

Tesis de Posgrado

Estudio fitoquímico de *Werneria Poposa Philippi*

Ponce, María Alejandra

1994

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

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

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

Cita tipo APA:

Ponce, María Alejandra. (1994). Estudio fitoquímico de *Werneria Poposa Philippi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2644_Ponce.pdf

Cita tipo Chicago:

Ponce, María Alejandra. "Estudio fitoquímico de *Werneria Poposa Philippi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2644_Ponce.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"ESTUDIO FITOQUIMICO DE *Werneria poposa* Philippi"

AUTOR

María Alejandra Ponce

Director de Tesis

Dr. Eduardo G. Gros

Lugar de Trabajo

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Ciencias Químicas

-1994-

Tesis
2644
y.2

A Henry y a Andrés,

por haber compartido el esfuerzo.

*Agradezco a Dios, por sobre todas las cosas,
por haberme concedido la gracia de compartir la vida con ellos
y de que este trabajo fuera posible.*

Agradezco al Dr. Eduardo G. Gros por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, por su estímulo intelectual y material y por su ejemplo de dedicación al trabajo.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Juana de la Fuente y a la Lic. Isabel del Valle Morales por haber conseguido la recolección y envío del material vegetal a estudiar.

Al UMYMFOR (CONICET - FCE y N) por las determinaciones instrumentales realizadas en el transcurso de esta tesis:

Al Sr. Jorge Aznárez por los espectros de masa y CG - EM y por el mantenimiento de los equipos Varian Mat CH-7A y VG-TRIO-2/2000.

A los Dres. Darío Doller, Jorge Palermo, Juan Bautista Rodríguez, Gerardo Caballero y Gustavo Revelli, por los espectros de RMN.

Al Sr. Gustavo Arabehty y al Dr. Gerardo Burton por el mantenimiento de los equipos de RMN, Varian XL-100 y Bruker ACE-200.

A las Lic. María M. de Moglia y María de las Mercedes Rivero por la operación del CGL.

A las Lic. Zulema Marta Marcote y María de las Mercedes Rivero por los microanálisis.

Al Dr. Hugo Garraffo por los espectros de masa de alta resolución y de RMN a 300 MHz.

Al Dr. Jorge Palermo, por su generosidad en la transmisión desinteresada de conocimientos y enseñanza de técnicas experimentales e instrumentales durante el comienzo de este trabajo.

A los Dres. Irma Mastronardi y Juan Carlos Oberti por la búsqueda, fotocopia y envío de las citas bibliográficas pedidas.

A la Dra. Elena Ancibor, por sus esclarecedoras charlas y el material bibliográfico facilitado.

A los Lic. Henry Hughes, Andrea Bruttomesso, Sergio Giacobello, Patricia Zunszain, Miriana Biondic, Alejandro Roccatagliata, Eduardo Sproviero y Dres. Lydia Galagovsky y Carlos Stortz por las enseñanzas y colaboración para el uso de los distintos programas de computación.

A la Dra. Alicia M. Seldes por ofrecerme el uso de su computadora personal y la de su laboratorio.

A todo el Cuerpo Auxiliar del Departamento por ser los artesanos que moldean la valiosa arcilla.

A todos aquellos profesores que mantienen con su coherencia el espíritu del Departamento como ámbito de formación integral de los docentes y docentes-doctorandos siendo fuente permanente de consulta.

A todos mis maestros y profesores, a todos los que me enseñaron o me permitieron aprender.

A María del Carmen Ares, Rosa Ricarte, Rosa Cintas y en particular a Eduardo López por su amable colaboración.

También deseo agradecer,

A mis queridos amigos y compañeros, que ya no están en el Departamento, Elizabeth Lewcowicz, Guillermo Amorín, Jorge Furlong, Javier Montserrat y Mario González, y a aquellos con quienes todavía tengo la alegría de compartir este lugar de trabajo: Henry Hughes, Andrea Bruttomesso, Alejandro Chiocconi, Cristina Tettamanzi, Raquel Goldberg, Daniel Bassi, Luis Iglesias, Alicia Baldessari, Lydia Galagovsky, Osvaldo Teme Centurión, Fabiana Makler, Marcelo Otero, Andrea Schvartzapel, Brenda Feely y Amelia Salinas.

A Alicia Seldes y a toda la gente de su laboratorio durante estos años, Marta Maier, Marta Romero, Mónica Deluca, Jorge Palermo, Henry Hughes, Laura Schor, Gabriela Cabrera, Sergio Giacobello y Alejandro Roccatagliata por su afecto y cordialidad.

A Mario, Patricia, Delia y Martín por demostrarnos hace años ya que era posible.

A Marga y Eduardo, Tito y Nelly, por compartir todos los momentos tratando de mantener la fuerza para seguir adelante con alegría y optimismo.

A Laura P., Claudia O., Inés, Alcirita, Gaby, Ercilia, Clara, Hans, Lily, Patricia R., por su amistad y hermosas reuniones.

En particular deseo agradecer

A Rosa Erra-Balsells y a Sergio Bonesi por sus permanentes muestras de afecto, por su comprensión y sus consejos.

A Miriana y Patricia Z. por los buenos momentos compartidos (Andrés, ? y ?).

No soy yo quien te engendra. Son los muertos.
Son mi padre, su padre y sus mayores;
Son los que un largo dédalo de amores
Trazaron desde Adán y los desiertos.

Jorge Luis Borges.

A Arturo, Nata, Mario, Sarita, Zulema...
Y porqué no a Antonia, Francisco y Manuel.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

λ	longitud de onda
°C	grado centígrado
(c)	cuarteto
(d)	doblete
(m)	multiplete
(s)	singulete
(t)	tripleto
^{13}C -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
^1H -RMN	Resonancia magnética nuclear protónica.
APT	Attached Proton Test
AV	arrastre con vapor
brs	broad signal, (señal ancha)
CCD	cromatografía en capa delgada
CG	cromatografía gaseosa
CG-EM	cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución
CM	cloruro de metileno
cm	centímetro
δ (ppm)	desplazamiento, en partes por millón
EM	espectrometría de masa
eV	electrón volt
FID	detector de ionización de llama
g	gramos
H	hexano
hs	horas

int. rel.	intensidad relativa
IR	infrarrojo
J (Hz)	constante de acoplamiento (medida en Hertz)
l	litro
long	longitud
M+	ion molecular
m.a.	multiplete ancho
m/z	relación masa/carga
Me	metilo
mg	miligramo
MHz	Megahertz
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
nm	nanometros
Psi	libras por pulgada cuadrada
RDA	retro Diels-Alder
Rf	relación de frente
Rp	fase reversa
s.a.	singulete ancho
seg	segundos
s.n.m.	sobre el nivel del mar
Tf	temperatura final
tf	tiempo final
Ti	temperatura inicial
ti	tiempo inicial

TMS	tetrametilsilano, referencia interna para resonancia magnética nuclear
tr	tiempo de retención
u	micrones
UV-Vis	ultravioleta - visible
v/v	concentración, volumen en volumen

INDICE.

INTRODUCCION	1-10
Bibliografía	11-12
DESCRIPCION GENERAL DE LA LABOR REALIZADA	13
<i>Werneria poposa</i> proveniente de Salta	13
Extracto de hexano	13-16
Material obtenido por arrastre con vapor	17-19
<i>Werneria poposa</i> proveniente de Jujuy	20
Extracto de cloruro de metileno	20-27
Extracto metanólico	28-33
Compuestos volátiles. Análisis por CG-EM	34-44
DITERPENOIDES	45-64
Descripción particular de la labor realizada	65-71
Bibliografía	72-73
SESQUITERPENOIDES	74-82
Descripción particular de la labor realizada	83-92
Bibliografía	93-94
HIDROXI ACETOFENONAS PRENILADAS	95-98
Descripción particular de la labor realizada	99-108
Bibliografía	109
FLAVONOIDES	110-125
Descripción particular de la labor realizada	126-132
Bibliografía	133
CUMARINAS	134-148
Descripción particular de la labor realizada	149-155
Bibliografía	156-158

EXPERIMENTAL	159-162
<i>Werneria poposa</i> originaria de la provincia de Salta	163
Extracto no polar	163-175
Estudio de productos volátiles	176-179
<i>Werneria poposa</i> originaria de la provincia de Jujuy	180
Extracto de cloruro de metileno	180-196
Extracto metanólico	197-203
RESUMEN	204-206

INTRODUCCION

Las *Wernerias* argentinas son doce, a saber:

W. heteroloba

W. poposa

W. aretioides

W. rosenii

W. villosa

W. cochlearis

W. pseudodigitata

W. pigmaea

W. apiculata

W. incisa

W. denticulata

W. spathulata

De éstas, la única estudiada fitoquímicamente, la *Werneria poposa philippi*, es la que se informa en este trabajo.

CLASIFICACION:

CLASE: DÍCOTILEDONEAE

SUBCLASE: SYRUPETALAE

ORDEN: CAMPANULALES

FAMILIA: COMPOSITAE

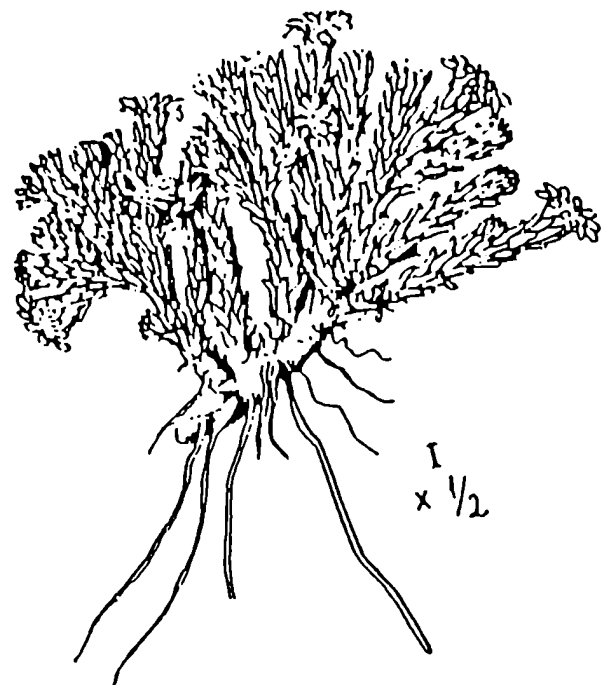
SUBFAMILIA: ASTEROIDEAE

TRIBU: SENECTIONEAE

SUBTRIBU: OTHONNINAE

GENERO: WERNERIA

ESPECIE: POPOSA



Planta en flor.

FAMILIA *Compositae*.

Pertenecen a esta familia más de 1000 géneros y alrededor de 20.000 especies. Es considerada la más extensa de las Angiospermas. Dentro de las dicotiledóneas forma un orden separado, *Asterales* o *Campanulales*, en la subclase *Asteridae*.

Posee una distribución cosmopolita, sus especies se encuentran en todos los

continentes con la excepción del Antártico. No existen especies marinas y las de agua dulce son muy escasas. Es más abundante en las regiones templado-cálidas, en especial en zonas que no están densamente forestadas. Ejemplares pertenecientes a esta familia suelen ser muy abundantes en las regiones montañosas y en las zonas áridas, pero escasean en las selvas tropicales bajas.

La mayor parte de las Compuestas que crecen en regiones templadas son hierbas y arbustos. Existen también especies arbóreas que predominan en regiones templado cálidas y tropicales (Cronquist, 1977; Porter, 1959).

El nombre de la familia deriva de las cabezuelas compactas que semejan flores individuales, pero que en realidad están constituidas por flores más pequeñas y tubulares en el centro y liguladas en la zona marginal, por lo tanto lo que aparece como una sola flor es en realidad una flor compuesta. Ejemplos típicos son el girasol, los cardos, dalias, crisantemos, etc.

En la República Argentina crecen espontáneamente 197 géneros y alrededor de 1.400 especies (Cronquist, 1977; Cabrera, 1963).

La Familia está dividida en 13 Tribus agrupadas en 2 Subfamilias de acuerdo a la clasificación de Hoffman (Cabrera, 1971; Hegnauer, 1964) :

Subfamilia *Liguliflorae*. (flores liguladas, con látex)

Tribu: *Cichorieae*.

Subfamilia: *Tubuliflorae*. (algunas flores del disco tubulosas o bilabiadas, sin látex).

Tribus: *Vernonineae*, *Eupatorieae*, *Astereae*, *Inuleae*, *Helenieae*, *Heliantheae*, *Anthemideae*, ***Senecioneae***, *Calenduleae*, *Arctotideae*, *Cynareae*, *Mutiseae*.

TRIBU *Senecioneae* :

Comprende más de 100 géneros con un total de 3.000 especies ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son hierbas anuales o perennes, de hojas alternas, capítulos en cimas corimbiformes. También se encuentran arbustos y árboles (Heywood *et al.*, 1977).

Esta tribu está subdividida en dos subtribus:

a) Subtribu *Senecioninae* Dum.

b) Subtribu *Blennospermatinae* Rydb.

La subtribu *Senecioninae* Dum. comprende 95 géneros, entre estos se encuentra el género ***Werneria***.

La *Werneria poposa* Philippi presenta caracteres generales y específicos que están relacionados con el ambiente en el que vive, por lo cual pasaremos a describirlo someramente.

Este género posee especies que se presentan como cojines.

Se denomina cojín a una planta muy achaparrada con entrenudos muy cortos donde la porción epigia sobresale poco sobre el nivel del suelo, con profusa cantidad de raíces. En el caso particular de *Werneria poposa* se trata de una masa de raíces adventicias cuyo origen son las ramas del cojín.

El altiplano jujeño, con los cordones montañosos y los macizos aislados que se levantan por sobre su nivel, es un paisaje abierto con una vegetación que rara vez cubre totalmente el suelo (Ruthsatz, 1974, Ruthsatz *et al.*, 1975). Los cojines que forman generalmente comunidades definidas y en superficies limitadas, constituyen un componente característico y dominante. Llegan a representar hasta un 70-80% de la vegetación del área. Las manchas verde vivo, gris verdoso o casi blanco de los cojines se destacan nítidamente sobre el fondo de las piedras y rocas sueltas o se confunden en un complejo mosaico entre la sal y la tierra húmeda de los bordes de las salinas.

La curiosa forma biológica de estas plantas motivó el estudio comparativo de sus estructuras morfológicas. Dentro de las conocidas como cojines podemos nombrar especies pertenecientes a distintas familias de Dicotiledóneas abarcando distintos géneros y distintas especies. En el mundo, las plantas en cojín son típicas de las zonas áridas, montañosas o no, de todos los continentes. El mayor número de especies se encuentra en América latina, entre los Andes, la Patagonia y las Islas Australes. El segundo lugar lo ocupa el altiplano de Pamir en Asia y el resto se distribuye en Europa, Africa y América del Norte.

Se vinculó siempre a las plantas en cojín con las floras de las regiones áridas y se consideró a dicha forma biológica como un ejemplo típico de las mismas.

Existe una amplia literatura que reseña los caracteres generales xeromorfos de los vegetales y discute el fenómeno de su aparición, sus posibles causas, su significado evolutivo y hasta su terminología (Ruthsatz, 1974, 1978 y Ruthsatz *et al.*, 1975 y bibliografía allí citada.).

Los cojines estudiados son plantas perennes y de hojas persistentes. Su forma exterior varía, pero de todos modos en todos los casos se trata de cojines individuos, o sea, una estructura vegetal formada por las ramificaciones más o menos profusas de una sola planta. Se han descartado los conglomerados o

colonias de individuos, aunque esta distribución es bastante difícil de establecer, ya que se observó la coalescencia de varios cojines cercanos de *Azorella*, *Verbena* y *Anthobryum*.

En la Puna jujeña los cojines se hallan distribuidos entre las regiones fitogeográficas puneña y altoandina (Cabrera, 1957, 1971). Su presencia depende de la altitud ya que no se encuentra ninguna de las especies estudiadas por debajo de 3.400 m s.n.m. y el límite superior coincide con la línea de las nieves, lo que equivale en la zona a 5000-5.100 m s.n.m..

Los lugares de vida de las especies estudiadas se diferencian a menudo tanto desde el punto de vista edáfico como microclimático. Sin embargo, todas ellas se hallan sometidas a una serie de condiciones externas que comprenden heladas nocturnas, vientos fuertes, intensa radiación durante gran parte del año y escasas precipitaciones limitadas al verano. El medio donde crecen los cojines es muy árido y el suelo excesivamente pobre en materia orgánica. La región presenta una serie de características locales como vegas, "tomas de agua" (lugar muy alto, rocoso, con agua infiltrada y congelada, donde se introducen las tuberías y se extrae el agua que se descongela paulatinamente por la presión y la temperatura), laderas protegidas de los vientos fríos, etc. Los cojines en particular parecen aprovechar estas condiciones ecológicas especiales y así sobreviven activos durante todas las estaciones del año.

La causa de las plantas en cojín sigue siendo hasta ahora, en cierta forma, una incógnita de la Botánica. Generalmente se explica la aparición de la forma pulvinada (cojín), en tantas familias diferentes, por la adaptación convergente. Se llegó a comprobar mediante cultivos experimentales, que los cojines propiamente dichos tienen este carácter determinado genéticamente y no varían de forma por un cambio drástico del medio ambiente; pero al mismo tiempo sobreviven con dificultad a este cambio.

Algunos autores dan una mayor incidencia a la organización interna y a la plasticidad de los vegetales, como requisito principal para sobrellevar con éxito la adversidad del medio, siendo diferente en cada especie, el camino que lleva a un equilibrio positivo con el ambiente.

