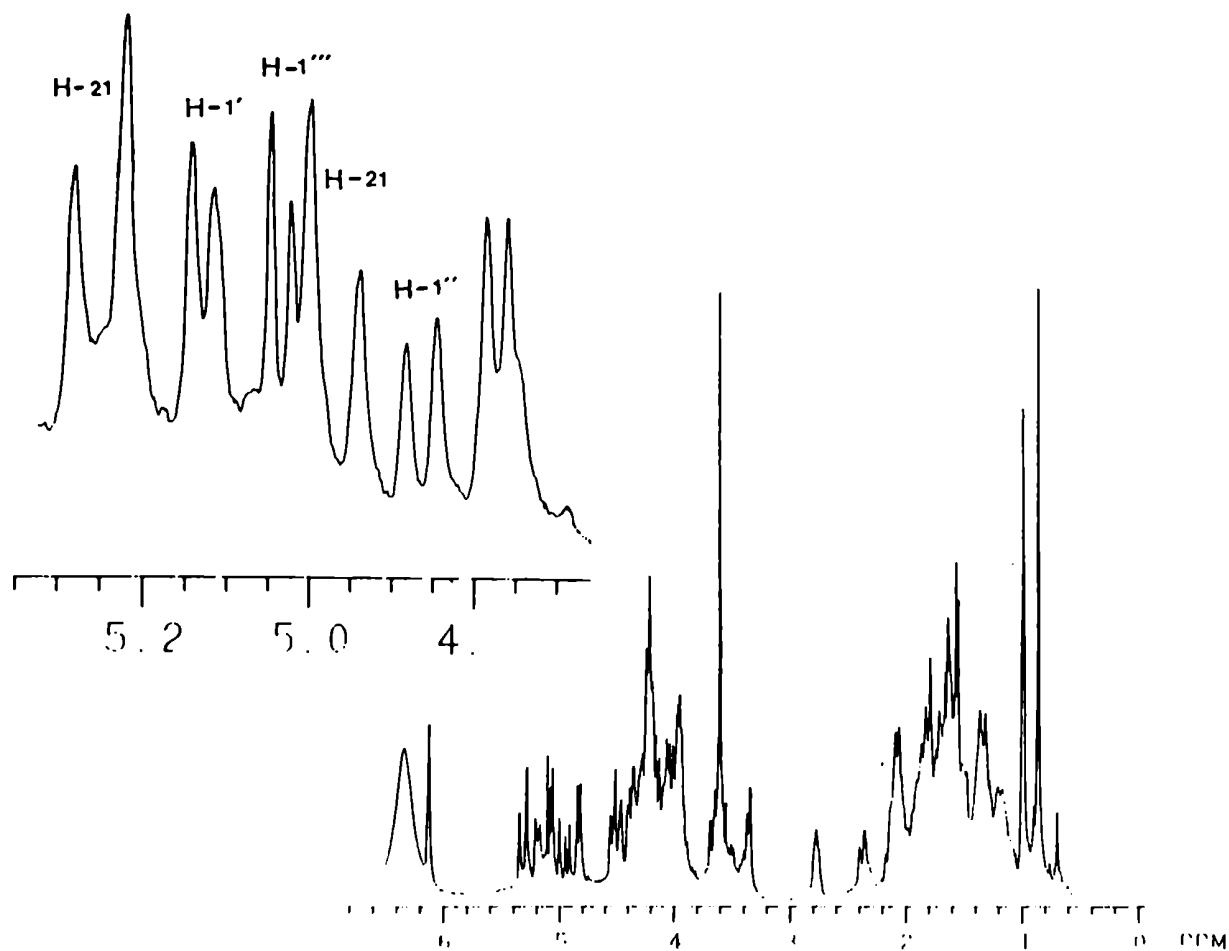


Fig. 94. Espectro RMN- $^1\text{H}$  del compuesto LVIII.

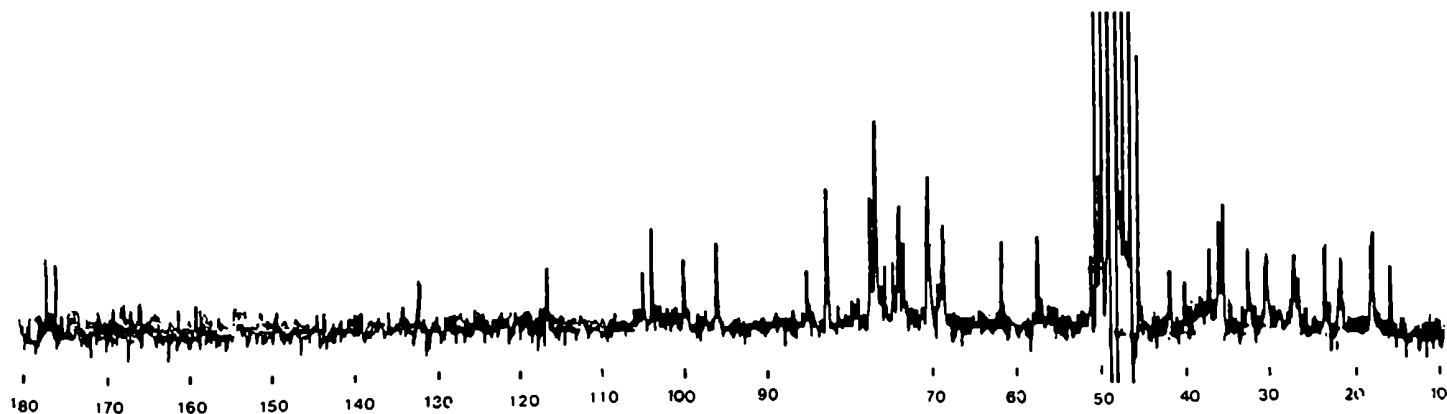


Fig. 95. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto LX.

Asumiendo que tanto la glucosa como la cimarsa pertenecían a la serie D, avalado por los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  de los compuestos LVIII y LX [43], el compuesto LVIII fue identificado como digitoxigenina 3-O-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosido] y el compuesto LX como digitoxigenina 3-O-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosido].

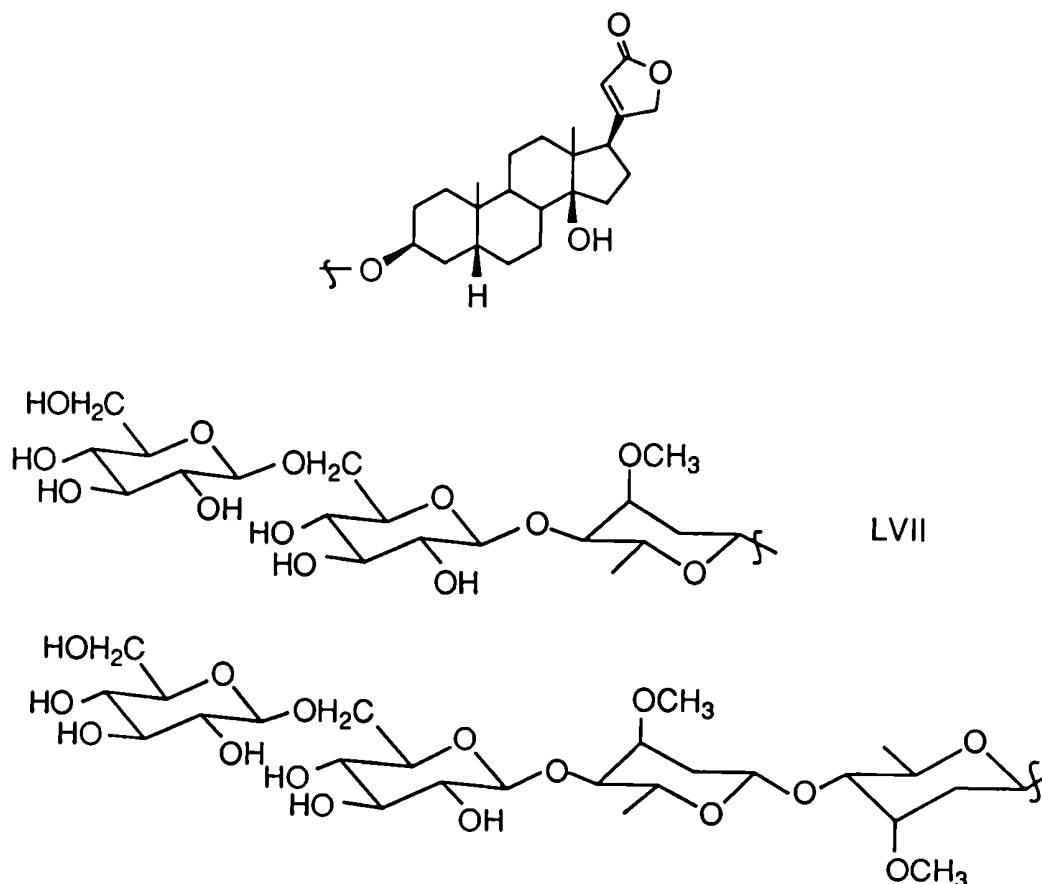


Fig. 96. Compuestos LVIII y LX.

## Análisis del compuesto LXI

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de este compuesto indicaba que el mismo era un pentaglicósido de digitoxigenina y los desplazamientos químicos de sus carbonos anoméricos eran 96.5, 100.4, 102.6, 103.9 y 104.3 ppm.

La determinación del peso molecular dió el siguiente resultado:

ión	m/z	masa exacta	fórmula molecular
$[\text{M}+\text{Li}]^+$	1137		
$[\text{M}+\text{Na}]^+$	1153		
$[\text{M}+\text{K}]^+$	1169	1169.5419	$\text{C}_{56}\text{H}_{90}\text{O}_{23}\text{K}$

El espectro EM/CAD/EM del ión  $[\text{M}+\text{H}]^+$  del compuesto LXI presentaba pérdidas de 162 u ( $\text{F}_1\text{H}_2^+$ ), 2x 162 u ( $\text{F}_2\text{H}_2^+$ ), 2x 162 +144 u ( $\text{F}_3\text{H}_2^+$ ), y 2x 162 +2x 144 u ( $\text{F}_4\text{H}_2^+$ ), indicando la presencia de tres didesoxi-OMe-hexosas linealmente unidas a la aglicona y dos hexosas normales unidas a éstas.

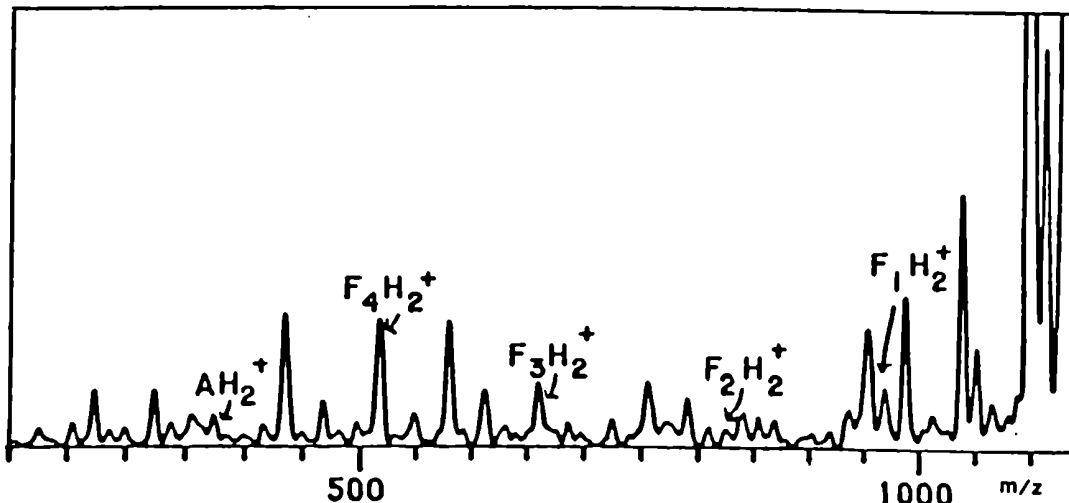


Fig. 97. Espectro EM/CAD/EM del ión  $[\text{M}+\text{K}]^+$  del compuesto LXI.

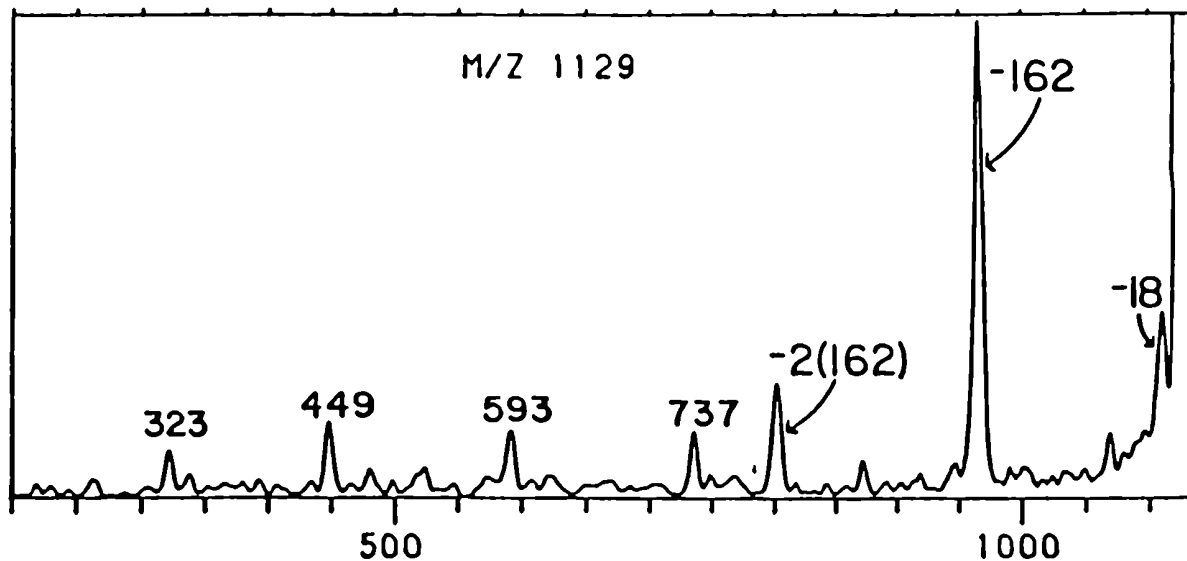


Fig. 98. Espectro EM/CAD/EM del ión  $[M-H]^-$  del compuesto LXI.

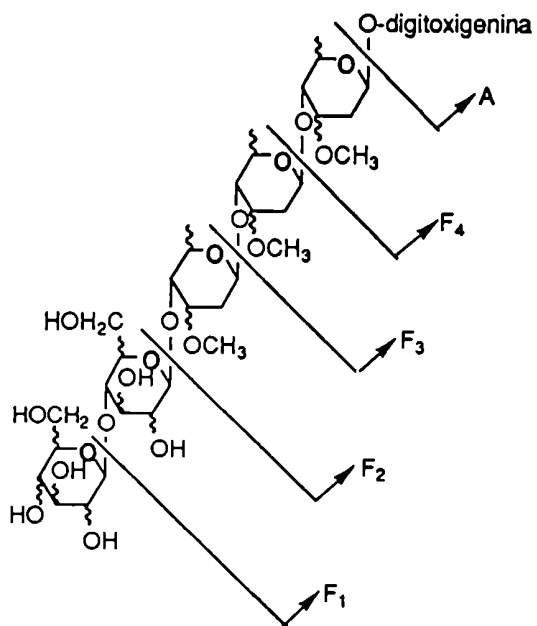


Fig. 99. Esquema de fragmentaciones por EM/CAD/EM del compuesto LXI.

La interpretación de este espectro no resultó sencilla debido al gran número de fragmentos iónicos presentes, muchos de los cuales no pudieron ser explicados. En este sentido los espectros EM/CAD/EM de los iones  $[M+Li]^+$  y  $[M-H]^-$  fueron de gran importancia debido a su mayor simplicidad. En ellos se observaron sólo los fragmentos  $F_1H_2^+$ ,  $F_2H_2^+$  y  $F_3H_3^+$ , lo que permitió corroborar la secuencia anteriormente planteada.

Fue efectuada una hidrólisis ácida del compuesto **LXI** y los azúcares obtenidos fueron derivatizados como alditoles acetilados. Su análisis por CGL indicó que los monosacáridos eran cimarosa, diginosa y glucosa en una relación aproximada 2:1:2. Este resultado fue coincidente con los datos obtenidos a partir de EM.

Los valores de desplazamiento químico para los carbonos 2, 6 y MeO- de las 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosas en el espectro de RMN- $^{13}C$  del compuesto **LXI** avalaban también la presencia de diginosa y cimarosa en el compuesto [46]. En particular, el carbono anomérico a 96.5 ppm era característico de  $\beta$ -D-cimarosa unida a digitoxigenina, por lo cual se podían plantear entonces para el compuesto **LXI** las siguientes estructuras:

**caso i: Glc-Glc-Dgn-Cim-Cim-Digitoxigenina**

**caso ii: Glc-Glc-Cim-Dgn-Cim-Digitoxigenina**

Para determinar cual de las dos posibles estructuras antes mencionadas para el compuesto **LXI** era la correcta se realizó un análisis de corrimientos de desplazamientos químicos en forma teórica para cada unión glicosídica en los casos i y ii. Resultó importante para la conclusión obtenida la unión glicosídica entre la glucosa y la 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosa. Los valores calculados para el

desplazamiento químico de RMN- $^{13}\text{C}$  de C-1<sup>IV</sup> de glucosa son los siguientes:

C-1<sup>IV</sup> Glc

$\beta$ -D-Glc- $\beta$ -D-Dgn (caso i): 103.8 ppm

$\beta$ -D-Glc- $\beta$ -D-Cim (caso ii): 106.0 ppm

El valor de desplazamiento químico observado experimentalmente para ese carbono fue de 103.9 ppm. Por lo tanto la secuencia quedó determinada como:

**Glc-Glc-Dgn-Cim-Cim-Digitoxigenina**

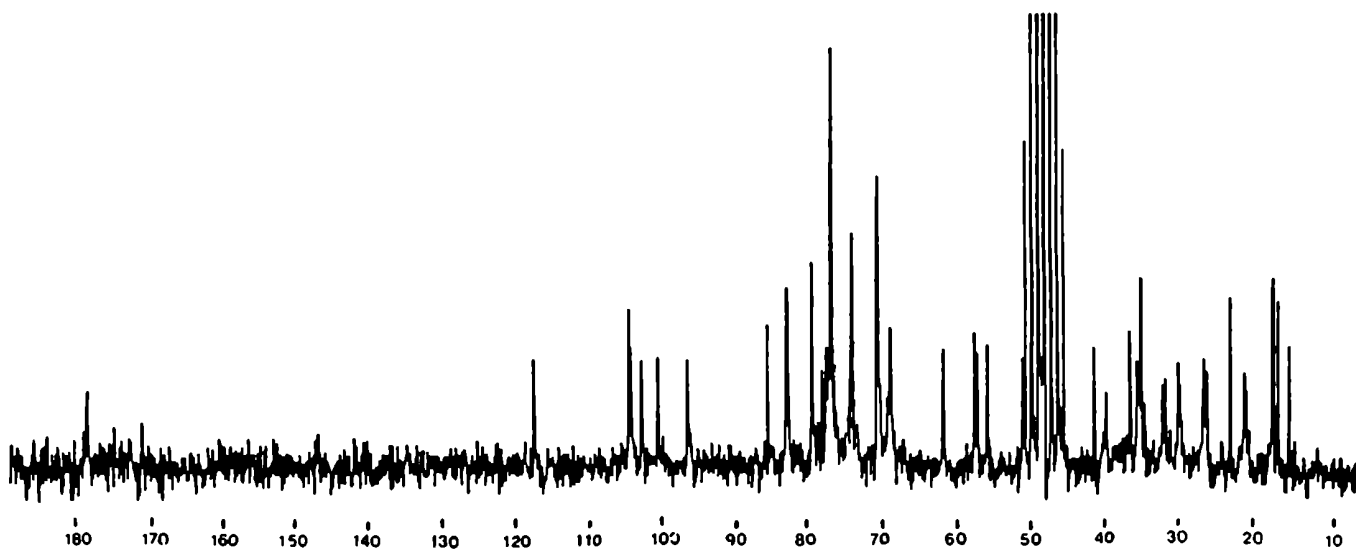


Fig. 100. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto LXI.

Debido a la presencia de una única señal a 62.1 ppm en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de LXI fue determinada la unión entre las glucosas a través de la posición 6. Las señales en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  correspondientes a los demás carbonos de las glucosas resultaron consistentes con esta determinación [45].

Sobre la base de los datos expuestos el compuesto LXI fue identificado como digitoxigenina 3-O- $[\beta\text{-D-glucopiranosil-(1-6)-}\beta\text{-D-glucopiranosil-(1-4)-}\beta\text{-D-diginopiranosil-(1-4)-}\beta\text{-D-cimaropiranosil-(1-4)-}\beta\text{-D-cimaropiranosido}]$ .

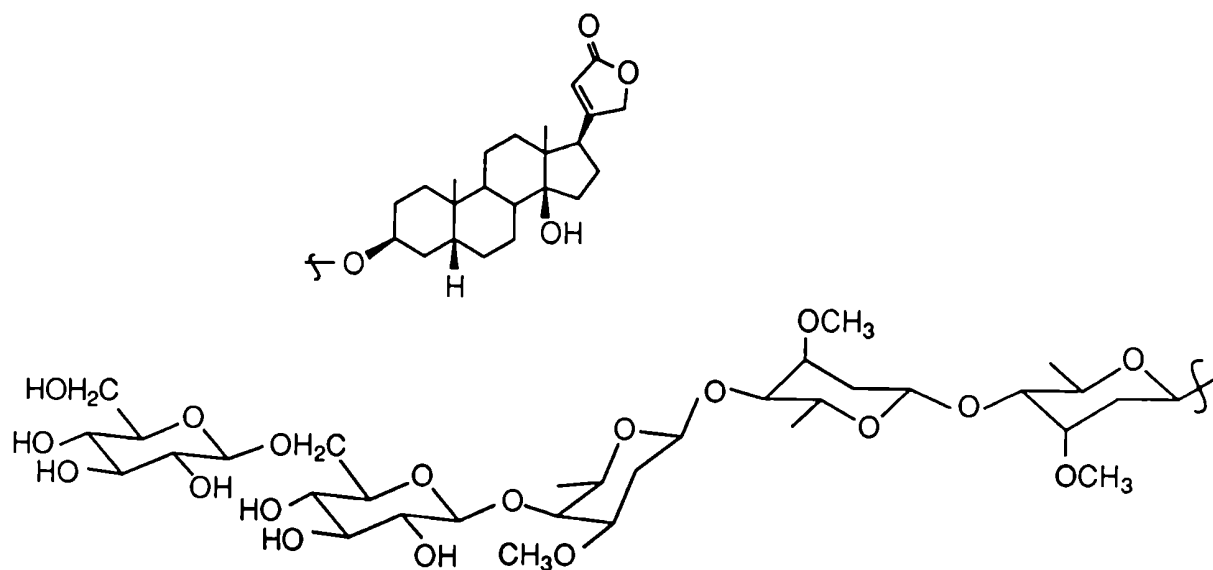


Fig. 101. Compuesto LXI.

Cabe destacar que los compuestos LVII y LIX-LXI no han sido hasta el momento descritos en la literatura como productos naturales.

Actividad citotóxica: Se ensayó la actividad citotóxica de los compuestos LVI a LXI frente al sistema KB, resultando todos inactivos.

Actividad antiviral: El compuesto LXI presentó actividad antiviral frente al herpes HSV II (herpes simplex virus) a una concentración de 0.5 µg/ml (concentración 10 veces inferior a la concentración tóxica), con un porcentaje de reducción de la población viral de un 99.6 %. Los compuestos LVI-LX resultaron altamente tóxicos.

### Subfracción B

Esta subfracción fue acetilada con Ac<sub>2</sub>O-Py y los productos acetilados fueron purificados por cromatografía en columna de sílica. Se obtuvieron dos subfracciones, una de las cuales contenía el compuesto LXIV puro y la otra era una mezcla de los compuestos LXV y LXVI de acuerdo con los datos obtenidos por CGL

Sobre la base de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C el compuesto LXIV fue identificado como sacarosa peracetilada y los compuestos LXV y LXVI como α y β-glucosa peracetilados.



***Discusión de los resultados  
obtenidos***

## **Hidrocarburos**

El patrón para la composición de hidrocarburos observado en este trabajo, con predominio de hidrocarburos impares sobre los pares, es coherente con los patrones habituales en plantas superiores [142]. Si bien los constituyentes más abundantes suelen ser los hidrocarburos de 29 ó 31 átomos de carbono, en este trabajo se encontraron como mayoritarios los de 23 y 25 átomos de carbono. Este hecho no reviste mayor importancia ya que la diferencia en la composición puede deberse a variables biológicas (tipo de tejido, etc.) y a influencia del entorno [142].

Debido a estos hechos y a que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se ha descartado [143] el empleo del patrón de hidrocarburos para diferenciar familias y sólo en pocas ocasiones se ha empleado con éxito para diferenciar géneros [144].

## **Acidos grasos y derivados biosintéticos**

Los alcoholes lineales son muy comunes y están ampliamente distribuidos en plantas. En vista de ello la obtención de alcoholes lineales de 16 y 18 átomos de carbono en este trabajo no presenta mayor interés desde el punto de vista quimiotaxonómico. Los aldehídos y las cetonas lineales se encuentran con menos frecuencia [142].

La formación de alcoholes, aldehídos y cetonas lineales a partir de ácidos grasos se ha atribuido a procesos térmicos o enzimáticos [145].

Las etilcetonas encontradas muestran una preponderancia de las de número impar de carbonos sobre las de número par, siendo mayoritarias las de 15 y 17 carbonos (ver tabla 11, pág. 161). Se descarta que sean artefactos producidos por descomposición térmica de ácidos grasos durante la saponificación de la fracción de la que provienen, debido a que sólo fueron encontrados en una de las dos fracciones saponificadas.

El compuesto III, 1-OMe-hexadecanal, posiblemente sea un artefacto originado a partir de hexadecanal en la separación de la fracción por CLAR utilizando metanol como solvente.

La composición en ácidos grasos libres responde a las características generales de lo observado en plantas superiores [142,146]. En especial, el contenido de ácidos grasos comunes de 16 y 18 átomos de carbono (C 16:0, C 18:0, C 18:1 y C 18:2) con preponderancia de ácido palmítico (C 16:0) es característico de la familia Apocynaceae [147,148].

Los ésteres de ácidos grasos de esteroides no son producidos por una reacción de esterificación simple y reversible a partir de esteroides y ácidos grasos ya que se requiere la presencia de 1,2-diacil o triacilglicerol como donador de grupos acilo, en contraste con la producción de ésteres de esteroides en tejidos de animales, en los cuales acilcoenzima A o fosfatidilcolina son los donadores de grupos acilo. Estudios realizados sobre especificidad enzimática en hojas de espinaca y en raíces de *Zea mays* han demostrado una inespecificidad con respecto a los sustratos esteroides (emplearon los más comunes) y en cambio especificidad con respecto de los ácidos grasos, mostrando una preferencia por los más insaturados [149]. Las razones de esta preferencia no han sido aún aclaradas.

Acido graso	libre (%)	esterif. $\Delta^{20}$ esteroles (%)	6-cetoest. (%)	esterif. Glc-est. (%)	monoglicé ridos
14:3			1.6		
15:1		5.6	4.9		
15:3	1.4				
16:0	43.2	16.7	17.8	41.1	+
16:3		34.7	17.1		
17:0	2.3	0.5			
18:0	7.4	3.8	3.9	8.9	
18:1	20.1	6.8	15.3	11.1	+
18:2	18.8	23.8	30.0	29.4	
18:3		1.0	5.3		
no identif.	6.8	7.1	4.1	9.5	
% saturados	56.8	22.6	22.6	55.2	
% insat.	43.2	77.4	77.4	44.8	

Tabla 5. Composición porcentual (%) de ácidos grasos aislados en distintas fracciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo avalan estos hechos, ya que se observa un predominio de ácidos grasos insaturados (ver tabla 5) en los ésteres de esteroides. En este sentido es sorprendente el elevado porcentaje del ácido graso C 16:3, que no fue detectado como ácido graso libre.

Los ácidos grasos obtenidos en otras fracciones, como ésteres de glucósidos de esteroides y monoglicéridos presentan similar composición a la de ácidos grasos libres.

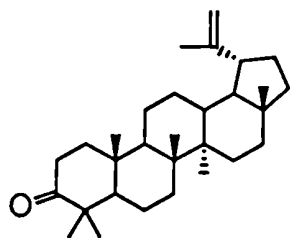
### **Triterpenoides**

La familia Apocynaceae no se ha caracterizado por presentar gran variedad de esqueletos triterpénicos. Se han aislado de esta familia principalmente  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, libres o esterificadas con ácidos grasos o ácido acético [150], los ácidos oleánico y ursólico; lupeol, libre o esterificado; y otros pocos derivados con los mismos esqueletos [10,11,151].

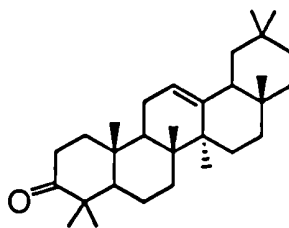
Debido a la amplia distribución de estos compuestos en plantas superiores su aislamiento no reviste interés desde el punto de vista quimiotaxonómico a nivel familia [142] y posiblemente tampoco sea posible su utilización a nivel género o especie.

Los triterpenoides aislados del extracto de raíz de *Mandevilla pentlandiana* se muestran en la figura 102, y como puede observarse en la misma responden en línea general a lo antes mencionado para la familia.

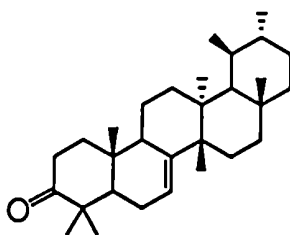
El aislamiento de 24-metilencicloartanona en este trabajo no resulta sorprendente debido a que cicloartenol y 24-metilencicloartanol juegan un rol importante en la biosíntesis de fitoesteroides [152-154] y debido a que se estima que en algún paso de la biosíntesis de los mismos, previo a la demetilación de carbono 4, se produce un intermediario 3-ceto [154].



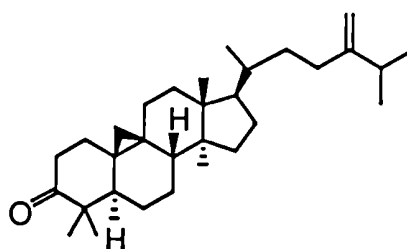
IV



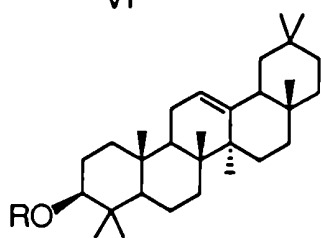
V



VI

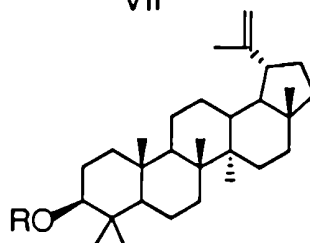


VII



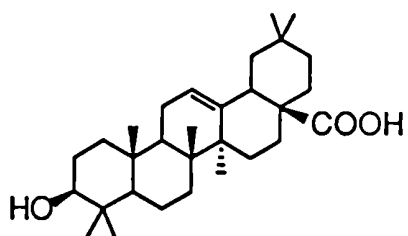
R=H (XX)

R= acido graso

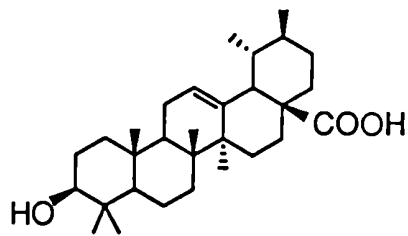


R=H (XXI)

R= acido graso



XXXI



XXXII

Fig. 102. Triterpenoides aislados en este trabajo.

## **Esteroles**

### *Acilesteroles:*

Numerosas investigaciones revelan que ciertos tejidos de plantas, particularmente las raíces, contienen tanto enzimas para la síntesis como para la hidrólisis de ésteres de esteroides. Esto conduce a la especulación de que los ésteres de esteroides pueden tener un rol dinámico importante en los procesos de producción de fitoesteroides, de manera de regular la cantidad de esteroides libres necesarios como precursores para otros procesos biosintéticos. En ciertos procesos biosintéticos se requiere por ejemplo, la oxidación en carbono 3 y los ésteres podrían actuar en este caso bloqueando ese paso, frenando todo el proceso hasta que una nueva producción del metabolito final en dicho proceso sea requerida por la planta [149].

No hay fundamentos en cambio, que avalen la suposición de que los ésteres de esteroides puedan ser requeridos para el transporte de esteroides entre distintos tejidos de la planta, aunque la posibilidad de que estén involucrados en movimientos intracelulares de esteroides junto con proteínas transportadoras tiene que ser todavía investigada [149].

Debido a la diferente composición observada en este trabajo entre esteroides libres y esterificados (ver tablas 5 y 6), que da cuenta de la selectividad de los procesos de esterificación, es posible especular teniendo en cuenta los hechos mencionados, sobre el rol de los ésteres de esteroides en la biosíntesis de compuestos que utilicen a esos esteroides como precursores.

### $\Delta^{20}$ esteroides:

Los esteroides del ámbito marino siempre mostraron una mayor variedad estructural, y por ello se consideró esa diversidad como propia de ese medio y de organismos inferiores. Se asumió que esos esteroides "únicos" jugaban un rol importante y particular como componentes de membranas en esos organismos [155,156].

En los últimos años hubo un renovado interés en el aislamiento e identificación de esteroides de plantas superiores, posiblemente debido al uso de técnicas más modernas de separación. Es así que se identificaron en el ámbito terrestre esteroides no comunes, ya aislados de fuentes marinas o sin precedentes [157-159].

En la figura 103 se muestran algunos ejemplos de esteroides aislados de fuentes terrestres.

Esteroides  $\Delta^{17(20)}$  y  $\Delta^{20(22)}$  fueron aislados en el ámbito marino [162,163], pero no había sido informado previamente el aislamiento de  $\Delta^{20}$  esteroides como productos naturales.

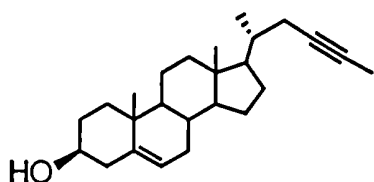
Derivados de este tipo fueron sintetizados con el fin de acumular datos espectroscópicos previendo su aislamiento de organismos marinos y con el fin de analizar sus fragmentaciones en espectrometría de masa [79].

Los esteroides aislados en este trabajo como derivados esterificados se muestran en la fig. 104 y se detalla su composición en la tabla 6.

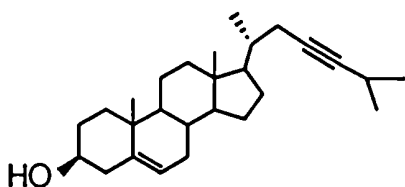
Se descarta la posibilidad de que los  $\Delta^{20}$  esteroides sean artefactos producidos en la saponificación, ya que las señales características en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de estos compuestos a  $\delta$  4.8-4.9 se observaban en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la fracción antes de su saponificación.



Es interesante el aislamiento de estos compuestos, ya que están estructuralmente relacionados con los correspondientes 20-hidroxiderivados y éstos últimos posiblemente sean precursores de cardenólidos (ver pág. 15). Estos 20-hidroxiderivados no fueron aislados libres ni esterificados y su conexión con  $\Delta^{20}$  esteroides, así como el rol de los  $\Delta^{20}$  esteroides en la biosíntesis de cardenólidos deberá ser demostrada.



esteroides aislados de  
*Gynostemma pentaphyllum*  
(Cucurbitaceae) [157]  
y de la esponja *Calyx*  
*niceaensis* [160].



esteroides aislados  
de semillas de  
*Phaseolus vulgaris*  
(Leguminosae) [161]

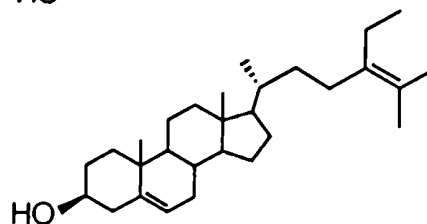
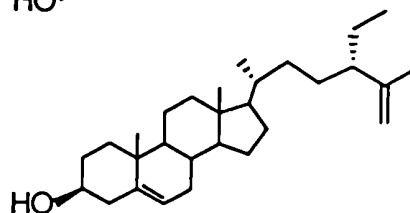
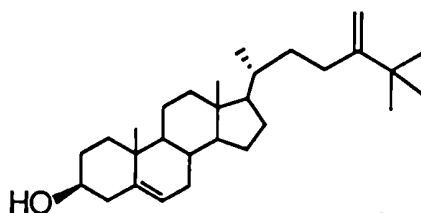


Fig. 103. Esteroides aislados de fuentes terrestres.

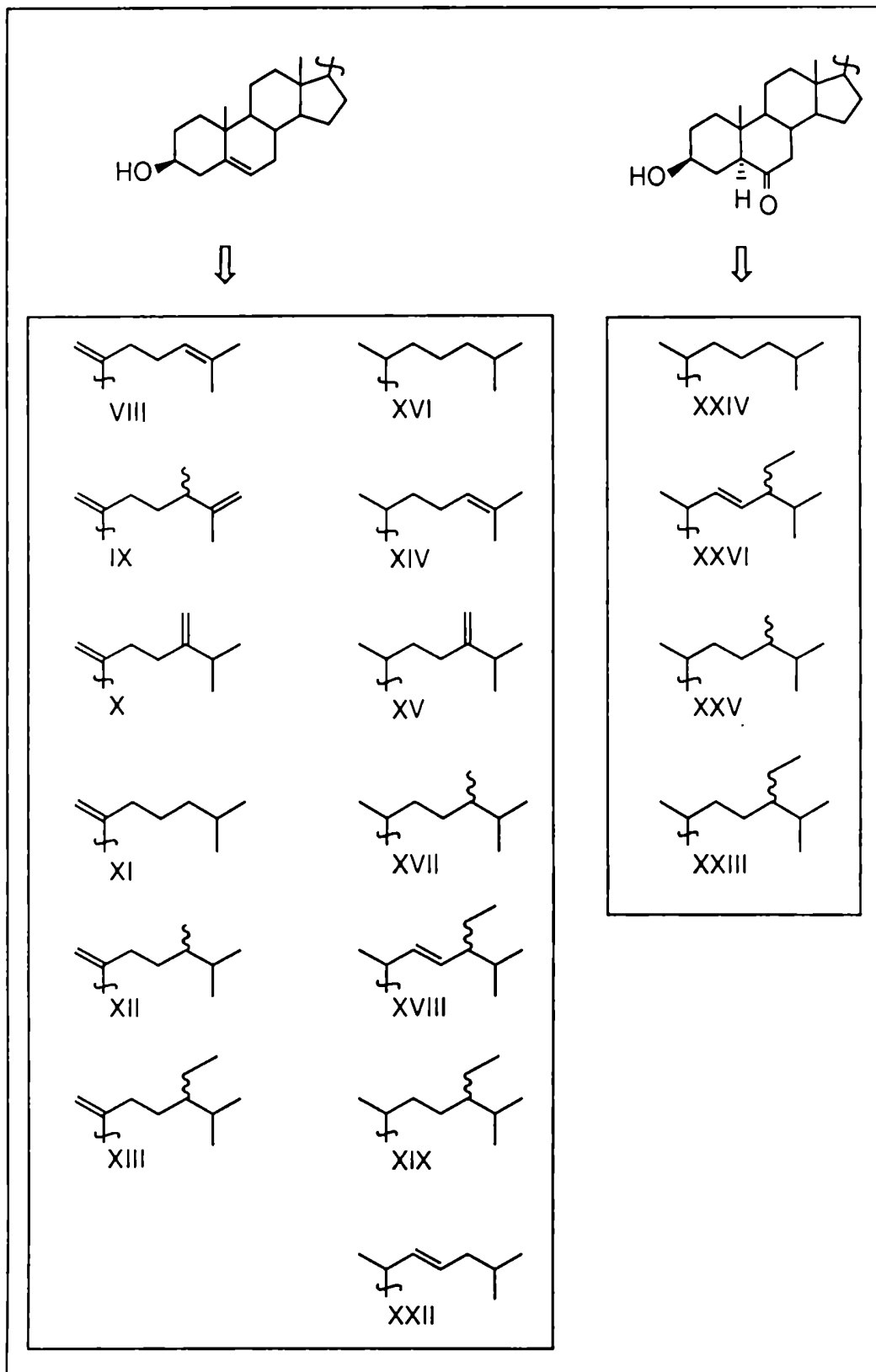


Fig. 104. Esteroles esterificados aislados en este trabajo.

Compuesto	%	Compuesto	%
VIII	9.6	XVII	15.5
IX	0.6	XVIII	2.1
X	25.6	XIX	28.8
XI	6.8	XXII	tr.
XII	tr.	XXIII	2.5
XIII	2.6	XXIV	tr.
XIV	0.6	XXV	0.4
XV	0.5	XXVI	0.9
XVI	3.4		

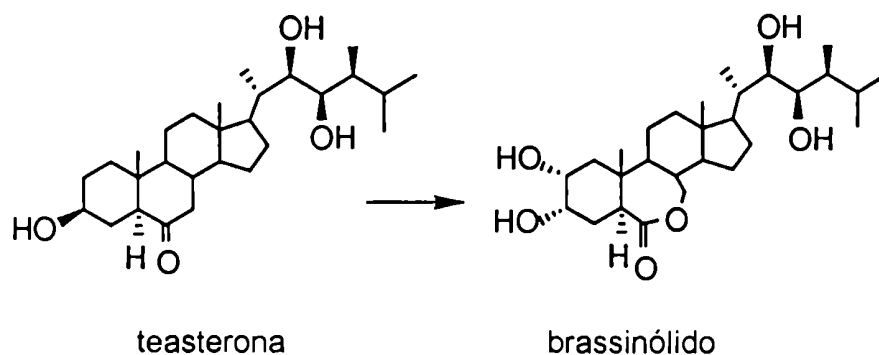
Tabla 6. Composición de esteroides esterificados.

El hecho de que los  $\Delta^{20}$  esteroides se encuentren sólo en forma esterificada indicaría que están involucrados en un proceso biosintético en el cual son precursores, según lo argumentado en la discusión de acilesteroides.

*5 $\alpha$ -6-cetoesteroides:*

El posible rol de los 5 $\alpha$ -6-cetoesteroides en la planta, a diferencia del de los  $\Delta^{20}$  esteroides, resulta menos evidente, ya que posiblemente sean también intermediarios biosintéticos de otros productos (no aislados) teniendo en cuenta que se aislaron en forma esterificada.

Estos 5 $\alpha$ -6-cetoestanoles, nuevos como productos naturales, llaman la atención en virtud de su parecido estructural con teasterona, un compuesto considerado precursor de brassinosteroides [164]. Los brassinosteroides, hormonas de crecimiento de plantas [165, 166], no fueron extensamente estudiados hasta la década pasada, y su presencia se consideraba restringida a ciertos géneros. Ultimamente se ha observado que se encuentran ampliamente distribuidos en varias familias y especialmente en ciertos tejidos [164].



*Fitoesteroles comunes:*

El compuesto **XV**, 24-metilcolesterol, se ha encontrado en numerosas ocasiones en el ámbito terrestre, principalmente en polen, del cual suele ser uno de los esteroides mayoritarios [151].

Los esteroides mayoritarios en plantas superiores suelen ser sitosterol, campesterol y estigmasterol, hecho con el cual concuerda el resultado del presente trabajo. Las hipótesis aceptadas sobre su rol fisiológico son el de actuar como hormonas o precursores de hormonas y estar involucrados en el reordenamiento estructural de membranas [153, 167].

Desde un punto de vista funcional se clasifica a los esteroides, según la sustitución que presentan en carbono 3, en cuatro grupos:

- esteroides libres
- ésteres de esteroides (ésteres de ácidos grasos)
- glicósidos de esteroides
- 6-O-acilglicósidos de esteroides (ésteres de ácidos grasos) [153].

	libres	esterif.	glucos.	acilglucos.
colesterol (XVI)		3.4		
campesterol (XVII)	11.4	15.5	7.6	8.9
estigmasterol (XVIII)	19.0	2.1	14.9	9.8
sitosterol (XIX)	67.7	28.8	76.0	77.8
total	98.1	49.8	98.5	96.5
relación sito/estig.	3.6	13.7	5.1	7.9

Tabla 7. Composición de esteroides comunes (en %) según su clasificación funcional.

El aislamiento de glicósidos de esteroides y de ésteres de glicósidos de esteroides se ha informado en numerosas ocasiones en gran variedad de familias. Se considera que los glicósidos de esteroides existen en todas las plantas. Los esteroides que han sido encontrados hasta el momento son sitosterol, campesterol, estigmasterol y colesterol y no se encontró ninguno de

sus precursores. El hidrato de carbono presente en estos compuestos es generalmente glucosa, aunque se han encontrado también manosa, xilosa y ácidos urónicos. En todos los casos el azúcar está unido por C-1 a C-3 del esteroles y en el caso de los ésteres de ácidos grasos de glucósidos de esteroides, la esterificación tenía lugar en la posición 6 del azúcar (4 en el caso de xilosa [114]) [153].

No hay datos suficientes ni concluyentes como para asegurar cual es la función de estos glicósidos en la planta, aunque la hipótesis de que contribuyen al transporte de esteroides es la más aceptada [153].

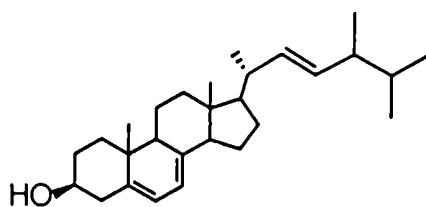
El contenido de glicósidos y acilglicósidos de esteroides no cambia significativamente con la edad de la planta. Sin embargo, suele observarse una variación en la relación sitosterol: estigmasterol. El contenido diferente de esteroides en sus distintas formas indica que todas esas formas no se hallan en un simple equilibrio. Aunque los cambios en la composición sean pequeños es muy posible que esas mínimas diferencias influyan en la fisiología de la planta [167].

En particular en este trabajo se ha observado que si bien no hay diferencias globales significativas entre la composición de los esteroides libres y los glicosidados, la relación sitosterol: estigmasterol varía considerablemente (ver tabla 7).

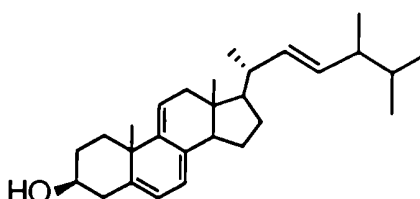
#### **Peróxidos de esteroides:**

Los peróxidos de esteroides han sido aislados en numerosas ocasiones, tanto de hongos como de invertebrados marinos [168-172].

Aunque se especuló con la posibilidad de que el peróxido de ergosterol sea un artefacto obtenido fotoquímicamente a partir de ergosterol, se ha demostrado que en la transformación de ergosterol al correspondiente epidióxido en hongos no relacionados taxonómicamente, operan tanto un paso fotoquímico como uno enzimático [172].



ergosterol



$\Delta^{9(11)}$  ergosterol

Los  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesteroles no parecen ser productos finales de un proceso metabólico, y es probable que puedan actuar como sustratos de varios sistemas enzimáticos [172]. Existe una hipótesis sobre la participación de epidióxidos en la introducción de funciones oxigenadas en terpenos [173]. El aislamiento conjunto de epidioxiesteroles y  $\Delta^{4,7}$ -3,6-dicetonas en la esponja *Raphidostila incisa* ha conducido a la suposición de que estos esteroides puedan ser los precursores de las cetonas [169].

La posibilidad de que los compuestos **XXXIII** y **XXXIV** aislados en el presente trabajo sean artefactos generados en el procesamiento del extracto se excluye debido a que no se detectó ninguno de los correspondientes  $\Delta^{5,7}$  y  $\Delta^{5,7,9(11)}$  esteroides, de los cuales deberían provenir por fotooxidación [169].

La presencia de hongos en la raíz de *Mandevilla pentlandiana* parecería improbable debido a que no se detectó ergosterol, generalmente el esteroide mayoritario en hongos y a las cantidades aisladas de estos compuestos y además, debido a que el compuesto **XXXIV** fue aislado únicamente de organismos marinos.

El origen biosintético de estos compuestos y la función que cumplen en la planta, así como su posible conexión con otros metabolitos aislados queda aún por elucidar.

El compuesto **XXXIII** presenta actividad citotóxica en adenocarcinoma MCF-7 y carcinosarcoma Walker 256 [109].

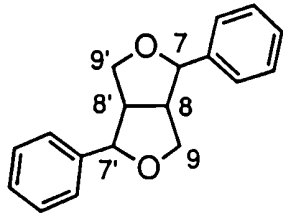
Cabe destacar que los compuestos **XXXIII** y **XXXIV** no habían sido aislados de plantas superiores anteriormente.

## Lignanos

En particular, en la familia Apocynaceae, el aislamiento de lignanos era característico en el género *Trachelospermum* [9,146] pero recientemente han aparecido informes de su aislamiento en el género *Allamanda* [174], *Cerbera* [175] y *Parsonsia* [176]. Mientras que los lignanos aislados de *Trachelospermum* no presentan una característica estructural común, los aislados de los otros géneros poseen un sistema 7,9' y 7',9-bisepoxilignano o relacionado (con apertura de un ciclo).

El compuesto **LI**, (+)-pinoresinol, fue aislado en numerosas ocasiones [174], es el más común de los lignanos con el esqueleto antes mencionado y es conocida su actividad antihipertensiva y sedativa [177].





Esqueleto 7, 9'-9, 7' bisepoxilignano

El compuesto LII, (+)-8- $\alpha$ -hidroxipinoresinol fue aislado en el género *Olea* (Oleaceae) [136] y ésta es la primera vez que se lo aísla en la familia Apocynaceae.

### Pregnanos

La presencia de pregnanos está siempre relacionada con los productos de los cuales son precursores, principalmente hormonas esteroidales, alcaloides y cardenólidos [178,179] debido a que generalmente no son productos finales en los procesos metabólicos.

Los pregnanos aislados de plantas presentan las siguientes características estructurales [180]:

- poseen doble enlace  $\Delta^5$  o configuración  $\alpha$  en C-5.
- presentan fusión de anillos B y C *trans*.
- presentan fusión de anillos C y D *cis* en el caso de haber un grupo hidroxilo en posición 14, lo cual es muy frecuente, y *trans* en el caso de haber un hidrógeno en posición 14.
- en general poseen grupos hidroxilo adicionales en diversas posiciones, algunos de los cuales pueden estar esterificados o glicosidados.
- contienen uno o varios grupos carbonilo en posiciones 1,3,12,15 ó 20.

Si bien se han encontrado excepciones a las características antes enumeradas, éstos casos no son frecuentes.

Las características de los pregnanos de la familia Apocynaceae fueron comentadas en el capítulo 1 (pág. 5).

Por los datos expuestos resulta evidente que el compuesto **XLIII** (pág. 72) aislado en este trabajo no responde a las características estructurales observadas en los pregnanos de la familia, ni tampoco a aquellas más generales antes enunciadas.

Con respecto a la presencia de un grupo metoxilo en la posición 21 en el compuesto **XLIII**, puede descartarse la posibilidad de que sea un artefacto por varios motivos:

- no se empleó MeOH en el proceso extractivo
- las condiciones de aislamiento del compuesto **XLIII** fueron aplicadas al compuesto 3 $\beta$ -acetil-14 $\beta$ ,21-dihidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (**XLVIa**) y no se observó metilación
- no se detectó la presencia del 21-hidroxi-derivado correspondiente, producto que debería dar origen al compuesto **XLIII**
- la introducción sintética del grupo metoxilo resulta dificultosa y no se esperaría que fuese cuantitativa.

Más aún, se ha informado [181,182] del aislamiento de 21-metoxi-pregnanos naturales de *Periploca sepia* (Asclepiadaceae).

Es sabido [38] que 3 $\beta$ ,14 $\beta$ ,21-trihidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona es un intermediario en la biosíntesis de cardenólidos (pág. 15), sin embargo nunca fue aislado como producto natural.

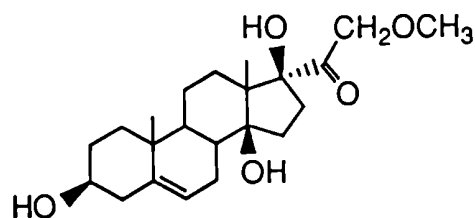


Fig. 105. Pregnano aislado de *Periploca s.*

Por lo tanto el aislamiento del compuesto **XLIII** plantea algunos interrogantes acerca de la biosíntesis de cardenólidos, ya que es notoria su relación con el compuesto mencionado en el párrafo anterior. Sin embargo, la presencia del metoxilo en posición 21 del esteroide plantea la posibilidad de que ésta sea una forma de bloqueo de la biosíntesis, ya sea para almacenar el intermediario regulando el proceso, o como una reacción lateral conducente a un producto de deshecho.

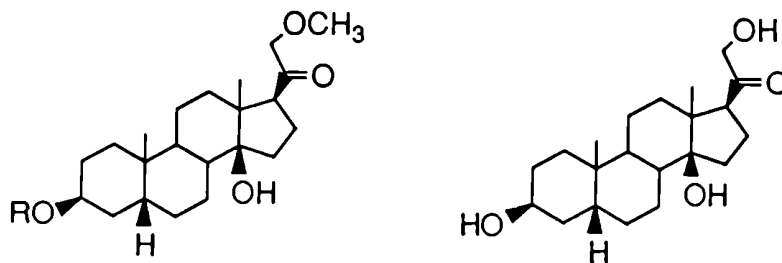


Fig. 106. Compuesto **XLIII** y un compuesto cuya intermediación en la biosíntesis de cardenólidos ha sido demostrada.

También llama la atención que el pregnano **XLIII** se encuentre glicosidado, ya que se cree que la glicosidación de cardenólidos ocurre en etapas posteriores de la biosíntesis, cuando el esqueleto del cardenólido está completo (ver cap. 2) [183].

Por otro lado, la presencia del compuesto **XLIII** parecería avalar la ruta de los pregnanos (pág. 15) en la biosíntesis de cardenólidos en esta planta.

### **Cardenólidos**

Los cardenólidos aislados en este trabajo se muestran en la figura 107 y la composición porcentual de los mismos sobre el total de cardenólidos aislados se muestra en la tabla 8.

Se observa en dicha tabla que los cardenólidos aislados en este trabajo presentaron únicamente dos agliconas, oleandrigenina y digitoxigenina, con predominio de esta última. La escasa proporción en que se las ha encontrado en forma libre manifiesta la eficiencia de los procesos de glicosidación.

Puede observarse también en la tabla 8 que existe un predominio de los cardenólidos más glicosidados por sobre los monoglicosidados, y que no se aisló ningún diglicósido. Esto indicaría que el proceso de incorporación de más de una unidad monosacáridica podría ocurrir o muy eficientemente o a través de la introducción de disacáridos.

Cabe destacar que se obtuvo un mayor porcentaje de aquellos monoglicósidos (**XLIX**, **L**, **LIII** y **LIV**) con diginosa o digitalosa unidas a la aglicona, que no pueden ser utilizados como precursores de los cardenólidos mayoritarios (que poseen cimaraosa directamente unida a la aglicona) que del glicósido **XL** que posee cimaraosa unida a la aglicona.

Compuesto	%	aglicona	nº azúc.	tipo de azúc.
XXXVIII	0.8	olg		
XXXIX	0.6	dg		
XL	1.5	dg	1	cim
XLIX	5.6	olg	1	dgn
L	9.0	dg	1	dgn
LIII	4.7	olg	1	dgt
LIV	6.6	dg	1	dgt
LVI	7.9	olg	3	dgn,glc,glc
LVII	2.1	olg	3	cim,glc,ram
LVIII	3.5	dg	3	cim,glc,glc
LIX	24.9	dg	3	cim,glc,ram
LX	13.8	dg	4	cim,cim,glc,glc
LXI	19.0	dg	5	cim,cim,dgn, glc,glc

**Tabla 8.** Composición de los cardenólidos aislados.

En cuanto a la distribución de azúcares en los glicósidos, se observó que siempre una 2,6-dideoxi-3-OMe-hexosa se hallaba directamente unida a la aglicona. En el caso de haber otras desoxihexosas similares, éstas se unían a la primera y las hexosas normales se unían a éstas en forma lineal. Este hecho concuerda con los datos informados en la literatura [14,15] para la distribución de azúcares en cardenólidos.

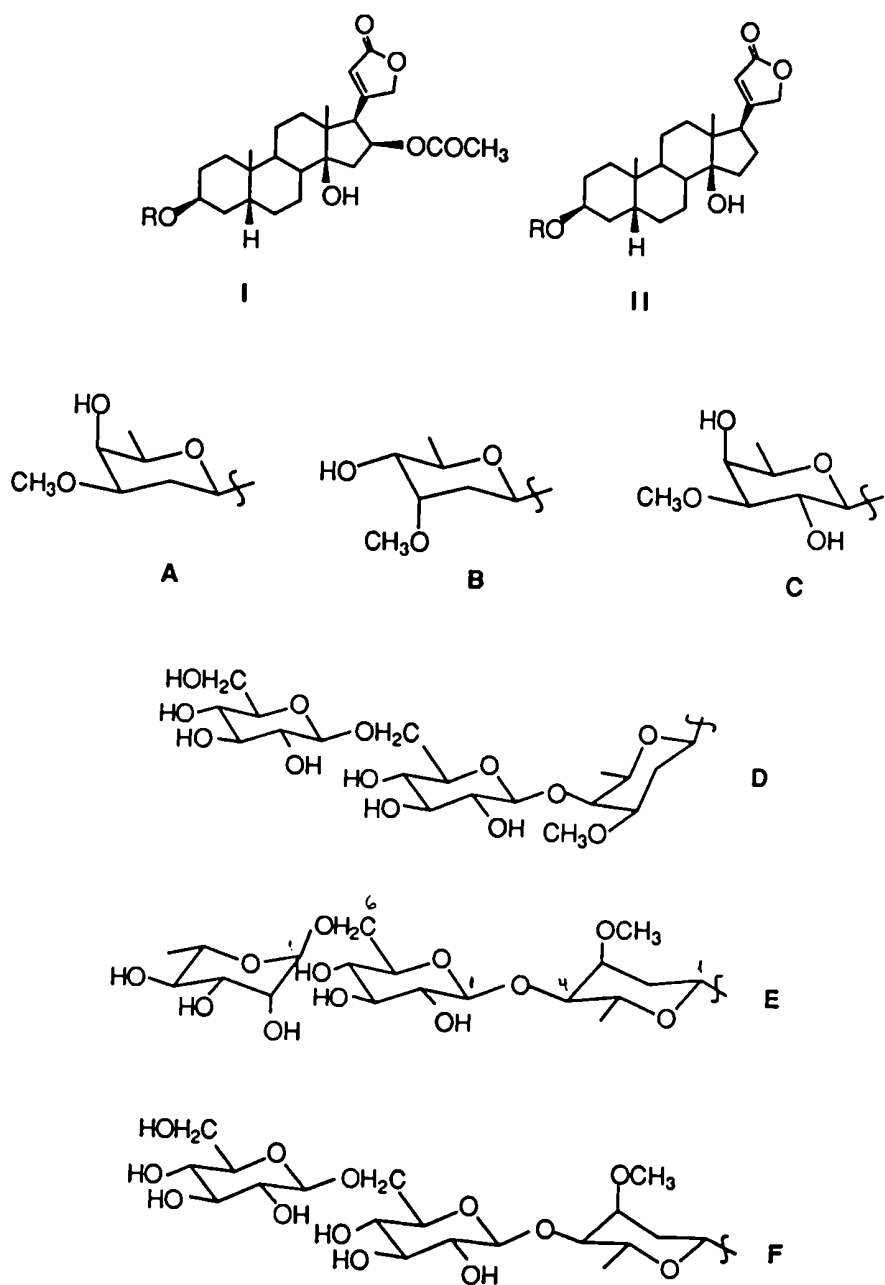
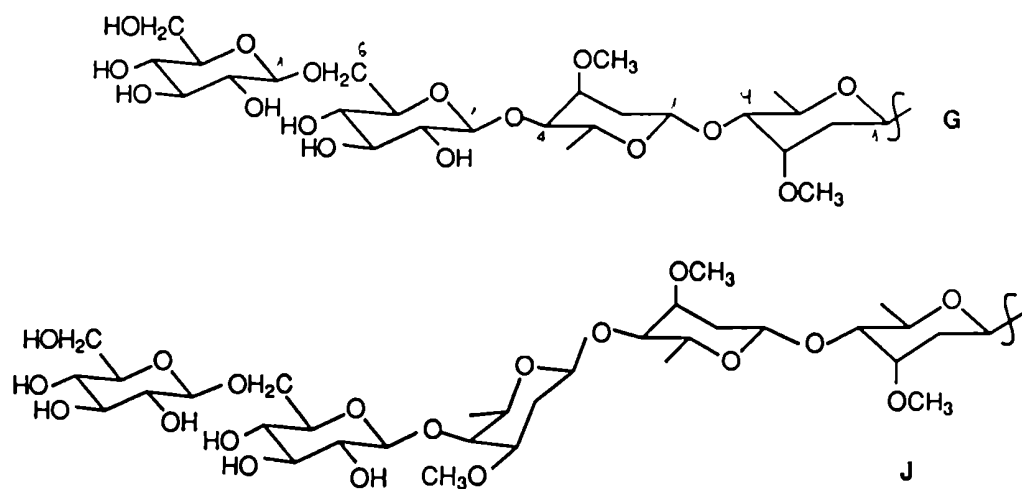


Fig. 107. Cardenólidos aislados del extracto etanólico de raíz de *M. pentlandiana*.