Los estudios sobre la vegetación de las estepas andinas del noroeste argentino no son muy numerosas. Las primeras informaciones se refieren a descripciones de viajes por la región, como los de Seckt (1912), Castellanos (1928), Meyer (1943) y Fries (1905) (Ruthsatz *et al.*, 1975), este último con un enfoque

fisonómico-florístico detallado de la vegetación.

Posteriormente Czajka y Vervoorst (1956) (Ruthsatz *et al.*, 1975) realizaron un relevamiento geográfico, representando la vegetación por medio de una serie de transecciones este-oeste. El primer estudio intensivo sobre la fitogeografía y fitosociología del área fue publicada por Cabrera en 1957 (Cabrera, 1957).

En lo que respecta a representaciones cartográficas en una escala mayor que 1:1.000.000, se cuenta con un mapa a nivel exploratorio de la Alta Cuenca del Bermejo hecho por Movia, en 1972, que abarca el sector este de la región que nos ocupa. Posteriormente, utilizándose resultados de un estudio general sobre la fitosociología y el clima de la región (Ruthsatz *et al.*, 1975) se efectuó un relevamiento que pretendió dar una idea del complejo diseño que presentan las comunidades de las estepas andinas del noroeste argentino y de su relación con los efectos activos del ambiente.

CARACTERES ESPECIFICOS DE LA *Werneria poposa* Philippi.

Vive entre 4.000 y 4.600 m s.n.m. Cojines chatos, laxos, "en cepillo", rizomatosos, de 40 a 60 cm de diámetro y 6 cm de altura en laderas secas y también en suelo limoso-arenoso de los bordes de ríos y lagunas.

Ramificación densa tanto horizontal como verticalmente. Ramas terminando aproximadamente a un mismo nivel rematadas en rosetas foliares densamente cilíndricas. Hoja de 0,5 a 0,8 cm de largo, base anchamente envainadora, porción media distal subcilíndrica terminando en tres mucrones (insinuación de hoja trífida). Plantas vecinas: *Parastrephia lucida* y gramíneas.

ANATOMIA:

Hoja: en vista superficial. Epidermis de células pequeñas, aproximadamente isodimétricas, de contorno rectilíneo, semejantes en ambas caras. Estomas de tipo anomocítico, en ambas epidermis y en el tercio distal de la hoja. Vascularización: red vascular en el tercio distal con algunas ramas decurrentes; las aréolas poco delimitadas con terminaciones vasculares libres ramificadas y también terminaciones libres en los márgenes foliares.

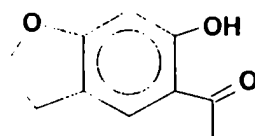
Caracteres específicos de la *Werneria poposa* Philippi: hoja en vista

superficial y CT: células epidérmicas vesiculosas prominentes como papilas, más pronunciadas en la epidermis abaxial. Estomas hundidos con un amplio repliegue cuticular, dispuestos aproximadamente paralelos al eje mayor de la hoja. Mesófilo dorsiventral invertido en el tercio distal debido a la posición vertical adpresa de las hojas en la roseta; un nervio principal. Tallo con estructura secundaria: xilema de los haces vasculares secundarios sin anillos de crecimiento. Raíz con estructura primaria: número de los grupos de xilema variable entre 3-4 y 6 (Ancibor, 1980).

ANTECEDENTES DE ESTUDIOS FITOQUIMICOS DE ESPECIES DEL GENERO *Werneria*.

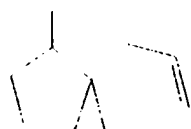
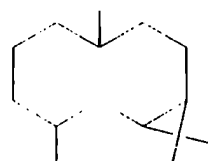
Aproximadamente 40 especies del género *Werneria* se encuentran distribuidas en América del Sur a lo largo de la Cordillera de los Andes. En el Perú se conocen unas 30 especies (Heywood *et al.*, 1977). De las especies argentinas del género *Werneria*, sólo ha sido estudiada fitoquímicamente la *Werneria poposa* Philippi, en nuestros laboratorios. Si bien desde hace muchos años, los géneros *Senecio*, *Werneria* y *Chersodoma* (Senecioneae, Compositae), han sido empleados en la farmacopea herbolaria de la medicina folklórica del noroeste argentino como "drogas antireumáticas" y como remedio para la hipertensión, mal de altura y desórdenes de tipo digestivo (contra los cólicos), no se conoce ninguna investigación fitoquímica de las especies del género *Werneria* hasta 1983.

La primera especie estudiada fitoquímicamente fue la *Werneria ciliolata*, sudamericana, recolectada en Ticlio, provincia de Huarochiri, Departamento de Lima, Perú (Lock de Ugaz *et al.*, 1984). Del extracto clorofórmico de hojas, tallos y raíces se aisló e identificó dihidroeuparina. Este compuesto había sido previamente encontrado en *Eupatorium urticaefolium* (Bonner *et al.*, 1962) y en *Helianthella uniflora* (Bohlmann *et al.*, 1970).

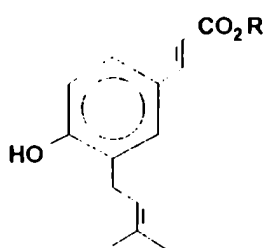


Dihidroeuparina.

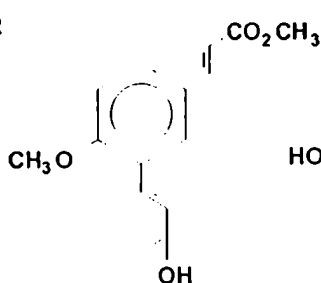
En 1984, Bohlmann (Bohlmann *et al.*, 1984) informa que de las partes aéreas de *Werneria stuebelii* (el material fue recolectado en febrero de 1982 en Perú), se aislaron β -cedreno, biciclogermacrano y nueve derivados de metil p-cumarato, todos formados por prenilación (Compuestos 1 a 9).

 β -cedreno

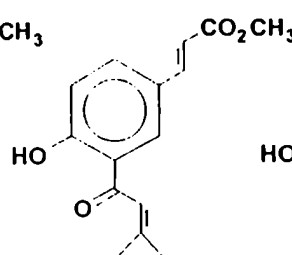
biciclogermacrano



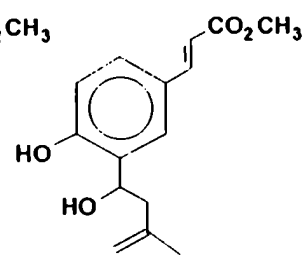
1: R=H

2: R=CH₃

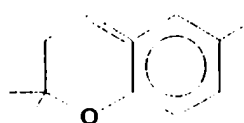
3



4

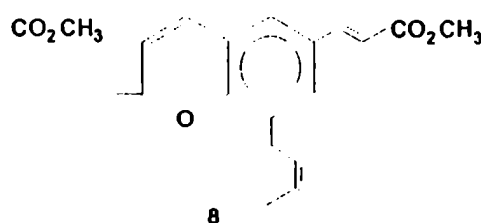


5

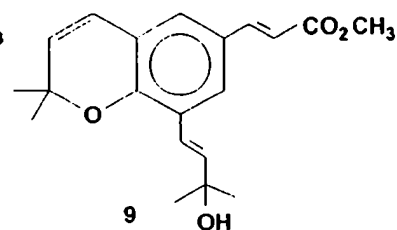


6: 9,10 E

7: 9,10 Z



8

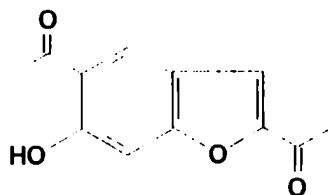


9

El compuesto (2), fue encontrado previamente en especies de *Baccharis* (Bohlmann *et al.*, 1979 a), el compuesto (1), había sido aislado de especies de *Fluorensia* (Bohlmann *et al.*, 1979 b) y de *Baccharis* (Bohlmann *et al.*, 1981). Un ácido o-prenilado fue aislado de especies de *Hemizonia* y de *Coniza* (Bohlmann *et*

al., 1979 c).

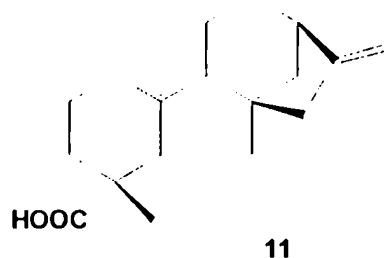
En el año 1988, aparece una nueva publicación sobre el género donde se describe el aislamiento e identificación de un benzofurano, el 2,5-diacetil-6-hidroxibenzofurano (**10**), de la *Werneria ciliolata* (Lock de Ugaz *et al.*, 1988).



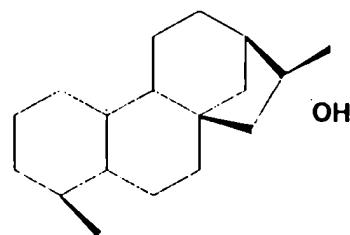
10

Del estudio de *Werneria decora*, en 1990, se aislaron dos diterpenos, el ácido kaur-16-en-19-oico (**11**), y el kauran-16- α -ol (**12**), y alcaloides pirrolizidínicos: N-oxoretorsina (**13**), N-oxoretonecina (**14**) y el ácido isatinécico (**15**) (Lock de Ugaz *et al.*, 1990).

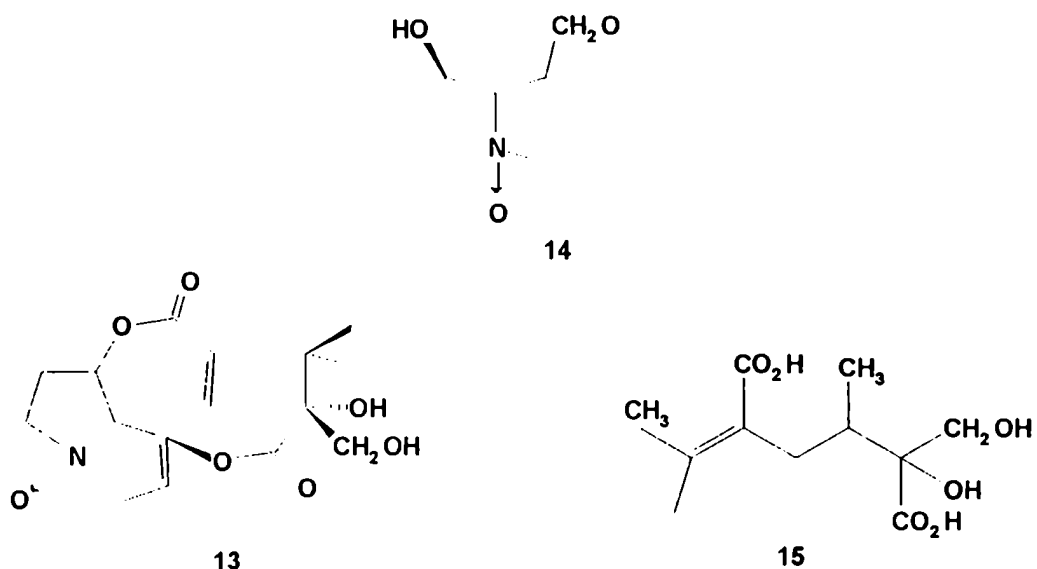
Si bien todos estos compuestos habían sido encontrados previamente (Hanson *et al.*, 1976; Segall *et al.*, 1983; Molyneux *et al.*, 1982; Drewes *et al.*, 1981), fue la primera vez que se informaron alcaloides pirrolizidínicos en este género.



11

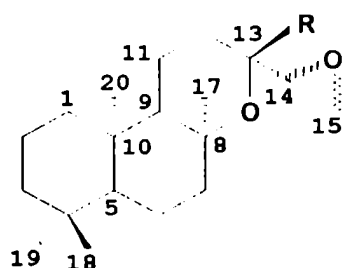


12

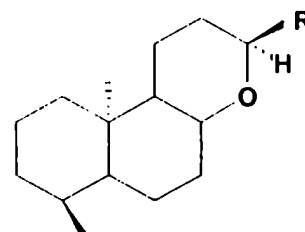


En el trabajo de tesis de Jesús Franco, (Lock de Ugaz *et al.*, 1990) había sido informado el aislamiento de hentriacontano, pentatriacontano, ácido palmítico y hexadecanoato de metilo. En este caso, el material vegetal también era peruano, fue recolectado en 1983 en Ticlio, Perú, a 5.000 m s.n.m..

Recientemente, un grupo italiano (De Tommasi *et al.*, 1992) publicó los resultados del estudio de *Werneria dactylophylla*, recolectado en Cordillera del Cóndor, Provincia de Ayabaca, Perú. Aislaron e identificaron, proveniente de los extractos de sus partes aéreas, un nuevo diterpeno: el ent-16-hidroxi-14 ξ ,15 ξ -epoxi-13-epi-óxido de manoilo (**19(1)**), y los ya conocidos ent-13-epi; ent-16-hidroxi-13-epi-óxido de manoilo (**20(1)** y **(2)**) y ent-14 ξ ,15 ξ -epoxi-13-epi-óxido de manoilo (**19(2)**).



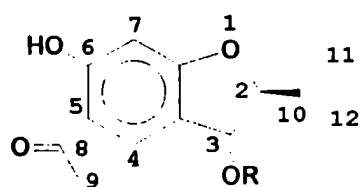
19 (1) R : CH₂OH
(2) R : CH₃



20 (1) R : CH₃
(2) R : CH₂OH

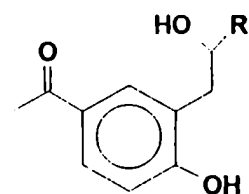
Este mismo grupo prosiguiendo sus estudios sobre metabolitos biológicamente activos de plantas sudamericanas, vuelve a estudiar con el grupo peruano la *Werneria ciliolata* dado que los derivados del benzofurano (**10**) poseen actividad bacteriostática, antitumoral e insecticida (Piacente *et al.*, 1992).

Al emprender una reinvestigación sistemática encuentran y aíslan toxol, acetato de toxol (**21(1)** y **21(2)** respectivamente) y dos nuevas acetofenonas, 3-(2-hidroxi-isopent-3-enyl)-4-hidroxi-acetofenona y 3-(2,3-dihidroxi-isopentil)-4-hidroxi-acetofenona (**22(1)** y **22(2)** respectivamente) (Piacente *et al.*, 1992).



21 (1) R : H

(2) R : CH₃C(=O)-



22 (1) R:

(2) R:

BIBLIOGRAFIA.

- ◆ Ancibor, E., (1980) *Bol. Soc. Arg. Bot.* **19**, 157.
- ◆ Bohlmann, F., Zdero, C., King, R., Robinson, H. (1984) *Phytochemistry*, **23**, 1135.
- ◆ Bohlmann, F., Grenz, M. (1970) *Chem. Ber.*, **103**, 90.
- ◆ Bohlmann, F., Knauf, W., King, R.M., Robinson, H. (1979 a) *Phytochemistry*, **18**, 1011.
- ◆ Bohlmann, F., Japupovic, J. (1979 b) *Phytochemistry*, **18**, 1189.
- ◆ Bohlmann, F. Zdero, C., Grenz, M., Dhar, A.K., Robinson, H., King, R.M. (1981) *Phytochemistry*, **20**, 281.
- ◆ Bohlmann, F., Zdero, C. (1979 c) *Phytochemistry*, **18**, 336.
- ◆ Bonner, W.A., De Graw J.L. Jr. (1962) *Tetrahedron*, **18**, 1295.
- ◆ Cabrera, A.L. (1971). "Flora de la provincia de Jujuy, República Argentina". Parte X: Compositae. Colección Científica del INTA, Buenos Aires.
- ◆ Cabrera, A.L. (1957) *Rev. de Invest. Agr.*, **11**, 317.
- ◆ Cabrera, A.L. (1963) "Flora de la Provincia de Buenos Aires", Tomo IV, Parte VI. Colección Científica del INTA, Buenos Aires.
- ◆ Cronquist A. (1977) "Introducción a la Botánica". Compañía Editorial Continental S.A., México D.F., 2° Ed. , pág 368.
- ◆ De Tommasi, N., Aquino, R., De Simone, F., Piacente, S., Pizza, C. (1992) *Phytochemistry.*, **31**, 1042.
- ◆ Drewes, S.E., Antonowitz, I., Kaye, P.T., Coleman, P.C. (1981) *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* 287.
- ◆ Hanson, J.R., Siverns, M., Piozzi, F., Savona, G., (1976) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 114.
- ◆ Hegnauer, R., (1964) "Chemotaxonomie der Pflanzen", Band 3 Birkhauser Verlag, Basel, Pág. 448.
- ◆ Heywood, V.H., Harborne, J.B., Turner, B.L., (1977) "The Biology and Chemistry of the Compositae", **2**, Academic Press, New York, pág 629.
- ◆ Lock de Ugaz, O., Hajar, A., Borges del Castillo, J., Seligman, O. ,Wagner, H. (1984) *Fitoterapia*, **55**, 248.
- ◆ Lock de Ugaz, O., Peralta A., (1988) *Rev. Latinoamer. Quím.*, **19**, 71
- ◆ Lock de Ugaz, O., Franco, J., Seminario, G., Delle Monache, F., Millan, B., Ubillas Sánchez, R.P., Schlemper, E.O., Tempesta, M.S. (1990) *Phytochemistry*, **29**, 2373.