Compuesto	aglicona	R
XXXVIII	I	H
XXXIX	II	H
XL	II	A
XLIX	I	B
L	II	B
LIII	I	C
LIV	II	C
LVI	I	D
LVII	I	E
LVIII	II	F
LIX	II	E
LX	II	G
LXI	II	J

Fig. 107 (continuación).

La unión de las glucosas entre sí, a través de la posición 6, es el tipo de unión más frecuentemente encontrado en cardenólidos y existen pocos ejemplos en los que se las ha encontrado unidas a través de la posición 4 [21,184].

Los cardenólidos aislados, tanto en lo que respecta a las agliconas como a los azúcares, son característicos dentro de la familia Apocynaceae en los géneros *Beaumontia*, *Adenium* y *Nerium*, aunque éstos también producen otras agliconas.

El compuesto LVIII fue informado en literatura [28] en 1990 por primera vez en *Beaumontia brevituba* y *B. murtonii* y los compuestos LVII, LIX-LXI son nuevos como productos naturales.

Cabe destacar el aislamiento de los compuestos LX y LXI, ya que hay muy pocos informes sobre el aislamiento de tetra- y pentaglicósidos de cardenólidos. También es interesante el aislamiento de los compuestos LVII y LIX, ya que hay pocos informes sobre el aislamiento de ramnósidos en la familia Apocynaceae [17].

### Análisis de los glicósidos

#### Métodos de hidrólisis:

El problema fundamental que hay que tener en cuenta en la hidrólisis de glicósidos de cardenólidos es el hecho de que estos compuestos presentan generalmente hidratos de carbono con comportamientos muy diferentes frente a los agentes hidrolíticos en cuanto a su labilidad.



Si bien es siempre mejor la degradación de glicósidos por métodos enzimáticos, en el caso de cardenólidos las limitaciones son especialmente importantes debido a que no existen enzimas comerciales capaces de hidrolizar 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosas en forma general. Por lo tanto, pueden utilizarse glicosidasas sólo para obtener una hidrólisis parcial en el caso de glicósidos que poseen hexosas comunes.

Las 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosas son fácilmente hidrolizables en medio ácido diluido, HCl ó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 60 °C durante 15 a 30 minutos. Los solventes empleados son MeOH, EtOH o dioxano debido a la solubilidad de los glicósidos en estos medios. En el caso de usar MeOH hay que tener la precaución de hidrolizar después los metilglicósidos obtenidos. Condiciones más enérgicas de hidrólisis producen tanto la descomposición de estos azúcares como de las agliconas [15].

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que es necesario regular las condiciones de hidrólisis para cada glicósido particular. Condiciones muy suaves conducen a la obtención de oligosacáridos y en condiciones enérgicas las 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosas se descomponen. La presencia de unidades de glucosa unidas en posición 6 dificulta aún más la hidrólisis. Por lo tanto, se deben encontrar las condiciones adecuadas para obtener después de la hidrólisis los distintos tipos de hexosas en la relación en la que se encuentran en el glicósido.

Las condiciones que resultaron más adecuadas para este trabajo fueron H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 N / EtOH ó dioxano (1:1) a (1:4), a 60 °C - 70 °C en tubo cerrado durante 30 min. a una hora. La temperatura juega un rol más importante que el tiempo de hidrólisis.

Las dos 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosas encontradas en este trabajo formando parte de los glicósidos de cardenólidos, diginosa y cimarosa,

exhibieron diferencias en su labilidad. La diginosa se obtuvo en general en defecto.

#### Análisis de los glicósidos por espectrometría de masa:

En los espectros FAB<sup>+</sup>/EM de los compuestos LVI-LXI de las especies protonadas no fueron observados los fragmentos F<sub>1</sub>H<sub>2</sub><sup>+</sup>, F<sub>2</sub>H<sub>2</sub><sup>+</sup>, etc, importantes en la determinación de la secuencia de los azúcares en los glicósidos.

Si bien se había informado que estas rupturas podían observarse en glicósidos [61, 62], los resultados obtenidos en este trabajo podrían deberse a la posibilidad de pasos adicionales de fragmentación en estos compuestos que conducirían a una mayor dispersión de los fragmentos iónicos [185].

Por esta razón se empleó espectrometría de masa tandem (EM/CAD/EM) para investigar las estructuras de los compuestos LVI, LVIII, LX y LXI. Se trabajó con las especies protonadas, cationizadas con litio, sodio y potasio y desprotonadas.

En los espectros de las especies protonadas se observaron muchas más fragmentaciones que en otros sistemas similares [185] y no todos los fragmentos pudieron ser justificados. En todos los espectros se observaron pérdidas de H<sub>2</sub>O, MeOH, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 194 u (162 + MeOH), además de los fragmentos esperados F<sub>1</sub>H<sub>2</sub><sup>+</sup>, F<sub>2</sub>H<sub>2</sub><sup>+</sup>, etc.

Los espectros EM/CAD/EM de las especies cationizadas con litio resultaron más directos de interpretar ya que presentaron menor número de fragmentaciones. Aunque no se obtuvo buena información sobre la aglicona, se obtuvieron fragmentos informativos sobre las masas de los azúcares y su secuencia.

Los espectros de las especies  $[M+K]^+$  resultaron más complicados que los anteriores debido a una pérdida en la energía translacional producida por la activación colisional, que se tradujo en un corrimiento en las masas (de hasta 3 u), provocando asignaciones más dificultosas [185]. Además los espectros resultaron más complejos.

Los espectros EM/CAD/EM de las especies desprotonadas (iones negativos) resultaron mucho más sencillos que los de modo positivo, aunque no se obtuvo información sobre la aglicona. Esto concuerda con los datos informados en literatura [63].

En el caso del compuesto LVI hubo además poca información sobre la secuencia probablemente debido a la estabilización del sistema conjugado obtenido por pérdida de AcOH (ver figura 108). Se obtuvo un espectro caracterizado por pequeñas pérdidas de fragmentos neutros [185].

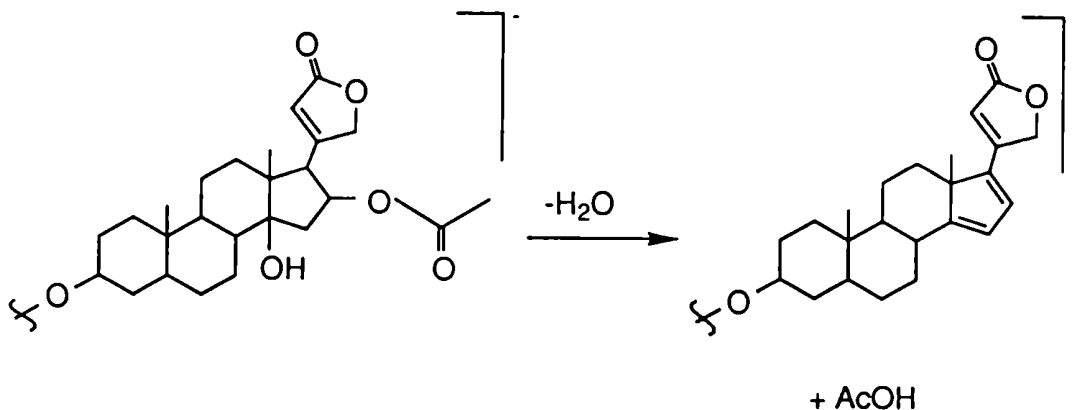


Fig. 108.

Puede concluirse entonces que los espectros FAB/EM resultaron importantes para la determinación del peso molecular aunque no brindaron información estructural.

La disociación por activación colisional de distintos precursores iónicos permitió obtener en cambio, una valiosa información estructural consistente con las determinaciones de los pesos moleculares. Los espectros obtenidos por CAD de los precursores cationizados con litio resultaron especialmente útiles y sencillos aunque la identificación del azúcar terminal como pérdida más importante del espectro resultó ser una ventaja del espectro de las especies desprotonadas.

Estas técnicas combinadas resultan ser una herramienta fundamental para el análisis de glicósidos.

#### Análisis de la secuencia de azúcares en glicósidos por corrimientos en las señales de RMN-<sup>13</sup>C por efectos de glicosidación:

Teniendo en cuenta los valores de desplazamiento químico esperados considerando efectos de glicosidación para el carbono anomérico de glucosa unida a diginosa y a cimarosa (103.8 y 106.0 ppm respectivamente) y comparando con los valores obtenidos experimentalmente para los compuestos LVI-LXI, puede observarse una muy buena correlación en todos los casos (ver tabla 9).

Las pequeñas diferencias pueden deberse a efectos conformacionales o de solvente, ya que los espectros fueron realizados en MeOD y no en D<sub>2</sub>O [43].

Si bien A. Shashkov y colaboradores [43] no proponen el método para determinar la secuencia de azúcares en un glicósido, sino para conocer un parámetro desconocido de un azúcar particular del mismo tal como configuración absoluta o configuración de un carbono anomérico, se podría suponer que si dichos parámetros son conocidos o estimables esta aplicación puede ser posible.

Las limitaciones son muchas sin duda, ya que no podrían diferenciarse azúcares con los mismos parámetros estructurales.

Carbono anomérico de Glc	LVI	LVII	LVIII	LIX	LX	LXI
1 <sup>ii</sup>	104.0	105.5	105.3	105.5		
1 <sup>iii</sup>					105.4	
1 <sup>iv</sup>						103.9

Tabla 9. Desplazamiento químico en RMN-<sup>13</sup>C del carbono anomérico de glucosa unida a 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosa.

Este método en combinación con otras técnicas puede emplearse para secuenciar azúcares isómeros, los cuales no pueden ser diferenciados por técnicas de espectrometría de masa.

***Parte Experimental***

---

## INSTRUMENTOS Y METODOS EMPLEADOS

Los puntos de fusión (pf) fueron determinados en un aparato Fischer-Johns y no fueron corregidos.

Los espectros de absorción ultravioleta fueron realizados en un espectrómetro 8451 A Diode Array Spectrophotometer Hewlett-Packard.

Las rotaciones ópticas fueron determinadas en un polarímetro Perkin Elmer 141.

Los espectros de masa (EM) fueron realizados a 50 ó 70 eV en un espectrómetro de masa Varian Mat CH-7A con sistema de introducción directa de muestra y sistema de procesamiento de datos Varian Mat Spectra System 166 con teletipo Tektronix 4010-1 e impresor Tektronix 4631.

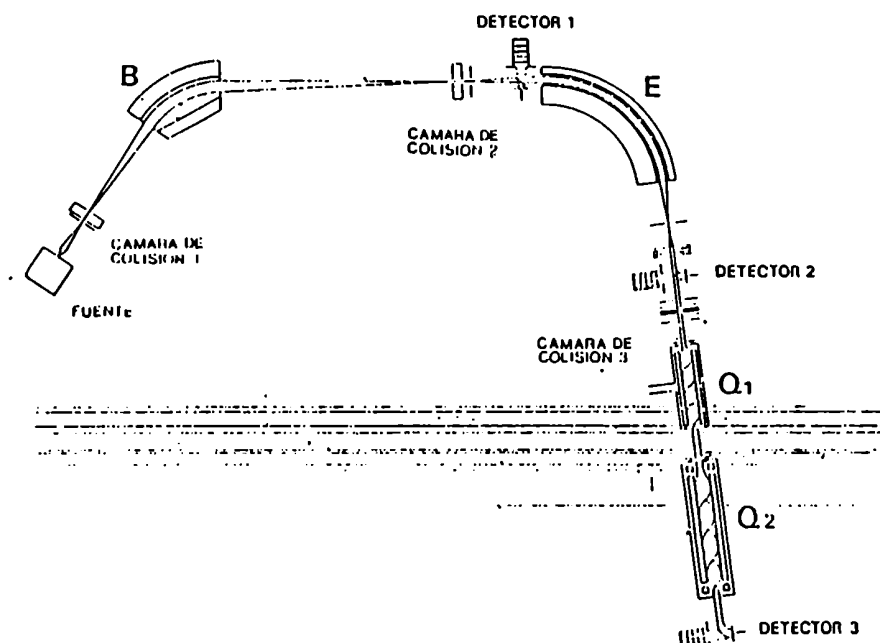
Las cromatografías gas-líquido combinadas con espectrometría de masa (CGL-EM) fueron realizadas en un sistema compuesto por un cromatógrafo gaseoso Varian 1400 acoplado a un espectrómetro de masa Varian Mat CH-7A con procesador automático de datos Varian Mat Spectra System 166 con teletipo Tektronix 4010-1 e impresor Tektronix 4631 o en un equipo Hewlett-Packard 5970 B Mass Selective Detector.

Los espectros de masa (FAB<sup>+</sup>/EM) de los compuestos LIII, LIV, LVII y LIX fueron efectuados en un espectrómetro de masa ZAB-SEQ (VG) híbrido BEqQ (B: sector magnético, E: sector eléctrico, q: cuadrupolo solo radiofrecuencia, Q: cuadrupolo) (Fig. 109), siendo la sección BE de alta resolución de simetría reversa.

El instrumento fue operado en modo de iones positivos.

La ionización por FAB fue efectuada utilizando una pistola de iones cesio (Cs) a 40 kv y calibración de masas utilizando CsI. La muestra fue introducida

directamente en la cámara de iones sobre una matriz conteniendo alrededor de 2  $\mu$ l de alcohol m-nitrobencílico o tioglicerol. En algunos casos se efectuó el agregado a la matriz de solución de NaCl para precatonizar la muestra. El voltaje de aceleración fue de 8 kV.



**Fig. 109.** Esquema del espectrómetro ZAB-SEQ (VG) híbrido BEQQ.

Los espectros de los compuestos LIII y LIV obtenidos para el estudio de secuencia genética se efectuaron por CAD (disociación activada por colisión) en la 3ª región libre de campo utilizando como cámara de colisión gaseosa el primer cuadrupolo (q) (no analizador) operado sólo por radiofrecuencia para este propósito. Las colisiones de baja energía (c.a. 30 eV) se hicieron utilizando argón como gas de colisión a una presión de c.a.  $2 \times 10^{-5}$  mbar para condiciones de simple colisión. Los iones hijo formados fueron analizados en el segundo cuadrupolo (Q) con resolución unitaria.



La detección de iones se efectuó por el sistema de fotomultiplicadores y en los casos en que fue necesario mejorar la relación señal-ruido para señales débiles, se efectuó por analizador multicanal. En los espectros en los que se empleó sólo el analizador sectorial BE se utilizó el detector 2 y en los estudios de secuencia genética con el sistema híbrido BE-qQ, se utilizó el detector 3.

El análisis por EM de los compuestos LVI, LVIII, LX y LXI fue efectuado en colaboración con J. Crockett y M. L. Gross del Departamento de Química de la Universidad de Nebraska. Los espectros de masa de los compuestos LVI, LVIII, LX y LXI fueron efectuados en un espectrómetro de masa tandem de tres sectores, analizador Kratos MS-50: espectrómetro de masa de alta resolución de geometría Nier-Johnson (EM-1), seguido de un EM-2: analizador electrostático (ESA) (ver fig. 110). El mismo está equipado con una fuente comercial Kratos de bombardeo de átomos rápidos, una pistola Ion Tech saddle-field (Ion Tech, Middlesex, Eng.) y un sistema de procesamiento de datos Kratos DS-55. El software requerido para la adquisición y procesamiento de los barridos EM/EM fue preparado en el laboratorio del Dr. M. Gross.

Los iones fueron producidos en la fuente por bombardeo de la muestra con átomos de argón a 6-7 keV. Las mediciones de alta resolución se efectuaron sobre las especies cationizadas con potasio a una resolución de 10000. Estas especies cationizadas se eligieron debido a que eran más abundantes que los otros iones. Dos iones CsI fueron elegidos como referencia, uno de masa mayor y otro de masa menor que el ión de interés. Se realizaron de 4 a 6 determinaciones, las cuales se promediaron.

Los espectros obtenidos por disociación por activación colisional fueron efectuados seleccionando el ión precursor con el primer analizador EM-1 a una resolución de 1500 (ancho a 10% de altura). El ión seleccionado fue disociado

utilizando helio como gas de colisión en la cámara de 3° RLC. Se introdujo la cantidad de helio necesaria como para reducir el haz en aproximadamente un 35%. El EM-2 fue entonces barrido y los 5 a 30 barridos de 20 seg fueron promediados, rindiendo el espectro de masa EM/CAD/EM de los iones producidos.

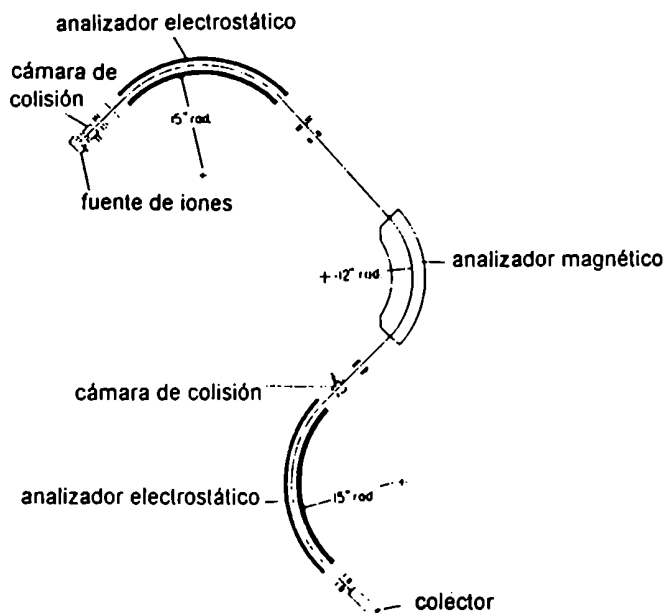


Fig. 110. Esquema del espectrómetro Kratos MS-50.

La muestra se disolvió en cloroformo-MeOH (1:1) (1 mg/ml). Para desorber los iones por FAB, una pequeña cantidad del glicósido (c.a. 1-2  $\mu$ l) se mezcló con la matriz en una probe de cobre. Las especies protonadas fueron desorbidas de una matriz de glicerol. Las especies cationizadas fueron todas desorbidas de una matriz de alcohol m-nitrobencílico y 15 % de glicerol, saturada con Lil para obtener las especies litiadas, NaI ó  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para obtener especies cationizadas con sodio y KI para obtener las especies cationizadas con potasio. Las especies desprotonadas fueron desorbidas de una matriz de trietanolamina.

Los espectros de las especies cationizadas con litio fueron efectuados en un espectrómetro de masa de cuatro sectores, prototipo de VG.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN- $^1\text{H}$ ) fueron realizados a 100.1 MHz en un espectrómetro Varian XL-100-15.

Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de los compuestos LVI-LXI fueron realizados en un espectrómetro GE-300 a 300 MHz.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) fueron realizados a 25.2 MHz en un espectrómetro Varian XL-100-15 utilizando pulsos de  $45^\circ$  y velocidad de repetición de pulsos de 0.71 seg. Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplados de hidrógeno fueron obtenidos por irradiación a la frecuencia central de 4 ppm del espectro de RMN- $^1\text{H}$ .

Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  selectivamente desacoplados fueron obtenidos por irradiación de la señal de  $^1\text{H}$  deseada variando la potencia del desacoplador.

La multiplicidad de las señales en RMN- $^{13}\text{C}$  fue determinada mediante la técnica APT (Attached Proton Test), utilizando una secuencia de pulsos:  $90^\circ \pm x - \tau - 180^\circ \pm y - \tau - \text{FID}$  ( $\tau = 7$  msec), desconectando el desacople en el período entre los dos pulsos; y la técnica SPDD (Single Pulse Delayed Decoupling) utilizando la secuencia  $90^\circ - \tau - \text{FID}$  ( $\tau = 7$  msec) desconectando el desacoplador durante el período  $\tau$  y extendiendo artificialmente el origen de la FID al instante posterior a la finalización del pulso mediante un "llenado de ceros" [187].

La medición de los tiempos de relajación spin-red ( $T_1$ ) del compuesto XLIII fue efectuada por la técnica de inversión-recuperación rápida, cuya secuencia es  $180^\circ \pm x - \tau - 90^\circ - \text{FID}$ . Se realizaron siete experimentos en los que se fue variando  $\tau$  según  $\tau_n = \tau_{n-1} + I + n \times SI$ , con  $\tau_0 = 0.05$  seg, (primer incremento)  $I = 0.05$  seg y (segundo incremento)  $SI = 0.03$  msec. En un octavo experimento se tomó  $\tau = 3$  seg.

Los espectros de RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$  y 2D-RMN del compuesto **XXX** fueron realizados en un espectrómetro GE-500. Los parámetros empleados en el espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Correlated Spectroscopy) fueron los siguientes:

- Dimensión 1: número de puntos por bloque= 2048  
frecuencia= 500.11 MHz  
ancho espectral= 4987.53 Hz
- Dimensión 2: número de puntos por bloque= 512  
frecuencia= 500.11 MHz  
ancho espectral= 4987.53 Hz
- Pulsos totales= 4096
- Número de pulsos por espectro= 16
- Número de espectros= 256

La secuencia HMQC (Proton Detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) y los parámetros empleados en la misma fueron los siguientes:

$^1\text{H}$	$90^\circ_x - \Delta - 180^\circ_x - \Delta - 90^\circ_{-x}$	$-\tau - 90^\circ_x - \Delta -$	$-t_1/2 - 180^\circ_x - t_1/2 -$	$-\Delta$ -adquisición ( $t_2$ )
$^{13}\text{C}$	$180^\circ_x$	$-90^\circ_\varphi$	$-90^\circ_{-x}$	

donde  $\Delta = 2 \text{ } ^1J_{\text{CH}}$  y la fase  $\varphi$  se cicla según x, y, -x, -y.

- Dimensión 1: número de puntos por bloque= 2048  
frecuencia= 500.11 MHz  
ancho espectral= 4987.53 Hz
- Dimensión 2: número de puntos por bloque= 512  
frecuencia= 125.75 MHz  
ancho espectral= 25316.46 Hz
- Pulsos totales= 2048
- Número de pulsos por espectro= 8
- Número de espectros= 256

La secuencia HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) y los parámetros empleados en la misma fueron los siguientes:

$^1\text{H}$   $90^\circ_x$ - $\Delta_1$ -  $-\Delta_2$ -  $-t_1/2$ - $180^\circ_x$ - $t_1/2$ - -adquisición (t2)  
 $^{13}\text{C}$   $90^\circ_{\pm x}$   $90^\circ_\phi$   $90^\circ_x$   
donde  $\Delta_1 = 1/2 \ ^1J_{\text{CH}}$  y  $\Delta_2 = 1/2 \ ^nJ_{\text{CH}}$ .

- Dimensión 1: número de puntos por bloque= 2048  
frecuencia= 500.11 MHz  
ancho espectral= 4987.53 Hz
- Dimensión 2: número de puntos por bloque= 1024  
frecuencia= 125.75 MHz  
ancho espectral= 25316.46 Hz
- Pulsos totales= 24576
- Número de pulsos por espectro= 96
- Número de espectros= 256

En todos los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ , los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

Los testigos de  $\alpha$  y  $\beta$ -curcumeno fueron gentilmente suministrados por el Dr. J. A. Retamar (IPNAYS, Santa Fé, Argentina).

Los testigos de esteroides fueron adquiridos a Aldrich Chemical Co. Inc. (estigmasterol) y Sigma Chem. Co. (sitosterol y colesterol) o fueron amablemente suministrados por Dr. C. Djerassi (Department of Chemistry, Stanford University, California, EEUU), el Dr. M. Barbier (Institut des Substances Naturelles, Gif-sur Yvette, Francia), el Dr. G. W. Patterson (Department of Botany, University of Maryland, EEUU) y el Dr. C. Catalán (Universidad Nacional de Tucumán, Argentina).

El digitalósido de digitoxigenina testigo fue gentilmente suministrado por el Dr. T. Yamauchi (Fukuoka University, Fukuoka, Japón).

Los testigos de cardenólidos fueron adquiridos a Sigma Chem. Co. y Roth (EEUU).

Las 2,6-didesoxi-3-OMe-hexosas testigos fueron obtenidas por hidrólisis ácida de glicósidos comerciales o de glicósidos suministrados por el Dr. T. Yamauchi o el Dr. P. Junior (Universidad de Düsseldorf, Düsseldorf, Alemania).

Todos los solventes empleados fueron purificados por destilación. La evaporación de los mismos fue efectuada a temperaturas menores de 40 °C y presión reducida. Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (v/v).

## METODOS CROMATOGRÁFICOS

### a) Cromatografía en capa delgada:

Se utilizaron las siguientes cromatoplasmas:

- silicagel 60 preparadas sobre hojas de aluminio (Merck o Riedel de Haën), espesor: 0.2 mm, con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F<sub>254</sub>).
- silicagel 60 preparadas sobre hojas de poliéster (Aldrich o Sigma), espesor: 0.2 mm, con indicador F<sub>254</sub>.
- silicagel 60 de alta resolución (HPTLC- Merck), con indicador F<sub>254</sub>.
- fase reversa de alta resolución C-18 (HPTLC- Merck), con indicador F<sub>254</sub>.

Como agente de revelado se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (1:1) y posterior calentamiento en estufa a 110 °C.

b) Cromatografía en capa preparativa:

Para muestras de menos de 40 mg, se emplearon en forma preparativa cromatoplasmas de sílica gel 60 (Merck o Sigma) sobre vidrio, de 20 x 20 cm de superficie y 0.25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a la longitud de 254 nm (F<sub>254</sub>).

En caso de mayor cantidad de muestra se prepararon placas de silicagel 60 G (Merck) de 2 mm de espesor sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm de superficie.

c) Cromatografía "flash" en columna seca:

Este método fue empleado para un fraccionamiento rápido del extracto y para separaciones cromatográficas en las cuales los componentes a separar presentaban diferencias de R<sub>f</sub> no menor de 0.2. Se empleó silicagel 60 G (Merck) o Kieselgel S (Riedel de Haën).

d) Cromatografía en columna:

Se utilizaron como adsorbentes silicagel H (Merck), silicagel 60 (Merck, 230-400 mesh) y Kieselgel S (Riedel de Haën, 230-400 mesh) para cromatografía "flash". En todos los casos las cromatografías fueron realizadas con mediana presión utilizando aire comprimido.

También se utilizó una columna armada con 100 g de Sephadex LH-20 en MeOH.

e) Cromatografía gas-líquido:

Las cromatografías gas-líquido fueron realizadas en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 A que contaba con detector de ionización de llama (FID)

y se utilizó nitrógeno como gas portador. Las condiciones y columnas empleadas se indican en cada caso.

Fueron utilizadas las siguientes columnas capilares:

- 1) **HP-1** (longitud 5 m, diámetro interno (d.i.) 0.53 mm)
- 2) **HP-5** (long. 15 m, 0.2 mm d.i)
- 3) **SP-2330** (long. 15 m, 0.25 mm d.i.)

Para las cromatografías gas-líquido acopladas con espectrometría de masa se utilizó helio como gas portador y se emplearon las siguientes columnas empacadas:

- 4) **OV-17 3%** (long. 1.80 m, d.i. 2mm)
- 5) **SP-2330** (long. 1.20 m, d.i. 2mm)

f) Cromatografía líquida de alta resolución:

Las cromatografías líquidas de alta resolución fueron realizadas en dos cromatógrafos Micromeritics equipados uno con un detector de índice de refracción Micromeritics modelo 771 y otro con un detector de UV Micromeritics modelo 787, y ambos con inyector manual Micromeritics 730. Las columnas cromatográficas utilizadas en los distintos casos fueron las siguientes:

- 1) **Alltech R-Sil C-18 (High Load)** (tamaño de partícula 10  $\mu\text{m}$ , longitud 500 mm x 10 mm d.i.)
- 2) **Altex Ultrasphere ODS** (tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ , long. 250 mm x 10 mm d.i.)

Las mezclas de solventes utilizadas se indican en cada caso, y están expresadas en relaciones de volumen. Los solventes de elución utilizados fueron purificados por bidestilación.



## REACCIONES GENERALES

### a) Saponificación:

La muestra a saponificar fue suspendida en una solución de KOH (5 %) en EtOH (20-30 mg/ml). Se reflujo durante una hora y se dejó enfriar. Se agregó agua y se extrajo con diclorometano (3 x V). La fase orgánica se lavó con agua (2 x V), HCl dil. (2 x V) y agua hasta pH neutro de las aguas de lavado. La solución así obtenida fue evaporada a presión reducida.

La fase acuosa se llevó a pH 5 con HCl dil. y se extrajo con diclorometano (3 x V). La nueva fase orgánica se lavó con agua.

### b) Metilación con CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>:

La muestra fue tratada con una solución etérea de diazometano hasta disolución de la misma y persistencia del color amarillo intenso de la solución de diazometano. La solución se dejó en reposo hasta desaparición del color y fue llevada a sequedad con corriente de nitrógeno.

### c) Acetilación:

La muestra fue tratada con una mezcla de Ac<sub>2</sub>O-Py (1:1) y se dejó una noche a temperatura ambiente. Se volcó sobre hielo/HCl (c) y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua (2 x V), s.s. de NaHCO<sub>3</sub> (2 x V) y agua (2 x V) y se evaporó a presión reducida.