- ◆ Molyneux, R., Roitman, J., Benson, M., Lundin, R. (1982) *Phytochemistry* **21**, 439.
- ◆ Piacente, S., Aquino, R., De Tommasi, N., Lock de Ugaz, O., Chavez Orellana, H. (1992) *Phytochemistry*, **31**, 2182.
- ◆ Ponce, M.A., Gros, E.G. (1991) *An. Asoc. Quím. Argent*, **79**, 197.
- ◆ Porter C.L., (1959) "Taxonomy of Flowering Plants". W.F. Freeman y Co., San Francisco.
- ◆ Ruthsatz, B. (1974) *Bol. Soc. Arg. Bot.*, **16**, 27.
- ◆ Ruthsatz, B. y Movia, C. (1975). "Relevamiento de las estepas andinas del NO de la Provincia de Jujuy, República Argentina, FECIC".
- ◆ Ruthsatz, B. (1978) *Darwiniana*, **21**, 491.
- ◆ Segall, H.J., Dallas, J.L. (1983) *Phytochemistry*, **22**, 1271.

DESCRIPCION GENERAL DE LA LABOR REALIZADA.

A.- *Werneria poposa* PROVENIENTE DE SALTA.

A.1.-EXTRACTO DE HEXANO.

La labor de investigación realizada comprendió el estudio fitoquímico de la planta *Werneria poposa* Philippi, que crece exclusivamente en la provincia fitogeográfica altoandina en el noroeste argentino, entre 4600 y 5300 m de altitud y cuyas virtudes estomacales son bien apreciadas por los lugareños.

El material a estudiar fue recibido en mayo de 1987, proveniente de la provincia de Salta. Fue secado, molido y extraído en Soxhlet usando como solventes de extracción hexano, cloruro de metileno, y metanol sucesivamente.

El extracto obtenido a partir de hexano se fraccionó mediante cromatografía en columna de sílica gel H obteniéndose 6 fracciones que se llamaron H-1 a H-6 respectivamente.

El monitoreo por CCD de cada una de estas fracciones, se realizó utilizando solventes de polaridad creciente tal como su orden de elución. A su turno, cada una de estas fracciones se fraccionó por columna cromatográfica usando sílica flash; las subfracciones así obtenidas se analizaron por cromatografía gaseosa (CG) y para aquellas cuya masa y presencia de componentes mayoritarios así lo permitían, se purificaron posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Así la fracción H-1 se subfraccionó mediante cromatografía en columna de sílica flash en 11 fracciones que se llamaron H-1/(1-6), H-1/(7), H-1/(8), H-1/(9), H-1/(10), H-1/(11), H-1/(12+13), H-1/(14), H-1/(15+16), H-1/(17), H-1/(18-30).

Del comportamiento de las mismas en CCD y CG se dedujo la presencia de hidrocarburos y compuestos sesquiterpénicos.

Las fracciones H-1/(1-6), H-1/(7), H-1/(8) y H-1/(18-30), resultaron ser mezclas de hidrocarburos, la primera y la última al estado líquido y las otras al estado sólido. Se analizaron por CG en paralelo contra mezclas de hidrocarburos patrones (C-21 a C-32) y (C-12 a C-40), para comparar los perfiles de CG obtenidos. Estas fueron analizadas posteriormente por CG-EM. El resto de la fracciones enumeradas a partir de la H-1 resultaron ser mezclas de sesquiterpenos. Sus estructuras no se pudieron elucidar por ser mezclas complejas y carecer de masa apreciable para proseguir los estudios espectroscópicos.

La H-2 resultó tener comportamiento similar a la H-1 y no se la subfraccionó.

La fracción H-3 se subfraccionó por columna de sílica gel, utilizando como solvente de elución hexano-cloruro de metileno en mezclas de polaridad creciente.

Las subfracciones provenientes de la columna, se combinaron según comportamiento en CCD, obteniéndose las siguientes fracciones: H-3/(1-7), H-3/(8), H-3/(9), H-3/(10+11), H-3/(12-19), H-3/(20-22), H-3/(23-30).

La fracción H-3(20-22), presentaba una sola mancha por CCD, y por espectrometría de ^1H -RMN presentaba una señal doblete a $\delta > 9$, con J 1,5 Hz por lo que se supuso que podía provenir de un aldehído. Su estudio se realizó por CG-EM y por espectrometría de ^{13}C -RMN. Posteriormente se repitieron los espectros luego de ser purificada por CLAR. Los datos espectroscópicos obtenidos respondían a los del aldehído kaurénico y fueron coincidentes con los presentes en bibliografía para este compuesto (Piozzi *et al.* 1971, ver Capítulo Diterpenoides, pág 69 y 70). El análisis por CLAR de la fracción H-3(20-22) proporcionó un cromatograma en el que se distinguía una agrupación de señales subdivisible en tres y un cuarto pico, bien resuelto y separado por varios minutos de los anteriores, que resultó ser el aldehído kaurénico (ver Capítulo Diterpenoides, pág 65).

La primera agrupación de picos fue unida y repurificada por CLAR. Para tratar de lograr una mayor resolución, (6,6 mg era la masa total de la señal mal resuelta) se utilizaron diferentes mezclas de solventes lográndose una mejor separación. Dada la escasez de material se resolvió no continuar con el proceso de elucidación estructural de los compuestos que acompañaban al aldehído kaurénico.

H-4.

La fracción H-4, luego de ser analizada por CCD fue subfraccionada por columna. Las subfracciones se agruparon según comportamiento en CCD en H-4/(1-6), H-4/(7-9), H-4(10-12), H-4(13-15), H-4(16-26). Dado que la primera y la última fracción de esta serie presentaban una sola mancha de R_f muy distinto, se las analizó por ^1H -RMN. Resultó ser que la subfracción H-4(1-6) era una cera y la H-4(16-26) presentaba señales a $\delta > 9$, análogas a las observadas para el aldehído kaurénico. Por comparación contra el propio aldehído se observó que poseían distintos R_f s.

Se purificó por columna la fracción H-4(16-26) y se obtuvieron fracciones que se agruparon según su comportamiento en CCD en H-4(16-26)(1+2) y H-4(16-26)(3-

12). No se prosiguió el análisis de las subfracciones provenientes de la separación por CLAR por tener muy poca masa de cada una de ellas.

La H-4(16-26)(1+2) mostró por CLAR, tres componentes mientras que H-4(16-26)(3-12) presentó 5 señales (A,B,C,D y E). Cada uno de estos componentes fue analizado por CG. Luego de estudiar los resultados de estos cromatogramas, se realizaron los espectros ^1H -RMN de las fracciones H-4(16-26)(1+2)2 y de H-4(16-26)(3-12)A y H-4(16-26)(3-12)B, sin obtener resultados satisfactorios.

Se resolvió no proseguir con este análisis por tener poca masa en cada una de las mezclas. Se dejaron congeladas a -70° para un posterior análisis por CG-EM. La pérdida notable de masa obtenida a través de la secuencia de purificación descrita se adjudica a pérdidas importantes por la volatilidad de los compuestos manipulados.

H-5.

Para subfraccionar H-5 se utilizó sílica gel flash separándose 7 subfracciones según su comportamiento en CCD. Estas fueron: H-5(1-9), H-5(10-12), H-5(13-17), H-5(18-20), H-5(21-25), H-5(26-34), H-5(35-40).

De todas estas subfracciones luego de ser analizadas por CG, se decidió trabajar con la H-5(21-25). Dado que se volvió a subfraccionar por cromatografía en columna, se obtuvieron 6 nuevas fracciones: H-5(21-25)(1-4), H-5(21-25)(5), H-5(21-25)(6), H-5(21-25)(7-9), H-5(21-25)(10), H-5(21-25)(11-14).

Luego de efectuar el mismo análisis que con la fracción madre (CCD, CG), se intentó purificar por CLAR las fracciones H-5(21-25)(5), H-5(21-25)(6) y H-5(21-25)(7-9). Para efectuar su purificación por CLAR se buscaron las condiciones cromatográficas en placas de sílica de fase reversa, comenzando a trabajar con la fracción más abundante, la H-5(21-25)(7-9). En el cromatograma obtenido por CLAR se vieron tres señales principales, de las cuales dos de ellas, mal resueltas justificaban por su masa una posterior purificación. Cada uno de ellos fué nuevamente analizado por CLAR, lográndose obtener dos componentes de cada uno de ellos. Las cuatro subfracciones así obtenidas fueron analizadas posteriormente por CG. El análisis por CG-EM de las mismas, proporcionó señales cuyos EM mostraban pesos moleculares de m/z 204, lo cual confirmaba la presencia de sesquiterpenos.

Dado que sólo se contaba con el espectro de masa de esos productos y que los mismos no coincidían con espectros registrados en literatura no fue posible caracterizarlos.

H-6.

La masa de la fracción a estudiar era de 700 mg; se efectuó la separación por columna de sílica gel H, usando como solvente de desarrollo mezclas de polaridad creciente de cloruro de metileno-acetato de etilo. Se obtuvieron 7 subfracciones que fueron controladas por CCD: H-6(1-6)/(6)/(7)/(8-10)/(11-14)/(15-20)/(21-final).

Todas estas subfracciones mostraron por CCD más de una mancha. El análisis por CG mostró que la H-6(15-20) presenta un pico mayoritario, mientras que las restantes presentaban mezclas de productos.

Por lo tanto, se volvió a purificar en distintas columnas las siguientes fracciones: H-6(8-10)/(11-14)/(15-20). Por ser la que tenía mayor masa y que contenía parte de las otras dos, se comenzó a fraccionar la H-6(11-14). Esto se realizó con columna de sílica gel H y usando como solvente mezclas de hexano-acetato de etilo. Se obtuvieron así las fracciones H-6(11-14)/(1-5)/(6)/(7)/(8+9)/(10+11)/(12-15).

Todas estas nuevas fracciones fueron analizadas por CG, y en función de los resultados se buscaron las condiciones de análisis por CLAR para las fracciones (7)/(8+9)/(12-15) y (16+17). Al efectuar dicho análisis se observó que tanto para la (7) como para la (8+9) lo que en CG se veía como un solo pico principal aparecía en el cromatograma líquido como una banda con muchos hombros; se tomó también uno de los hombros bien definidos y se lo volvió a estudiar por CLAR observándose nuevamente más de un pico. Su análisis fue suspendido dada la complejidad detectada.

A.2.-MATERIAL OBTENIDO POR ARRASTRE CON VAPOR.

Con una nueva partida de planta (80g), procedente de San Antonio de los Cobres, Provincia de Salta se decidió no realizar procedimientos extractivos, dado que habiendo partido de mayor cantidad, las masas de productos puros a las que se llegó fueron muy pequeñas como para proseguir con la elucidación estructural, o en caso de no ser una sustancia pura, proseguir con la purificación.

Por otra parte se tenía la certeza de la presencia de sustancias volátiles. Es así como esta partida se destinó al estudio de los componentes volátiles, aislándoles a partir del material vegetal, por medio de una destilación por arrastre con vapor. El extracto proveniente de este procedimiento, se analizó por CG, utilizando columnas empacadas con distintas fases tales como EMULFOR, SE-30, OV-17 y OV-101. Se obtuvo mejor resolución con estas dos últimas. Lo propio se realizó con la columna capilar HP-5. El extracto se analizó por CG-EM utilizando ambos tipos de columnas. Se obtuvo como información que la mayor proporción de componentes volátiles está constituida por sesquiterpenos, pudiéndose detectar pocos monoterpenos. En principio, esto se atribuyó al poco contenido de los mismos o a la pérdida de ellos durante los procedimientos efectuados (secado de la planta, etc.)

Debido a la complejidad de los cromatogramas obtenidos se decidió fraccionar el extracto utilizando cromatografía en columna seca de sílica gel. Se obtuvieron 8 fracciones que se rotularon según la mezcla de solventes con que se desarrolló la cromatografía. De estas fracciones, la número 1 se descartó dada la insignificante masa obtenida. Las restantes fueron a su vez subfraccionadas y estas subfracciones fueron analizadas por CG. Para aquellas que tenían masa y pureza suficiente se realizó una posterior purificación para tratar de identificar los distintos componentes. No se pudieron aislar compuestos en cantidad apreciable como para seguir trabajando con ellos. Al analizarlos por CG, sus cromatogramas seguían siendo muy complejos para la masa que se disponía. El único compuesto aislado e identificado se supone es un artefacto proveniente de la solubilización de la muestra en un solvente adecuado para ser analizada por CLAR. Este compuesto $C_5H_{10}O_2$, fue aislado de la fracción 2, según el siguiente procedimiento: Luego de fraccionarla se obtuvieron 5 subfracciones, de las cuales dos, por presentar una única mancha por CCD, y pocos picos por CG, se purificaron por CLAR. Se obtuvieron tres picos, que fueron analizados por CG y para el tercero, que daba un único pico por CG

capilar (HP-5), se confirmó su pureza por CLAR. Al dar nuevamente un único pico se realizaron las técnicas espectroscópicas usuales (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, y CG-EM). El compuesto estudiado resultó ser el dímero proveniente de la condensación aldólica de acetona (ver Parte Experimental pág 177).

Fracciones 2 y 3.

Según se pudo determinar, las fracciones 2 y 3 presentaban una zona en común. Por esto se decidió recromatografiar la fracción 3 en columna seca, controlando mediante CCD para que los compuestos correspondientes a la zona en común pasaran a la fracción 2. Esta nueva fracción se llamó 2'. Fue recromatografiada en columna de sílica H, con mezclas de polaridad creciente de hexano-cloruro de metileno. Se obtuvieron 5 fracciones.

Los CG de estas fracciones eran de una complejidad apreciable. En función de la masa y del aspecto de los cromatogramas se resolvió seguir trabajando con la (6-11). Se analizó esta fracción por CLAR (metanol-agua 95:5, columna RP 18). Se observaron una banda ancha que se denominó 2 y dos picos más, 3 y 4, que fueron colectados por CLAR preparativa. Dada su escasa masa, el 3 se descartó para posteriores estudios mientras que el 4 se volvió a estudiar por CLAR (RP 18 partículas de 5 μ), para confirmar su pureza. Se confirmó la existencia de un único pico, que por CG mostró una pureza del 92%. La banda ancha 2 fue reanalizada por CLAR, (columna RP 18 partículas de 5 μ), mostrando dos picos mal resueltos 4 y 5, los cuales fueron analizados por CG resultando para el 4 un compuesto mayoritario, 68%, y para el 5, una mezcla compleja cuya posterior purificación no se continuó por no tener material suficiente.

Fracción 4.

Se la subfraccionó por columna con sílica gel H separándose, con mezclas de hexano-cloruro de metileno según su comportamiento en CCD, 5 subfracciones: Fracción 4 (1-4)/(5-8)/(9-15)/(16-20)/(21-40).

El análisis por CG mostró que todas las subfracciones eran mezclas complejas; por lo que se descartaron.

Fracciones 5 y 6.

La fracción 5 fue analizada por CCD y se comprobó que mayoritariamente eran compuestos de $R_f > 0,5$, por lo que se supuso que eran hidrocarburos volátiles; se reservaron para estudios posteriores.

Ocurrió algo equivalente con la fracción 6 y se decidió análogamente.

Fracción 7.

Luego de ser analizada por CCD, se subfraccionó por columna con mezclas de hexano-acetato de etilo y se obtuvieron 6 subfracciones: (1-3)/(4)/(5)/(6)/(7+8)/(10). Las subfracciones se analizaron por CG y según los resultados obtenidos se decidió analizar por CLAR la (6)(38mg), y la (7+8)(32mg). La (6) revelaba instantáneamente violeta con ácido sulfúrico en CCD.

El análisis por CLAR mostró para cada una de ellas un pico principal con varios hombros y distintos satélites.

Para la fracción (6), este pico principal por CG resultó ser una mezcla. No se prosiguió con el estudio de los volátiles en esta forma porque se comprobó que era ineficiente.

B.- *Werneria Poposa* PROVENIENTE DE JUJUY.

En Enero de 1989 se recibió una partida de aproximadamente 2 kg de material vegetal proveniente de La Quiaca, Departamento de Yavi, Provincia de Jujuy. El material fue molido, secado y extraído en Soxhlet en forma análoga al procedimiento efectuado con la primera partida salteña. En esta oportunidad se efectuaron dos extractos en lugar de tres ya que los dos primeros con solvente poco polar y medianamente polar eran parecidos. Con la partida jujeña se obtuvieron dos extractos, utilizando cloruro de metileno y metanol respectivamente. De los aproximadamente 2 kg de material se obtuvo un rendimiento del 17% como extracto de cloruro de metileno y del 23% al ser reextraído con metanol. Los extractos se fraccionaron por cromatografía en columna seca con sílica gel G y cada una de estas fracciones se subfraccionó, utilizando nuevamente la técnica cromatográfica antedicha, y estas subfracciones se analizaron por CG. Aquellas cuya masa y presencia de componentes mayoritarios así lo permitían se purificaron posteriormente por cromatografía en columna usando sílica H, o cromatografía en columna seca usando sílica gel G o sílica gel flash según fuera el material disponible; y luego por CLAR. Los productos puros así obtenidos se caracterizaron mediante las técnicas aplicadas para los extractos estudiados anteriormente.

B.1.- EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO:

Se lo fraccionó usando mezclas de solventes de polaridad creciente recogiendo 10 fracciones: CM-1 a CM-10.

Se analizaron estas fracciones por CCD, desarrolladas con cloruro de metileno y con detección con radiación UV y luego revelado con ácido sulfúrico y calor. Se observaron manchas fluorescentes para las fracciones CM-9 y CM-10, con sustancias fuertemente retenidas y manchas rojas al revelar con sulfúrico y calor, para las CM-4, CM-5 y CM-6.

Como en este solvente las fracciones CM-1, CM-2 y CM-3, se desplazan con el frente del solvente, se las estudió por CCD con un solvente de menor polaridad; también se cromatografió junto con ellas la CM-4.

Utilizando hexano se logró detectar una zona de manchas intermedia, separada claramente de los productos menos polares, posiblemente hidrocarburos.

De este modo se confirmó la presencia de los sesquiterpenos, los que sólo habían podido ser detectados mediante análisis por CG-EM de las fracciones poco polares, de la partida de planta salteña.

Dada la separación por CCD de las tres zonas francamente definidas para las fracciones CM-1 a CM-4, se decidió separarlas por cromatografía en columna seca, con sílica gel flash, reagrupando luego según lo visto por CCD. Cuando se trata de hidrocarburos, aquellos que se desplazan en sílica gel H con el frente de solvente, quedan más retenidos usando la sílica gel flash. Por esa razón se prefirió usar sílica gel flash cuando era necesaria la purificación de compuestos no polares o poco polares.

CM-1.

Se la fraccionó por cromatografía en columna seca, usando sílica gel flash como adsorbente y hexano como solvente de desarrollo. Se obtuvieron 8 fracciones y se analizaron por CCD. De acuerdo a esto se agruparon en 4 subfracciones principales, que se llamaron CM-1E1/(1)/(2)/(3-5) y (6-8). Se fraccionó nuevamente la (3-5), aplicando el mismo procedimiento. Se volvieron a obtener 8 fracciones, de las cuales luego de analizarlas por CCD y reagrupar quedaron 4: CM1(E1)(3-5)(E2)/(1)/(2)/(3-5) y (6-8). Luego de estudiarlas por CCD y compararlas con las 4 obtenidas en la primera separación E1, se decidió reagruparlas. Quedaron entonces, luego de fraccionar los hidrocarburos de la fracción CM-1, 4 subfracciones: CM-1E1(1), CM-1E1(2)+CM-1E1(3-5)(2)=CM-1E1E2(2); CM-1E1(3-5)E2(3-5); CM-1E1(6-8)+CM-1E1(3-5)E2(6-8)=CM-1E1E2(6-8). A su vez posteriormente se hizo una cromatografía en columna seca de la última subfracción usando dos solventes y obteniendo 2 subfracciones CM-1E1E2(6-8) hexano y CM-1E1E2(6-8) cloruro de metileno respectivamente.

CM-2.

Se procedió de forma análoga que con la CM-1 y se obtuvieron también 8 fracciones que luego de ser analizadas por CCD se agruparon en 4 que se llamaron también análogamente: CM-2(E1)(1); CM-2(E1)(2); CM-2(E1)(3-5); CM-2(E1)(6-8).

Por CCD de estas fracciones se observó que la CM-2(E1)(6-8) era prácticamente una sola mancha, y se la estudió por CLAR. Asimismo, todas estas

fracciones fueron estudiadas por CG y comparadas contra patrones de mezclas de hidrocarburos (C₂₉-C₃₁).

Se observó que las fracciones anteriormente aisladas de la CM-1 y la CM-2 presentaban, en común con el patrón, los picos correspondientes a los hidrocarburos mayoritarios de número de carbono 29 y 31, pero diferente aspecto en el resto del cromatograma. Para la separación de los hidrocarburos por CLAR se tomó la fracción CM-2(E1)(6-8), la cual en sílica gel de alta resolución presentaba no menos de cuatro componentes. Por CLAR se obtuvo un cromatograma de un pico francamente mayoritario el cual resultó ser luego de analizarlo por CG por coinyección con patrón, ¹H-RMN y CG-EM, una mezcla de hidrocarburos lineales de número de carbono impar C₂₉-C₃₁-C₃₃.

Con la fracción CM-2E1(3-5) se procedió en forma análoga a lo efectuado con la CM-1E1E2(6-8), obteniéndose las fracciones CM-2E1(3-5) hexano y CM-2E1(3-5) cloruro de metileno.

CM-3.

Esta fracción también se separó por cromatografía en columna seca, y se agrupó según CCD en CM-3(1), CM-3(2) y CM-3(3-6). Luego de recolectadas estas fracciones se lavó la columna con etanol. Las 3 fracciones se analizaron por CCD y CG y resultaron ser mezclas de hidrocarburos y ceras (por espectroscopía de RMN protónica).

La fracción proveniente de la evaporación del etanol usado para el lavado de la columna se estudió por CCD contra la CM-4 tal cual, y se resolvió juntarlas y proseguir con la separación conjunta.

CM-4.

Se procedió a separar esta fracción por columna seca usando como adsorbente sílica gel G. Se usaron mezclas de solventes de polaridad creciente y se obtuvieron 7 fracciones.

Se estudiaron las fracciones obtenidas por CCD y se compararon contra CM-1, CM-2 y CM-3. Se usaron distintos solventes de desarrollo y se observó que, a diferencia de lo ocurrido con CM-1, CM-2 y CM-3, la primera fracción obtenida contenía poca masa frente a la masa total de fracción analizada. Por esto se supuso

que en esta fracción había mayor contenido de compuestos más polares que los hidrocarburos que constituían la mayor parte de las fracciones anteriores.

Se observó que la cuarta fracción no se desplaza del origen con solvente no polar. Las fracciones 3 a 7 constituyen la mayor parte de la CM-4 y presentan el mismo aspecto por CCD.

Se consideró que de acuerdo al comportamiento observado para la CM-4, en la CM-5 se encontrarían compuestos de mayor interés como sesqui y diterpenos; se decidió guardar la CM-4 y se procedió a separar la CM-5 con las técnicas de purificación y análisis ya descriptas.

CM-5.

Por columna seca de sílica gel G, se obtuvieron 8 fracciones. Estas se nombraron CM-5(E1)/(1)/(2)/(3)/(4)/(5)/(6)/(7)/(8). Se estudiaron por CCD y según el aspecto de la placa al revelar con ácido sulfúrico éstas podrían haberse agrupado en CM-5(E1)/(1-3)/(4-6)/(7+8). Antes de hacer esta agrupación se analizaron por CG y se decidió dejar sin agrupar las (6) y (8).

La agrupación final resultó ser entonces: CM-5(E1)/(1-3)/(4+5)/(6)/(7)/(8).

Al estudiar los CG correspondientes a estas agrupaciones, se decidió repurificar la fracción CM-5(E1)(6). Se hizo nuevamente cromatografía en columna seca y se obtuvieron 6 nuevas subfracciones, las CM-5(E1)(6)/(1) a (6) respectivamente.

Se observó que las CCD de estas fracciones eran todas bien diferentes, en particular, la (3) que presenta dos manchas y las (5) y (6), que presentan manchas violetas al revelar con ácido sulfúrico y calor. A todas estas fracciones se las estudió por CG y se decidió volver a purificar las (3) y (5). Luego de hacer CCD de alta resolución de ambas se optó por seguir adelante con la (5) porque revelaba violeta con sulfúrico y calor y tenía bastante masa.

Volvió a purificarse con columna de sílica gel flash, y las fracciones se analizaron por CCD y se agruparon según su comportamiento en 5 subfracciones. De estas (ver Parte Experimental, pág 185), se purificó la CM-5(E1)(6)(5)(26-34), se analizaron las fracciones por CCD y se agruparon en 3 fracciones principales llamadas (1-9), (9-11) y (12-final). La posterior purificación de esta última señaló la presencia de tres picos de los cuales el tercero era aparentemente mayoritario. Así entonces se obtuvieron a partir de la (12-final) 3 fracciones que se llamaron A1, A2,

y A3, respectivamente. A1 y A2 fueron estudiadas luego por CG-EM (ver Sección Compuestos Volátiles, pág 41) y A3 por los métodos espectroscópicos convencionales resultando ser (-)- α -cadinol (ver Capítulo Sesquiterpenos, pág 90).

La fracción (9-11) es la anterior a la (12-final) y si bien se observó claramente que no era un solo producto (CCD), como tenía relativamente bastante masa, se decidió purificarla por CLAR. En este caso se obtuvo un cromatograma complejo de una serie de picos mal resueltos colectándose 6 fracciones.

Las fracciones CM-5(E1)(6)(5)(26-34)(9-11)CLAR 1 a CLAR 6 fueron analizadas por CG. De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió estudiar por espectrometría RMN de ^1H y de ^{13}C y CG-EM, las CLAR 1, 3, y 5, que se llamaron respectivamente 16, 18 y 20, éstas resultaron ser mezclas complejas que posteriormente se estudiaron por CG-EM.(ver Sección Compuestos Volátiles, pág 41).

CM-6.

Se fraccionó la CM-6 por cromatografía en columna seca de sílica gel G. Inicialmente se obtuvieron 7 fracciones (CCD) que luego de ser analizadas por CG se agruparon en CM-6(E1)// (1)/ (2+3)/ (4)/ (5)/ (6+7)

Por el aspecto de estos cromatogramas se decidió seguir purificando la (6+7). Se volvió a purificar por cromatografía de columna seca usando el mismo sistema de adsorbente y eluyente. Se obtuvieron así 8 fracciones. Estas fracciones fueron estudiadas por CCD y se agruparon en: CM-6(E1)(6+7)// (1) a (8) respectivamente.

Al estudiarlas por CG se decidió agrupar las CM-6(E1)(6+7)(1-5), quedando entonces reducidas a 5 fracciones. Se observó que la CM-6 (E1)(6+7)(6) presenta una coloración violeta al revelar con ácido sulfúrico y calor. Esta fracción se volvió a purificar nuevamente por cromatografía en columna seca, obteniéndose 4 fracciones de las cuales la última presentaba una sola mancha por CCD y revelaba violeta con ácido sulfúrico y calor. Por lo tanto las fracciones CM-6(E1)(6+7)(6)//(1-5)/(6)/(7)/(8), se analizaron por CG. En el cromatograma correspondiente a la (8), se observó un solo pico de 88,8% de pureza. Este también se encuentra en todas las fracciones provenientes de la CM-6(E1)(6+7)(6), pero en menor proporción. Este pico también se encuentra en la CM-6(E1)(7) tal cual, por lo que se lo consideró el producto mayoritario de la CM-6. Al producto responsable de esa señal se lo denominó A4.

Esta fracción fue analizada con las técnicas espectroscópicas habituales y resultó ser una p-hidroxí cetona prenilada de fórmula $C_{13}H_{16}O_2$ (ver Capítulo Hidroxí acetofenonas preniladas, pág 99).

CM-7.

El componente mayoritario llamado (A5) resultó ser el mismo compuesto encontrado en la fracción anterior (ver la deducción y discusión en Parte experimental, pág 188 y Capítulo Hidroxí acetofenonas preniladas, pág 100).

CM-8.

Se decidió purificar esta fracción en columna seca de sílica gel G. Se obtuvieron 8 fracciones que se analizaron por CCD y se agruparon en 3 fracciones principales llamadas: CM-8(E1)/(2-5)/(6)/(7). Se tomó parte de la CM-8(E1)(7) y se purificó nuevamente por columna seca de sílica gel G. Se obtuvieron varias fracciones de las cuales por su masa y su aspecto en CCD sólo importan la CM-8(E1)(7)/(E2)50%(4-6) y la (E2)(75%)(1-3). Estas fueron mezclas, la primera más compleja que la segunda (CG), pero con un compuesto francamente mayoritario. Nuevamente se tomó parte de la (4-6) y se fraccionó por columna con sílica gel H. Se obtuvieron fundamentalmente 4 fracciones que fueron agrupadas luego de analizarlas por CCD resultando: CM-8 (E1) (7) (E2) (50%) (4-6) // (1-26) / (26-28) / (30-33) / (34-40).

La fracción (26-28) resultó ser por CCD una mancha única que revelaba rojo con ácido sulfúrico y calor y se la llamó A6. Esta fue el mismo compuesto que el encontrado en las dos fracciones anteriores (A4=A5=A6, ver Parte Experimental pág 190 y Capítulo Hidroxí acetofenonas preniladas, pág 100).

CM-9.

Siguiendo con la misma metodología se obtuvieron 9 subfracciones, las cuales luego de ser analizadas por CCD se redujeron a 4 fracciones principales: CM-9(1-3)/(5+6)/(7)/(8). Las (5+6) y (7) resultaron ser mezclas por CCD. El análisis por CG de la (1-3) presentó un pico mayoritario (82%) identificado como ftalato de isooctilo (EM característico). La fracción (8) reveló por CCD una mancha mayoritaria

roja y por CG capilar se obtuvo un pico mayoritario (60%) a tr 13,70 min. La purificación por columna de sílica gel H rindió 4 fracciones principales que fueron agrupadas luego de ser analizadas por CCD. Así entonces surgieron las CM-9(8)/(1-38)/ (39-41)/ (42-45)/ (46-final). Se analizaron estas fracciones por CG resultando ser las (1-38) y (46-final) mezclas y las (39-41) y (42-45) el mismo compuesto con más de 90% de pureza. Los espectros de masa y de RMN de ^1H y de ^{13}C permitieron caracterizar el producto encontrado como un alcohol prenilado de fórmula $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$ (ver Parte Experimental, pág 194 y Capítulo Hidroxi acetofenonas preniladas, pág 101).

Es de hacer notar que era la primera vez que se aislaba una acetofenona prenilada y su derivado hidratado en la cadena isoprénica en una especie del género *Werneria*.

CM-10.

Siguiendo con la metodología anterior se obtuvieron 5 fracciones CM-10 / (1)/ (2)/ (3)/ (4)/ (5). Estas se analizaron por CG, con el mismo programa que para la CM-9, y se observaron dos picos principales para las (2) y (3) correspondientes a la cetona prenilada y su alcohol encontrados en fracciones anteriores; un único pico mayoritario para la (1), a tr:11,80 min; correspondiente a la cetona prenilada y un único pico a tr 13,62 de 93% de pureza para la (4) correspondiente al alcohol de la cetona prenilada.

La (5) resultó ser mezcla de los anteriores más compuestos sólidos amarillos que se estudiaron en el extracto metanólico.

Dado que en esta fracción no se aislaron más compuestos de interés, se decidió pasar al estudio del extracto metanólico, luego de realizar un estudio de los acompañantes de los compuestos aislados por CG-EM.

Esquemáticamente, los resultados obtenidos en el estudio del extracto de cloruro de metileno se presentan en el esquema siguiente:

ESQUEMA DE RESULTADOS LOGRADOS EN EL ANALISIS DE *Werneria poposa* EN DICLOROMETANO.

PROCEDIMIENTO: Parte aérea de la planta seca (Secada a temperatura ambiente en estufa con circulación forzada de aire.)

Molienda

Extracción en Soxhlet: Se utilizaron dos solventes: 1) Cloruro de metileno
2) Metanol

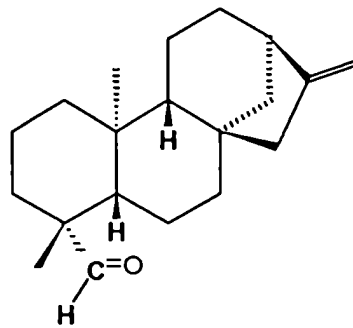
Ambos extractos se fraccionaron por cromatografía en columna seca de sílica. Se obtuvieron 10 fracciones del extracto de cloruro de metileno (CM-1 a CM-10) y 5 fracciones del extracto metanólico (M-1 a M-5).

A continuación se presentan los compuestos aislados más importantes para cada fracción, cuyas estructuras fueron elucidadas utilizando métodos espectroscópicos.

CM-1 y CM-2
Mezclas de hidrocarburos y ceras.
Hidrocarburos mayoritarios (C-29 a C-31)

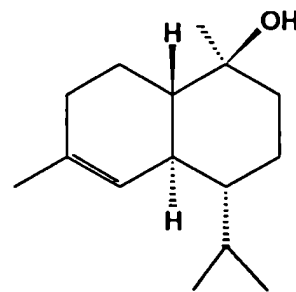
CM-3
Mezcla de hidrocarburos y ceras.

CM-4



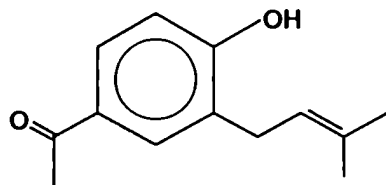
19-al-16-en-kaureno

CM-5



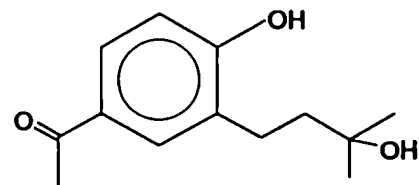
(-)- α -cadinol

CM-6, 7 y 8.



4-hidroxi-3-(isopenten-2 il) acetofenona

CM-9.



4-hidroxi-3-(3'-hidroxiisopentil) acetofenona

CM-10 : Presentaba compuestos comunes a ambos extractos.

B.2.- EXTRACTO METANOLICO.

Se separó el extracto metanólico a través de columna seca usando sílica gel flash como adsorbente y mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo-metanol como solvente de elución.

Luego de ser analizados por CCD se agruparon en 8 fracciones principales que se llamaron M-1 a M-8 respectivamente.