### d) Métodos de hidrólisis [15]:

Fueron empleadas las siguientes técnicas:

1. Se suspendió la muestra en una mezcla de  $\text{HCO}_2\text{H}-\text{H}_2\text{O}$  (1:1) (20 mg/ml) y se dejó una noche con agitación a temperatura ambiente. Se extrajo con diclorometano (3 x V). La fase orgánica se lavó con agua (2 x V), sc. dil. de  $\text{NaHCO}_3$  (2 x V) y agua (2 x V) y se evaporó a presión reducida. Los líquidos de lavado se unieron a la fase acuosa. La fase acuosa se neutralizó con s.s. de  $\text{NaHCO}_3$  y se evaporó a presión reducida.
2. Se agregó a la muestra una mezcla de  $\text{MeOH}-\text{HCl}$  0.1 N (1:1) (10 mg/ml) y se refluxó 30-60 min. Se extrajo con diclorometano. El procedimiento de extracción fue equivalente al de la técnica 1.
3. Se agregó a la muestra una solución de  $\text{HCl}$  (c) en acetona (1:37) (5 mg/ml) y se dejó 5 días a temperatura ambiente. Se agregó entonces una cantidad equivalente de  $\text{MeOH}$  y la mezcla resultante se eluyó por una columna con resina Dowex de intercambio de aniones en su forma básica. Se extrajo con diclorometano y se evaporó a presión reducida.
4. Se agregó a la muestra en un tubo con tapa a rosca una mezcla de  $\text{EtOH}$  (o  $\text{MeOH}$  o dioxano) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 N y se calentó el tubo cerrado a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  en estufa durante una hora. El procedimiento de extracción fue equivalente al de la técnica 1.
5. Se agregó a la muestra en un tubo con tapa a rosca una mezcla de dioxano- $\text{HCl}$  6% (1:3) y se calentó el tubo cerrado a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  en estufa durante 2 hs. El procedimiento de extracción fue equivalente al de la técnica 1.

e) Preparación de alditoles acetilados:

La muestra (1-5 mg) disuelta en 1 ml de agua fue tratada con una gota de  $\text{NH}_3$  (c) y  $\text{NaBH}_4$  (10 mg/mg azúcar) durante 12 hs a temperatura ambiente.

Se llevó a pH 6 con HCl dil. y se evaporó hasta sequedad. Se trató con Ac<sub>2</sub>O-Py (1:1) y se calentó a 100 °C durante una hora. Se procedió a continuación del mismo modo que en la técnica de acetilación.

El análisis por CGL de los aldononitrilos acetilados obtenidos fue efectuado utilizando una columna capilar HP-5 (ver pág. 144), temp. 100 °C a 200 °C; 5°C/min y una columna capilar SP-2330 (ver pág. 144), temp. 200 °C a 250 °C; 10 °C/min y 200 °C (5 min) a 250 °C; 10 °C/min con compensación de columna en ambas condiciones.

f) Preparación de aldononitrilos acetilados:

La muestra (1-5 mg) se dejó 12 hs en desecador y luego se trató con Py (0.5 ml) y NH<sub>2</sub>OH.HCl (60% en peso del azúcar). Se calentó en estufa a 70 °C durante 45 min. Se agregó Ac<sub>2</sub>O (0.5 ml) y se calentó en estufa a 70 °C durante 45 min. Se procedió a continuación del mismo modo que en la técnica de acetilación.

El análisis por CGL de los aldononitrilos acetilados obtenidos fue efectuada en una columna capilar SP-2330 (ver pág. 144), temp. 200 °C (9 min) a 250 °C; 10 °C/min con compensación de columna.

Preparación de 21-OMe derivados

A una mezcla de la muestra y silicagel (1:20) se agregó una solución de diazometano en éter etílico en gran exceso con agitación. Se dejó 15 min, se filtró y se evaporó a presión reducida [132].

### Test de Kedde

Se preparó en el momento de usar una mezcla 1:1 de ácido 3,5-dinitrobenzoico 2% en MeOH e NaOH 2N. Una gota de solución de la muestra se agregó a 0.2 ml de mezcla [13]. Un color rosado a violeta indica reacción positiva.

### ESPECIE VEGETAL ANALIZADA Y SU PROCESAMIENTO

La raíz de la planta *Mandevilla pentlandiana* fue colectada en Agua de Oro, Córdoba, Argentina, y fue identificada por el Dr. Luis Ariza Espinar del Museo de Botánica de Córdoba.

2.7 kg de raíces secas de *Mandevilla pentlandiana* fueron extraídas a temperatura ambiente con EtOH y el extracto fue concentrado a presión reducida obteniéndose 180 g del mismo.

### ESTUDIO QUIMICO DE RAIZ DE MANDEVILLA PENTLANDIANA

El extracto etanólico fue fraccionado tal cual se describe en la página 22, obteniéndose las siguientes fracciones: fracción 1, 5 g; fracción 2, 23 g, fracción 3: 136 g.

Como se indica en la página 22, la fracción 1 fue subdividida en las siguientes subfracciones: subfracción 1a, 75 mg; subfracción 1b, 1.01 g; subfracción 1c, 1.13 g; subfracción 1d, 1.04 g; subfracción 1e, 1.50 g.

De la subfracción 1a fueron aisladas por cromatografía en capa preparativa en hexano dos subfracciones 1a<sub>1</sub> y 1a<sub>2</sub>. La subfracción 1a<sub>1</sub> contenía hidrocarburos saturados lineales y la subfracción 1a<sub>2</sub> los hidrocarburos sesquiterpénicos  $\alpha$ -curcumeno (I) y  $\beta$ -curcumeno (II). Ambas fracciones fueron analizadas por CGL y CGL-EM.

La subfracción 1b (que contenía mayoritariamente ésteres de ácidos grasos) fue saponificada (pág. 142) obteniéndose una fase orgánica y ácidos grasos en la fase acuosa (fig. 13, pág. 25). Los ácidos grasos fueron identificados por análisis por cromatografía gaseosa de sus ésteres metílicos obtenidos por metilación con diazometano (ver pág. 142), utilizando columnas capilares HP-5 y SP-2330 (ver pág. 141) y comparando sus tiempos de retención con los de compuestos testigo; y por CGL-EM en una columna SP-2330 (ver pág. 141).

Fueron identificados los siguientes ácidos grasos: C 15:1 (5.6%), C 16:0 (16.7%), C 17:0 (0.5%), C 18:0 (3.8%), C 18:1 (6.8%), C 18:2 (23.8%), C 18:3 (1.0%), C 16:3 (34.7%).

La fase orgánica fue fraccionada como se indica en la pág. 24 en 1b<sub>1</sub> y 1b<sub>2</sub>. La subfracción 1b<sub>1</sub> fue separada por CLAR (columna 1 pág. 141, eluyente MeOH, detector RI) obteniéndose los compuestos III (1-OMe-hexadecanal), IV (lupenona) y una mezcla que fue separada por CLAR (columna 2 pág. 141, eluyente MeOH, detector RI) rindiendo los compuestos V ( $\beta$ -amirenona) y VI (multiflorenona) contaminado con VII (24-metilencicloartanona). El compuesto III fue identificado sobre los datos de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM. Los compuestos IV y V fueron identificados sobre la base de sus espectros RMN-<sup>1</sup>H y EM y los compuestos VI y VII por CGL-EM.

La subfracción 1b<sub>2</sub> fue fraccionada por CLAR (columna 1 pág. 141, MeOH, RI). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por CGL y las que resultaron

mezclas fueron nuevamente cromatografiadas por CLAR (columna 2, pág. 141, MeOH, RI) hasta obtener compuestos puros. Se obtuvieron los compuestos:

- VIII (colest-5,20,24-trien-3 $\beta$ -ol),
- IX (24 $\xi$ -metilcolest-5,20,25-trien-3 $\beta$ -ol),
- X (24 $\xi$ -metilcolest-5,20,24(24<sup>1</sup>)-trien-3 $\beta$ -ol),
- XI (colest-5,20-dien-3 $\beta$ -ol),
- XII (24 $\xi$ -metilcolest-5,20-dien-3 $\beta$ -ol),
- XIII (24 $\xi$ -etilcolest-5,20-dien-3 $\beta$ -ol),
- XIV (colest-5,24-dien-3 $\beta$ -ol),
- XV (24 $\xi$ -metilcolest-5,24(24<sup>1</sup>)-dien-3 $\beta$ -ol),
- XVI (colest-5-en-3 $\beta$ -ol),
- XVII (24 $\xi$ -metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol),
- XVIII (24 $\xi$ -etilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol),
- XIX (24 $\xi$ -etilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol).

Los compuestos VIII a XIX se hallaban en el extracto como ésteres de ácidos grasos.

Los compuestos VIII y X fueron identificados sobre la base de los datos de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM. Los compuestos IX y XI a XV fueron identificados sobre la base de los datos de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y EM y los compuestos XVI a XIX por CGL, por comparación con testigos.

La subfracción 1c fue saponificada y procesada de la misma manera que la fracción anterior. Por tratamiento y análisis de la fase acuosa fueron identificados los siguientes ácidos grasos: C 15:1 (4.9%), C 16:0 (17.8%), C 18:0 (3.9%), C 18:1 (15.3%), C 18:2 (30.0%), C 18:3 (5.3%), C 16:3 (17.1%), C 14:3 (1.6%).

La fase orgánica proveniente de la saponificación fue fraccionada por cromatografía flash en columna seca utilizando AcOEt-hexano (5%, 10%, 15%, 20% y 25%), obteniéndose las subfracciones A-E. De la subfracción A (15 mg) fueron identificadas por CGL-EM etilcetonas lineales de 13 y 15 a 19 átomos de carbono. De la subfracción B (56 mg) fueron identificados por CGL-EM y CGL y comparación con testigos los compuestos **XX** ( $\beta$ -amirina) y **XXI** (lupeol); y de la subfracción C (35 mg) por las mismas técnicas, los compuestos **XXII** (colest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol), **XVI**, **XVII**, **XVIII** y **XIX**.

La subfracción D (48 mg) no pudo ser analizada ya que mostraba por ccd y CGL ser excesivamente compleja. La subfracción E (29 mg) fue cromatografiada por CLAR (columna 1, pág. 141; MeOH, RI), obteniéndose el compuesto **XXIII** (3 $\beta$ -hidroxi-24 $\xi$ -etil-5 $\alpha$ -colest-6-ona) que fue identificado sobre la base de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM, y la mezcla de los compuestos **XXIV** (3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -colest-6-ona), **XXV** (3 $\beta$ -hidroxi-24 $\xi$ -metil-5 $\alpha$ -colest-6-ona) y **XXVI** (3 $\beta$ -hidroxi-24 $\xi$ -etil-5 $\alpha$ -colest-22-en-6-ona), los que fueron identificados por CGL-EM.

Los compuestos **XVI** a **XXVI** aislados de esta fracción se hallaban esterificados en el extracto original.

La subfracción 1d fue procesada por cromatografía flash en columna seca y posteriormente cromatografía en columna de sílica usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente en ambos casos. El tratamiento por CLAR de la misma (columna 1, pág. 141, MeOH-AcOEt 4:1, RI) permitió aislar los compuestos **XX** ( $\beta$ -amirina) y **XXI** (lupeol), que fueron identificados por RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM. El compuesto **XX** estaba contaminado con un 5% en total de los alcoholes lineales C 16:0 (**XXVII**) y C 18:0 (**XXVIII**), los cuales fueron identificados por análisis por CGL y comparación con testigos.

La subfracción 1e fue analizada junto con la fracción siguiente.

Por cromatografía flash en columna seca de la fracción 2 empleando un sistema de solventes de elución hexano-acetona se obtuvieron ocho subfracciones 2a (0.64 g, eluída con 10% acetona); 2b (1.07 g, 15% acetona); 2c (1.07 g, 20% acetona); 2d (2.06 g, 30% acetona); 2e (4.67 g, 35% acetona); 2f (1.57 g, 50% acetona); 2g (4.81 g, 50% acetona) y 2h (1.77 g, 100% acetona).

La subfracción 2a fue cromatografiada en columna de Sephadex LH-20 empleando MeOH, colectándose las subfracciones A (260 mg), B (135 mg) y C (106 mg). Una porción de la subfracción A fue metilada con diazometano (ver pág. 141) y fueron analizados los ésteres metílicos obtenidos por CGL (columna 2, pág. 141) y por CGL-EM (columna 5, pág. 141). Fueron identificados los siguientes ácidos grasos (%): C 16:0 (43.2), C 17:0 (2.3), C 15:3 (1.4), C 18:0 (7.4), C 18:1 (20.1), C 18:2 (18.8).

La subfracción B fue analizada por CGL (columna 2, pág. 141) y CGL-EM (columna 4, pág. 141) identificándose los compuestos **XVII** (campesterol), **XVIII** (stigmasterol), **XIX** (sitosterol) y **XXIX** ( $\alpha$ -tocoferol).

Por cromatografía en columna de sílica flash primero y en capa preparativa después, empleando como solvente de elución diclorometano-acetona (95:5) en ambos casos, se obtuvo el compuesto **XXX** ((+)-aromadendra-1(10),4-dien-15-al-3-ona), que fue identificado sobre la base de los datos de sus espectros de RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC, HMBC y EM.



La subfracción 2b fue cromatografiada en columna de Sephadex LH-20 con MeOH, obteniendo una fracción que posteriormente fue tratada por cromatografía flash en columna seca empleando un sistema de solventes hexano-AcOEt. Se obtuvieron las subfracciones A (20 mg, eluída con 30% de AcOEt), B (105 mg, 40% AcOEt) y C (40 mg, 50% AcOEt).

La subfracción A rindió por CLAR (columna 1, pág. 141, MeOH, RI) los compuestos **XXXI** (ácido oleoico) y **XXXII** (ácido ursólico), los que debieron ser purificados por CLAR (columna 2, pág. 141, MeOH-H<sub>2</sub>O 95:5, UV 210 nm). Los compuestos **XXXI** y **XXXII** fueron identificados sobre la base de los datos de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, EM y en el caso del compuesto **XXXI** también por el espectro RMN-<sup>1</sup>H de su derivado metilado obtenido por metilación con diazometano (pág. 142).

La subfracción B rindió por CLAR (iguales condiciones que la subfracción A) los compuestos **XXXII** (ácido ursólico), **XXXIII** (peróxido de ergosterol) y **XXXIV** (peróxido de  $\Delta^9(11)$  ergosterol). Los compuestos **XXXIII** y **XXXIV** fueron identificados por los datos de sus espectros RMN-<sup>1</sup>H y EM.

De la subfracción C por CLAR (iguales condic. A) se obtuvieron los compuestos **XXXV** (monoglicérido del ácido graso C 16:0) y **XXXVI** (monoglicérido del ácido graso C 18:1), los cuales fueron identificados por los datos de sus espectros RMN-<sup>1</sup>H y EM.

Por cromatografía de la subfracción 2c en columna de Sephadex LH-20 con MeOH como solvente se obtuvieron dos subfracciones, una de las cuales contenía los compuestos **XXXI** y **XXXII** y de la otra precipitó de MeOH una sustancia sólida blanca (**XXXVII**, fitoesterol 3-O-[6-O-acil- $\beta$ -D-glucopiranosido]). Esta sustancia fue acetilada con Ac<sub>2</sub>O-Py (pág. 142) y purificada por

cromatografía en capa preparativa en hexano-AcOEt (4:1) obteniéndose **XXXVIIa**. La sustancia **XXXVIIa** fue identificada por los espectros RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

La composición de los ácidos grasos presentes fue determinada por saponificación (pág. 142) y metilación (pág. 142) de los componentes de la fase acuosa obtenida en la saponificación. Fueron identificados por CGL (columnas 2 y 3, pág. 141) los ácidos grasos C 16:0 (41.1%), C 18:0 (8.9%), C 18:1 (11.1%) y C 18:2 (29.4%).

La fase orgánica obtenida a partir de la saponificación fue hidrolizada según la técnica 4 (pág. 143) con MeOH a 100 °C en tubo cerrado. El monosacárido obtenido en la fase acuosa fue acetilado (pág. 142) e identificado por CGL (columna 3, pág. 141, 240 °C isotérmica) como  $\alpha$  y  $\beta$ -metilglucósidos. Los fitoesteres obtenidos en la hidrólisis fueron analizados por CGL (columna 2, pág. 141) identificándose los compuestos **XVII** (campesterol, 7.6%), **XVIII** (stigmasterol, 14.9%) y **XIX** (sitosterol, 76.1%).

Por cromatografía flash en columna seca de la subfracción 2d con hexano-AcOEt (1:2) se obtuvieron dos subfracciones 2d<sub>1</sub> (318 mg) y 2d<sub>2</sub> (939 mg).

La subfracción 1d<sub>1</sub> por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 rindió las subfracciones A, B y C. La subfracción A fue separada por CLAR (columna 1 pág. 141, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 6:4, UV 220 nm), obteniéndose los compuestos **XXXVIII** (oleandrogenina, 12 mg) y **XXXIX** (digitoxigenina, 4 mg). El compuesto **XXXVIII** fue purificado por CLAR (columna 2, pág. 141, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 1:1, UV 220 nm) e identificado por sus espectros RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM y por acetilación (pág. 142) y comparación con una muestra auténtica de acetato de oleandrogenina. El compuesto **XXXIX** fue identificado por sus espectros RMN-<sup>1</sup>H y EM y por comparación con una muestra auténtica.

Por cromatografía en capa preparativa de la subfracción B en AcOEt se obtuvo el compuesto **XL** (digitoxigenina 3-O- $\beta$ -D-cimaropiranosido, 12 mg) que fue identificado por sus espectros RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$  y EM, y una mezcla de moléculas lineales hidroxiladas, que rindió por CLAR (columnas 1 y 2, pág. 141, MeOH-H<sub>2</sub>O 5%, detector UV 245 nm) el compuesto mayoritario de la mezcla, **XLI** (ácido (9Z,11E)-13-hidroxi-octadeca-9,11-dienoico) identificado por sus espectros RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ . El compuesto **XL** fue además hidrolizado (técnica 2, pág.143) y el monosacárido obtenido fue derivatizado como el alditol acetilado y el aldononitrilo acetilado (pág. 143, 144) los cuales permitieron confirmar por CGL la presencia de cimarosa en el compuesto.

Por cromatografía en capa preparativa de la subfracción C en hexano-AcOEt (1:2) se obtuvo el compuesto **XLII** (siringaldehído, 3 mg) que fue identificado por RMN- $^1\text{H}$  y EM.

La subfracción 2d<sub>2</sub> por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 con MeOH y posterior cromatografía en columna de sílica en AcOEt, rindió el compuesto **XLIII** (3 $\beta$ ,14 $\beta$ -hidroxi-21-metoxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona 3-O- $[\beta$ -D-diginopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosido], 168 mg). Este compuesto fue identificado por RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , EM y por análisis de sus productos de hidrólisis según la técnica 4 en MeOH (pág. 143).

Por cromatografía en capa preparativa de los productos de la hidrólisis se obtuvieron los metilglicósidos y la aglicona (**XLVI**, 3 $\beta$ ,14 $\beta$ -dihidroxi-21-metoxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona). Los metilglicósidos fueron hidrolizados por tratamiento con una mezcla EtOH-H<sub>2</sub>O/ HCl 0.5 N (1:1) en tubo cerrado en estufa a 60 °C durante una hora. Los hidratos de carbono fueron derivatizados como alditoles y aldononitrilos acetilados (pág. 143, 144) y analizados por CGL determinándose la presencia de cimarosa y diginosa en relación 2:1 y por otro lado este dato fue

confirmado pues fueron separados cimarosa y diginosa por cromatografía en capa preparativa (hexano-acetona 3:2). La aglicona fue purificada por CLAR (columna 1, pág. 141, MeOH-H<sub>2</sub>O 85:15, RI). Se obtuvo la misma pura (**XLVI**, 10 mg) y además se obtuvieron los compuestos **XLVIII** (1-O-metil- $[\beta$ -D-cimaropiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimarofuranósido], 4 mg) y **XLVII** (cimarósido de **XLVI**, 2 mg). El compuesto **XLVIII** fue hidrolizado según la técnica 4 en EtOH (pág. 143). A partir del producto de la hidrólisis fue preparado el correspondiente alditol acetilado (pág. 143), que fue analizado por CGL coincidiendo su tr con el correspondiente de cimarosa. Finalmente fue identificado por RMN-<sup>1</sup>H. La aglicona **XLVI** fue identificada por sus espectros RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM, y por comparación con otros derivados 21-OMe sintéticos. El compuesto **XLVII** fue identificado por RMN-<sup>1</sup>H.

Por cromatografía en columna de la subfracción 2e empleando como solvente de elución AcOEt-hexano (3:1) y posterior CLAR (columna 1, pág. 141, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 1:1, UV 220 nm) se obtuvieron los compuestos **XLIX** (oleandrigenina 3-O- $\beta$ -D-diginopiranosido, 21 mg) y **L** (digitoxigenina 3-O- $\beta$ -D-diginopiranosido, 33 mg). Estos compuestos fueron identificados por sus espectros RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM y por análisis de RMN-<sup>1</sup>H de sus derivados acetilados y por sus productos de hidrólisis. El compuesto **XLIX** fue hidrolizado según la técnica 1 (pág. 143) y el compuesto **L** según la técnica 2 (pág. 143).

Por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 de la subfracción 2f se obtuvieron dos subfracciones, una de las cuales contenía los compuestos aislados de la subfracción 2e y la otra por cromatografía en capa preparativa en hexano-AcOEt (1:2) rindió los compuestos **LI** ((+)-pinoresinol, 4 mg) y **LII** ((+)-8 $\alpha$ -hidroxi-pinoresinol, 6 mg). Estos compuestos fueron identificados por RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, EM y por sus rotaciones ópticas.

Por cromatografía en columna de sílica utilizando como solvente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (10:1) de la subfracción 2g y posterior CLAR (columna 1, pág. 141, MeOH-H<sub>2</sub>O 7:3, UV 220 nm) se obtuvieron los compuestos **LIII** (oleandrigenina 3-O-β-D-digitalopiranosido, 35 mg) y **LIV** (digitoxigenina 3-O-β-D-digitalopiranosido, 48 mg). Estos compuestos fueron identificados por sus espectros RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM, y por análisis de RMN-<sup>1</sup>H de sus productos acetilados y por sus productos de hidrólisis. El compuesto **LIII** fue hidrolizado según la técnica 3 (pág. 143) y el compuesto **LIV** según la técnica 2 (pág. 143, a 80 °C durante 4 hs).

Por cromatografía flash en columna seca de la subfracción 2h empleando como solvente un sistema CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH se obtuvieron dos subfracciones A (5% MeOH) y B (10% MeOH). La subfracción B fue analizada junto con la fracción siguiente. De la subfracción A precipitó una sustancia sólida blanca (**LV**) que fue acetilada con Ac<sub>2</sub>O-Py (pág. 142) e identificada por el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de su derivado acetilado (**LVa**) como glucósido de fitoesterol. La sustancia **LV** fue hidrolizada según la técnica 4 (pág. 143, empleando EtOH, en tubo cerrado a 100 °C durante 2 hs). La fase orgánica fue analizada por CGL (columna 2, pág. 141) y fueron identificados los fitoesteroles **XVII** (campesterol, 9.2%), **XVIII** (estigmasterol, 10.2%) y **XIX** (sitosterol, 80.6%).

Por cromatografía flash en columna seca de la fracción 3 eluyendo con AcOEt-MeOH se obtuvieron dos subfracciones 3a (10% MeOH) y 3b (15% a 100% MeOH, no interesó su análisis para los fines de este trabajo). La subfracción 3a fue cromatografiada en columna de Sephadex LH-20 empleando MeOH como solvente y se obtuvieron las subfracciones A y B.

La subfracción B fue acetilada (pág. 142) y los componentes mayoritarios fueron aislados utilizando cromatografía en columna de sílica empleando como solvente hexano-AcOEt (3:2). Se obtuvieron los compuestos **LXIV** (sacarosa peracetilada) y **LXV** y **LXVI** ( $\alpha$  y  $\beta$ -glucopiranosidos peracetilados) que fueron identificados por sus espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ .

La subfracción A fue separada por CLAR (columna 1, pág. 141, MeOH-H<sub>2</sub>O 7:3, UV 220 nm) obteniéndose los compuestos **LVI** a **LXI**, que fueron purificados por la misma técnica y con la misma columna: **LVI** (MeOH-H<sub>2</sub>O 6:4, 58 mg), **LVII** (MeOH-H<sub>2</sub>O 7:3, 15 mg), **LVIII** (MeOH-H<sub>2</sub>O 7:3, 25 mg), **LIX** (MeOH-H<sub>2</sub>O 7:3, 182 mg), **LX** (MeOH-H<sub>2</sub>O 75:25, 100 mg) y **LXI** (MeOH-H<sub>2</sub>O 8:2, 139 mg). Los compuestos **LVI-LXI** fueron identificados sobre la base de los datos de sus espectros RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , FAB<sup>+</sup>/EM y EM/CAD/EM. A pesar de la masa disponible en el caso de los compuestos **LIX-LXI** los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  fueron realizados con sólo 50 mg debido a la viscosidad de las soluciones. Los compuestos **LVI-LXI** fueron hidrolizados según la técnica 4 (pág. 143) y los azúcares obtenidos fueron derivatizados como sus alditoles y aldononitrilos acetilados (pág. 143, 144), los cuales fueron analizados por CGL. El compuesto **LIX** (22 mg) se hidrolizó por tratamiento con EtOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25 N (1:1) a 70°C durante una hora. El hidrolizado se neutralizó por percolación a través de una columna de Amberlite CG 120, se evaporó y se obtuvo la aglicona y un trisacárido (**LXII**, 8 mg,  $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)-D-cimaropiranososa) que fue aislado por cromatografía en capa preparativa en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (10:3) y analizado por RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  y posteriormente hidrolizado según la técnica 4 (pág. 143) para obtener un disacárido (**LXIII**, rutinosa). Por hidrólisis de **LIX** según la técnica 5 se obtuvieron glucosa y ramnosa, las cuales fueron identificados por preparación de sus alditoles

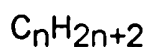
acetilados (pág. 143) y además fueron separados por cromatografía en capa preparativa utilizando como solvente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (10:3) y fueron determinados sus poderes rotatorios.

Los compuestos **LVI-LXI** fueron identificados como: **LVI** (oleandrogenina 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-diginopiranosido]), **LVII** (oleandrogenina 3-O-[α-L-ramnopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosido]), **LVIII** (digitoxigenina 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosido]), **LIX** (digitoxigenina 3-O-[α-L-ramnopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosido]), **LX** (digitoxigenina 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosido]), **LXI** (digitoxigenina 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-diginopiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosido]).

DATOS ESPECTROSCOPICOS Y CONSTANTES FISICAS DE LOS  
COMPUESTOS AISLADOS

**Hidrocarburos lineales:**

Fueron analizados por CGL comparando sus tr con los de testigos. Se utilizó una columna HP-1 (pág. 141), temperatura: 100 °C a 280 °C; 10 °C/min. La identidad de estos compuestos fue comprobada por CGL-EM (columna OV-17 3%, pág. 141), temperatura: 80 °C a 290 °C; 10 °C/min.



n	M <sup>+</sup>	%	n	M <sup>+</sup>	%
14	198	1.5	25	352	11.1
16	226	5.3	26	366	5.3
18	254	5.0	27	380	6.9
19	268	3.5	28	394	5.7
20	282	6.5	29	408	8.1
21	296	8.1	30	422	3.8
22	310	4.5	31	436	6.9
23	324	10.4	34	464	3.4
24	338	3.5			

En todos los casos se observó el pico base m/z 57.

Tabla 10. Composición de hidrocarburos.



## Sesquiterpenos hidrocarbonados:

El análisis de estos compuestos fue efectuado por CGL-EM y coinyección con testigos por CGL.

CGL: Columna HP-1 (pág. 141), temperatura: 100 °C a 280 °C, 10 °C/min.

CGL-EM: Columna OV-17 3% (pág. 141), temperatura: 80 °C a 290 °C; 10 °C/min.

*$\alpha$ -curcumeno (I)*: tr: 2.64 min.

EM m/z (%): 202 (29), 187 (4), 145 (27), 133 (21), 132 (71), 119 (100), 105 (63), 91 (36), 69 (36), 41 (61).

*$\beta$ -curcumeno (II)*: tr: 2.92 min.

EM m/z (%): 204 (57), 189 (25), 175 (11), 161 (87), 133 (74), 121 (37), 119 (78), 107 (70), 105 (96), 93 (88), 91 (100), 69 (43), 41 (95).

## 1-OMe-hexadecanal (III):

CGL: Columna HP-5 (pág. 141), temperatura: 150 °C a 280 °C; 10 °C/min.; tr: 2.87 min.

CLAR: Columna RP-18, 10  $\mu$ m (pág. 141), MeOH, detector RI; tr: 9.04 min.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 4.36 (t.a., J= 6Hz, 1H, H-1); 3.32 (s, 3H, OMe); 2.00 (m, 1H, OH); 1.55 (s.a., 2H, H-2); 1.26 (s.a., H-3 a 15); 0.88 (m, 3H, H-16).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 104.5 (C-1); 52.5 (OCH<sub>3</sub>); 32.5 (C-2); 31.9 (C-14); 29.6 (C-5 a C-12); 29.2 (C-4 y C-13); 22.7 (C-15); 14.1 (C-16).

EM m/z (%): 241 (M-31, 10); 208 (2); 180 (1); 166 (1); 152 (1); 138 (1); 124 (3); 110 (4); 96 (13); 82 (27); 75 (100); 71 (86).

## Acidos Grasos

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron analizados por CGL comparando sus tiempos de retención con los de testigos. Se utilizó una columna HP-5 (pág. 141); temperatura: 60°C a 300°C; 10°C/min. La identidad de estos compuestos fue determinada por CGL-EM (pág. 141); temperatura: 60°C a 260°C; 10°C/min.

Ester metílico	M <sup>+</sup>	Pico base (m/z)
C 14:3	236	103
C 15:1	254	74
C 15:3	250	74
C 16:0	270	74
C 16:3	264	58
C 17:0	284	74
C 18:0	298	74
C 18:1	296	55
C 18:2	294	67
C 18:3	292	79

### Cetonas triterpénicas:

CGL: (iguales condiciones que para el compuesto III)

CLAR: Columna RP-18, 10 μm (iguales condiciones que para el compuesto III);

Columna RP-18, 5 μm (pág. 141), MeOH, detector RI.