Las CCD de estas 8 fracciones con acetato de etilo como solvente de desarrollo, mostraron claramente que las primeras 5 fracciones se comportaban de manera similar a las del extracto de cloruro de metileno. Presentaban un conjunto de manchas en un amplio rango de R_f sin presentar sustancias retenidas en el origen. Por otra parte, las últimas 4 fracciones quedan fuertemente retenidas. Se observaba un color amarillo fuerte con metanol y vapores de amoníaco. También se verificó que presentaban distinto comportamiento grupalmente al ser analizadas por CG. Al utilizar columna HP-5, con el programa estándar usado para las últimas fracciones del extracto de cloruro de metileno, se obtuvieron cromatogramas para las primeras 5 fracciones, mientras que los materiales contenidos en el sobrenadante de las 4 últimas en solución metanólica no eluyeron de la columna.

En función de este comportamiento se supuso que las primeras 5 fracciones contenían compuestos semejantes a los encontrados en el extracto anterior, quizás algunos en su forma mas polar, (es decir, si en el de hexano estaba como cetona, en el de metanol estaría como alcohol), mientras que los compuestos polioxigenados, se encuentran en las 4 últimas.

Se analizó fracción por fracción, aplicando las técnicas de purificación y análisis ya descriptas, y se verificó la suposición anterior.

M-1 y M-2.

Considerando las ínfimas masas de cada una de estas fracciones frente a las restantes, y su comportamiento por CCD y CG, se decidió no fraccionarlas, ya que representaban una fracción minoritaria de este extracto.

M-3.

Esta fracción fue obtenida a partir del fraccionamiento del extracto metanólico con una mezcla hexano-acetato de etilo 1:1. Por CG presentaba un pico mayoritario (77,7%) y por CCD presentaba dos zonas, una de $R_f > 0,5$ con manchas que revelan violeta con ácido sulfúrico y calor y la otra con $R_f < 0,1$ que revela amarillo en las mismas condiciones. Las bandas fueron separadas por cromatografía en columna seca usando mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo-metanol, y se obtuvieron 12 subfracciones llamadas: M-3/1 a M-3/12.

Cada una de estas fracciones fue estudiada por CCD y se agruparon de la siguiente manera: M-3/ (1+2), (3+4), (5+6), (7+8+9), (10+11+12). A estas se las llamó, a los efectos de simplificar M-3, A, B, C, D, y E respectivamente. La última de estas fracciones, M-3 E presentaba por CCD una parte importante retenida en la zona de siembra análoga a la fracción M-4.

Estas nuevas fracciones se estudiaron por CG y la M-3 D resultó ser un producto de pureza $> 88,8 \%$, mientras que las tres anteriores eran mezclas complejas. Sus espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C y CG-EM, demostraron que lo encontrado no era más que el compuesto denominado A4=A5=A6, previamente encontrado en el extracto de cloruro de metileno.

M-4.

Se intentó separar por columna seca usando sílica gel flash, pero la fracción no era totalmente soluble en AcOEt-MeOH (1:1). Por ello, se separó por filtración la fracción insoluble (MeOH 4-S) y el filtrado se llevó a sequedad (MeOH 4-L)

Se decidió repurificar la fracción M-4 L por columna seca con sílica gel flash como adsorbente y mezclas de hexano-acetato de etilo-acetona-metanol como eluyente.

Se obtuvieron inicialmente 13 fracciones llamadas M-4 L/1 a M-4 L/13 respectivamente.

Se estudiaron estas 13 fracciones por CCD. Las primeras 4 fracciones se estudiaron por separado, porque con el solvente de desarrollo de la placa total se desplazan con el frente del solvente. Las restantes se agruparon: M-4 L/ (5+6), (7), (8), (9), (10+11+12+13).

Para las 4 fracciones iniciales se usaron mezclas de hexano-acetato de etilo como solvente de desarrollo para estudiarlas por CCD. Se obtuvo para la primera una gran cantidad de manchas y se descartó.

La segunda era una mezcla de dos productos mayoritarios. La tercera fracción estaba prácticamente pura por CCD. En la cuarta, también se encontró una mancha mayoritaria, de R_f que la anterior que revelaba violeta. Estas últimas dos fracciones M-4 hexano-acetato de etilo 1:1 (3) y (4) se estudiaron por CG. Esta última es la mezcla de la cetona y el derivado hidratado en la cadena isoprénica, ya encontrados previamente en el extracto de cloruro de metileno.

M-4 S.

Dado que fundió en un amplio rango de temperaturas, se decidió purificarla por cromatografía en columna seca. Para ello se buscaron previamente condiciones en CCD. Cuando se desarrolló la cromatografía con cloruro de metileno se observó que quedaba retenido material amarillo. Se probaron mezclas de cloruro de metileno-metanol y se observaron manchas con escasa resolución. Por agregado de ácido acético se obtuvo una mancha nítida con $R_f > 0,4$. Por estos datos, sus problemas de solubilidad, su color, se sospechó la presencia de compuestos polioxigenados tipo flavonoides o cumarinas.

Se utilizó cromatografía en columna seca y se utilizaron mezclas de polaridad creciente de hexano-cloruro de metileno-acetona-metanol. Se obtuvieron inicialmente 13 fracciones, M-4 S/1 a 13. Se estudiaron por CCD. Se observó que las fracciones M-4 S/ (6), (7) y (8) presentaban color amarillo.

Se agruparon en la siguiente forma M-4 S/ (1-6), (7+8), (10), (11+12+13). Se estudiaron las 3 últimas que fueron llamadas A, B, y C. Se descartó la (9).

El análisis elemental de las A, B, C, (sólidos amarillos, A y B, pardo amarillento para C), fue negativo para nitrógeno y con un alto contenido de oxígeno. De las tres se estudió en detalle la C dado que las otras dos eran fundamentalmente el mismo compuesto con distinto grado de pureza. Se estudió por espectroscopía UV y se procedió según la técnica descrita por Mabry (Mabry *et al.*, 1970, ver Capítulo Flavonoides, pág 126). En el espectro UV se obtuvieron corrimientos tales que hicieron suponer la presencia de hidroxilo en posiciones 3, 5, 7, y 4' y metoxilo en 3' (Isoramnetina) (Ver Parte Experimental, pág 200 y Capítulo Flavonoides, pág 128).

El espectro de masa directo rindió un M^+ correspondiente a $C_{16}H_{12}O_7$; los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C mostraban en ambos casos dos zonas perfectamente diferenciadas, una zona aromática y el metoxilo a campos altos.

Se estudió una muestra patrón de ramnetina (3, 5, 3', 4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona) por espectrometría UV y fue descartada la posibilidad de que el metoxilo se encontrara en C-3. Así se pudo comprobar la diferencia en los corrimientos debidos a hidroxilos vecinos con $AlCl_3/HCl$, los cuales se modificaban para esta última al tener hidroxilos vecinos en el anillo B. Con esto se aseguró la posición del grupo metoxilo para nuestro compuesto en C-3'. También se comparó su espectro de RMN de 1H en $DMSO-d_6$ y se ratificó la estructura propuesta, ISORAMNETINA.

M-5.

Se separó la mezcla (18 g) por cromatografía en columna seca usando sílica gel flash y mezclas de hexano-acetato de etilo-metanol como eluyente.

Se obtuvieron inicialmente 12 fracciones, M-5/ 1 a M-5/ 12 que fueron agrupadas, M-5/ (3+4), (5+6), (7+8+9). Se descartaron las 2 primeras por ser escasa su masa y las 3 últimas por haber sido obtenidas con solvente demasiado polar (ácido acético).

A las 3 fracciones resultantes de la agrupación anterior se las llamó A, B y C respectivamente.

Las M-5 A y B, mostraban más de una mancha por CCD, si bien presentaban una zona francamente mayoritaria. Al evaporar el solvente de la M-5 A, se obtuvo un sólido amarillento amarronado, mientras que con la M-5 B, se obtuvo un producto amarillo marrón, mucho más puro que el anterior (menor rango de punto de fusión). Pero la fracción que revelaba con ácido sulfúrico y calor como una sola mancha y luego de evaporar el solvente daba un sólido amarillo oscuro era la C. Todas estas fracciones, las M-5 A, B, C, fueron estudiadas por RMN de 1H y se resolvió continuar con la M-5 C ya que ésta producía un espectro más limpio (las señales que se presentaban en este también estaban presentes en los demás, pero en los otros con más ruido).

Se estudiaron sus espectros UV e IR, nuevamente según la técnica descrita (Mabry *et al.*, 1970). Se observaron corrimientos debidos a la presencia de hidroxilos vecinos. El ^{13}C -RMN presentaba señales en la zona aromática para 9 carbonos y

un metoxilo de baja intensidad comparada con la de las 9 señales principales. Esta señal también se observaba en el espectro de RMN protónico donde se veían claramente dos dobletes con J_{orto} (11 Hz) y dos singuletes entre ellos. Se recrystalizó de mezclas de acetona-metanol-agua hasta punto de fusión constante. El microanálisis del producto de la cuarta recrystalización indicaba una fórmula mínima $C_9H_6O_4$, asimilable a una cumarina. Su EM confirmó su M^+ y pico base a m/z 178. En el espectro de ^{13}C -RMN, aunque de menor intensidad que en el anterior se observaba la señal de metoxilo, pero este grupo no surgía cabalmente de los valores analíticos. Por esto se decidió estudiar por CG-EM lo que quedaba disuelto en el solvente sobrenadante de recrystalización.

El producto recrystalizado resultó ser ESCULETINA. Sus datos espectroscópicos coinciden con los presentes en bibliografía. Su punto de fusión coincidía con lo informado en bibliografía (Karrer *et al.*, 1958, ver Capítulo Cumarinas, pág 149) y el aspecto de la zona aromática por RMN de 1H coincidía exactamente con el registrado para este compuesto (Aldrich *et al.*, 1974, ver Capítulo Cumarinas, pág 150).

El sobrenadante se estudió por CG-EM, así como también la parte soluble de las fracciones M-5 A y B. Se observó que en el sobrenadante de la M-5 A se presentaban dos señales, las cuales correspondían a la cetona prenilada, en mucha menor proporción y al derivado hidratado en la cadena isoprénica, como producto ampliamente mayoritario.

En la M-5 B aparte de las dos presentes en la A se observaba como producto mayoritario un posible propil benceno; mientras que en el sobrenadante de recrystalización de M-5 C, se encontraron los presentes en las anteriores, más dos productos cuyos análisis indicaban, para el primero, una fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$, $M^+=192$ uma, que se identificó como ISOESCOPOLETINA y para el segundo, una fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$, $M^+=194$ uma, que se identificó como DIHIDROISOESCOPOLETINA. Acompañando al sólido recrystalizado se detectó un compuesto cuyo punto de fusión y análisis por espectrometría de masa indicó una fórmula molecular $C_{10}H_8O_5$, $M^+=208$ uma que luego se identificó como FRAXETINA.

Por estos resultados obtenidos, se pudo justificar la presencia de la señal de metoxilo en el espectro de esculetina, como procedente de alguna de las sustancias anteriores que actuó como impureza y no fue eliminada por sucesivas recrystalizaciones.

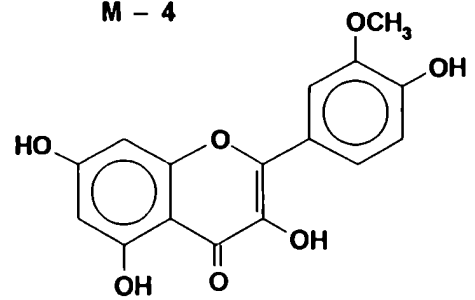
Esquemáticamente, los resultados obtenidos en el estudio del extracto metanólico se presentan en el diagrama siguiente:

ESQUEMA DE RESULTADOS LOGRADOS EN EL ANALISIS DEL EXTRACTO METANOLICO DE *Werneria Poposa*.

M - 1, 2 y 3.

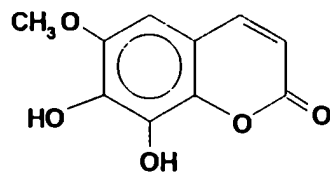
Presentan compuestos hallados en el extracto anterior.

M - 4

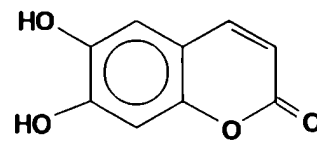


isoramnetina

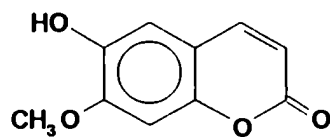
M - 5



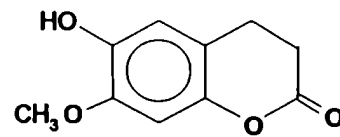
fraxetina



esculetina



isoescopoletina



dihidroisoescopoletina

COMPUESTOS VOLATILES. ANALISIS POR CG-EM.

Para las fracciones CM-1 y CM-2, aparte de la franja correspondiente a los hidrocarburos mayoritarios C-29 - C-31 por CCD (Rf 0,9), se observaban para ambas una franja intermedia de RF 0,5. Se procedió a tratar de detectar los acompañantes volátiles de los hidrocarburos, analizando estas fracciones por CG-EM, ya que los métodos utilizados con anterioridad para la planta salteña fueron ineficientes. Lo mismo se hizo con los acompañantes volátiles de las ceras, que no eran de nuestro interés estudiar, fracciones CM-3 y CM-4. Aplicando la misma metodología se identificaron compuestos volátiles que acompañaban, formando mezclas complejas como minoritarios, al (-)- α -cadinol, fracción CM-5, y al aldehído kaurénico, fracciones CM-5 y CM-6. Este último no pudo ser aislado como tal en la planta jujeña.

Como no se tenían en el laboratorio los patrones de todos los posibles mono, sesqui y diterpenos que podrían encontrarse y sólo se podía contar con muestras comerciales, las posibilidades para determinar la estructura de los componentes de nuestras mezclas constituía un área dificultosa.

Se resolvió entonces estudiar por CG-EM las distintas mezclas cuya complejidad no había permitido el aislamiento de sus componentes por los métodos usuales. Comparando el espectro de los picos correspondientes a cada una de ellas contra los espectros guardados en las espectrotecas comerciales se observó que en muchos casos el % de similitud tanto para la búsqueda F como para la R (ver abajo) era alto (> 90 %) para algunos casos. Además, el tipo de estructura, era coincidente con la de la familia de los compuestos que se habían podido aislar y caracterizar por los métodos tradicionales.

A continuación se presenta una tabla en la que se detalla el peso molecular y la estructura adjudicada, con su porcentaje de factibilidad (F y/o R) y su C.A.S.

La búsqueda de identidad para cada una de las señales en el cromatograma de masa fue efectuada comparando contra datos de espectros almacenados en memoria (NBS Library, LAB BASE, VG Analytical) utilizando las técnicas de búsquedas provistas por el software del instrumento.

En las tablas presentadas se listan de izquierda a derecha los compuestos identificados de menor a mayor tiempo de retención.

Se utilizó una Columna Capilar DB-5(SE-54); Largo: 15m; Diámetro interno: 0,25 mm; Split 100:1; P. Col: 10 Psi 70 Kpa; Temperatura de inyector 240°; con el

siguiente programa: Temperatura inicial:100°, Tiempo inicial: 3 min; Velocidad de calentamiento: 10°/min; Temperatura final 300°; Tiempo final: 15 min.

Las abreviaturas que se encuentran debajo de cada dibujo en cada casillero indican:

E: Número de espectro según la base consultada.

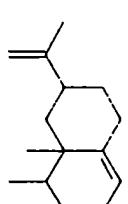

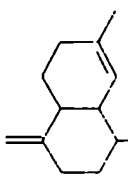
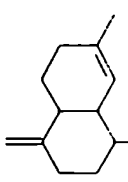

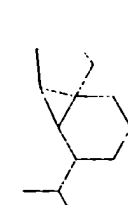
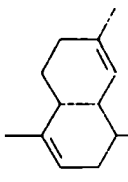
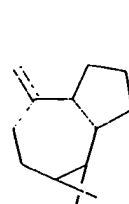
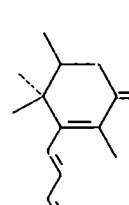
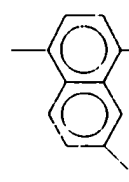
CAS: Número de registro del Chemical Abstracts.

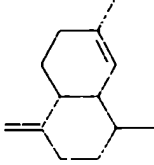
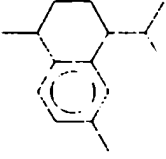
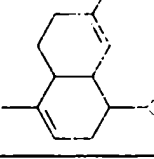
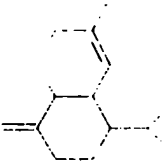

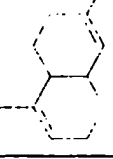
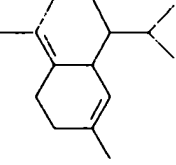
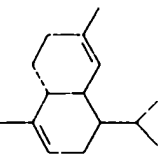
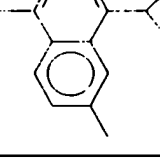
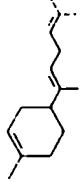
%: Porcentaje de similitud. Puede ser FOR (F) o REV (R).

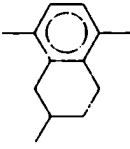
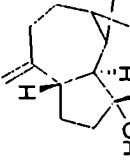
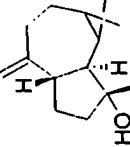

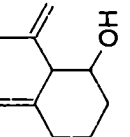
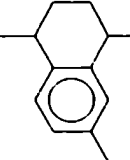
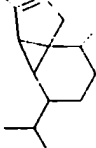
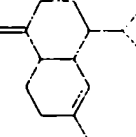
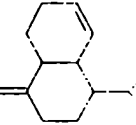
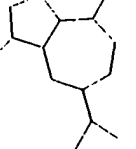

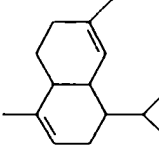
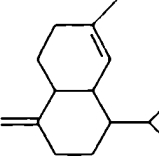
Todos los casos en los que no se especifica es FOR.

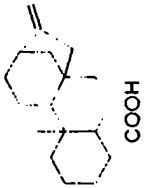
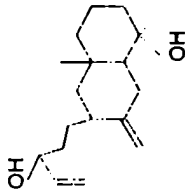
FOR: % de coincidencia entre incógnita y referencia seleccionada considerando todos los picos en una escala de 0 a 1000.

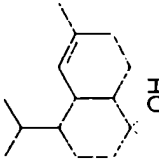
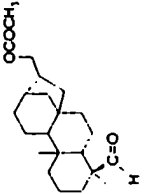
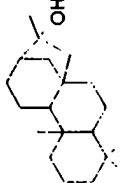
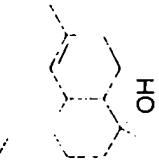
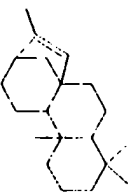
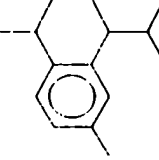
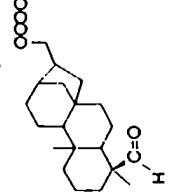
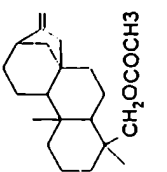
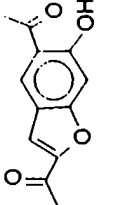
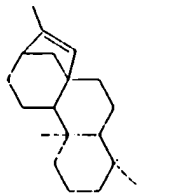
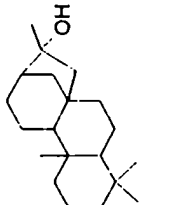
REV: % de coincidencia entre incógnita y referencia seleccionada considerando sólo los picos que aparecen en la referencia, en una escala de 0 a 1000.


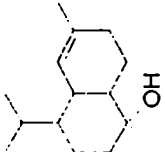

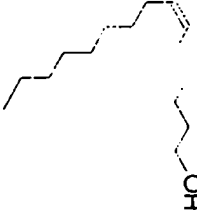
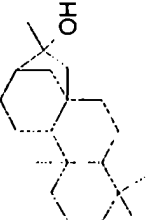
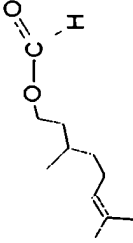
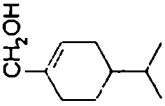
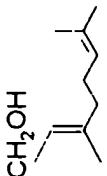
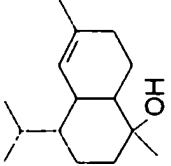
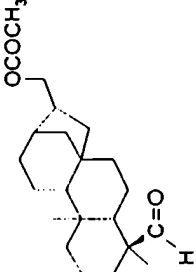
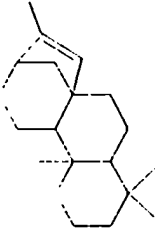
CM-1E1(1)	1		E: 19507 CAS: 10219-75-7 %: 85,6	2		E: 19489 CAS: 13877-93-5 %: 78,8	3		E:19484 CAS: 39029-41-9 %: 93	3		E: 19484 CAS: 39029-41-9 %: 94,9
CM-1E1(8)	5		E: 19501 CAS: 5989-08-2 %: 80,9	6		E: 19447 CAS: 17699-14-8 %: 84,5	4		E: 19469 CAS: 31983-22-9 %: 79,7			
CM-1(18)	7		E: 19444 CAS: 25246-27-9 %: 86	8		E: 19408 CAS: 68931-37-3 %: 82 (R)	9		E: 18392 CAS: 483-78-3 %: 92,2 (R)			

CM-2E1(2)	3		E: 19484 CAS: 39029-41-9 %: 89,3	12		E: 19079 CAS: 483-77-2 %: 86,4	4		E: 19469 CAS: 31983-22-9 %: 92,3
	3		E: 19484 CAS: 39029-41-9 %: 85,6	12		E: 19079 CAS: 483-77-2 %: 80,6	4		E: 19469 CAS: 31983-22-9 %: 89,2
	13		E: 19490 CAS: 483-76-1 %: 83,4	4		E: 19469 CAS: 31983-22-9 %: 92,3	9		E: 18392 CAS: 483-78-3 %: 92,8
					14		E: 19434 CAS: 17627-44-0 %: 88,2		

CM-2E1(6-8)Cl	<p>15</p>  <p>E: 13584 CAS: 30316-17-7 %: 73,1</p>	<p>16</p>  <p>E: 22326 CAS: 77171-55-2 %: 81,3</p>	<p>16</p>  <p>E: 22326 CAS: 77171-55-2 %: 90,5</p>	<p>17</p>  <p>E: 27492 CAS: 64566-18-3 %: 71,6</p>	<p>18</p>  <p>E: 8720 CAS: 15358-81-3 %: 70,1</p>	<p>12</p>  <p>E: 19079 CAS: 483-77-2 %: 72,5</p>
CM-3(3-6)	<p>6</p>  <p>E: 19447 CAS: 17699-14-8 %: 90,3</p>	<p>19</p>  <p>E: 19460 CAS: 30021-74-0 %: 88,3</p>	<p>3</p>  <p>E: 19484 CAS: 39029-41-9 %: 85,6</p>	<p>20</p>  <p>E: 18391 CAS: 489-84-9 %: 77,1</p>	<p>2</p>  <p>E: 19489 CAS: 13877-93-5 %: 73,6</p>	
CM-3Terp	<p>4</p>  <p>E: 19469 CAS: 31983-22-9 %: 94,6</p>	<p>3</p>  <p>E: 19484 CAS: 39029-41-9 %: 91,2</p>				

<p>CM-4(5+6)</p>	<p>21</p>  <p>E: 34168 CAS: 20316-84-1 %: 80,8 (R)</p>
<p>CM-4(7+8)</p>	<p>22</p>  <p>E: 34635 CAS: 4549-12-6 %: 88,7</p>

<p>CM-5E1(6)(5) (26-34)(12-f)(1)= (A1)</p>	<p>23</p>  <p>E: 22737 CAS: 19435-97-3 %: 75,9</p>	<p>24</p>  <p>E: 38587 CAS: 55902-84-6 %: 83,5</p>	<p>25</p>  <p>E: 32768 CAS: 5524-17-4 %: 88,6</p>			
<p>CM-5E1(6)(5) (26-34)(12-f)(2)= A2</p>	<p>23</p>  <p>E: 22737 CAS: 19435-97-3 %: 88,7 (R)</p>	<p>26</p>  <p>E: 30377 CAS: 5947-50-2 %: 73,1</p>				
<p>CM-5E1(6)(5) (26-34)(9-11) CLAR5= 20</p>	<p>12</p>  <p>E: 19079 CAS: 483-77-2 %: 85,4</p>	<p>24</p>  <p>E: 38587 CAS: 55902-84-6 %: 76</p>	<p>27</p>  <p>E: 37137 CAS: 72150-74-4 %: 81,1 (R)</p>	<p>28</p>  <p>E: 21899 CAS: 53947-86-7 %: 83,3 (R)</p>	<p>26</p>  <p>E: 30377 CAS: 5947-50-2 %: 91,6</p>	<p>29</p>  <p>E: 32769 CAS: 5354-44-9 %: 85,9 (R)</p>

<p>CM-5E1(8)(7) hex-AcOEt 1:1 (1)</p>	<p>30</p>  <p>E: 19440 CAS: 23986-74-5 %: 92</p>	<p>23</p>  <p>E: 22737 CAS: 19435-97-3 %: 81,8</p>	<p>31</p>  <p>E: 19439 CAS: 24048-44-0 %: 67,4</p>	<p>32</p>  <p>HO</p> <p>E: 23497 CAS: 68797-95-5 %: 94,4</p>	<p>29</p>  <p>E: 32769 CAS: 5354-44-9 %: 72</p>	
<p>CM-5E1(8)(7) hex-AcOEt 1:1 (3)</p>	<p>33</p>  <p>E: 15487 CAS: 105-85-1 %: 84,3</p>	<p>34</p>  <p>CH₂OH</p> <p>E: 9142 CAS: 35376-39-7 %: 81,4</p>	<p>35</p>  <p>CH₂OH</p> <p>E: 9133 CAS: 106-24-1 %: 89,5</p>	<p>23</p>  <p>OH</p> <p>E: 22737 CAS: 19435-97-3 %: 78,3</p>	<p>24</p>  <p>C=O H OCOCH₃</p> <p>E: 38587 CAS: 55902-84-6 %: 76</p>	<p>26</p>  <p>E: 30377 CAS: 5947-50-2 %: 73,1</p>

LISTADO CAS.

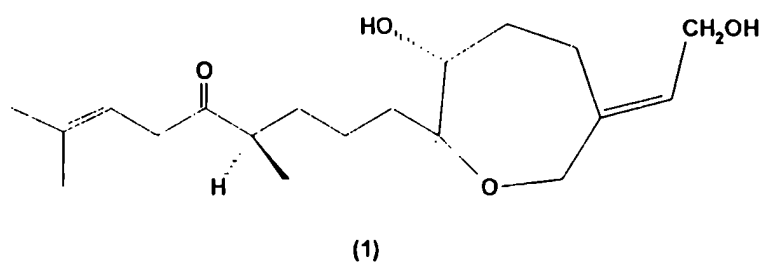
- 1:** 1, 8A-Dimetil-7-(1-metiletenil)-1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 8A-octahidronaftaleno.
- 2:** 4,11,11-Trimetil-8-metilen-biciclo 7.2.0 undec-4-eno.
- 3:** 7-Metil-1-(1-metiletil)-4-metileno-1, 2, 3, 4, 4A, 5, 6, 8A-octahidronaftaleno.
- 4:** 4, 7-Dimetil-1-(1-metiletil)-1, 2, 4A, 5, 6, 8A-hexahidronaftaleno.
- 5:** 2, 6, 6, 9-Tetrametil-triciclo 5.4.0.0.2,8 undec-9-eno.
- 6:** 3, 7-Dimetil-4-(1-metiletil) 3A, 3B, 4, 5, 6, 7-hexahidro-1H-ciclopenta 1, 3 ciclopropa 1, 2 benceno.
- 7:** Decahidro-1, 1, 7-trimetil-4-metilen-,1H-cicloprop E azuleno.
- 8:** 3-(1,3-Butadienil)-2, 4, 4, 5-tetrametil-, (E)- 2-ciclohexen-1-ona.
- 9:** 1, 6-Dimetil-4-(1-metiletil)- naftaleno.
- 10:** 2, 6, 6, 9-Tetrametil-, (E, E, E)- 1, 4, 8-cicloundecatrieno.
- 11:** 1, 2, 4A, 5, 8, 8A-Hexahidro-4, 7-dimetil-1-(1-metiletil)-, 1S naftaleno.
- 12:** 1, 2, 3, 4-Tetrahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-, (1S-cis) naftaleno.
- 13:** 1, 2, 3, 5, 6, 8A-Hexahidro-4, 7-dimetil-1-(1-metiletil)-, (1S)-naftaleno.
- 14:** 4-(1,5-Dimetil-1,4-hexadienil)-1-metilciclohexeno.
- 15:** 1, 2, 3, 4-Tetrahidro-2, 5, 8-trimetilnaftaleno.
- 16:** (-)-Spathulenol.
- 17:** (R)-(-)-14-Metil-8-hexadecin-1-ol
- 18:** o-Menta-1(7), 8-dien-3-ol.
- 19:** 1, 2, 3, 4, 4A, 5, 6, 8A-Octahidro-7-metil-4-metilen-1-(1-metiletil) naftaleno.
- 20:** 1, 4-Dimetil-7-(1-metiletil)-azuleno.
- 21:** Kaur-4- β -16-en-18-oico.
- 22:** 1, 4A-Dimetil-1-hidroxi-6-(3-hidroxi-3-metil-4-pentenil)-7-metilen-decahidronaftaleno.
- 23:** 1, 2, 3, 4, 4A, 7, 8, 8A-Octahidro-1, 6 dimetil-4-(1-metiletil)-1-naftalenol.

- 24:** 17-Acetiloxi-18-al-,4- β -Kaurano.
- 25:** Kauran-16-ol.
- 26:** Kaur-15-ene.
- 27:** Kaur-4- β -18-acetiloxi.
- 28:** 1, 1'-(6-Hidroxi-2, 5-benzofurandiil) bis-etanona.
- 29:** H-Kauran-16- β -ol
- 30:** Germacreno D.
- 31:** 1S-(1- α , 4- β)-1, 8-Dimetil-4-(1-metiletetil)--Spiro 4.5 dec-7-eno.
- 32:** (Z)-6-Pentadecen-1-ol
- 33:** Formiato de 3, 7-dimetil 6-octen-1-ol.
- 34:** cis-p-2-Menten-1-ol.
- 35** (E)-3, 7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol.

DITERPENOIDES.

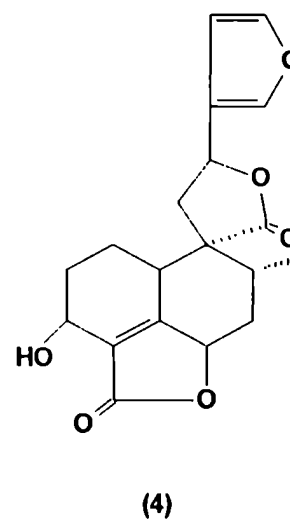
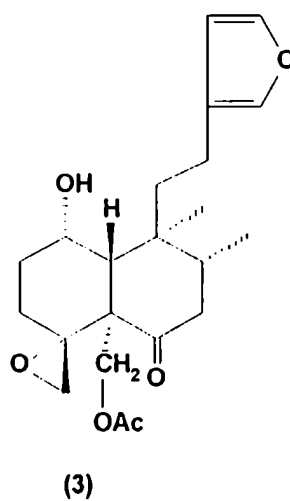
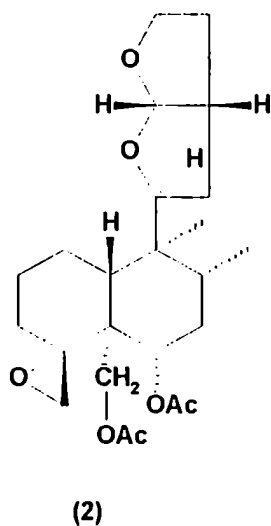
El número de diterpenoides conocidos ha aumentado sustancialmente en los últimos treinta años (Hanson, 1968). La diversidad de los esqueletos diterpénicos hallados en la actualidad es tan grande como la de los sesquiterpenos. Se los encuentra tanto en plantas como en animales y hongos.

Un éter cíclico importante, zoapatanol (1), ha sido aislado de una planta mexicana, la *Montanoa tomentosa*, la cual es usada como abortiva.

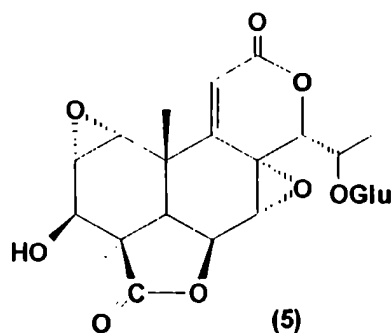


El estudio fitoquímico del género *Labiatae* ha rendido nuevos diterpenoides bicíclicos y tetracíclicos.

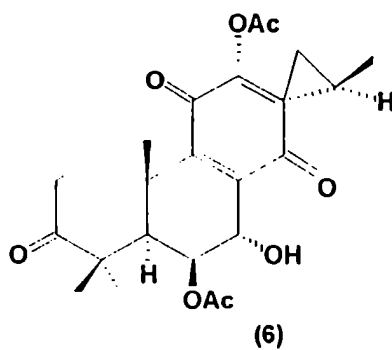
Algunos clerodanos bicíclicos han atraído interés como insecticidas. El estudio de las especies *Ajuga*, *Salvia* y *Teucrium* han dado productos del tipo (3) y (4). Clerodin presenta la configuración absoluta que muestra (2).



Dentro de los diterpenos tricíclicos, un número de lactonas citotóxicas han sido aisladas de especies *Podocarpus*. Algunas de ellas poseen también propiedades de reguladoras de crecimiento, entre las que se puede ejemplificar con la inumakilactona A (5).

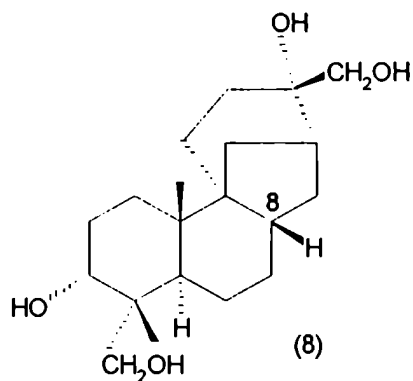


Las especies *Coleus* y *Plectranthus* han sido también una fuente de quinonas diterpenoidales altamente oxigenadas tales como barbatusin (6).