*Lup-20(29)-en-3-ona (Lupenona IV):*

CGL: tr: 13.88 min.

CLAR: tr: 16.19 min. (columna 10  $\mu\text{m}$ ); tr: 19.64 min. (columna 5  $\mu\text{m}$ ).

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 4.69 (s.a., 1H, H-30); 4.58 (s.a., 1H, H-30); 2.28 (m, 2H, H-2); 1.70 (s, 3H, H-29); 1.10 (s, 3H, H-26\*); 1.08 (s, 3H, H-25\*); 1.04 (s, 3H, H-24); 0.98 (s, 3H, H-27); 0.96 (s, 3H, H-23); 0.82 (s, 3H, H-28); \* señales que pueden intercambiarse.

EM m/z (%): 424 (44); 409 (13); 381 (5); 314 (16); 313 (19); 245 (19); 218 (26); 205 (85); 189 (34); 109 (100).

*Olean-12-en-3-ona ( $\beta$ -Amirenona V):*

CGL: tr: 13.59 min.

CLAR: tr: 19.05 min. (columna 10  $\mu\text{m}$ ); tr: 24.76 min. (columna 5  $\mu\text{m}$ ).

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.21 (m, 1H, H-12); 1.15 (s, 3H, H-27); 1.10 (s, 3H, H-23); 1.07 (s, 6H, H-25 y H-26); 1.03 (s, 3H, H-24); 0.88 (s, 6H, H-29 y H-30); 0.85 (s, 3H, H-28).

EM m/z (%): 424 (13); 409 (4); 271 (3); 257 (2); 218 (100); 205 (11); 203 (28); 189 (9).

*Multiflor-7-en-3-ona (Multiflorenona VI):*

CGL: tr: 13.89 min.

CLAR: tr: 26.67 min. (columna 5  $\mu\text{m}$ ).

EM m/z (%): 424 (90); 409 (58); 271 (9); 257 (37); 245 (10); 218 (100); 205 (76).

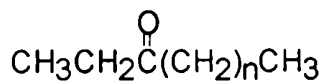
*Cicloart-24(24<sup>1</sup>)-en-3-ona (24-Metilencicloartanona VII):*

CGL: tr: 14.45 min.

EM m/z (%): 438 (52); 423 (19); 395 (12); 355 (11); 354 (11); 313 (32); 300 (25); 175 (40); 95 (100).

### Etilcetonas

Fueron analizadas por CGL-EM en una columna OV-17 (pág. 141), temperatura: 60 °C a 290 °C; 10 °C/min.



n	%	M <sup>+</sup> · (%)
9	6.5	198 (4)
11	26.0	226 (5)
12	8.7	240 (3)
13	35.8	254 (5)
14	9.9	268 (1)
15	13.1	282 (3)

Otros iones observados:  
[M-29]<sup>+</sup>; m/z 72; m/z 71 y  
m/z 57 (pico base).

Tabla 11

### Esteroles:

CGL: Columna HP-5 (pág. 141). Temperatura: 150 °C a 280 °C, 10 °C/min.

CLAR: Columna RP-18, 10 μm (pág. 141), MeOH, flujo: 8 ml/min; Columna RP-18, 5 μm (pág. 141), MeOH, flujo: 3 ml/min; detector RI.

*Colesta-5,20,24-trien-3 $\beta$ -ol (VIII):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 13 (pág. 165).

RMN-<sup>13</sup>C: ver tabla 14 (pág. 167).

EM m/z (%): 382 [M<sup>+</sup>] (75); 367 (35); 364 (8); 349 (35); 273 (22); 272 (84); 271 (100); 258 (10); 256 (10); 255 (36); 253 (26); 229 (20); 213 (41); 159 (45); 145 (62); 136 (11); 109 (79); 93 (85).

*24 $\xi$ -Metilcolesta-5,20,25-trien-3 $\beta$ -ol (IX):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 13 (pág. 165).

EM m/z (%): 396 [M<sup>+</sup>] (100); 381 (20); 378 (8); 363 (21); 273 (8); 272 (33); 271 (48); 255 (10); 229 (24); 213 (36); 159 (27); 150 (18); 145 (38); 123 (20); 107 (38); 93 (37).

*24 $\xi$ -Metilcolesta-5,20,24(24<sup>1</sup>)-trien-3 $\beta$ -ol (X):*

pf: 83-85 °C (EtOH-H<sub>2</sub>O).

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 13 (pág. 165).

RMN-<sup>13</sup>C: ver tabla 14 (pág. 167).

EM m/z (%): 396 [M<sup>+</sup>] (83); 381 (46); 378 (8); 363 (33); 273 (21); 272 (87); 271 (100); 255 (39); 229 (19); 213 (36); 159 (35); 150 (13); 145 (46); 123 (26); 107 (38); 93 (37).

*Colesta-5,20-dien-3 $\beta$ -ol (XI):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 13 (pág. 165).

RMN-<sup>13</sup>C: ver tabla 14 (pág. 167).

EM m/z (%): 384 [ $M^{+}$ ] (78); 369 (9); 366 (6); 351 (17); 314 (10); 299 (7); 281 (4); 272 (13); 271 (12); 229 (21); 213 (23); 159 (24); 145 (40); 133 (34); 81 (85); 55 (100).

*24 $\xi$ -Metilcolesta-5,20-dien-3 $\beta$ -ol (XII):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 13 (pág. 165).

EM m/z (%): 398 [ $M^{+}$ ] (99); 383 (18); 380 (12); 365 (41); 314 (100); 299 (34); 281 (18); 272 (12); 271 (26); 258 (10); 255 (5); 253 (10); 229 (52); 213 (44); 159 (30); 145 (44); 138 (4); 133 (30); 81 (59); 69 (65); 55 (68); 43 (59).

*24 $\xi$ -Etilcolesta-5,20-dien-3 $\beta$ -ol (XIII):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 13 (pág. 166).

EM m/z (%): 412 [ $M^{+}$ ] (65); 397 (10); 394 (7); 379 (22); 314 (100); 299 (30); 281 (14); 271 (22); 229 (48); 213 (42); 159 (41); 145 (59); 133 (43); 95 (69); 81 (74); 69 (75); 55 (76); 43 (68).

Compuesto	%	CGL (trr) <sup>†</sup>	CLAR (trr) <sup>★</sup>
VIII	9.6	1.01	0.56
IX	0.6	1.03	0.57
X	25.6	1.04	0.57
XI	6.8	0.99	0.65
XII	tr.	1.04	0.70
XIII	2.6	1.09	0.73
XIV	0.6	1.02	0.78
XV	0.5	1.05	0.80
XVI	3.4	1.00	1.00
XVII	15.5	1.06	1.09
XVIII	2.1	1.08	1.07
XIX	28.8	1.11	1.14
XXII	tr.	0.98	
XXIII	2.5	1.30	0.43
XXIV	tr.	1.15	0.39
XXV	0.4	1.23	0.40
XXVI	0.9	1.26	0.40

Tabla 12. Composición y tiempos de retención en CGL y CLAR de los esteroides esterificados aislados.

trr<sup>†</sup> relativo a colest-5-en-3 $\beta$ -ol.

trr<sup>★</sup> relativo a colest-5-en-3 $\beta$ -ol.

Compuesto	H-3	H-6	H-18	H-19	H-21	H-24	H-26,27	H-24 <sup>1</sup>	H-29
VIII	3.50	5.36	0.60	1.02	4.80	5.12	1.61		
	m, 1H	m, 1H	s, 3H	s, 3H	s.a., 1H	m, 1H	s.a., 3H		
					4.88		1.69		
					s.a., 1H		s.a., 3H		
IX	3.50	5.36	0.58	1.02	4.78		4.66	1.02	
	m, 1H	m, 1H	s, 3H	s, 3H	s.a., 1H		s.a. 2H	d, 3H	
					4.87		1.66	J=7 Hz	
					s.a., 1H		s, 3H		
X	3.50	5.35	0.60	1.01	4.81		1.05	4.70	
	m, 1H	m, 1H	s, 3H	s, 3H	s.a., 1H		d, 6H	m, 1H	
					4.90		J=6 Hz	4.77	
					s.a., 1H		m, 1H		
XI	3.50	5.36	0.60	1.02	4.78		0.88		
	m, 1H	m, 1H	s, 3H	s, 3H	s.a., 1H		d, 6H		
					4.85		J=6 Hz		
					s.a., 1H				
XII	3.50	5.36	0.59	1.02	4.77		0.86	0.80	
	m, 1H	m, 1H	s, 3H	s, 3H	s.a., 1H		d, 6H	d, 3H	
					4.87		J=6 Hz	J=6 Hz	
					s.a., 1H				

Tabla 13. RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos VIII a XV.



Compuesto	H-3	H-6	H-18	H-19	H-21	H-24	H-26,27	H-24 <sup>1</sup>	H-29
XIII	3.50	5.36	0.59	1.02	4.77		0.84		0.85
	m, 1H	m, 1H	s, 3H	s, 3H	s.a., 1H		d, 6H		t, 3H
					4.88		J=6 Hz		J=7Hz
XIV	3.50	5.36	0.68	1.02	s.a., 1H		1.61		
	m, 1H	m, 1H	s, 3H	s, 3H	0.95	5.12	s.a., 3H		
					d, 3H	m, 1H	1.69		
XV	3.50	5.36	0.69	1.02	0.96		s.a., 3H		
	m, 1H	m, 1H	s, 3H	s, 3H	d, 3H		1.04	4.66	
					J=7 Hz		d, 6H	s.a., 1H	
							J=7 Hz	4.72	
								s.a., 1H	

Tabla 13 (cont.) RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos VIII a XV.

Solvente: CDCl<sub>3</sub>, TMS como estándar interno (δ en ppm).

Compuesto	VIII	X	XI
C-1	37.2	37.3	37.3
C-2	31.6	31.6	31.6
C-3	71.7	71.6	71.7
C-4	42.3	42.3	42.3
C-5	140.6	140.6	140.7
C-6	121.4	121.3	121.4
C-7	31.8	31.8	31.8
C-8	32.3	32.3	32.3
C-9	50.3	50.3	50.3
C-10	36.5	36.5	36.5
C-11	21.2	21.2	21.1
C-12	38.7	38.7	38.7
C-13	43.0	43.0	43.0
C-14	56.6	56.6	56.6
C-15	24.2	24.2	24.2
C-16	25.8	25.9	25.9
C-17	56.0	56.0	55.8
C-18	12.8	12.8	12.7
C-19	19.4	19.4	19.3
C-20	149.1	149.1	149.5
C-21	109.3	109.3	109.1
C-22	37.6	36.4	37.9
C-23	27.1	33.4	26.2
C-24	124.2	155.7	38.8
C-25	131.2	34.0	27.8
C-26	25.6	21.8	22.6
C-27	17.7	21.8	22.5
C-24 <sup>1</sup>		106.1	

Tabla 14. RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos VIII, X y XI.

Solvente: CDCl<sub>3</sub>, TMS como estándar interno (δ en ppm).

Colesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol (XIV):

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 13 (pág. 166).

EM m/z (%): 384 [M<sup>+</sup>] (60); 369 (55); 366 (7); 351 (19); 314 (13); 300 (52); 299 (30); 272 (50); 271 (100); 253 (20); 231 (18); 213 (25); 159 (31); 145 (36); 95 (58); 69 (87).

24 $\xi$ -Metilcolesta-5,24(24<sup>1</sup>)-dien-3 $\beta$ -ol (XV):

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 13 (pág. 166).

EM m/z (%): 398 [M<sup>+</sup>] (36); 383 (13); 365 (6); 314 (100); 299 (22); 271 (37); 213 (10); 145 (12); 95 (15); 69 (19).

Colest-5-en-3 $\beta$ -ol (XVI):

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

EM m/z (%): 386 [M<sup>+</sup>] (96); 371 (23); 368 (36); 353 (26); 315 (12); 300 (29); 275 (49); 273 (20); 255 (28); 247 (13); 231 (32); 213 (61); 145 (74); 43 (100).

24 $\xi$ -Metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol (XVII):

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

EM m/z (%): 400 [M<sup>+</sup>] (15); 315 (7); 289 (9); 255 (19); 231 (6); 213 (14); 178 (5); 163 (8); 145 (59); 95 (93); 83 (100); 43 (95).

*24ξ-Etilcolest-5,22-dien-3β-ol (XVIII):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

EM m/z (%): 412 [M<sup>+</sup>] (15); 369 (4); 351 (5); 300 (9); 271 (16); 255 (18); 213 (14); 163 (9); 145 (60); 95 (93); 83 (100); 69 (87).

*24ξ-Etilcolest-5-en-3β-ol (XIX):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

EM m/z (%): 414 [M<sup>+</sup>] (91); 396 (59); 329 (11); 303 (59); 255 (11); 213 (30); 145 (59); 109 (58); 95 (73); 81 (100); 43 (69).

*Colest-5,22-dien-3β-ol (XXII):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

EM m/z (%): 384 [M<sup>+</sup>] (96); 366 (9); 351 (35); 300 (29); 299 (11); 273 (20); 255 (29); 231 (33); 229 (44); 213 (61); 178 (16); 59 (86); 43 (100).

*3β-Hidroxi-24ξ-etil-5α-colestan-6-ona (XXIII):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 3.55 (m, 1H, H-3); 0.92 (d, J=6 Hz, 3H, H-21); 0.85 (t, J=7 Hz, 3H, H-29); 0.83 (d, J=7 Hz, 3H, H-26\*); 0.81 (d, J=6 Hz, 3H, H-27\*); 0.76 (s, 3H, H-19); 0.67 (s, 3H, H-18); \*señales que pueden ser intercambiadas.

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 36.7 (C-1); 30.7 (C-2\*); 70.6 (C-3); 30.1 (C-4\*); 56.7 (C-5); 210.3 (C-6); 46.7 (C-7); 37.9 (C-8); 54.0 (C-9); 40.8 (C-10); 21.5 (C-11); 39.5 (C-12); 42.9 (C-13); 56.7 (C-14); 24.0 (C-15); 28.0 (C-16); 56.0

(C-17); 12.0 (C-18); 13.1 (C-19); 36.0 (C-20); 18.7 (C-21); 33.9 (C-22); 26.2 (C-23); 45.8 (C-24); 29.2 (C-25); 19.0 (C-27); 22.7 (C-26); 23.1 (C-28); 12.0 (C-29).

EM m/z (%): 430 [M<sup>+</sup>] (100); 415 (5); 412 (5); 397 (4); 359 (2); 340 (20); 290 (4); 289 (13); 271 (5); 247 (18); 95 (21); 86 (27); 84 (40).

*3β-Hidroxi-5α-colestan-6-ona (XXIV):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

EM m/z (%): 402 [M<sup>+</sup>] (68); 387 (8); 384 (17); 369 (11); 331 (32); 289 (23); 288 (9); 287 (11); 271 (16); 262 (11); 247 (33); 95 (100).

*3β-Hidroxi-24ξ-metil-5α-colestan-6-ona (XXV):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

EM m/z (%): 416 [M<sup>+</sup>] (15); 401 (2); 398 (6); 385 (12); 383 (4); 345 (6); 289 (15); 276 (6); 271 (22); 247 (17); 95 (96); 55 (100).

*3β-Hidroxi-24ξ-etil-5α-colest-22-en-6-ona (XXVI):*

CGL: ver tabla 12 (pág. 164).

CLAR: ver tabla 12 (pág. 164).

EM m/z (%): 428 [M<sup>+</sup>] (28); 413 (5); 410 (6); 395 (2); 367 (10); 357 (8); 289 (15); 288 (18); 287 (28); 271 (22); 247 (17); 95 (96); 55 (100).

### **Triterpenoles**

CGL: Columna HP-5 (pág. 141). Temperatura: 150 °C a 280 °C, 10 °C/min.

CLAR: Columna RP-18, 10 μm (pág. 141), MeOH-AcOEt (4:1), detector RI.

*Olean-12-en-3 $\beta$ -ol* ( $\beta$ -amirina XX):

CGL: tr: 13.72 min.

CLAR: tr: 13.3 min.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.20 (m, 1H, H-12); 3.22 (dda, J=10 y 6 Hz, 1H, H-3); 1.14 (s, 3H, H-27); 1.00 (s, 3H, H-23); 0.97 (s, 3H, H-26); 0.94 (s, 3H, H-25); 0.87 (s, 6H, H-29 y 30); 0.83 (s, 3H, H-28); 0.79 (s, 3H, H-24).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 145.0 (C-13); 121.7 (C-12); 79.0 (C-3); 55.2 (C-5); 47.7 (C-9); 47.3 (C-18); 46.8 (C-19); 41.9 (C-14); 39.8 (C-8); 38.8 (C-4); 38.6 (C-1); 37.2 (C-10 y C-22); 34.8 (C-21); 33.3 (C-29); 32.7 (C-7 y C-17); 31.1 (C-20); 28.4 (C-15); 28.1 (C-23); 27.3 (C-2 y C-28); 26.2 (C-16 y C-27); 23.7 (C-30); 23.6 (C-11), 18.4 (C-6); 15.6 (C-24 y C-25).

EM m/z (%): 426 (62); 411 (14); 393 (3); 218 (100); 207 (43); 205 (21); 203 (81); 189 (47); 133 (25); 95 (60).

*Lup-20(29)-en-3 $\beta$ -ol* (lupeol XXI):

CGL: tr: 14.06 min.

CLAR: tr: 11.0 min.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 4.69 (s.a., 1H, H-30); 4.59 (sa, 1H, H-30); 3.20 (dda, J=10 y 6 Hz, 1H, H-3); 2.34 (m, 2H, H-2); 1.68 (sa, 3H, H-29); 1.04 (s, 3H, H-26); 0.98 (s, 3H, H-23); 0.94 (s, 3H, H-27); 0.83 (s, 3H, H-25); 0.79 (s, 3H, H-28); 0.76 (s, 3H, H-24).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 150.7 (C-20); 109.1 (C-30); 78.9 (C-3); 55.2 (C-5); 50.4 (C-9); 48.3 (C-19<sup>a</sup>); 47.9 (C-18<sup>a</sup>); 42.9 (C-17<sup>b</sup>); 42.8 (C-14<sup>b</sup>); 40.8 (C-8); 40.0 (C-22); 38.8 (C-4); 38.7 (C-1); 38.0 (C-13); 37.1 (C-10); 35.5 (C-16); 34.3 (C-7); 29.8 (C-21); 28.0 (C-23); 27.4 (C-2 y C-15); 25.2 (C-12); 20.9 (C-11); 19.3 (C-29); 18.3 (C-6); 18.0 (C-28); 16.1 (C-25<sup>c</sup>); 16.0 (C-26<sup>c</sup>); 15.4 (C-24); 14.5 (C-27). a, b y c : señales que pueden intercambiarse.

EM m/z (%): 426 (100); 411 (17); 393 (4); 383 (4); 218 (60); 207 (71); 205 (25); 203 (36); 194 (51); 189 (67); 121 (58); 109 (86).

### **Alcoholes lineales**

CGL: condiciones idénticas a las de los triterpenoles (pág. 170).

*Hexadecanol* (XXVII): tr: 3.12 min.

*Octadecanol* (XXVIII): tr: 4.64 min.

### **$\alpha$ -tocoferol (XXIX):**

CGL: Columna HP-5 (pág. 141), condiciones idénticas a las informadas para esteroides (pág. 161); trr (relativo a sitosterol): 0.94.

EM m/z (%): 431 (49); 430 (100); 205 (5); 203 (2); 189 (1); 166 (8); 165 (58); 164 (50); 137 (2); 136 (2); 69 (8).

### **Aromadendra-1(10),4-dien-15-al-3-ona (XXX):**

Plumas amarillo pálido. Pf: 66-68 °C (éter etílico-hexano).  $[\alpha]_D^{20} = +40^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, c=0.068). UV  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (ε): 314 nm (15752), 323 nm (h), 260 nm (5660), 228 nm (h).

CGL: Columna HP-5 (pág. 141), idénticas condiciones que las informadas para esteroides (pág. 161). Tr: 4.49 min.

RMN-<sup>1</sup>H: Ver tabla 1 (pág. 56).

RMN-<sup>13</sup>C: Ver tabla 1 (pág. 56).

EM m/z (%): 230 (82); 215 (13); 203 (13); 201 (15); 189 (17); 188 (100); 187 (57); 174 (14); 173 (19); 160 (21); 159 (46); 146 (13); 145 (23); 131 (20); 118 (11).

### Acidos triterpénicos

*Acido Olean-12-en-3 $\beta$ -hidroxi-28-oico (Acido oleánico XXXI):*

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>-MeOD 5%): 5.28 (m, 1H, H-12); 3.20 (m, 1H, H-3); 1.14 (s, 3H, H-27); 1.00 (s, 3H, H-23); 0.94 (sa, 9H, H-25, H-29 y H-30); 0.77 (sa, 6H, H-24 y H-26).

EM m/z (%): 456 (13); 441 (2); 438 (4); 248 (100); 236 (6); 207 (35); 203 (72); 189 (14); 155 (13); 153 (9); 133 (26); 121 (16).

(XXXIa) (Derivado metilado de XXXI):

CGL: Columna HP-5 (pág. 141), idénticas condiciones a las informadas para esteroides (pág. 161). tr: 15.49 min.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.28 (m, 1H, H-12); 3.63 (s, 3H, -OMe); 3.20 (m, 1H, H-3); 1.14 (s, 3H, H-27); 1.00 (s, 3H, H-23); 0.93 (sa, 9H, H-25, H-29 y H-30); 0.79 (s, 3H, H-24); 0.73 (s, 3H, H-26).

*Acido Urs-12-en-3 $\beta$ -hidroxi-28-oico (Acido ursólico XXXII):*

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.26 (m, 1H, H-12); 3.20 (m, 1H, H-3); 1.10 (s, 3H, H-27); 0.99 (s, 3H, H-23); 0.94 (m, 9H, H-25, H-29 y H-30); 0.82 (s, 3H, H-26); 0.77 (s, 3H, H-24).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>-MeOD 5%): 180.8 (C-28); 138.5 (C-13); 125.8 (C-12); 79.0 (C-3); 55.7 (C-5); 53.3 (C-18); 48.0 (C-9 y C-17); 42.5 (C-14); 39.9 (C-8<sup>a</sup>); 39.6



(C-19<sup>a</sup>); 39.4 (C-20<sup>a</sup>); 39.1 (C-1 y C-4); 37.3 (C-10 y C-22); 33.5 (C-7); 31.1 (C-21); 28.4 (C-15 y C-23); 27.2 (C-2); 24.7 (C-16); 23.9 (C-29); 23.7 (C-27); 21.5 (C-30); 18.8 (C-6); 17.4 (C-26<sup>b</sup>); 17.3 (C-11<sup>b</sup>); 16.0 (C-24<sup>c</sup>); 15.8 (C-25<sup>c</sup>).

a,b y c: señales que pueden intercambiarse.

EM m/z (%): 456 (5); 438 (1); 248 (100); 236 (3); 207 (35); 203 (54); 189 (11); 133 (42); 121 (12).

(XXXIIa) (derivado metilado de XXXII):

CGL: Columna HP-5 (pág. 141), idénticas condiciones que las informadas para esteroides (pág. 161). Tr: 16.08 min.

### Peróxidos de esteroides

*5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-(22E)-5 $\alpha$ -ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (XXXIII):*

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 6.55 (d, J= 8 Hz, 1H, H-6<sup>a</sup>); 6.24 (d, J= 8Hz, 1H, H-7<sup>a</sup>); 5.19 (m, 2H, H-22 y H-23); 3.95 (m, 1H, H-3); 1.00 (d, J=6.5 Hz, 3H, H-21); 0.91 (d, J= 7 Hz, 3H, H-28); 0.89 (s, 3H, H-19); 0.84 (d, J= 7 Hz, H-26); 0.82 (s, 3H, H-18); 0.81 (d, J= 7 Hz, H-27). a: señales que pueden intercambiarse.

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 135.2 (C-23); 135.0 (C-7); 132.1 (C-22); 130.5 (C-6); 82.0 (C-8); 79.3 (C-5); 66.4 (C-3); 56.1 (C-17); 51.6 (C-14); 51.0 (C-4); 44.5 (C-13); 42.7 (C-24); 39.6 (C-20); 39.3 (C-1 y C-12); 36.9 (C-10); 34.6 (C-9); 33.0 (C-25); 30.1 (C-2); 28.6 (C-15); 23.4 (C-16); 20.8 (C-11); 20.6 (C-27); 19.9 (C-26); 19.6 (C-21); 18.2 (C-19); 17.5 (C-28); 12.9 (C-18).

EM m/z (%): 428 (4); 396 (100); 363 (56); 337 (23); 271 (15); 253 (27); 251 (9); 211 (16); 200 (77); 199 (12); 197 (10); 159 (29); 152 (14); 143 (29); 109 (17); 107 (17); 95 (20); 93 (15); 69 (61).

*5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-(22E)-5 $\alpha$ -ergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (XXXIV):*

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): 6.61 (d, J= 8.5 Hz, 1H, H-6<sup>\*</sup>); 6.29 (d, J= 8.5 Hz, 1H, H-7<sup>\*</sup>); 5.44 (m, 1H, H-11); 5.21 (m, 2H, H-22 y H-23); 4.02 (m, 1H, H-3); 1.10 (s, 3H, H-19); 1.00 (d, J= 6.5 Hz, 3H, H-21); 0.91 (d, J= 7 Hz, 3H, H-28); 0.84 (d, J= 6.5 Hz, 3H, H-26); 0.82 (d, J= 7 Hz, 3H, H-27); 0.75 (s, 3H, H-18). a y b: señales que pueden intercambiarse.

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): 142.4 (C-9); 135.2 (C-23); 134.9 (C-7); 132.2 (C-22); 130.6 (C-6); 119.5 (C-11); 82.5 (C-8); 66.3 (C-3); 55.8 (C-17); 48.1; 43.5; 42.7 (C-24); 41.1; 39.8 (C-20); 37.9; 36.0; 33.0 (C-25); 32.5; 30.6; 29.6; 28.6; 25.5; 20.9 (C-19); 20.7 (C-27); 19.9 (C-26); 19.6 (C-21); 17.5 (C-28); 12.9 (C-18).

**EM m/z (%)**: 426 (10); 410 (13); 408 (11); 394 (85); 392 (13); 376 (100); 361 (16); 251 (58); 247 (22); 209 (12); 195 (14); 157 (11); 109 (20); 107 (20); 95 (26); 93 (21); 91 (25); 83 (34); 69 (99).

### Monoglicéridos

*1-O-[hexadecanoíl]-sn-glicerol (XXXV):*

**EM m/z (%)**: 330 (2); 300 (4); 270 (14); 257 (30); 240 (9); 196 (4); 182 (10); 176 (6); 154 (14); 134 (75); 112 (41); 98 (100); 73 (17).

*1-O-[(9Z)-octadeca-9-enoíl]-sn-glicerol (XXXVI):*

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): 5.36 (m, 2H, H-9 y H-10); 4.20 (dd, J= 6 y 1 Hz, 2H, H-sn-1 glic.); 3.88 (m, 1H, H-sn-2 glic.); 3.65 (m, 2H, H-sn-3 glic.); 2.36 (ta, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub><sup>\*</sup>-COOR); 2.06 (m, 4H, -CH<sub>2</sub><sup>\*</sup>-CH=CH-); 1.27 (s, 24 H); 0.88 (m, 3H, -CH<sub>3</sub>).

**EM m/z (%)**: 356 (2); 325 (2); 266 (2); 264 (26); 213 (1); 180 (2); 123 (7); 98 (100); 73 (16).

ác. (9Z,11E)-13-hidroxi-octadeca-9,11-dienoico (**Acido coriónico XLI**)

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): 6.51 (dd, J= 15 y 11 Hz, 1H, H-11); 5.99 (dd, 11 y 11 Hz, 1H, H-10); 5.67 (dd, J= 15 y 7 Hz, 1H, H-12); 5.50 (m, 1H, H-9); 4.18 (dda, J= 12 y 6 Hz, 1H, H-13); 2.30 (m, 2H, H-2 y H-8); 1.34 (sa, H-3 a H-7, H-14 a H-17); 0.90 (m, 3H, H-18).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): 179.0 (C-1); 135.4 (C-11); 132.9 (C-12); 127.5 (C-10); 125.7 (C-9); 72.8 (C-13); 37.2 (C-14); 33.9 (C-2); 31.4 (C-16); 29.2, 29.1 y 28.9 (C-4 a C-7); 27.7 (C-8); 25.3 (C-15); 24.6 (C-3); 22.5 (C-17); 14.0 (C-18).

*Sitosterol 3-O-[6-O-palmitoil-β-D-glucopiranosido] peracetilado (XXXVIIa)*

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): 5.36 (m, 1H, H-6); 5.20 (dd, J= 9 y 9 Hz, 1H, H-3'); 5.05 (dd, J= 9 y 9 Hz, 1H, H-4'); 4.97 (dd, J= 9 y 8 Hz, 1H, H-2'); 4.59 (d, J= 8 Hz, 1H, H-1'); 4.20 (m, 1H, H-6'); 4.10 (m, 1H, H-6'); 3.68 (m, 2H, H-5'); 3.50 (m, 1H, H-3); 2.30 (m, 2H, H-2''); 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO-); 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO-); 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO-); 1.27 (sa, H-4'' a H-15''); 1.00 (s, 3H, H-19); 0.79-0.98 (m, H-26, H-27, H-29, H-21 y H-16''); 0.68 (s, 3H, H-18).

**RMN-<sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): 173.8 (C-1''); 170.0 (CH<sub>3</sub>COO-); 169.0 (CH<sub>3</sub>COO-); 140.0 (C-5); 121.9 (C-6); 99.4 (C-1'); 80.0 (C-3'); 72.8 (C-3); 71.6 (C-5'); 71.4 (C-4'); 62.0 (C-6'); 56.6 (C-14); 55.9 (C-17); 50.1 (C-9); 45.7 (C-24); 42.2 (C-13); 39.6 (C-12); 38.8 (C-4); 37.1 (C-1); 36.6 (C-10); 36.0 (C-20); 34.0 (C-2''); 33.8 (C-22); 31.8 (C-7, C-8 y C-14''); 29.6 (C-5'' a C-13''); 29.2 (C-4''); 29.1 (C-2 y C-25); 28.1 (C-16); 26.0 (C-23); 24.7 (C-3''); 24.2 (C-15); 23.0 (C-28); 22.6 (C-15''); 20.9 (C-11); 20.8 (CH<sub>3</sub>COO-); 20.6 (CH<sub>3</sub>COO-); 19.7 (C-26); 19.3 (C-19); 19.0 (C-27); 18.7 (C-21); 14.0 (C-16''); 11.9 (C-29); 11.8 (C-18).