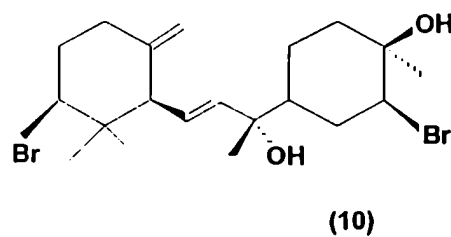
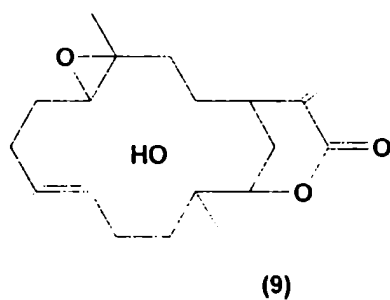


También dentro del género *Labiatae*, de las especies *Sideritis* e *Isodon*, se han aislado diterpenos tetracíclicos, altamente oxigenados. La mayoría de los mismos poseen configuración *ent*, con la esteoquímica A/B antipodal.

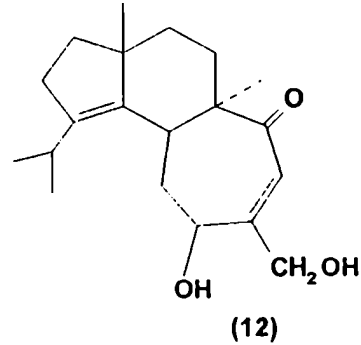
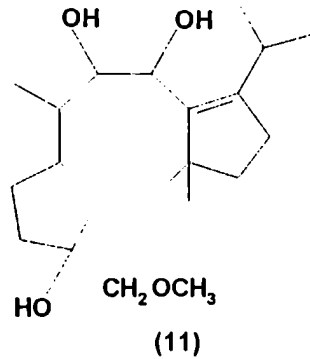
El aphidicodin (**8**), obtenido del hongo *Cephalosporium aphidicola* presenta esteoquímica normal (tipo esteroide) y actúa como antibiótico antitumoral.



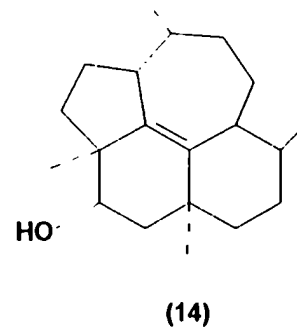
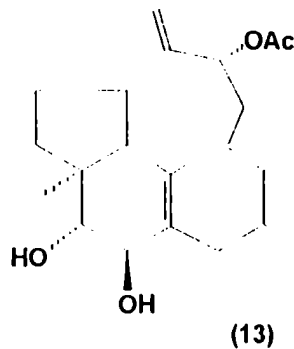
De organismos marinos se han aislado estructuras diterpénicas de esqueleto macrocíclico tipo cembrano. Se ejemplifica con sinularin (**9**), que fue aislado de *Sinularia flexibilis*. Obtusadiol (**10**), que se obtuvo del alga *Laurencia obtusa*, al igual que los monoterpénidos de fuentes marinas, posee halógeno.



En hongos se han encontrado estructuras diterpenoides interesantes: cotylenins y cyathins (11 y 12).

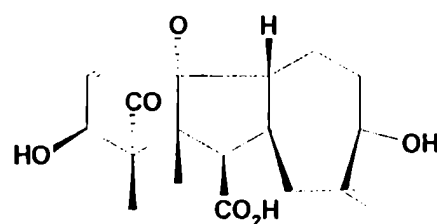


Los diterpenoides también forman parte de las secreciones defensivas de insectos. Las termitas producen un interesante grupo de alcoholes de trinervitano ejemplificados por los compuestos (13) y (14).



Las giberelinas, hormonas de crecimiento vegetal, son diterpenoides tetracíclicos (Zamir *et al.*, 1980). Estos productos forman dos series, una de 20 carbonos y otra de 19 carbonos (GA₃, ácido giberélico) (16, 15). Aunque existen diterpenoides policíclicos, estructuralmente similares, todas las hormonas giberelínicas aisladas de plantas pertenecen a estas series (Díaz *et al.*, 1985).

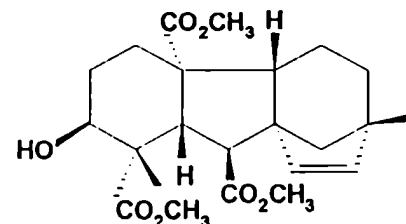
Estas hormonas de desarrollo fueron descubiertas cuando se investigó la muerte de plantas de arroz en Oriente. Este mal se caracterizaba por el desmedido crecimiento de las semillas de arroz, las cuales nunca llegaban a la madurez. Al examinar las plantas, se descubrió que esta anomalía era causada por un hongo, el *Giberella fujikuroi*, parásito del cereal, y un metabolito que fue llamado giberelina. Las giberelinas son importantes como hormonas de crecimiento de las plantas, que controlan la elongación de la célula. Recientemente se ha descubierto otra fuente de giberelinas en el hongo *Sphaceloma manihoticola*. Más tarde se encontró que las giberelinas son producidas universalmente por las plantas en pequeñas proporciones como hormonas de crecimiento y poseen importantes funciones regulatorias. Se han realizado estudios aplicando giberelinas en forma exógena y se observó la respuesta de las plantas inoculadas. La GA₃ se usa comercialmente en prácticas de horticultura. (Haslam, 1985; Thomson, 1985 ; Torssell, 1981).



(15)

GA₃ (Ac. Giberélico.)

(Series de C-19.)



(16)

A₁₃

(Series de C-20.)

BIOSINTESIS DE DITERPENOS DE TIPO KAURENO.

El geranylgeranilpirofosfato es el precursor de los diterpenos. La ciclación normalmente procede directamente hacia el sistema decalina, el cual es subsecuentemente neutralizado por adición de agua o eliminación de hidrógeno, muchas veces vía reordenamientos de Wagner-Meerwein. La configuración de los carbonos 5, 8, 9, y 10 (numeración de esteroides) es determinada por el plegamiento de la cadena de *trans-trans* geranylgeraniol. Una configuración silla-silla da el esqueleto labdano. La hidratación del carbonio del C-8 produce labdadienol pirofosfato, el cual es un importante intermediario para la biosíntesis de diterpenos

tri y tetracíclicos. Un mecanismo concertado de 5 pasos de corrimientos de tipo Wagner-Meerwein, con inversión de configuración en cada centro conduce al esqueleto de ácido hardwickiico. Las modificaciones de la cadena son menos estereoespecíficas.

En diterpenos es común que ambas formas enantioméricas se produzcan ocasionalmente en las mismas especies. Las ciclaciones han sido imitadas con éxito *in vitro*, y consecuentemente el modo de ciclación no está enteramente determinado por la topología de la enzima pero está electrónicamente controlado (Trainor *et al.*; 1980; Parry *et al.*, 1980). También existen diterpenos tetracíclicos de conformación normal, como los derivados del filocladeno que requieren una ciclación que conduce a intermediarios 5α , 10β (Fig 1).

Los diterpenos tetra y pentacíclicos probablemente tengan un origen biogenético común. El esquema biogenético de Wenkert emplea un ión carbonio no clásico proveniente de pimaradieno protonado, el cual colapsaría a los tetracíclicos kaureno, atisireno y estaqueno o ciclaría al pentacíclico traquilobano (St. Pyrek, 1970; Wenkert, 1955; Hanson, 1968; Coates *et al.*, 1969).

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA DE KAURENOS.

Los compuestos más difundidos en plantas superiores son los derivados de los esqueletos de kaureno (**18**), beyereno (**19**), atisireno (**21**), y traquilobano (**20**).

En general, las señales de los grupos metilo de C-4 no son afectados por el tipo de esqueleto de la molécula, ya que los anillos A y B son idénticos para todos los compuestos de la serie (*enantio* 5β , 10α , C-19 axial, C-18 ecuatorial), estos metilos para la serie *ent* aparecen entre δ 0,85 y 0,81 (Henrick *et al.*, 1964; Piozzi *et al.*, 1972).

Cuando la molécula posee un grupo funcional oxigenado sobre C-4, es posible determinar si éste está ubicado en C-18 o C-19; la reducción del grupo funcional a hidroximetilo produce en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ un sistema AB con $J=11$ Hz que aparece en distintas posiciones según sea ecuatorial o axial.

En los compuestos derivados de los cuatro esqueletos mencionados, que poseen un grupo oxigenado axial y un metilo ecuatorial, ambos sobre C-4, este último posee los siguientes desplazamientos químicos (St Pyrek, 1970; Henrick *et al.*, 1964; Piozzi *et al.*, 1972; Bjeldanes *et al.*, 1972) :

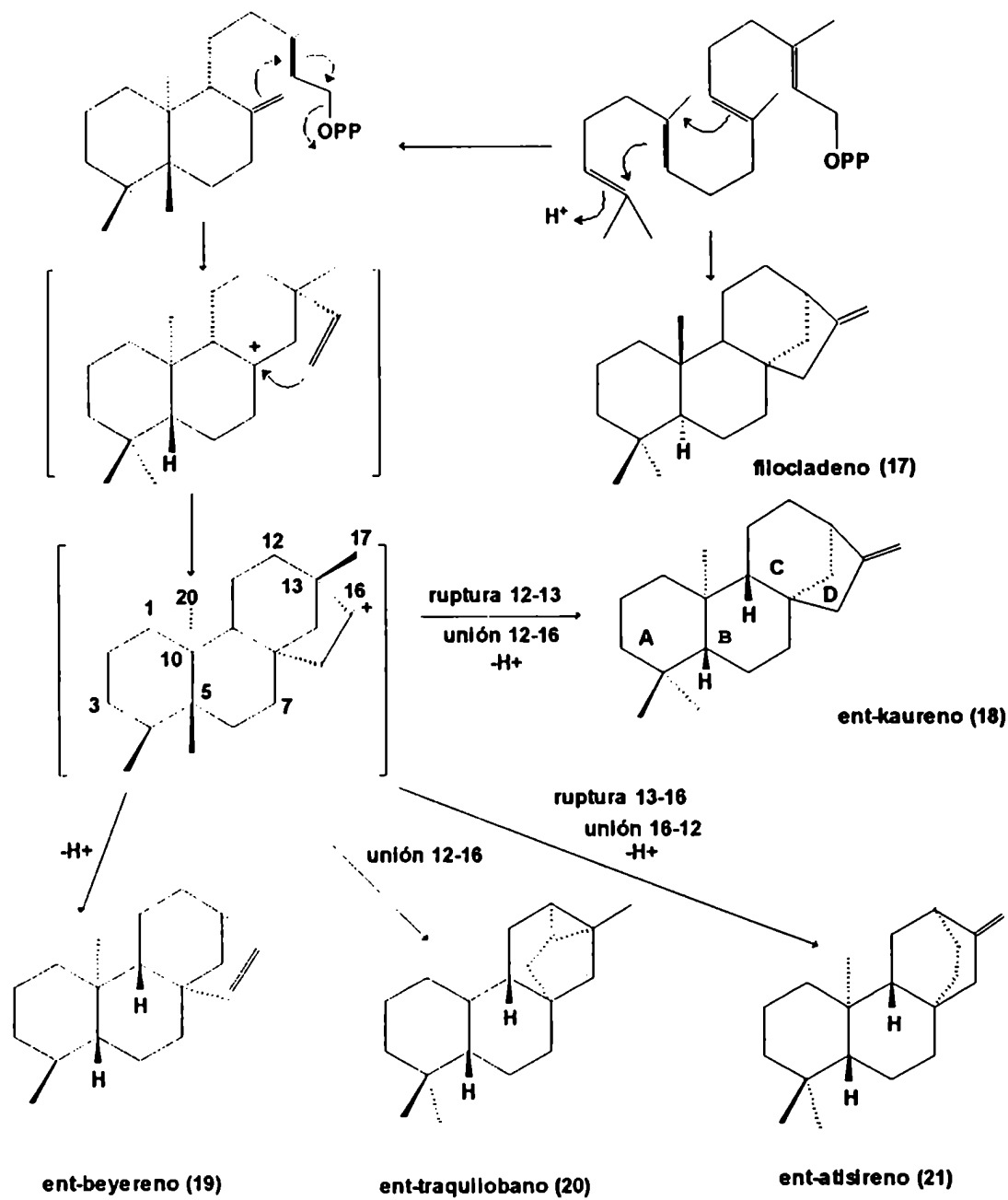


Fig 1: Biosíntesis de diterpenos tetracíclicos.

Variación del valor de resonancia del grupo metilo ecuatorial sobre C-4 en función de la agrupación presente en el mismo carbono con orientación axial.

Grupo axial	δ Me ecuatorial
CH ₃	0,83
CH ₂ OH	0,92-0,96
CH ₂ OAc	0,90-0,94
CH ₂ Ac	0,99
CHO	1,24
COOH	1,12-1,15

El desplazamiento químico de Me-20 puede dar indicios sobre las posibles variaciones en el anillo C. Así entonces en el kaureno (**18**) aparece a δ 1,00, mientras que en el filocladeno (**17**) a δ 0,89, y a idéntico valor en el dihidrofilocladeno; esto es debido a que en el kaureno (anillos A, B y C con configuración *trans-anti-cis*) existe una interacción 1-3 di axial entre Me-20 y el CH₂-12 que no se encuentra en los derivados del filocladeno de configuración *trans-anti-trans* (5 α , 10 β) (Henrick *et al.*, 1964).

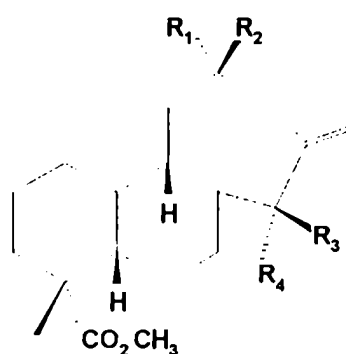
La presencia de grupos oxigenados en C-19 axial también produce variaciones en la posición de la señal del Me-20 para los derivados del kaureno. La metilación de un grupo carboxilo axial en C-4 produce una protección sobre el Me-20 de aproximadamente 0,12 ppm, mientras que este efecto no se observa para un carboxilo ecuatorial, permitiendo así decidir la posición del sustituyente de C-4. Se supone que en la conformación más estable del grupo carboximetilo, el Me-20 se encuentra en la zona de desprotección del grupo carbonilo.

En los kaurenos no influye sobre el Me-20 la presencia de un doble enlace en C-6 ni grupos hidroxilo o éster en las posiciones 3 α , 3 β , 15 α ó 15 β .

Valores de resonancia del Me-20 en relación a grupos funcionales sobre C-4.

Grupo funcional sobre C-4	Valor δ del Me-20
Me	1,00
CH ₂ OH	0,99
CH ₂ OAc	1,02
CHO	0,86
COOH	0,94
COOMe	0,82

En los derivados del kaureno (**18**), se aprecia que las señales de los dos H-17 aparecen como un singulete ancho a δ 4,8 diferenciándose entre sí por introducción de grupos oxigenados en C-15. Por ejemplo, en el ácido 15 β -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**22**) aparecen a δ 4,98 y 5,19 (Cannon *et al.*, 1966) y en el 15-ceto derivado **23** a δ 5,2 y 5,9. También en los derivados de kaureno con un grupo funcional en C-12 pueden distinguirse los H-17, como por ejemplo en el 12-ceto-grandiflorenato de metilo (**24**) (Bohlmann *et al.*, 1978) donde éstos aparecen como dos singuletes anchos a δ 5,0 y 5,6 respectivamente.



(22) R₁=R₂=R₄=H ; R₃=AcO-

(23) R₁=R₂=H; R₃,R₄=O

(24) R₁=R₂=O; R₃=R₄=H Δ (9,11)

(25) R₁=R₂=R₄=H; R₃= β -OH

El filocladeno (**17**) se diferencia del kaureno (**18**) por las señales de los hidrógenos alílicos; mientras que en el kaureno el H-13 aparece a δ 2,65 como un

(s.a.), y los H-15 a δ 2,06 (s.a.), en el filocladeno el H-13 se encuentra a δ 2,95 (s.a.) y los H-15 a δ 2,58 (m.a.) (Henrick *et al.*, 1964).

Los otros tres componentes de la serie *ent*, beyereno (**19**), traquilobano (**20**) y atisireno (**21**) se diferencian del kaureno por los hidrógenos olefínicos y por los del ciclopropano para el traquilobano (**20**), que no presenta hidrógenos olefínicos, siendo su señal característica la de los hidrógenos del anillo ciclopropano que aparecen entre δ 0,55 y 0,90. Los hidrógenos olefínicos del beyereno aparecen como un sistema AB característico a δ 5,48 y 5,70 con $J=6$ Hz que, junto con la presencia de Me-17 a δ 1,0 permite distinguir este esqueleto del kaureno (**18**) y del atisireno (**21**) (Hanson, 1968; Mc Crindle *et al.*, 1968; Hasan *et al.*, 1982).

Los derivados del atisireno se caracterizan por poseer los dos hidrógenos vinílicos bien diferenciados que presentan dos señales; una como un singulete ancho a δ 4,7 y otra a δ 4,55 mejor resuelta, como un cuarteto con $J=2$ Hz (Pinar *et al.*, 1978). Esto se debe a la diferencia de entorno que tienen estos hidrógenos por ser todos anillos de seis miembros a diferencia del kaureno en el que el doble enlace exocíclico está sobre el anillo de cinco miembros.

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO DE KAURENOS.