*Sitosterol 3-O-[\beta-D-glucopiranosido] peracetilado (LVa)*

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): 5.35 (m, 1H, H-6); 5.12 (dd, J= 9 y 9 Hz, 1H, H-3'); 5.04 (dd, J= 9 y 9 Hz, 1H, H-4'); 4.94 (dd, J= 9 y 8 Hz, 1H, H-2'); 4.58 (d, J= 8 Hz, 1H, H-1'); 4.20 (m, 1H, H-6'); 4.10 (m, 1H, H-6'); 3.64 (m, 2H, H-5'); 3.50 (m, 1H, H-3); 2.30 (m, 2H, H-2''); 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO-); 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO-); 2.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO-); 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO-); 0.99 (s, 3H, H-19); 0.76-0.98 (m, H-26, H-27, H-29 y H-21); 0.68 (s, 3H, H-18).

**Siringaldehído (XLII):**

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): 9.84 (s, 1H, H-7); 7.17 (s, 2H, H-2 y H-5); 6.06 (m, 1H, HO); 4.00 (s, 6H, CH<sub>3</sub>O).

**EM** m/z (%): 182 (100); 181 (42); 167 (13); 153 (7); 151 (33); 137 (13); 121 (14); 93 (10); 71 (11).

**Pregnano glicosidado**

*3β, 14β-hidroxi-21-metoxi-5β-pregnan-20-ona 3-O-[\beta-D-diginopiranosil-(1-4)-\beta-D-cimaropiranosil-(1-4)-\beta-D-cimaropiranosido] (XLIII):*

Sólido amorfo.  $[\alpha]_D = 17.1^\circ$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, c= 0.16). UV  $\lambda_{m\acute{a}x}$  ( $\epsilon$ ): 232 nm (2490), 276 nm (635).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): 4.77 (da, J= 10Hz, 2H, H-1' y H-1''), 4.45 (dd, J= 9 y 2Hz, 1H, H-1'''), 4.08 (s, 2H, H-21), 3.46 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.44 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.43 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.40 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.88 (m, 1H, H-17), 1.34 (d, J= 6Hz, 3H, H-6'''), 1.22 (da, J= 6Hz, 6H, H-6' y H-6''), 0.95 (s, 3H, H-18), 0.94 (s, 3H, H-19).

EM:

m/z	Abund. relat. (%)	Fórmula molec.	Identificación
747.71	1		[M-OCH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
719.66	1		
634.4060	1	C <sub>36</sub> H <sub>58</sub> O <sub>9</sub>	[F <sub>1</sub> H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
607.3821	2	C <sub>34</sub> H <sub>55</sub> O <sub>9</sub>	[F <sub>1</sub> H-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
589.3729	1	C <sub>34</sub> H <sub>53</sub> O <sub>8</sub>	[F <sub>1</sub> H-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
490.3313	2	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub>	[F <sub>2</sub> H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
463.31	5		[F <sub>2</sub> H-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
445.3019	14	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> O <sub>5</sub>	[F <sub>2</sub> H-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
364.27	1		[AH] <sup>+</sup>
346.26	12		[AH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
319.23	16		
301.2147	72	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	[AH-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
273.23	19		
255.22	37		
161.13	35		
145.09	99		
113.06	100		
107.09	47		
105.07	31		
87.04	99		

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 215.9 (C-20), 101.7 (C-1'''), 99.5 (C-1''), 95.7 (C-1'), 84.9 (C-14), 82.4 (C-4'y C-4''), 78.8 (C-21), 77.7 (C-3'''), 77.0 (C-3'y C-3''), 72.8 (C-3), 70.4 (C-5'''), 68.4 (C-5'), 68.3 (C-5''), 66.8 (C-4'''), 59.2 (C-17), 58.2 (C-CH<sub>3</sub>O-cim), 57.9 (C-CH<sub>3</sub>O-cim), 57.0 (C-CH<sub>3</sub>O), 55.7 (C-CH<sub>3</sub>O-dgn), 49.6 (C-13), 40.0 (C-8), 39.1 (C-12), 36.5 (C-5), 35.6 (C-2' y C-2''), 35.2 (C-9 y C-10), 34.0 (C-15), 31.6 (C-2'''), 30.3 (C-4)\*, 30.1 (C-1)\*, 26.7 (C-6 y C-2), 24.9 (C-16), 23.8 (C-19),

21.7 (C-7), 20.9 (C-11), 18.3 (C-6' y C-6''), 16.9 (C-6'''), 15.3 (C-18). \*: señales que pueden intercambiarse.

Desacoples selectivos:

Irradiación (RMN-<sup>1</sup>H) a:  $\delta$  4.08: singulete a 78.8 ppm (RMN-<sup>13</sup>C).

$\delta$  4.45: singulete a 101.7 ppm.

$\delta$  4.77: singuletes a 95.7 y 99.5 ppm.

Tiempos de relajación spin-red ( $T_1$ ) en mseg: 140 (C-21); 424 (C-19); 417 (C-18); 82 (C-16); 53 (C-15); 55 (C-11); 116 (C-5); 155 (C-3); 222 (OCH<sub>3</sub> aglic.); 45\* (C-2' y C-2''); 59 (C-2'''); 103\* (C-4' y C-4''); 98 (C-4'''); 163 (C-5'); 183 (C-5''); 201 (C-5'''); 286\* (C-6' y C-6''); 347 (C-6'''). \* valores de  $T_1$  con muy buena correlación a pesar de corresponder a dos carbonos (lo cual indica que el valor de  $T_1$  para esos carbonos es muy similar e igual al valor indicado arriba).

CGL de los alditoles acetilados obtenidos a partir de XLIII: (pág. 143). tr: 4.04 min y 4.51 min. tr testigo de cimaritol acetilado: 4.04 min. tr testigo de diginitol acetilado: 4.50 min.

CGL de los aldononitrilos acetilados obtenidos a partir de XLIII: (pág. 144, temperatura: 200 °C isotérmica). tr: 7.58 min y 8.12 min. tr testigo del derivado de cim: 7.60 min. tr testigo del derivado de dgn: 8.13 min.

**XLIV y XLV** (*Cimarosa* y *diginosa*, azúcares libres obtenidos a partir de XLIII):

$[\alpha]_D$  XLIV= +49° (H<sub>2</sub>O, c= 0.12);  $[\alpha]_D$  cim= +51.2 [188]

$[\alpha]_D$  XLV= +54° (H<sub>2</sub>O, c= 0.20);  $[\alpha]_D$  dgn= +55 [189].

*3β,14β-dihidroxi-21-metoxi-5β--pregnan-20-ona (XLVI):*

pf: 82-87 °C (Et<sub>2</sub>O-hexano); [α]<sub>D</sub>=+70° (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, c= 0.030); UV λ<sub>máx</sub> (ε): 232 nm (600), 282 nm (200).

CLAR: Columna 1 (pág. 141), MeOH, RI, tr: 8.5 min.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 4.30 (sa, 1H, HO-14, se intercambia con D<sub>2</sub>O), 4.12 (sa, 1H, H-3), 4.07 (s, 2H, H-21), 3.43 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.89 (m, 1H, H-17), 0.96 (s, 3H, H-19), 0.95 (s, 3H, H-18).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 215.9 (C-20), 85.0 (C-14), 79.0 (C-21), 67.0 (C-3), 59.4 (C-17), 57.1 (CH<sub>3</sub>O), 49.7 (C-13), 40.1 (C-8), 35.5 (C-9)\*, 35.1 (C-10)\*, 34.1 (C-15), 33.6 (C-4), 29.9 (C-1), 28.0 (C-2), 26.6 (C-6), 24.9 (C-16), 23.9 (C-19), 21.7 (C-7), 21.0 (C-11), 15.4 (C-18). \* señales que pueden intercambiarse.

EM, 50 eV, m/z (%): 364 (1), 336 (3), 321 (7), 319 (8), 318 (1), 301 (28), 273 (1), 84 (100).

*3β,14β-hidroxi-21-metoxi-5β-pregnan-20-ona 3-O-β-D-cimaropiranósido (XLVII):*

CLAR: Columna 1 (pág. 141), MeOH, RI, tr: 11.97 min.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 4.72 (dd, J=9 y 2Hz, 1H, H-1'), 4.29 (sa, 1H, HO-14), 4.07 (s, 2H, H-21), 3.43 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 2.90 (m, 1H, H-17), 1.28 (d, J=6 Hz, 3H, H-6'), 0.95 (s, 3H, H-18), 0.94 (s, 3H, H-19).

*1-OMe-[β-D-cimaropiranosil-(1-4)-β-D-cimarofuranósido] (XLVIII):*

CLAR: Columna 1 (pág. 141), MeOH, RI, tr: 6.05 min.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.12 (dd, J= 5 y 3Hz, 1H, H-1), 4.57 (dd, J= 10 y 2Hz, 1H, H-1'), 3.44 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.42 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.30 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.22 (m, 2H, H-2<sub>ec</sub> y H-2'<sub>ec</sub>), 1.66 (m, 2H, H-2<sub>ax</sub> y H-2'<sub>ax</sub>), 1.32 (d, J= 6Hz, 3H, H-6'), 1.22 (d, J= 6Hz, 3H, H-6).

CGL de los alditos acetilados obtenidos a partir **XLVIII**: (pág. 143), tr: 4.03 min, tr cimaritol acetilado testigo: 4.04 min.

*3 $\beta$ -acetoxi-14 $\beta$ -hidroxi-21-metoxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (XLVIa')*:

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.08 (sa, 1H, H-3); 4.08 (s, 2H, H-21); 3.44 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2.88 (m, 1H, H-17); 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO); 0.98 (s, 3H, H-19); 0.96 (s, 3H, H-18).

*3 $\beta$ -hidroxi-21-metoxi-pregn-5-en-20-ona (XLVIb')*:

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.36 (m, 1H, H-6); 4.00 (s, 2H, H-21); 3.42 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2.61 (m, 1H, H-17); 1.02 (s, 3H, H-19); 0.67 (s, 3H, H-18).

## Lignanós

*(+)-pinoresinol (LI)*:

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +32° (CDCl<sub>3</sub>, c = 0.087); UV  $\lambda_{\text{máx}}$  (log  $\epsilon$ ) = 244 nm (3.55), 280 nm (3.67).

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 6.88 (m, 6H, H-aromát.); 5.60 (m, 2H, HO-aromát.); 4.75 (d, J = 5 Hz, 2H, H-7 y H-7'); 4.23 (m, 2H, H<sub>a</sub>-9 y H<sub>a</sub>-9'); 3.91 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.85 (m, 2H, H<sub>b</sub>-9 y H<sub>b</sub>-9'); 3.10 (m, 2H, H-8 y H-8').

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 146.7 (C-3 y C-3'); 145.2 (C-4 y C-4'); 132.9 (C-1 y C-1'); 118.9 (C-6 y C-6'); 114.3 (C-5 y C-5'); 108.6 (C-2 y C-2'); 85.9 (C-7 y C-7'); 71.7 (C-9 y C-9'); 56.1 (2 x OCH<sub>3</sub>); 54.2 (C-8 y C-8').

EM m/z (%): 358 (100); 327 (11); 205 (17); 163 (24); 151 (77); 137 (40); 131 (21); 124 (12).



*(+)-8 $\alpha$ -hidroxipinoresinol (LII):*

$[\alpha]_D = +23^\circ$  (CDCl<sub>3</sub>, c = 0.098); UV  $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$  (log  $\epsilon$ ): 244 nm (3.50), 280 nm (3.57).

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 6.97 (m, 6H, H-aromát.); 5.65 (m, 2H, HO-aromát.); 4.89 (d, J = 5 Hz, 1H, H-7'); 4.86 (s, 1H, H-7); 4.51 (dd, J = 10 y 1 Hz, 1H, H-9'<sub>ec</sub>); 4.20-3.70 (m, 3H, H-9 y H-9'<sub>ax</sub>); 3.94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.12 (m, 1H, H-8').

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 146.9 (C-3); 146.7 (C-3'); 146.0 (C-4); 145.4 (C-4'); 132.4 (C-1'); 127.0 (C-1); 119.7 (C-6 y C-6'); 114.7 (C-5); 114.3 (C-5'); 109.4 (C-2\*); 109.1 (C-2'\*); 91.7 (C-8); 87.8 (C-7); 85.9 (C-7'); 74.8 (C-9); 71.7 (C-9'); 60.2 (C-8'); 56.1 (2 x OCH<sub>3</sub>). \* señales que pueden intercambiarse.

EM m/z (%): 374 (100); 356 (1); 237 (11); 221 (33); 207 (50); 193 (19); 153 (61); 151 (76); 137 (65).

## Cardenólidos

*Oleandrigenina (XXXVIII):*

RMN-<sup>1</sup>H: Ver tabla 15 (pág. 185).

RMN-<sup>13</sup>C: Ver tabla 16 (pág. 186).

EM m/z (%): 261 (2); 260 (10); 258 (1); 245 (3); 228 (47); 203 (4); 187 (98); 158 (56); 155 (91); 127 (65); 126 (66); 101 (82); 95 (100); 71 (87); 67 (71).

Derivado acetilado (XXXVIIIa):

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.99 (sa, 1H, H-22); 5.49 (m, 1H, H-16); 5.09 (sa, 1H, H-3); 5.94 (ABX, 2H, H-21); 3.20 (d, J = 9 Hz, 1H, H-17); 2.75 (dd, J = 15 y 9 Hz, 2H, H-15); 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO); 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO); 0.97 (s, 3H, H-19); 0.96 (s, 3H, H-18).

*Digitoxigenina (XXXIX):*

RMN-<sup>1</sup>H: Ver tabla 15 (pág. 185).

EM m/z (%): 374 (1); 356 (100); 338 (86); 323 (66); 246 (6); 228 (33); 213 (62); 203 (47); 163 (70); 145 (59); 111 (77).

*Digitoxigenina 3-O-β-D-cimaropiranosido (XL):*

RMN-<sup>1</sup>H: Ver tabla 15 (pág. 185).

RMN-<sup>13</sup>C: Ver tabla 16 (pág. 186).

EM m/z (%): 474 (2); 400 (7); 374 (16); 356 (57); 339 (27); 338 (14); 323 (5); 259 (4); 246 (24); 228 (3); 203 (100); 163 (10); 162 (23); 145 (27); 124 (20); 111 (24); 107 (18); 95 (20).

CGL del alditol acetilado obtenido a partir de **XL** (pág. 143): tr: 4.13 min.,  
tr testigo: 4.13 min.

CGL del aldononitrilo acetilado obtenido a partir de **XL** (pág. 144): tr: 7.62 min.,  
tr testigo: 7.63 min.

*Oleandrigenina 3-O-β-D-diginopiranosido (XLIX):*

RMN-<sup>1</sup>H: Ver tabla 15 (pág. 185).

RMN-<sup>13</sup>C: Ver tabla 16 (pág. 186).

EM m/z (%): 372 (10); 356 (12); 354 (13); 338 (5); 323 (3); 246 (7); 228 (5); 203 (100); 163 (7); 124 (11); 111 (17).

Derivado acetilado (XLIXa):

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.99 (sa, 1H, H-22); 5.49 (ddd, J= 9, 9 y 2 Hz, 1H, H-16); 5.18 (dd, J= 4 y 1 Hz, 1H, H-4'); 4.94 (ABX, J= 17, 4 y 2 Hz, 2H, H-21); 4.48 (dd, J= 8 y 3 Hz, 1H, H-1'); 4.07 (sa, 1H, H-3); 3.36 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.20 (d, J= 9 Hz, H-17); 2.75 (dd, J= 15 y 9 Hz, 2H, H-15); 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO); 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO); 1.21 (d, J= 6 Hz, 3H, H-6'); 0.94 (s, 6H, H-18 y H-19).

CGL del alditol acetilado obtenido a partir de **XLIX** (pág. 143): tr: 4.50 min.,  
tr testigo del derivado de diginosa: 4.50 min.

*Digitoxigenina 3-O-β-D-diginopiranosido (L):*

RMN-<sup>1</sup>H: Ver tabla 15 (pág. 185).

RMN-<sup>13</sup>C: Ver tabla 16 (pág. 186).

Derivado acetilado (La):

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.88 (sa, 1H, H-22); 5.19 (dd, J= 3 y 1 Hz, 1H, H-4'); 4.90 (ABX, J= 18, 8 y 2 Hz, 2H, H-21); 4.50 (dd, J= 9 y 3 Hz, 1H, H-1'); 4.07 (sa, 1H, H-3); 3.45 (m, 1H, H-5); 3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2.76 (m, 1H, H-17); 1.21 (d, J= 6 Hz, 3H, H-6'); 0.95 (s, 3H, H-19); 0.88 (s, 3H, H-18).

CGL del alditol acetilado obtenido a partir de **L** (pág. 143): tr: 4.51 min.,  
tr testigo del derivado de diginosa: 4.50 min.

*Oleandrigenina 3-O-β-D-digitalopiranosido (LIII):*

[α]<sub>D</sub> = -7° (MeOH, c= 0.45).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 17 (pág. 189).

RMN-<sup>13</sup>C: ver tabla 18 (pág. 190).

FAB<sup>+</sup>/EM m/z (%): 615 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100); 593 ([M+H]<sup>+</sup>, 47); 533 (17); 433 (25); 373 (35); 355 (58); 257 (37); 217 (82); 181 (86); 133 (100).

Secuencia genética por EM/EM:

m/z ión precursor	m/z iones hijo	asignación
593	533	[M+1-AcOH] <sup>+</sup>
	433	[M+1-azúcar] <sup>+</sup>
433	373	[433-AcOH] <sup>+</sup>

	XXXVIII	XXXIX	XL	XLIX	L
H-22	5.99 sa	5.88 sa	5.89 sa	5.99 sa	5.88 sa
H-21	4.94 ABX	4.91 ABX	4.92 ABX	4.94 ABX	4.91 ABX
	J=17, 4, 2	J=18, 8, 2	J=18, 8, 2	J=17, 4, 2	J=18, 8, 2
H-19	0.97 s	0.97 s	0.94 s	0.94 s	0.94 s
H-18	0.96 s	0.89 s	0.88 s	0.94 s	0.88 s
H-17	3.20 d	2.76 m	2.77 m	3.20 d	2.76 m
	J=9			J=9	
H-16	5.50 ddd			5.49 ddd	
	J=9, 9, 3			J=9, 9, 3	
H-15	2.75 dd			2.75 dd	
	J=15, 9			J=15, 9	
H-3	4.15 sa	4.14 sa	4.02 sa	4.07 sa	4.07 sa
<u>Me</u> COO-	1.99 s			1.99 s	
H-1'			4.73 dd	4.46 dd	4.48 dd
			J=9, 2	J=9, 3	J=9, 3
H-4'			3.24 dd	3.70 dd	3.69 sa
			J=9, 3	J=4, 1	
H-6'			1.29 d	1.35 d	1.34 d
			J=6	J=6	J=6
<u>Me</u> O-			3.45 s	3.43 s	3.43 s

Solvente: CDCl<sub>3</sub>, TMS como estándar interno ( $\delta$  en ppm, J en Hz).

Tabla 15. RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos XXXVIII-XL, XLIX y L.

	XXXVIII	XL	XLIX	L
C-1	29.5	30.2 <sup>a</sup>	30.0	29.8 <sup>a</sup>
C-2	27.8	26.7 <sup>b</sup>	26.5	26.6 <sup>b</sup>
C-3	66.6	72.6	72.6	72.5
C-4	33.2	30.3 <sup>a</sup>	30.0	30.1 <sup>a</sup>
C-5	35.8	36.5	36.2	36.3
C-6	26.2	26.7 <sup>b</sup>	26.5	26.6 <sup>b</sup>
C-7	20.8 <sup>a</sup>	21.3 <sup>c</sup>	20.7 <sup>a</sup>	21.1 <sup>c</sup>
C-8	41.7	42.0	41.7	41.8
C-9	35.4	35.9	35.6	35.7
C-10	35.2	35.2	35.0	35.1
C-11	21.0 <sup>a</sup>	21.5 <sup>c</sup>	21.0 <sup>a</sup>	21.4 <sup>c</sup>
C-12	41.2	40.1	41.1	40.0
C-13	49.9	49.7	49.9	49.5
C-14	84.1	85.6	84.1	85.5
C-15	39.2	33.2	39.2	33.0
C-16	73.8	27.0 <sup>b</sup>	73.8	26.9 <sup>b</sup>
C-17	56.0	51.0	56.0	50.8
C-18	15.9	15.9	15.9	15.7
C-19	23.6	23.7	23.5	23.6
C-20	170.1 <sup>b</sup>	174.4 <sup>d</sup>	170.1 <sup>b</sup>	174.3 <sup>d</sup>
C-21	75.6	73.5	75.6	73.4
C-22	121.2	117.6	121.2	117.4
C-23	173.8 <sup>b</sup>	174.7 <sup>d</sup>	173.8 <sup>b</sup>	174.5 <sup>d</sup>
<u>C</u> H <sub>3</sub> CO	21.0 <sup>a</sup>		21.0 <sup>a</sup>	
CH <sub>3</sub> <u>C</u> O	167.5		167.5	
C-1'		95.6	97.8	97.6
C-2'		34.3	32.0	32.0
C-3'		77.6	77.9	77.9
C-4'		72.9	67.1	67.1
C-5'		70.8	70.3	70.3
C-6'		18.4	16.8	16.8
<u>C</u> H <sub>3</sub> O		57.3	55.7	55.6

Solvente: CDCl<sub>3</sub>, TMS como estándar interno ( $\delta$  en ppm).

**Tabla 16.** RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos XXXVIII, XL, XLIX y L.

Derivado acetilado LIIIa (RMN-<sup>1</sup>H): ver tabla 17 (pág. 188).

CGL del monosacárido acetilado obtenido a partir de LIII: Columna HP-5 (pág. 141), condiciones: 120 °C a 295 °C, 5 °C/min, tr: 6.33 min y 6.46 min., tr testigo de digitalosa acetilada: 6.33 min. y 6.46 min.

*Digitoxigenina 3-O-β-D-digitalopiranosido* (LIV):

[α]<sub>D</sub> = +8° (MeOH, c = 1.2).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 17 (pág. 188).

RMN-<sup>13</sup>C: ver tabla 18 (pág. 189).

FAB<sup>+</sup>/EM m/z (%): 558 ([M+1+Na]<sup>+</sup>, 22); 536 ([M+2]<sup>+</sup>, 100); 516 (26); 376 (27); 358 (25); 340 (30); 274 (32); 145 (100).

Derivado acetilado LIVa:

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 17 (pág. 188).

CGL del monosacárido acetilado obtenido a partir de LIV: Columna HP-5 (pág. 141), iguales condiciones que para el compuesto LIII, tr: 6.33 min y 6.46 min., tr digitalosa acetilada: 6.33 min. y 6.46 min.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) del monosacárido acetilado obtenido a partir de LIV: 5.65 (d, J = 8 Hz, 1H, H-1); 5.37 (dd, J = 4 y 1 Hz, 1H, H-4); 5.21 (dd, J = 10 y 8 Hz, 1H, H-2); 3.82 (m, 1H, H-5); 3.38 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO); 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO); 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO); 1.24 (d, J = 6 Hz, 3H, H-6).

	LIII	LIIIa	LIV	LIVa
H-22	5.98 sa	5.98 sa	5.88 sa	5.88 sa
H-21	4.93 ABX	4.93 ABX	4.89 ABX	4.90 ABX
H-19	0.94 s	0.90 s	0.93 s	0.91 s
H-18	0.94 s	0.94 s	0.88 s	0.88 s
H-17	3.20 d	3.20 d	2.75 m	2.75 m
	J= 9	J= 9		
H-16	5.49 ddd	5.47 ddd		
	J= 9, 9, 3	J= 9, 9, 3		
H-15	2.74 dd	2.74 dd		
	J= 15,10	J= 15,10		
H-3	4.06 sa	4.00 sa	4.05 sa	4.02 sa
CH <sub>3</sub> CO	1.99 s	1.99 s		
		2.07 s		2.06 s
		2.18 s		2.18 s
H-1'	4.26 d	4.41 d	4.26 d	4.42 d
	J= 8	J= 8	J= 8	J= 8
H-2'	3.65 m	5.07 dd	3.67 m	5.10 dd
		J= 10,8		J= 10,8
H-3'	3.21 dd	3.35 m	3.21 dd	3.35 m
	J= 10,3		J= 10,3	
H-4'	3.86 dd	5.33 dd	3.85 dd	5.33 dd
	J= 3,1	J= 3,1	J= 3,1	J= 3,1
H-5'		3.68 m		3.68 m
H-6'	1.36 d	1.23 d	1.35 d	1.23 d
	J= 6	J= 6	J= 6	J= 6
OCH <sub>3</sub>	3.54 s	3.36 s	3.54 s	3.36 s

Solvente: CDCl<sub>3</sub>, TMS como estándar interno ( $\delta$  en ppm y J en Hz).

Tabla 17. RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos LIII, LIIIa, LIV y LIVa.

	LIII	LIV		LIII	LIV
C-1	30.4	30.5	C-1'	102.5	102.5
C-2	26.8 <sup>a</sup>	26.8 <sup>a</sup>	C-2'	70.8	70.8
C-3	75.0	75.0	C-3'	84.0	84.0
C-4	30.5	30.5	C-4'	68.1	68.1
C-5	36.8	36.8	C-5'	70.6	70.6
C-6	27.1 <sup>a</sup>	27.1 <sup>a</sup>	C-6'	16.3	16.3
C-7	21.5 <sup>b</sup>	21.7 <sup>b</sup>	OCH <sub>3</sub>	56.6	56.6
C-8	42.0	42.0			
C-9	36.1	36.2			
C-10	35.5	35.6			
C-11	21.3 <sup>b</sup>	21.9 <sup>b</sup>			
C-12	40.7	40.4			
C-13	50.7	50.4			
C-14	84.2	85.8			
C-15	39.4	32.7			
C-16	75.3	27.4			
C-17	56.7	51.5			
C-18	15.8	15.8			
C-19	23.4	23.5			
C-20	171.3 <sup>c</sup>	176.4 <sup>c</sup>			
C-21	76.8	74.6			
C-22	120.9	117.0			
C-23	175.8 <sup>c</sup>	177.6 <sup>c</sup>			
CH <sub>3</sub> C <u>O</u>	170.7				
<u>C</u> H <sub>3</sub> CO	20.3				

Solvente: MeOD, TMS como estándar interno ( $\delta$  en ppm).

Tabla 18. RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos LIII y LIV.



*Oleandrigenina 3-O-[[β-D-glucopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-diginopiranosido] (LVI):*

$[\alpha]_D = -8^\circ$  (MeOH,  $c = 0.087$ ).

UV  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ ): 220 nm (6500).

FAB<sup>+</sup>/EM (AR):  $[M+K]^+ = 939.3984$ , corresponde a  $C_{44}H_{68}O_{19}K$ .

Valor calculado 939.3992.

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 19 (pág. 198).

RMN-<sup>13</sup>C: ver tabla 21 (pág. 200).

EM/CAD/EM de  $[M+H]^+$ :

Masa	Abund. Relat.	Pérdida	Identificación
883	16	18	$[M+H-H_2O]^+$
869	100	32	$[M+H-MeOH]^+$
823	8	78	$[M+H-H_2O-C_2H_4O_2]^+$
809	8	92	$[M+H-MeOH-C_3H_4O_2]^+$
757	22	144	
739	15	162	$F_1H_2^+$
707	36	194	$[F_1H_2-MeOH]^+$
577	8	2x162	$F_2H_2^+$
469	4	AH	$[162+162+144+H]^+$
433	49	2x162+144	$AH_2^+$
415	7		$[AH_2-H_2O]^+$
373	11		$[AH_2-60]^+$
355	15		$[AH_2-60-H_2O]^+$
337	8		$[AH_2-60-2xH_2O]^+$
325	3		$[162+162+H]^+$
163	2		$[162+H]^+$
145	8		$[144+H]^+$
113	2		$[144+H-MeOH]^+$

Abundancia relativa en %, pérdida en u.

CGL de los alditoles acetilados (pág. 143) obtenidos a partir de **LVI**: tr: 4.18 min. y 13.28 min., tr testigos del derivado de diginosa: 4.18 min., tr testigo del derivado de glucosa: 13.28 min.

CGL de los aldononitrilos acetilados (pág. 144) obtenidos a partir de **LVI**: tr: 7.36 min. y 17.04 min., tr testigo del derivado de diginosa: 7.35 min., tr testigo del derivado de glucosa: 17.03 min.

*Oleandrigenina 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosido] (LVII):*

$[\alpha]_D = -10^\circ$  (MeOH, c= 0.25).

UV  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ ): 220 nm (800).

RMN- $^1\text{H}$ : ver tabla 19 (pág. 198).

RMN- $^{13}\text{C}$ : ver tabla 21 (pág. 200).

FAB $^+$ /EM m/z (%): 908  $[\text{M}+\text{Na}+1]^+$  (100); 867 (22); 720 (15); 414 (12); 372 (24); 133 (85).

Derivado acetilado:

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.98 (sa, 1H, H-22); 5.49 (m, 1H, H-16); 3.45 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.19 (d, J= 9 Hz, 1H, H-17); 2.72 (m, 2H, H-15); 2.15, 2.09, 2.06, 2.05, 2.02, 1.99 y 1.97 (s,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 1.23 (da, 6H, H-6 y H-6''); 0.93 (s, 3H, H-18); 0.91 (s, 3H, H-19).

*Digitoxigenina 3-O-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosido] (LVIII):*

$[\alpha]_D = -7^\circ$  (MeOH, c= 0.35).

UV  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ ): 225 nm (1800).

FAB<sup>+</sup>/EM (AR): [M+K]<sup>+</sup>= 881.3915, corresponde a C<sub>42</sub>H<sub>66</sub>O<sub>17</sub>K.

Valor calculado: 881.3937.

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 19 (pág. 198).

RMN-<sup>13</sup>C: ver tabla 21 (pág. 200).

EM/CAD/EM de [M+H]<sup>+</sup>:

Masa	Abund. Relat.	Pérdida	Identificación
825	31	18	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
811	100	32	[M+H-MeOH] <sup>+</sup>
793	8	50	[M+H-H <sub>2</sub> O-MeOH] <sup>+</sup>
767	6	78	[M+H-H <sub>2</sub> O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
751	15	92	[M+H-MeOH-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
699	7	144	
681	8	162	F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup>
660	5	183	
649	12	194	[F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> -MeOH] <sup>+</sup>
631	12	212	[F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O-MeOH] <sup>+</sup>
519	6	2x162	F <sub>2</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup> ([AH <sub>2</sub> +144] <sup>+</sup> )
501	3		[F <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
487	3		[F <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -MeOH] <sup>+</sup>
469	5	AH	[2x162+144+H] <sup>+</sup>
437	17		[2x162+144+H-MeOH] <sup>+</sup>
375	14	2x162+144	AH <sub>2</sub> <sup>+</sup>
357	10		[AH <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
339	8		[AH <sub>2</sub> -2xH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
325	4		[162+162+H] <sup>+</sup>
274	6		[144+162+H-MeOH] <sup>+</sup>
163	2		[162+H] <sup>+</sup>
145	5		[144+H] <sup>+</sup>

Abundancia relativa en %, pérdidas en u.

CGL de los alditoles acetilados (pág. 143) obtenidos a partir de **LVIII**: tr: 3.60 min. y 13.12 min., tr testigo del derivado de cimarosa: 3.60 min., tr testigo del derivado de glucosa: 13.12 min.

CGL de los aldononitrilos acetilados (pág. 144) obtenidos a partir de **LVIII**: tr: 6.82 min. y 16.98 min., tr testigo del derivado de cimarosa 6.82 min., tr testigo del derivado de glucosa: 16.99 min.

*Digitoxigenina 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-cimaropiranosido] (**LIX**):*

$[\alpha]_D = -3^\circ$  (MeOH, c= 0.20).

UV  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ ): 220 nm (5100).

RMN- $^1\text{H}$ : ver tabla 19 (pág. 198).

RMN- $^{13}\text{C}$ : ver tabla 21 (pág. 200).

FAB $^+$ /EM m/z (%): 850 ([M+Na+H] $^+$ , 100); 551 (30); 386 (18); 375 (11); 145 (36).

Derivado acetilado:

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.88 (sa, 1H, H-22); 3.46 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 2.15, 2.09, 2.07, 2.05, 2.02 y 2.00 (s,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 1.23 (da, J= 6 Hz, 6H, H-6 y H-6'''); 0.92 (s, 3H, H-19); 0.88 (s, 3H, H-18).

CGL de los alditoles acetilados (pág. 143) obtenidos a partir de **LIX**: tr: 3.04 y 9.02 min., tr testigo del derivado de ramnosa: 3.03 min., tr testigo del derivado de glucosa: 9.03 min.

*α-L-ramnopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-cimaropiranososa (LXII),*

obtenido a partir de **LIX**:

$[\alpha]_D = +16^\circ$  (H<sub>2</sub>O, c= 0.18).

**RMN-<sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O): 4.86 (sa, 1H, H-1''); 4.79 (da, J= 9 Hz, 1H, H-1); 4.55 (d, J= 8 Hz, 1H, H-1'); 3.37, 3.41, 3.44 y 3.52 (s, OCH<sub>3</sub>); 1.33 (da, J= 6 Hz, 6H, H-6 y H-6'').

**RMN-<sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O): 104.9 (C-1'); 101.4 (C-1''); 100.0 (C-1β); 96.6 (C-1α); 82.5 (C-4β); 81.6 (C-4α); 77.3 (C-3'); 76.7 (C-3); 75.6 (C-5'); 74.1 (C-2'); 73.0 (C-4''); 71.3 (C-3''); 71.1 (C-2''); 70.7 (C-4'); 70.2 (C-5β); 69.6 (C-5''); 67.9 (C-6'); 64.6 (C-5α); 57.3 (OCH<sub>3</sub>); 33.7 (C-2β); 32.0 (C-2α); 18.3 (C-6); 17.7 (C-6'').

**CGL** de los alditos acetilados obtenidos (pág. 143) a partir de **LXII**: tr: 3.01 y 8.99 min., tr testigo del derivado de ramnosa: 3.01 min., tr testigo del derivado de glucosa: 8.99 min.

*Digitoxigenina 3-O-[[β-D-glucopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosido] (LX):*

$[\alpha]_D = -25^\circ$  (MeOH, c= 0.15).

UV  $\lambda_{\text{máx}}$  (ε): 224 nm (3500).

**RMN-<sup>1</sup>H**: ver tabla 20 (pág. 199).

**RMN-<sup>13</sup>C**: ver tabla 21 (pág. 200).

**FAB<sup>+</sup>/EM (AR)**: [M+K]<sup>+</sup>= 1025.4675, corresponde a C<sub>49</sub>H<sub>78</sub>O<sub>20</sub>K.

Valor calculado: 1025.4734.

**CGL** de los alditos acetilados (pág. 148) obtenidos a partir de **LX**: tr: 3.61 y 13.13 min., tr testigo del derivado de cimarosa: 3.61 min., tr testigo del derivado de glucosa: 13.13 min.

EM/CAD/EM de [M+H]<sup>+</sup>:

Masa	Abund. Relat.	Pérdida	Identificación
969	11	18	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
955	100	32	[M+H-MeOH] <sup>+</sup>
909	10	78	[M+H-H <sub>2</sub> O-MeOH] <sup>+</sup>
895	11	92	[M+H-MeOH-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
843	3	144	
825	2	162	F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup>
811	3	176	
801	3	186	
793	3	194	[F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> -MeOH] <sup>+</sup>
663	1	324	F <sub>2</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup>
613	2	AH	[162+162+144+144+H] <sup>+</sup>
519	5		F <sub>3</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup> ([AH <sub>2</sub> +144] <sup>+</sup> )
501	2		[F <sub>3</sub> H <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
487	1		[F <sub>3</sub> H <sub>2</sub> -MeOH] <sup>+</sup>
469	1		[F <sub>3</sub> H <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O-MeOH] <sup>+</sup>
			[2x162+144+H] <sup>+</sup>
437	6		[2x162+144+H-MeOH] <sup>+</sup>
375	2	4 azúc.	AH <sub>2</sub> <sup>+</sup>
357	2		[AH <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
339	1		[AH <sub>2</sub> -2xH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
325	1		[162+162+H] <sup>+</sup>
275	2		[162+144-MeOH] <sup>+</sup>

Abundancia relativa en %; pérdidas en u.

*Digitoxigenina 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-diginopiranosil-(1-4)-β-D-cimaropiranosil-(1-4)- cimaropiranosido] (LXI):*

Pf= 164-165 °C.

[α]<sub>D</sub>= -5° (MeOH, c= 0.25).

UV λ<sub>máx</sub> (ε): 226 nm (2900).

RMN-<sup>1</sup>H: ver tabla 20 (pág. 199).

RMN-<sup>13</sup>C: ver tabla 21 (pág. 200).

FAB<sup>+</sup>/EM (AR): [M+K]<sup>+</sup>= 1169.5419, corresponde a C<sub>56</sub>H<sub>90</sub>O<sub>23</sub>K.

Valor calculado: 1169.5510.

EM/CAD/EM de [M+H]<sup>+</sup>:

Masa	Abund. Relat.	Pérdida	Identificación
1113	18	18	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
1099	100	32	[M+H-MeOH] <sup>+</sup>
1053	5	78	[M+H-H <sub>2</sub> O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
1039	11	92	[M+H-MeOH-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
1013	2	118	
987	7	144	
969	3	162	F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup>
955	6	176	
937	2	194	[F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> -MeOH] <sup>+</sup>
757	3	AH	[2x162+3x144+H] <sup>+</sup>
725	2		[2x162+3x144+H-MeOH] <sup>+</sup>
663	3		F <sub>3</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup> ([AH <sub>2</sub> +2x144] <sup>+</sup> )
613	3		[F <sub>3</sub> H <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O-MeOH] <sup>+</sup>
581	6		[2x162+2x144+H-MeOH] <sup>+</sup>
551	2		[AH <sub>2</sub> +144+MeOH] <sup>+</sup>
519	6		F <sub>4</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup>
469	2		[F <sub>4</sub> H <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O-MeOH] <sup>+</sup>
437	6		[2x162+144+H-MeOH] <sup>+</sup>
375	2	5 azúc.	AH <sub>2</sub> <sup>+</sup>
357	2		[AH <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
339	2		[AH <sub>2</sub> -2xH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
325	3		[162+162+H] <sup>+</sup>
275	3		[144+162+H-MeOH] <sup>+</sup>
145	3		[144+H] <sup>+</sup>

Abundancia relativa en %, pérdidas en u.

CGL de los alditoles acetilados (pág. 143) obtenidos a partir de **LXI**: tr: 3.49, 3.94 y 12.93 min., tr testigo del derivado de cimariosa: 3.49 min., tr testigo del derivado de diginosa: 3.94 min., tr testigo del derivado de glucosa: 12.93 min.

Compuestos **LXIII**, **LXIV** y **LXV**:

*sacarosa peracetilada (LXIII)*:

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 5.69 (d, J= 4 Hz, 1H); 5.42 (m, 3H); 5.08 (dd, J= 10, 1H); 4.88 (dd, J= 10 y 4 Hz, 1H); 4.26 (m, 8H); 2.17, 2.11, 2.10, 2.04 y 2.02 (CH<sub>3</sub>COO).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 171.1, 170.9, 170.5, 170.3, 170.2, 170.1 y 170.0 (CH<sub>3</sub>COO); 104.6 (C-7); 90.6 (C-1); 79.7; 76.4; 75.6; 70.9; 70.3; 69.1; 68.9; 64.3 (C-11); 63.5 (C-12); 62.4 (C-6).

*α y β-D-glucopiranosas peracetiladas (LXIV y LXV)*

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 170.1, 169.7, 169.6, 169.5, 169.2, 169.0, 168.8, 168.6, 168.5 y 168.3 (COCH<sub>3</sub>); 91.4 (C-1β); 88.7 (C-1α); 72.3 (C-3β, C-5β); 70.0 (C-2β); 69.6 (C-3α, C-5α); 68.9 (C-2α); 67.9 (C-4α); 67.6 (C-4β); 61.3 (C-6α,β); 20.3 y 20.2 (COCH<sub>3</sub>).



	LVI	LVII	LVIII	LIX
H-22	6.25 sa	6.33 sa	6.12 sa	6.13 sa
H-21 (2H) (ABX)		5.23 da J=18 5.41 da J=18	5.03 da J=18 5.31 da J=18	5.03 da J=18 5.31 da J=18
H-19 (3H)	0.88 s	0.87 s	0.87 s	0.87 s
H-18 (3H)	1.11 s	1.06 s	1.00 s	1.00 s
H-17		3.37 d J=10	2.77 m	2.77 m
H-16	5.68 m	5.67 ddd J=10,10, 2		
H-15	2.75 dda J=15,10	2.78 dda J=15,10		
CH <sub>3</sub> CO- H-1'	1.84 s	1.84 s 5.19 da J=8	5.19 da J=9	5.18 da J=8
H-3'		4.45 dd J=9, 2	4.45 m	4.46 m
H-4'		3.69 dd J=9, 2	3.67 dd J=9, 2	3.69 dd J=9, 2
H-6'	1.64 d J=6 (3H)	1.63 d J=6 (6H)	1.57 d J=6 (3H)	1.63 d J=6 (6H)
CH <sub>3</sub> O- Otras:	3.35 s 4.53 da J=11 H-6'''b 4.82 da J=11 H-6''b	3.65 s 4.61 da J=11 H-6''	3.62 s 4.53 da J=11 H-6'''b 4.92 da J=11 H-6''b	3.64 s 4.60 da J=11 H-6'' 4.82 da J=11 H-6''
	4.66 da J=9	4.89 d J=8 H-1''	4.83 d J=8 H-1''	4.88 d J=8 H-1''
	5.12 da J=8	5.50 sa H-1'''	5.09 d J=8 H-1'''	5.49 sa H-1'''
	5.19 da J=8			

Solvente: Py-d<sub>5</sub>, con previo intercambio de la muestra con D<sub>2</sub>O (δ en ppm, J en Hz).

Tabla 19. RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos LVI-LIX.

	LX	LXI
H-22	6.12 sa	6.12 sa
H-21 (2H)	5.02 da	5.02 da
(ABX)	J=18	J=18
	5.31 da	
	J=18	
H-19 (3H)	0.87 s	0.87 s
H-18 (3H)	0.99 s	0.99 s
H-17	2.77 m	2.78 m
H-1'	5.18 da	5.16 da
	J=8	J=8
H-6'	1.64 da	1.64 da
	J=6 (6H)	J=6 (9H)
CH <sub>3</sub> O-	3.59 s	3.59 s
		3.36 s
Otras:	4.53 da	4.52 da
	J=11	J=11
	H-6 <sup>iv</sup> b	H-6 <sup>v</sup> b
	4.82 da	4.80 da
	J=10	J=10
	H-1 <sup>iii</sup> ,	H-1 <sup>iv</sup> ,
	H-6 <sup>iii</sup> b	H-6 <sup>iv</sup>
	5.09 d	5.04 d
	J=8	J=8
	H-1 <sup>iv</sup>	H-1 <sup>v</sup>

Solvente: Py-d<sub>5</sub>, con previo intercambio de la muestra con D<sub>2</sub>O. (δ en ppm, J en Hz).

Tabla 20. RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos LX y LXI.

	LVI	LVII	LVIII	LIX	LX	LXI
C-1	30.4 <sup>a</sup>	30.6 <sup>a</sup>	30.6 <sup>a</sup>	30.6 <sup>a</sup>	30.6 <sup>a</sup>	30.6 <sup>a</sup>
C-2	26.9 <sup>b</sup>	26.8 <sup>b</sup>	26.7 <sup>b</sup>	26.9 <sup>b</sup>	26.6 <sup>b</sup>	26.9 <sup>b</sup>
C-3	73.8	73.9	73.8	73.9	73.9	73.9
C-4	30.1 <sup>a</sup>	30.5 <sup>a</sup>	30.4 <sup>a</sup>	30.7 <sup>a</sup>	30.4 <sup>a</sup>	30.8 <sup>a</sup>
C-5	37.1	37.3	37.2	37.3	37.2	37.3
C-6	27.0 <sup>b</sup>	27.1 <sup>b</sup>	27.1 <sup>b</sup>	27.3 <sup>b</sup>	27.2 <sup>b</sup>	27.2 <sup>b</sup>
C-7	21.4 <sup>c</sup>	21.4 <sup>c</sup>	21.6 <sup>c</sup>	21.7 <sup>c</sup>	21.6 <sup>c</sup>	21.4 <sup>c</sup>
C-8	41.9	42.0	41.9	42.0	42.0	42.0
C-9	36.1	36.1	36.1	36.2	36.1	36.1
C-10	35.6	35.6	35.6	35.7	35.6	35.7
C-11	21.5 <sup>c</sup>	21.6 <sup>c</sup>	21.8 <sup>c</sup>	21.8 <sup>c</sup>	21.6 <sup>c</sup>	22.0 <sup>c</sup>
C-12	40.9	40.7	40.2	40.4	40.2	40.3
C-13	50.7	50.7	50.3	50.4	50.3	50.4
C-14	84.1	84.2	85.6	85.7	85.6	85.7
C-15	39.6	39.4	32.7	32.8	32.7	32.6 <sup>d</sup>
C-16	75.1	75.2	27.3 <sup>b</sup>	27.5 <sup>b</sup>	27.3 <sup>b</sup>	27.3 <sup>b</sup>
C-17	56.8	56.7	51.4	51.5	51.4	51.5
C-18	16.1	15.8	15.7	15.9	15.7	15.8
C-19	23.8	23.6	23.5	23.8	23.5	23.7
C-20	171.4 <sup>d</sup>	171.4 <sup>d</sup>	177.4 <sup>d</sup>	177.6 <sup>d</sup>	177.4 <sup>d</sup>	177.6 <sup>e</sup>
C-21	77.0	76.8	74.5	74.7	74.5	74.5
C-22	121.1	120.9	116.9	117.1	116.9	117.0
C-23	175.8 <sup>d</sup>	175.9 <sup>d</sup>	176.3 <sup>d</sup>	176.5 <sup>d</sup>	176.3 <sup>d</sup>	176.3 <sup>e</sup>
<u>C</u> H <sub>3</sub> CO	20.8	20.3				
CH <sub>3</sub> <u>C</u> O	170.5	170.7				

Tabla 21. RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos LVI-LXI.

	LVI	LVII	LVIII	LIX	LX	LXI
cim						
C-1		96.5	96.4	96.5	96.4	96.5
C-2		36.1	36.1	36.2	36.1	36.2
C-3		78.1	78.0	78.1	77.8	77.9
C-4		83.5	83.1	83.4	83.1	83.0
C-5		69.1	69.4	69.2	69.1	69.2
C-6		18.0	17.9	18.1	17.8	17.9
<u>CH</u> <sub>3</sub> O		58.1	55.9	58.1	57.7	57.5
cim'						
C-1					100.4	100.4
C-2					36.1	36.3
C-3					77.8	77.6
C-4					83.1	83.2
C-5					69.1	69.5
C-6					18.0	18.1
<u>CH</u> <sub>3</sub> O					57.8	57.9
dgn						
C-1	98.6					102.6
C-2	33.0					32.8
C-3	80.0					79.8
C-4	75.0					75.2
C-5	70.7 <sup>e</sup>					71.0
<u>CH</u> <sub>3</sub> O	56.3					56.1

Tabla 21 (cont.)

	LVI	LVII	LVIII	LIX	LX	LXI
glc						
C-1	104.0	105.5	105.3	105.5	105.4	103.9
C-2	74.2	74.5	74.4	74.5	74.4	74.4
C-3	77.0	77.2	77.2	77.2	77.2	77.3
C-4	70.7	71.1	71.0	71.1	71.0	71.0
C-5	76.2	76.0	76.1	76.0	76.1	76.6
C-6	70.9	67.8	70.9	67.8	70.9	71.0
ram						
C-1		101.5		101.5		
C-2		71.5		71.5		
C-3		71.7		71.8		
C-4		73.2		73.2		
C-5		69.4		69.4		
C-6		17.5		17.5		
glc'						
C-1	103.4		104.3		104.3	104.3
C-2	74.2		74.0		75.1	74.1
C-3	77.0		77.2		77.2	77.3
C-4	70.9		71.0		71.0	71.0
C-5	77.0		77.2		77.2	77.3
C-6	62.0		62.1		62.1	62.1

Solvente: CD<sub>3</sub>OD, TMS como estándar interno (δ en ppm).

a-e: señales que pueden intercambiarse.

Tabla 21 (cont.)

***Resumen***

---

La *Mandevilla pentlandiana* es un sufrútice trepador perteneciente a la familia Apocynaceae, que se encuentra distribuída en el norte y centro de nuestro país, principalmente en zonas serranas.

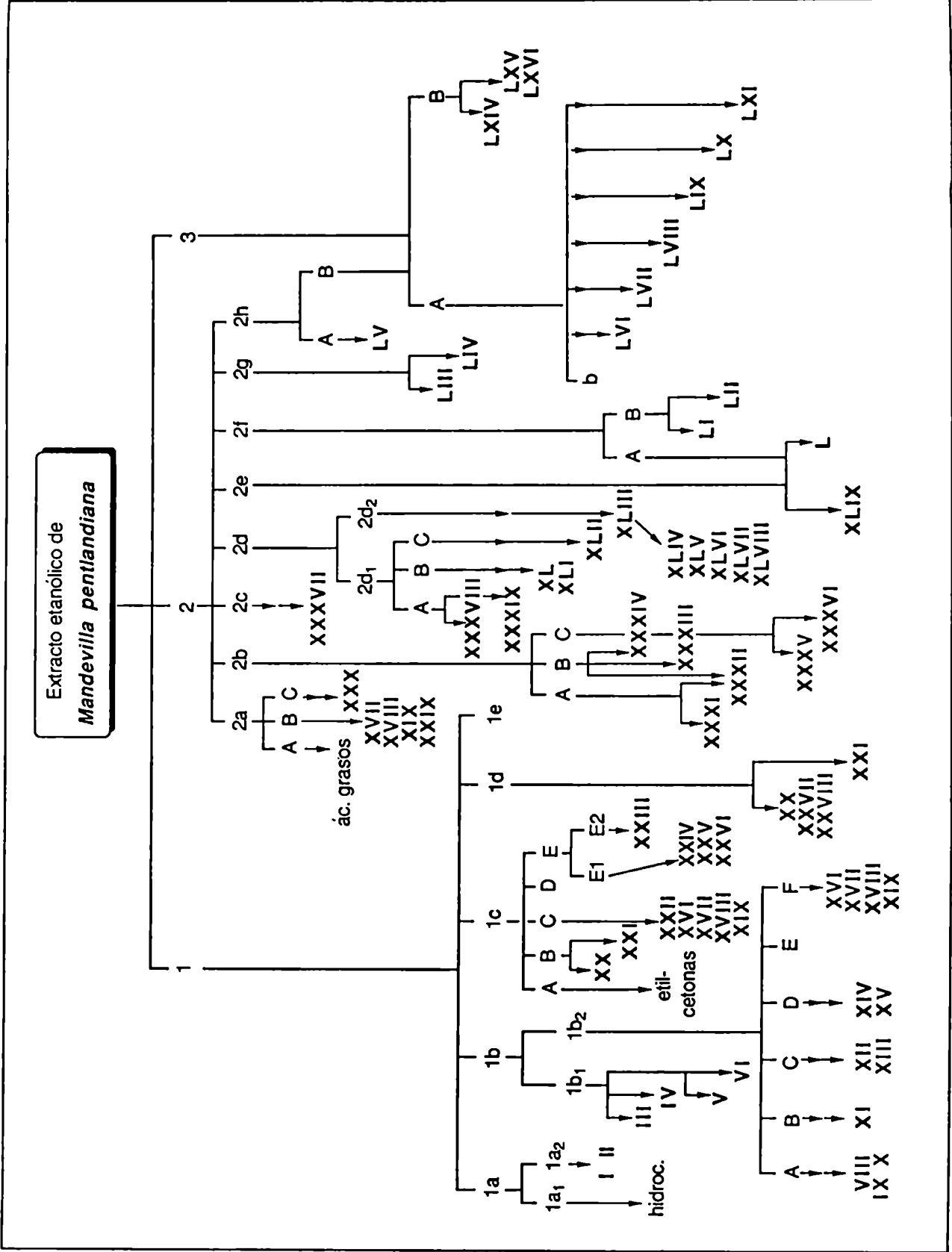
El objetivo de este Trabajo de Tesis fue el aislamiento y elucidación estructural de los cardenólidos presentes en el extracto etanólico de raíz de *Mandevilla pentlandiana*. Se aislaron y caracterizaron también otros metabolitos presentes en el mismo extracto, tales como hidrocarburos, triterpenoides (libres y esterificados), esteroides (libres, glucosidados y esterificados con ácidos grasos), peróxidos de esteroides, lignanos, un sesquiterpeno y un pregnano glicosidado.

El esquema de fraccionamiento del extracto se indica en la página 204.

El aislamiento de los compuestos fue efectuado mediante diversas técnicas cromatográficas tales como cromatografía en columna, cromatografía en columna seca, cromatografía en capa preparativa y cromatografía líquida de alta resolución.

La elucidación de la estructura de los mismos se realizó por métodos espectroscópicos tales como RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM. En RMN se utilizaron secuencias especiales de pulsos y métodos de correlación H-C (COSY, HMQC, HMBC). En el caso de espectrometría de masa se utilizaron técnicas de ionización por impacto electrónico (IE) y por bombardeo por átomos rápidos (FAB). La utilización de instrumental multisección permitió efectuar espectrometría de masa de alta resolución y la disociación por activación colisional permitió estudiar secuencias genéticas de iones seleccionados de muestras tal cual, cationizadas y desprotonadas.

En el caso de glicósidos, la determinación de la estructura de la aglicona y de los hidratos de carbono se realizó por métodos espectroscópicos sobre los productos de la hidrólisis y sobre el glicósido sin hidrolizar.



Esquema de fraccionamiento del extracto etanólico de raíz de *Mandevilla pentlandiana*.



Para determinar la estructura de los monosacáridos componentes se hidrolizaron los glicósidos y se derivatizaron convenientemente los productos de la hidrólisis. Dichos derivados se analizaron por CGL. Finalmente se determinó la secuencia en que los monosacáridos se hallaban unidos entre sí por medio de espectrometría de masa tandem empleando disociación por activación colisional.

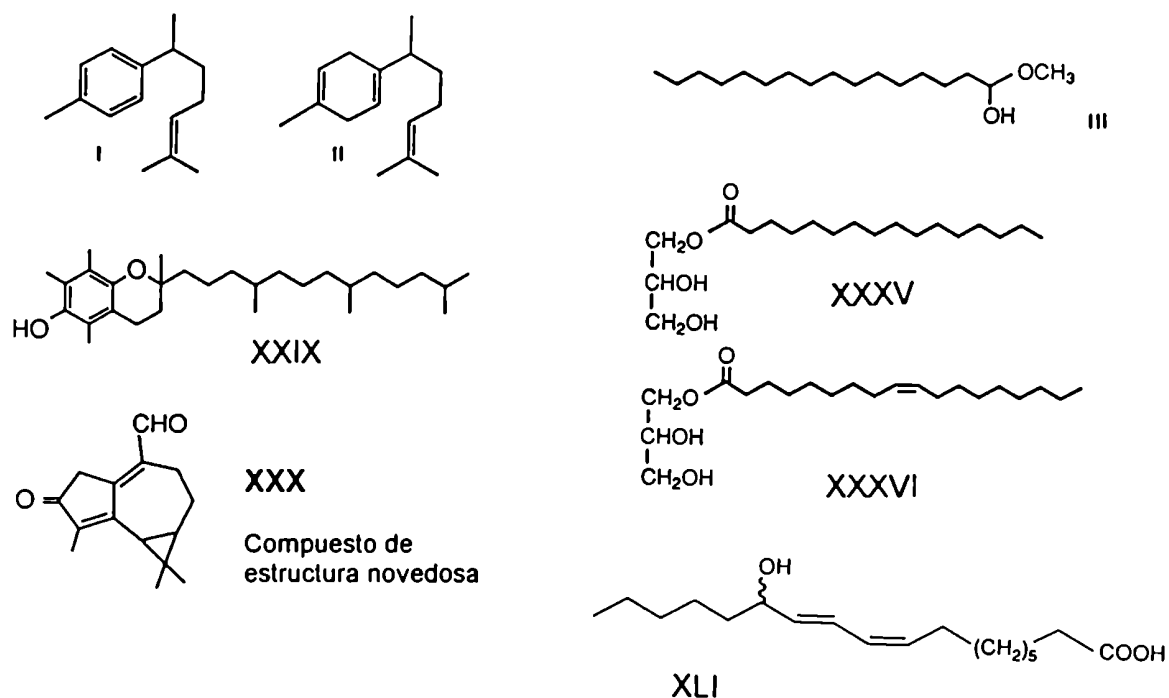
Se realizaron bioensayos para determinar la citotoxicidad de los cardenólidos aislados.

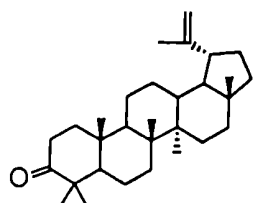
Los compuestos aislados en este Trabajo de Tesis son los siguientes:

Hidrocarburos lineales de 14, 16 a 31 y 34 átomos de carbono.

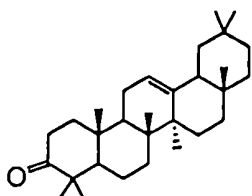
Etil cetonas lineales de 13 y 15 a 19 átomos de carbono.

Acidos grasos: C 16:0, C 17:0, C 15:3, C 18:0, C 18:1 y C 18:2.

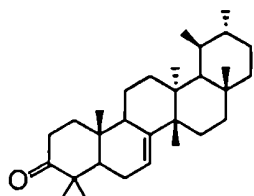




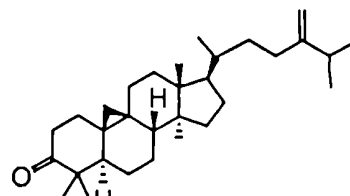
IV



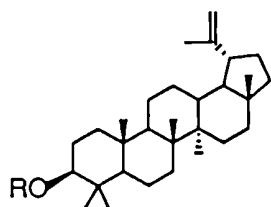
V



VI

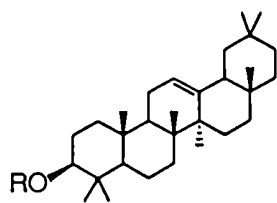


VII



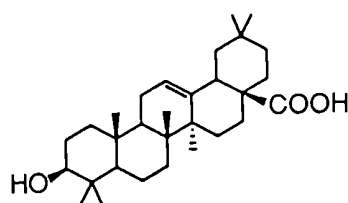
R=H (XXI)

R= acido graso

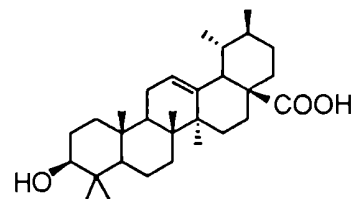


R=H (XX)

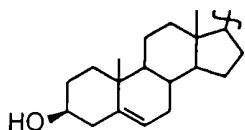
R= acido graso



XXXI

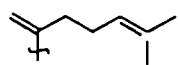


XXXII

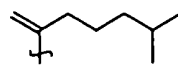


VIII-XIII

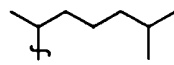
Compuestos de estructura novedosa



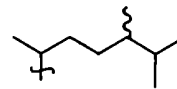
VIII



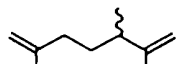
XI



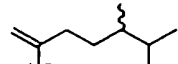
XVI



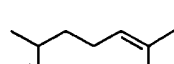
XVII



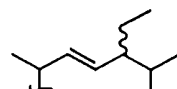
IX



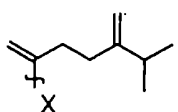
XII



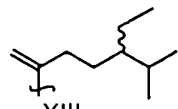
XIV



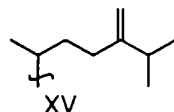
XVIII



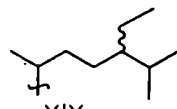
X



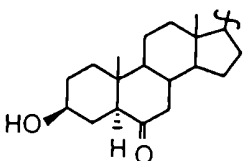
XIII



XV

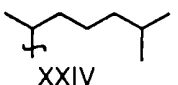


XIX

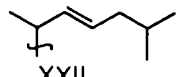


XXIII-XXVI

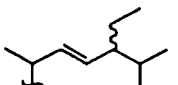
Compuestos de estructura novedosa



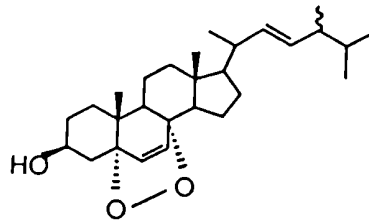
XXIV



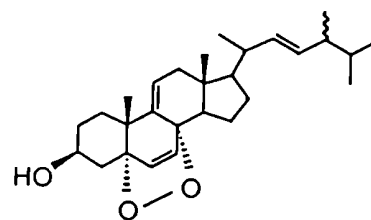
XXII



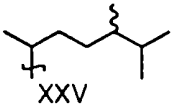
XXVI



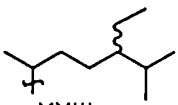
XXXIII



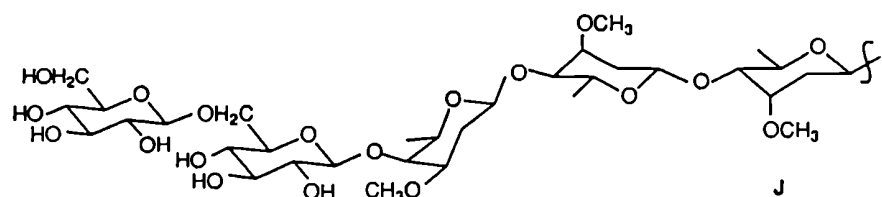
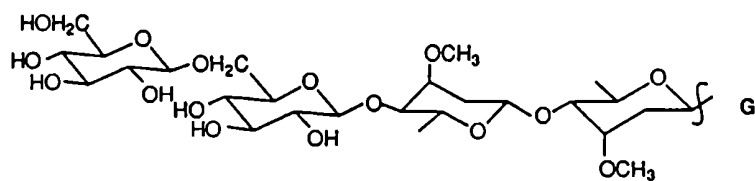
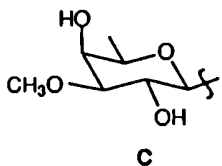
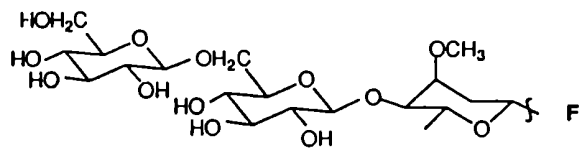
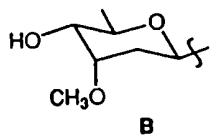
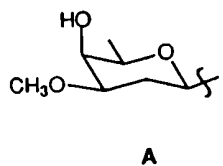
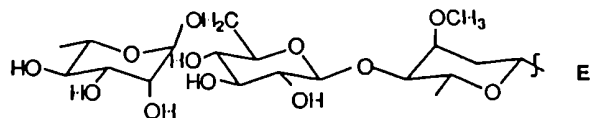
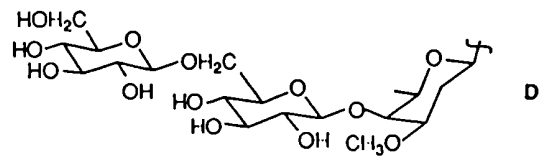
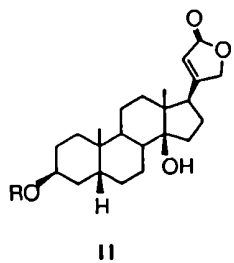
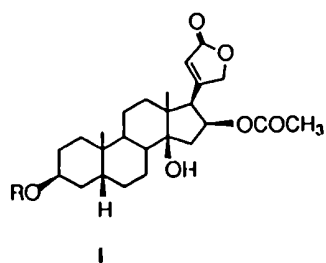
XXXIV



XXV



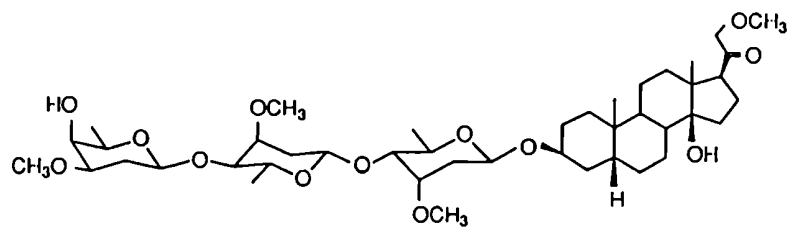
XXIII



Compuesto	aglicona	R
XXXVIII	I	H
XXXIX	II	H
XL	II	A
XLIX	I	B
L	II	B
LIII	I	C
LIV	II	C
LVI	I	D
LVII	I	E
LVIII	II	F
LIX	II	E
LX	II	G
LXI	II	J

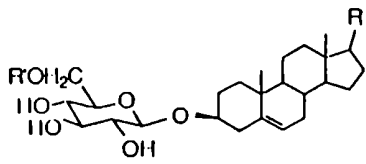
**LVII, LIX-LXI**

Compuestos de estructura novedosa



**XLIII**

Compuesto de estructura novedosa

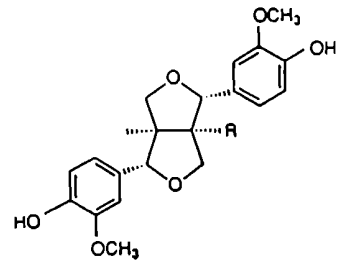
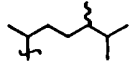
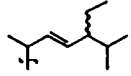
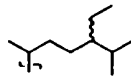


R' =
C 16:0
C 18:0
C 18:1
C 18:2

XXXVII

R' = H LV

R =



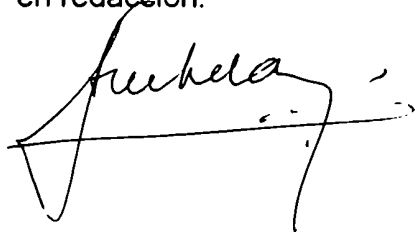
R = H LI

R = OH LII

*Saffol*

El presente trabajo dió origen a las siguientes publicaciones:

- \* "Steroidal derivatives from the roots of *Mandevilla pentlandiana*".  
Gabriela Cabrera; Jorge A. Palermo; Alicia M. Seldes; Eduardo G. Gros  
and Juan C. Oberti.  
*Phytochem.* **30**, 1239 (1991).
- \* "Phytochemical study of the roots of *Mandevilla pentlandiana*.  
Sterol peroxides and lignanes".  
G. Cabrera; J. C. Oberti; A. M. Seldes and E. G. Gros.  
*Anales Asoc. Quím. Argentina* **79**, 73 (1991).
- \* "A new pregnane glycoside from the roots of *Mandevilla pentlandiana*".  
Gabriela Cabrera; Alicia M. Seldes; Eduardo G. Gros and J. C. Oberti.  
*Phytochemistry*, en prensa.
- \* "Cardenolide Glycosides from the roots of *Mandevilla pentlandiana*".  
Gabriela M. Cabrera; Mónica E. Deluca; Alicia M. Seldes; Eduardo G.  
Gros ;Juan C. Oberti; Janeen Crockett and Michael L. Gross.  
*Phytochemistry*, en prensa.
- \* "A New Sesquiterpenoid from the roots of *Mandevilla pentlandiana*".  
Gabriela M. Cabrera; Alicia M. Seldes; Eduardo G. Gros and  
J. C. Oberti.  
en redacción.
- \* "Identification and structural elucidation of cardenolide glycosides by  
FAB/MS/CAD/MS".  
Gabriela M. Cabrera; Mónica E. Deluca; Alicia M. Seldes; Eduardo G.  
Gros ;Juan C. Oberti; Janeen Crockett and Michael L. Gross.  
en redacción.



## ***Bibliografía***

---

- [1] C. Ezcurra. *Darwiniana* **23**, 367 (1981).
- [2] "The Alkaloids. Chemistry and Physiology", (ed. R. H. F. Manske), Academic Press, VIII, cap. 13 (1965).
- [3] T. Yamauchi. *Yakugaku Zasshi* **105**, 695 (1985).
- [4] "Alkaloids. Chemical and Biological Perspectives", (ed: S. W. Pelletier), J. Wiley & sons, I (1982).
- [5] D. J. Robins. *Natural Product Reports* **6**, 577 (1989).
- [6] F. Abe y T. Yamauchi. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4661 (1987).
- [7] "The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology", (ed: A. Brossi), Academic Press, **32** (1988).
- [8] F. Abe y T. Yamauchi. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 4340 (1986).
- [9] "Chemistry of Lignans", (ed: C. B. S. Rao), Andhra University Press (1978).
- [10] F. Abe y T. Yamauchi. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1748 (1987).
- [11] F. Abe y T. Yamauchi. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1833 (1987).
- [12] Meyer. *Fl. Illustr. Tucumán* **1**, 137 (1977).
- [13] H. Flasch y W. Diembeck en "Cardiac Glycosides. Part I. Experimental Pharmacology", (ed: K. Greeff), Springer-Verlag, cap. 3 (1981).
- [14] P. Brown, F. Brüscheiler, G. R. Petit y T. Reichstein. *Org. Mass Spectrom.* **5**, 573 (1971).
- [15] T. Reichstein y E. Weiss. *Adv. Carbohydr. Chem.* **17**, 65 (1962).
- [16] T. Reichstein. *Naturwissenschaften* **54**, 53 (1967).
- [17] R. Chen, F. Abe, T. Yamauchi y M. Taki. *Phytochem.* **26**, 2351 (1987).
- [18] F. Abe y T. Yamauchi. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 1183 (1982).
- [19] F. Abe y T. Yamauchi. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 847 (1985).
- [20] H. T. A. Cheung y T. R. Watson. *J. Chem. Soc. Perkin I.* 2162 (1980).

- [21] F. Abe, Y. Móri, T. Yamauchi y Y. Saiki. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3811 (1988).
- [22] R. B. Arora y S. Rangaswami. "*Peruvoside and other cardiotonic glycosides of Thevetia Neriifolia Juss*", Thomson Press (1972).
- [23] I. F. Makarevich. *Khim. Prir. Soed.* **5**, 508 (1969).
- [24] F. Abe y T. Yamauchi. *Chem. Pharm. Bull.* **27**, 1604 (1979).
- [25] T. Yamauchi, F. Abe y A. S. C. Wan. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 2744 (1987).
- [26] T. Yamauchi, F. Abe y A. S. C. Wan. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4813 (1987).
- [27] T. Yamauchi, F. Abe y M. Takahashi. *Tetrahedron. Lett.* 1115 (1976).
- [28] T. Yamauchi, F. Abe y T. Santisuk. *Phytochem.* **29**, 1961 (1990).
- [29] T. Yamauchi y F. Abe. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 669 (1990).
- [30] H. Lüllmann y T. Peters. *Progr. Pharmacol.* **2**, 5 (1979).
- [31] "*Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*", John Wiley and Sons, vol. 4, pág. 510 (1964).
- [32] J. M. Robinski, G. L. Tewalt y A. T. Sneden. *J. Nat. Prod.* **50**, 211 (1987).
- [33] M. Fiebig, C. Duh, J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn y N. R. Farnsworth. *J. Nat. Prod.* **48**, 981 (1985).
- [34] T. W. Güntert y H. H. A. Linde en "*Cardiac Glycosides. Part I. Experimental Pharmacology*", (ed: K. Greeff), Springer-Verlag, cap. 2 (1981).
- [35] K. K. Chen. *J. Med. Chem.* **13**, 1029 (1970).
- [36] N. Ishikawa, H. Tsuru, T. Shigei, T. Anjyo y M. Okada. *Experientia.* **30**, 1308 (1974).
- [37] F. J. Zeelen. "*Medicinal Chemistry of Steroids*", (ed: H. Timmerman), Elsevier, cap. 17 (1990).
- [38] R. Tschesche. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **180**, 187 (1972).
- [39] M. E. Deluca, A. M. Seldes y E. G. Gros. *Phytochem.* **28**, 109 (1989).



- [40] M. S. Maier, A. M. Seldes y E. G. Gros. *Phytochem.* **25**, 1327 (1986).
- [41] M. Maier. Tesis Doctoral (1985).
- [42] M. E. Deluca. Tesis Doctoral (1986).
- [43] A. S. Shashkov, G. M. Lipkind, Y. A. Knirel y N. K. Kochetkov. *Magn. Reson. Chem.* **26**, 735 (1988).
- [44] K. Tori, S. Seo, Y. Yoshimura, H. Arita y Y. Tomita. *Tetrahedron Letters* **179** (1977).
- [45] T. Usui, N. Yamaoka, K. Matsuda, T. Tuzimura, H. Sugiyama y S. Seto. *J. Chem. Soc. Perkin I.* 2425 (1973).
- [46] F. Abe y T. Yamauchi. *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 3023 (1978).
- [47] S. Chen y J. K. Snyder. *J. Org. Chem.* **54**, 3679 (1989).
- [48] M. A. Posthumus, P. G. Kistemaker, H. L. C. Meuzelaar y M. C. Ten Noever de Brauw. *Anal. Chem.* **50**, 985 (1978).
- [49] H. -R. Schulten, T. Komori, T. Nohara, R. Higuchi y T. Kawasaki. *Tetrahedron* **34**, 1003 (1978).
- [50] H. -R. Schulten y D. E. Games. *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 120 (1974).
- [51] A. Neszmelyi, K. Tori y G. Lukacs. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 613 (1977).
- [52] P. Brown, F. Bruschiweiler y G. R. Pettit. *Helv. Chim. Acta.* **55**, 531 (1972).
- [53] B. Blessington e I. M. Morton. *Org. Mass Spectrom.* **3**, 95 (1970).
- [54] F. C. Falkner, J. Frölich y J. T. Watson. *Org. Mass Spectrom.* **7**, 141 (1973).
- [55] A. P. Bruins. *Anal. Chem.* **52**, 605 (1980).
- [56] A. P. Bruins. *Adv. Mass Spectrom.* **8A**, 246 (1979).
- [57] J. Vine, L. Brown, J. Boutagy, R. Thomas y D. Nelson. *Biomed. Mass Spectrom.* **6**, 415 (1979).

- [58] P. Brown, F. Brusweiler y G. R. Pettit. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4470 (1970).
- [59] R. E. II Shomo, A. Chandrasekaran, A. G. Marshall, R. H. Reuning y L. W. Robertson. *Biomed. and Environ. Mass Spectrom.* **15**, 295 (1988).
- [60] A. P. Bruins. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **48**, 185 (1983).
- [61] G. Allmaier y E. R. Schmid. *Mikrochimica Acta.* **III**, 179 (1985).
- [62] F. W. Crow, K. B. Tomer, J. H. Looker y M. L. Gross. *Anal. Biochem.* **155**, 286 (1986).
- [63] R. Isobe, T. Komori, F. Abe y T. Yamauchi. *Biomed. and Environ. Mass Spectrom.* **13**, 585 (1986).
- [64] W. Robien, B. Kopp, D. Schabl y H. Schwarz. *Progress in NMR Spectroscopy* **19**, 131 (1987).
- [65] N. K. Kochetkov, O. S. Chizhov y A. S. Shashkov. *Carbohyd. Res.* **133**, 173 (1984).
- [66] K. Bock, A. Brignole y B. W. Sigurskjold. *J. Chem. Soc. Perkin II* . 1711 (1986).
- [67] S. Seo, Y. Tomita, K. Tori y Y. Yoshimura. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3331 (1978).
- [68] L. Harwood. *Aldrichimica Acta.* **18**, 25 (1985).
- [69] "Archives of Mass Spectral Data", (ed: E. Stenhagen, S. Abrahamsson y F. W. McLafferty) **1**, 497 (1970).
- [70] H. Budzikiewics, C. Djerassi y D. H. Williams. "Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds", Holden-Day (1964).
- [71] H. Budzikiewicz, J. M. Wilson y C. Djerassi. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3688 (1963).

- [72] W. J. Chin, R. E. Corbett, C. K. Heng y A. L. Wilkins. *J. Chem. Soc. Perkin I* 1437 (1973).
- [73] J.-M. Lehn y G. Ourisson. *Bull. Soc. Chim. France*. 1137 (1962).
- [74] L. Ogunkoya. *Phytochem.* **20**, 121 (1981).
- [75] C. Djerassi, H. Budzikiewicz y J. M. Wilson. *Tetrahedron Letters* 263 (1962)
- [76] B. Tursch, R. Savoie, R. Ottinger y G. Chiurdoglu. *Tetrahedron Letters* 539 (1966).
- [77] R. T. Aplin y G. M. Hornby. *J. Chem. Soc. (B)* 1078 (1966).
- [78] H. E. Audier, R. Beugelmans y B. C. Das. *Tetrahedron Letters* 4341 (1966).
- [79] Y. M. Sheikh y C. Djerassi. *J. Org. Chem.* **38**, 3545 (1973).
- [80] I. Rubinstein y L. J. Goad. *Phytochem.* **13**, 481 (1974).
- [81] M. Romero. Tesis doctoral (1986).
- [82] K. Iguchi, S. Saitoh y Y. Yamada. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2553 (1989).
- [83] T. Akihisa, S. Thakur, F. Rosenstein y T. Matsumoto. *Lipids* **21**, 39 (1986).
- [84] C. Djerassi. *Pure & Appl. Chem.* **50**, 171 (1978).
- [85] I. J. Massey y C. Djerassi. *J. Org. Chem.* **44**, 2448 (1979).
- [86] G. Cabrera, J. A. Palermo, A. M. Seldes, E. G. Gros y J. C. Oberti. *Phytochem.* **30**, 1239 (1991).
- [87] M. A. A. El-Hafiz. *Phytochem.* **29**, 3936 (1990).
- [88] A. S. Gupta y S. A. Patwardhan en "*Handbook of Terpenoids*", (ed: S. Dev), CRC Press, **Vol II** (1989).
- [89] C. Djerassi, R. Shapiro y M. Vanderwalle. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4892 (1965).
- [90] Z. Zaretskii. "*Mass Spectrometry of Steroids*", (John Wiley, New York) Israel University Press, Jerusalem (1976).

- [91] A. P. Guevara, C. Y. Lim-Sylianco, F. M. Dayrit y P. Finch. *Phytochem.* **28**, 1721 (1989).
- [92] F. Wherli y T. Nishida. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **36**, 1 (1979).
- [93] J. W. Blunt y J. Stothers. *Org. Magn. Reson.* **9**, 439 (1977).
- [94] S. Itô, M. Kodama, M. Sunagawa, T. Oba y H. Hikino. *Tetrahedron Letters* 2905 (1969).
- [95] S. Seo, Y. Tomita y K. Tori. *Tetrahedron Letters* 7 (1975).
- [96] M. Sholichin, K. Yamasaki, R. Kasai y O. Tanaka. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1006 (1980).
- [97] K. Yamaguchi. "Spectral Data of Natural Products", Elsevier, **Vol. 1** (1979).
- [98] T.J. Walton, C.J. Mullins, R.P. Newton, A.G. Brenton y J.H. Beynon. *Biomed. and Environ. Mass Spect.* **16**, 289 (1988)
- [99] D. G. I. Kingston. *Tetrahedron* **27**, 2691 (1971).
- [100] B. M. Fraga. *Natural Product Reports* **7**, 515 (1990).
- [101] B. M. Fraga. *Natural Product Reports* **9**, 217 (1992).
- [102] M. Miski, D. H. de Luengo y T. J. Mabry. *Phytochem.* **26**, 199 (1987).
- [103] M. F. Summers, L. G. Marzilli y A. Bax. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 4285 (1986).
- [104] A. Bax y M. F. Summers. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093 (1986).
- [105] M. A. Khan y A. Rahman. *Phytochem.* **14**, 789 (1975).
- [106] Y. M. Sheikh y C. Djerassi. *Tetrahedron* **30**, 4095 (1974).
- [107] M. Guyot y M. Durgeat. *Tetrahedron Letters* **22**, 1391 (1981).
- [108] R. J. Stonard, J. C. Petrovich y R. J. Andersen. *Steroids* **36**, 81 (1980).
- [109] K. Kahlos, L. Kangas y R. Hiltunen. *Planta Medica* **55**, 389 (1989)
- [110] Y. Takaishi, M. Uda, T. Ohashi, K. Nakano, K. Murakami y T. Tomimatsu. *Phytochem.* **30**, 4117 (1991).

- [111] G. Pei-Wu, Y. Fukuyama, W. Rei, B. Jinxian y K. Nakagawa. *Phytochem.* **27**, 1895 (1988).
- [112] M. Della Greca, P. Monaco y L. Previtera. *J. Nat. Prod.* **53**, 1430 (1990).
- [113] E. Breitmaier, G. Haas y W. Voelter. "*Atlas of Carbon-13 NMR Data*", Heyden & Son (1979).
- [114] M. Della Greca, A. Molinaro, P. Monaco y L. Previtera. *Phytochem.* **30**, 2422 (1991).
- [115] M. Hartmann y E. Schlitter. *Helv. Chim. Acta* **23**, 548 (1940).
- [116] T. Reichstein. *Helv. Chim. Acta* **42**, 977 (1959).
- [117] W.H. Tallent, J. Harris, I.A. Wolff y R.E. Lundin. *Tetrahedron Letters* 4329 (1966)
- [118] L.F. Johnson y W.C. Jankowski. "*Carbon-13NMR Spectra*", John Wiley & sons (1972).
- [119] J.J. Hoffmann y J.R. Cole. *J. Pharm. Sci.* **66**, 1336 (1977).
- [120] "*The Aldrich Library of NMR Spectra*", (ed: C. J. Pouchert y J. R. Campbell), Vol II.
- [121] H. Allgeier. *Helv. Chim. Acta* **51**, 668 (1968).
- [122] T. Nakagawa, K. Hayashi y H. Mitsuhashi. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2244 (1983).
- [123] S. Tsukamoto, K. Hayashi y H. Mitsuhashi. *Tetrahedron* **41**, 927 (1985).
- [124] S. Tsukamoto, K. Hayashi, H. Mitsuhashi, F. O. Snyckers y T. G. Fourie. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 4807 (1985).
- [125] S. Tsukamoto, K. Hayashi, K. Kaneko, H. Mitsuhashi, F. O. Snyckers y T. G. Fourie. *J. Chem. Soc. Perkin I.* 2625 (1988).
- [126] Z. Zhang, J. Zhou, K. Hayashi y K. Kaneko. *Phytochem.* **27**, 2935 (1988).
- [127] W. R. Roush y R. J. Brown. *J. Org. Chem.* **48**, 5093 (1983).

- [128] C. Monneret, C. Conreur y Q. Khuong-Huu. *Carbohydr. Res.* **65**, 35 (1978).
- [129] S. Yasuda y T. Matsumoto. *Tetrahedron* **29**, 4087 (1973).
- [130] J. S. Brimacombe, Z. Al-Hasan y A. S. Mengech. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1800 (1980).
- [131] B. M. Arshava, Y. E. Raifel'd, S. M. Makin. *J. Org. Chem. USSR* 666 (1990). (*Zh. Org. Khim.* 788 (1990))
- [132] K. Ohno, H. Nishiyama y H. Nagase. *Tetrahedron Letters* 4405 (1979).
- [133] H. Tatematsu, M. Kurokawa, M. Niwa y Y. Hirata. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1612 (1984).
- [134] Z. Lin-gen, O. Seligmann, K. Jurcic y H. Wagner. *Planta Medica* **45**, 172 (1982).
- [135] P. K. Agraval y R. S. Thakur. *Magn. Reson. Chem.* **23**, 389 (1985).
- [136] H. Tsukamoto, S. Hisada y S. Nishibe. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 2730 (1984).
- [137] H. Jäger, O. Schindler y T. Reichstein. *Helv. Chim. Acta* **42**, 977 (1959).
- [138] A. M. Iribarren. Tesis Doctoral (1984).
- [139] T. Nakagawa, K. Hayashi, K. Wada y H. Mitsunashi. *Tetrahedron Letters* **23**, 5431 (1982).
- [140] C. Laffite, A. M. N. Phuoc Du, F. Winternitz, R. Wylde y F. Pratviel-Sosa. *Carbohydr. Res.* **67**, 91 (1978).
- [141] C. Laffite, A. M. N. Phuoc Du, F. Winternitz, R. Wylde y F. Pratviel-Sosa. *Carbohydr. Res.* **67**, 105 (1978).
- [142] J. B. Harborne y B. L. Turner. "*Plant Chemosystematics*", Academic Press, (1984).

- [143] G. Eglinton y R. J. Hamilton en "*Chemical Plant Taxonomy*", (ed: T. Swain), Academic Press (1963).
- [144] R. W. Scora, B. O. Bergh y J. A. Hopfinger. *Biochem. Syst. Ecol.* **3**, 215 (1975).
- [145] "*Food Flavours. Part A. Introduction*", (ed: I. D. Morton y A. J. Macleod), Elsevier (1982).
- [146] R. Darnley Gibbs. "*Chemotaxonomy of flowering plants*", Mc Gill-Queen's University Press, Vol. I, (1974).
- [147] C. Hitchcock y B. W. Nichols. "*Plant Lipid Biochemistry*", Academic Press (1971).
- [148] F. B. Shorland en "*Chemical Plant Taxonomy*", (ed: T. Swain), Academic Press (1963).
- [149] L. J. Goad, J. Zimowski, R. P. Evershed y V. L. Male en "*The Metabolism, Structure and Function of Plant Lipids*", (ed: P. K. Stumpf, J. B. Mudd y W. D. Nes), Plenum Press (1986).
- [150] "*The Terpenes*", (ed: J. Simonsen y W. C. J. Ross), Cambridge University Press, Vol. IV (1957).
- [151] R. Darnley Gibbs. "*Chemotaxonomy of flowering plants*", Mc Gill-Queen's University Press, Vol. II (1974).
- [152] L. J. Goad en "*Terpenoids in plants*", (ed: J. B. Pridham), Academic Press, Cap. 10 (1967).
- [153] C. Grundwald. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**, 209 (1975).
- [154] P. Benveniste. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**, 275 (1986).
- [155] C. Djerassi. *Pure & Appl. Chem.* **53**, 873 (1981).

- [156] C. Djerassi, N. Theobald, W. C. M. C. Kokke, C. S. Pak y R. M. K. Carlson. *Pure & Appl. Chem.* **51**, 1815 (1979).
- [157] T. Akihisa, T. Tamura, T. Matsumoto, W. C. M. C. Kokke y T. Yokota. *J. Org. Chem.* **54**, 606 (1989).
- [158] T. Akihisa, T. Yokota, N. Takahashi, T. Tamura y T. Matsumoto. *Phytochem.* **28**, 1219 (1989).
- [159] T. Akihisa, M. Kanari, T. Tamura y T. Matsumoto. *Phytochem.* **28**, 1271 (1989).
- [160] E. Steiner, C. Djerassi, E. Fattorusso, S. Magno, L. Mayol, C. Santacroce y D. Sica. *Helv. Chim. Acta* **60**, 475 (1977).
- [161] S. K. Kim, T. Akihisa, T. Tamura, T. Matsumoto, T. Yokota y N. Takahashi. *Phytochem.* **27**, 629 (1988).
- [162] Y. M. Sheikh, B. M. Tursch y C. Djerassi. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 3278 (1972).
- [163] Y. M. Sheikh, B. M. Tursch y C. Djerassi. *Tet. Lett.* 3721 (1972).
- [164] T. Yokota y N. Takahashi en "*Plant Growth Substances 1985*", (ed: M. Bopp), Springer-Verlag (1986).
- [165] N. B. Mandava en "*Plant Growth Substances*", (ed: N. B. Mandava), ACS (1979).
- [166] "*Chemistry of Plant Hormones*", (ed: N. Takahashi), CRC Press (1986).
- [167] W.R. Nes en "*The Metabolism, Structure and Function of Plant Lipids*", (ed: P. K. Stumpf, J. B. Mudd y W. D. Nes), Plenum Press (1986).
- [168] D. A. Casteel. *Natural Product Reports* **9**, 289 (1992).
- [169] A. A. L. Gunatilaka, Y. Gopichand, F. Schmitz y C. Djerassi. *J. Org. Chem.* **46**, 3860 (1981).
- [170] G. Bauslaugh, G. Just y F. Blank. *Nature* **202**, 1218 (1964).



- [171] M. Endo, M. Kajiwara y K. Nakanishi. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 309 (1970).
- [172] M. L. Bates, W. W. Reid J. D. White. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 44, (1976).
- [173] W. Bergmann y N. B. Meyers. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **620**, 46 (1959).
- [174] F. Abe y T. Yamauchi. *Phytochem.* **27**, 575 (1988).
- [175] F. Abe, T. Yamauchi y A. S. C. Wan. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 795 (1988).
- [176] F. Abe y T. Yamauchi. *Phytochem.* **28**, 1737 (1989).
- [177] T. Nikaido, T. Ohmoto, T. Kinoshita, U. Sankawa, S. Nishibe y S. Hisada. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3586 (1981).
- [178] A. Wettstein. *Experientia* **17**, 329 (1961).
- [179] E. Heftmann. *Lipids* **9**, 626 (1974).
- [180] D. Deepak, A. Khare y M. Khare. *Phytochem.* **28**, 3255 (1989).
- [181] R. Kasai, S. Sakuma, S. Kawanishi y J. Shoji. *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 1869 (1972).
- [182] J. Xu, K. Takeya y H. Itokawa. *Phytochem.* **29**, 344 (1990).
- [183] D. Paper y G. Franz. *Planta Medica* **55**, 30 (1989).
- [184] Z. Imre y T. Yurdun. *Planta Medica* **54**, 529 (1988).
- [185] J. Crockett. Tesis de Master (1990).
- [186] M. L. Gross, E. K. Chess, P. A. Lyon, F. W. Crow, S. Evans y H. Tudge. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **42**, 243 (1982).
- [187] P. Bigler. *J. Magn. Reson.* **55**, 468 (1983).
- [188] S. Rangaswami y T. Reichstein. *Helv. Chim. Acta.* **32**, 939 (1949).
- [189] H. H. Sauer, Ek. Weiss y T. Reichstein. *Helv. Chim. Acta.* **49**, 1625 (1966).