La espectroscopía de ^{13}C -RMN es de gran utilidad en el campo de los diterpenos tetracíclicos. Conocido el espectro del compuesto base, se pueden asignar las señales de cualquier derivado, comparando su espectro con el calculado usando modelos simples, obteniéndose así las posiciones de los grupos funcionales de la molécula (Von Carsten Lichterfelde *et al.*, 1977). Dada su similitud, todos los hidrocarburos presentan para los carbonos del anillo A y sus apéndices, señales prácticamente idénticas (Von Carsten-Lichterfelde *et al.*, 1977; Yamasaki *et al.*, 1976).

La introducción de un grupo carboxilo en C-19 trae como consecuencia cambios idénticos en todos los esqueletos, paralelos a los que ocurren al pasar de cualquier hidrocarburo al correspondiente ácido; el C- α se desprotege aproximadamente en 10 ppm, y el C- β se protege en 7 ppm (Breitmaier *et al.*, 1974). La eliminación del Me-19, por transformación a grupo carboxilo hace desaparecer la interacción H-C (Beierbeck *et al.*, 1977) de los hidrógenos de este metilo con el H-3 α

produciendo así la protección de C-3 en 3,5 ppm. Por la misma razón que el C-3, el C-18 se protege en 4,4 ppm.

Valores de resonancia de carbonos del anillo A de kaureno, atisireno y beyereno.

C	KAURENO (18)	ATISIRENO (21)	BEYERENO (19)
1	40,5	39,6	39,3
2	18,7	18,2	18,2
3	42,1	42,3	42,2
4	33,3	33,1	33,3
5	56,3	56,4	56,1
10	39,4	37,4	37,4
18	33,7	33,7	33,8
19	21,7	21,7	22,0

En el kaureno (18), el H-5 no tiene interacción con los H-19 y por lo tanto esta transformación no afecta al C-5 que se protege sólo en 0,8 ppm. Las señales de los C-6 y 7 son poco sensibles a los cambios de esqueleto que ocurren en los anillos C y D.

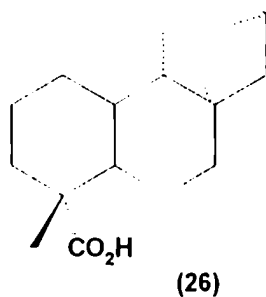
El C-8 varía en un amplio rango ya que es el punto donde se originan los distintos anillos que caracterizan a cada esqueleto (Hasan *et al.*, 1982; Yamasaki *et al.* 1976).

El C-9 permanece invariable a δ 52-53 en los compuestos con fusión B/C *trans*, mientras que en el kaureno aparece a δ 56,1, por ser menor en este último la distancia que existe entre el H-15 β y el H-9 β , lo que introduce una interacción de tipo H-C de mayor intensidad.

El C-20 aparece en el kaureno a δ 17,6, mientras que para los otros componentes de la serie aparece a campos mayores (ác. traquilobánico (26) a δ 12,5 y en el atisireno (21) a δ 13,9) (Eliel *et al.*, 1975; Crews *et al.*, 1978; Wiseman *et al.*, 1977). En los carbonos de los anillos C y D se encuentran diferencias significativas que permiten distinguir los distintos tipos de esqueleto, como se concluye de los datos expuestos en la tabla:

Valores de resonancia para aquellos carbonos involucrados en los anillos B y C.

C	KAURENO	ATISIRENO	AC.TRAQUILOBANICO	BEYERENO
6	20,3	18,8	21,8	20,3
7	41,3	9,5	39,2	37,4
8	44,3	33,5	40,8	49,1
9	56,1	52,9	52,2	53,0
20	17,6	13,9	12,5	15,1



Valores de resonancia para carbonos involucrados en anillos C y D.

C	KAURENO	ATISIRENO	AC.TRAQUILOBANICO	BEYERENO
11	18,1	28,7	19,7	20,5
12	33,3	36,6	20,6	33,7
13	44,0	28,7	24,3	43,6
14	39,9	27,4	33,1	61,3
15	49,2	48,4	50,4	135,2
16	156,0	152,7	22,4	136,1
17	102,8	104,2	20,6	25,0

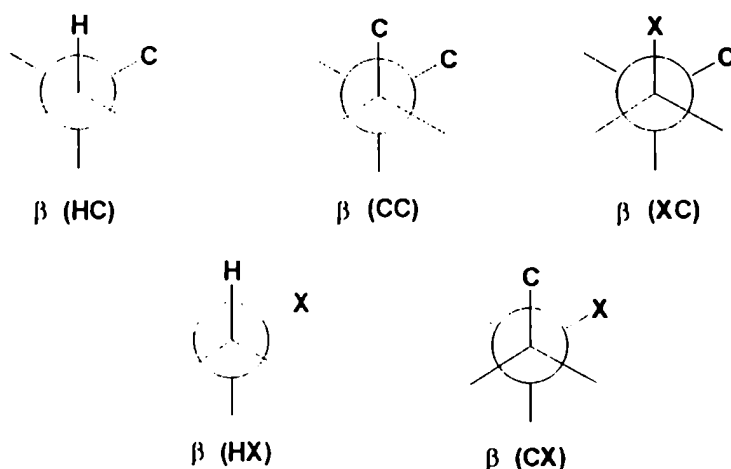
Para el traquilobano (**20**), la desaparición del doble enlace exocíclico y la aparición del Me-17, es el rasgo distintivo para este esqueleto. El C-16 a diferencia de los otros tres, presenta un valor muy bajo para un carbono cuaternario, que usualmente se encuentra entre δ 30 y 40 lo que tiene valor diagnóstico indicando la presencia del ciclopropano. El C-13 y el C-12 se desplazan a campos altos, especialmente este último por la desaparición de la olefina. El C-14 aparece a campos más bajos ya que ahora forma parte de un anillo de 5 miembros.

En el beyereno (**19**), el Me-17 se encuentra a δ 25 y los carbonos olefínicos a δ 135,2 y 136,1, característicos de este tipo de sustitución. El C-13 aparece ahora a campos más bajos por estar α al doble enlace, casi como en el kaureno (**18**). El C-14 del beyereno se encuentra a campos muy bajos con respecto a los demás, esto se explica por las interacciones C-H entre el H-14 β y los hidrógenos 7 β , 9, 12 β , y 17 y entre el H-14 α y 7 α y 17. Esta señal es útil para este tipo de esqueleto, ya que son pocas las que aparecen a campos tan bajos para un carbono sin funcionalizar.

Como los diterpenos kaurenoides difieren uno de otro por su patrón de oxidación, se realizaron estudios en el que observan las variaciones de las señales de los carbonos al introducir distintos sustituyentes oxigenados al esqueleto base (Patra *et al.*, 1980; Hanson *et al.*, 1976). Se verificó que la introducción de un grupo hidroxilo ecuatorial desprotege al C- α , y protege al C- β , lo mismo ocurre cuando el grupo es acetato. Corrimientos similares han sido informados en sistemas esteroidales rígidos cuando se introduce un hidroxilo o acetato en posición axial (Stothers, 1972). Esto sugiere claramente que no sólo la posición sino la estereoquímica de la misma en los anillos A, B y C puede ser determinada por comparación de sus espectros de ^{13}C -RMN con los de compuestos previamente informados.

Aunque la oxidación en C-19 es probablemente la más común, un número importante de compuestos pertenecientes a esta familia, la posee en C-18. El C-18 ecuatorial, cuando está oxidado se encuentra a campos menores que el axial (González *et al.*, 1981). Como se aprecia, existe una protección para el C-18. Esta diferencia puede explicarse en función de lo que fue llamado efecto *gamma-gauche*. Este efecto ha sido usado para asignar estereoquímicamente la orientación del sustituyente para una dada posición en un anillo de ciclohexano (Crews *et al.*, 1978). Beierbeck y Saunders (Beierbeck *et al.*, 1975) presentaron una nueva interpretación para este efecto β en el espectro de ^{13}C , en base a interacciones *gauche* entre hidrógenos, carbonos u otros sustituyentes en el carbono en cuestión y carbonos o

sustituyentes en posición β . En sucesivos trabajos (Beierbeck *et al.*, 1976) los investigadores detallaron aún más estas interacciones.



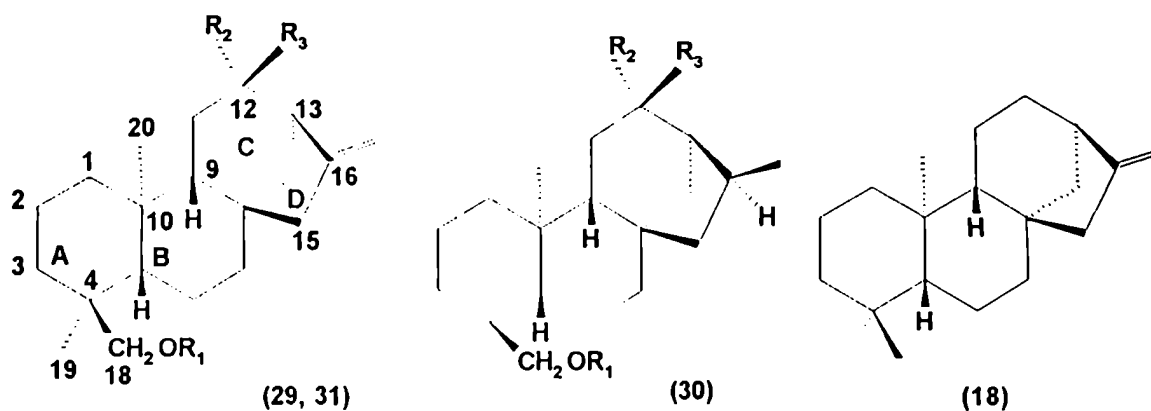
El efecto β (HC) fue adjudicado a una interacción *sin*-1,3-diaxial entre el hidrógeno del carbono observado y un hidrógeno sobre el carbono β , mientras que el efecto *gamma* (del mismo orden pero de signo contrario) fue descartado como un efecto del sustituyente en sí, e interpretado como la eliminación de un efecto β , debido al reemplazo del hidrógeno del C- β . Para sustituyentes distintos de carbono se agregó además una corrección por efecto inductivo.

Finalmente, (Beierbeck *et al.*, 1977) determinaron los valores numéricos para efectos β , γ inductivo y δ en sistemas de anillos de seis miembros en conformación silla. También calcularon para estos sistemas, los parámetros correspondientes a hidroxilos, aminas, carbonilos y olefinas. En base a dichos valores es posible predecir en forma semiempírica el desplazamiento químico de los carbonos de sistemas de ciclohexanos (por ejemplo anillos A, B, y C de compuestos terpenoides).

La posición de las resonancias para C-3, C-5, C-18 y C-19 muestran claramente el efecto protector cuando un hidroxilo se encuentra como sustituyente en esas posiciones como consecuencia de la eliminación de una de las interacciones H-H 1-3 diaxial. Existe una marcada diferencia en los espectros cuando el hidroxilo se encuentra sobre los carbonos 18 ó 19. Esta diferencia se aprecia de los datos de la tabla en la que se comparan los espectros de la estructura base y los compuestos sustituidos en C-18 y C-19 respectivamente.

Valores de resonancia de los carbonos de kaureno y sus derivados hidroxilados en C-18 y C-19

C	16-en-kaureno	18-OH-16-en-kaureno	19-OH-16-en-kaureno
1	41,3	39,9	40,5
2	18,7	18,0	18,3
3	42,0	35,3	35,6
4	33,3	37,6	38,7
5	56,1	49,3	56,8
6	20,3	20,0	20,5
7	40,4	39,9	41,6
8	44,2	44,2	44,2
9	56,1	56,0	56,2
10	39,3	39,2	39,2
11	18,1	18,2	18,2
12	33,3	33,3	33,3
13	44,2	44,0	44,0
14	39,9	40,9	39,7
15	49,2	49,3	49,1
16	156,0	155,8	155,8
17	102,8	103,0	103,0
18	33,7	72,1	27,1
19	21,7	17,5	65,4
20	17,6	18,2	18,5



(29) $R_1=R_3=H$, $R_2=OH$

(31) $R_3=H$; $R_1=COCH_3$; $R_2=OCOCH_3$

(30) $R_1=R_3=H$; $R_2=OH$

Se ha demostrado con derivados deuterados que, en otros tipos de diterpenos con anillos A y B similares a los compuestos aquí estudiados (Audier *et al.*, 1966), el grupo metilo que se elimina es esencialmente el angular de C-10. El ión M-18, originado por eliminación de agua, se observa en (29) y (30), y en (31) aparece su equivalente por pérdida de ácido acético.

La existencia de dos grupos alcohólicos en (29) y (30) y dos acetatos en (31), justifica la aparición de fragmentos a M-36 y M-120 respectivamente (Fig.2, ión C). Asimismo, a partir de los iones B y C se originan los D (M-18-15; M-60-15) y E (M-36-15; M-120-15).

De acuerdo a lo expuesto en la Fig 2 la eliminación de dos moléculas de agua se ve muy poco favorecida. En el caso particular de (31) la pérdida de dos moléculas de acético es el pico base del espectro. Esta diferencia se debe a que las eliminaciones de agua y ácido acético siguen distintos mecanismos. En función de esto se supone que en el caso de (29) y (30), el ión a M-18 se origina preferentemente por eliminación del hidroxilo secundario de C-12 mientras que el M-36 se forma a partir del anterior por pérdida del hidroxilo primario de C-18. Se supone que la eliminación de agua en un agrupamiento $-CH_2OH$ ecuatorial se produce principalmente con el hidrógeno del C-5 tal como se representa en la Fig 2 (Rodríguez González, 1971). En éste la formulación del ión con el doble enlace entre los C-11 y 12 se postula por la imposibilidad de situarlo entre los 12 y 13 (Jefferies *et al.* 1968).

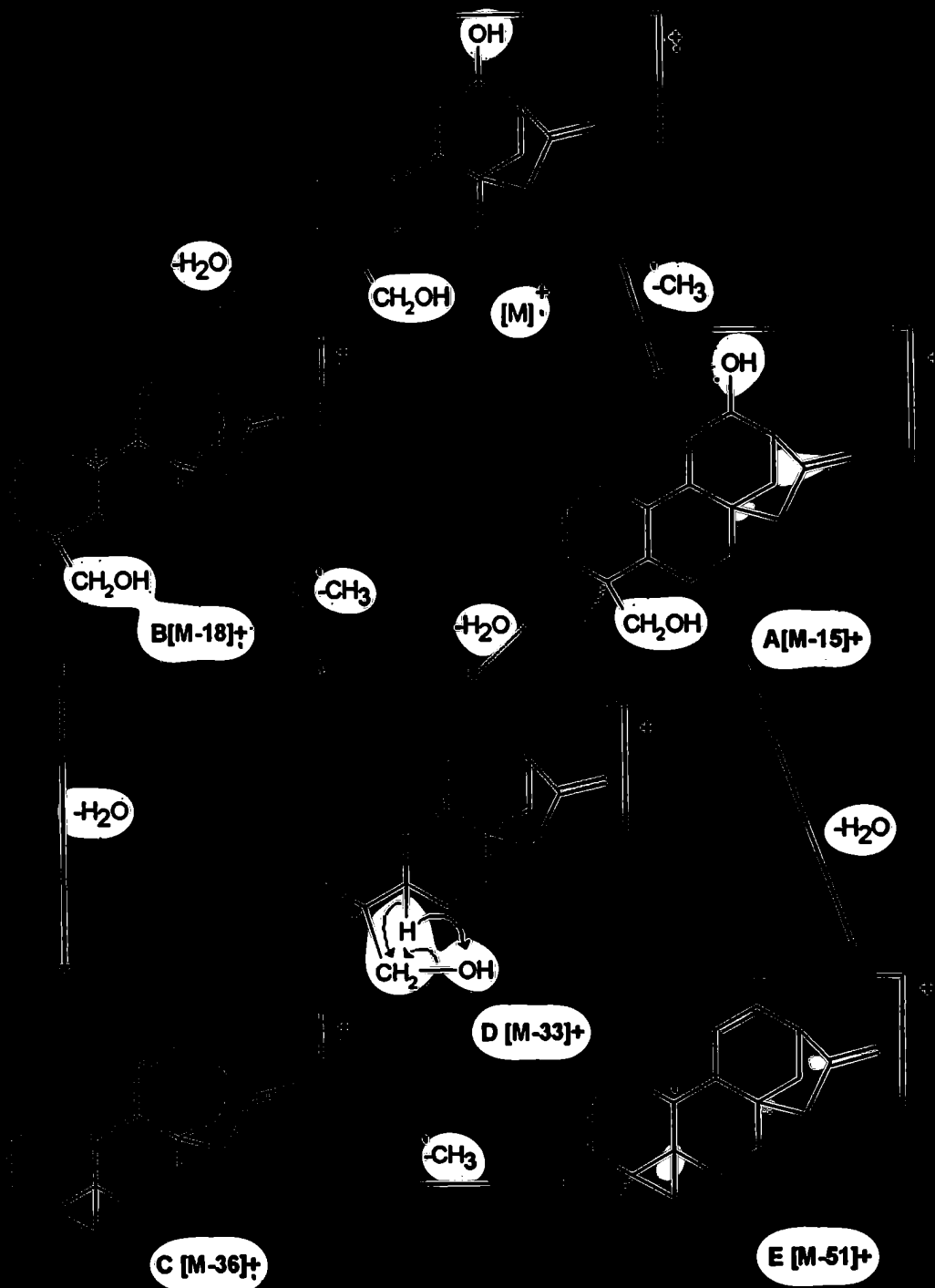


FIG 2

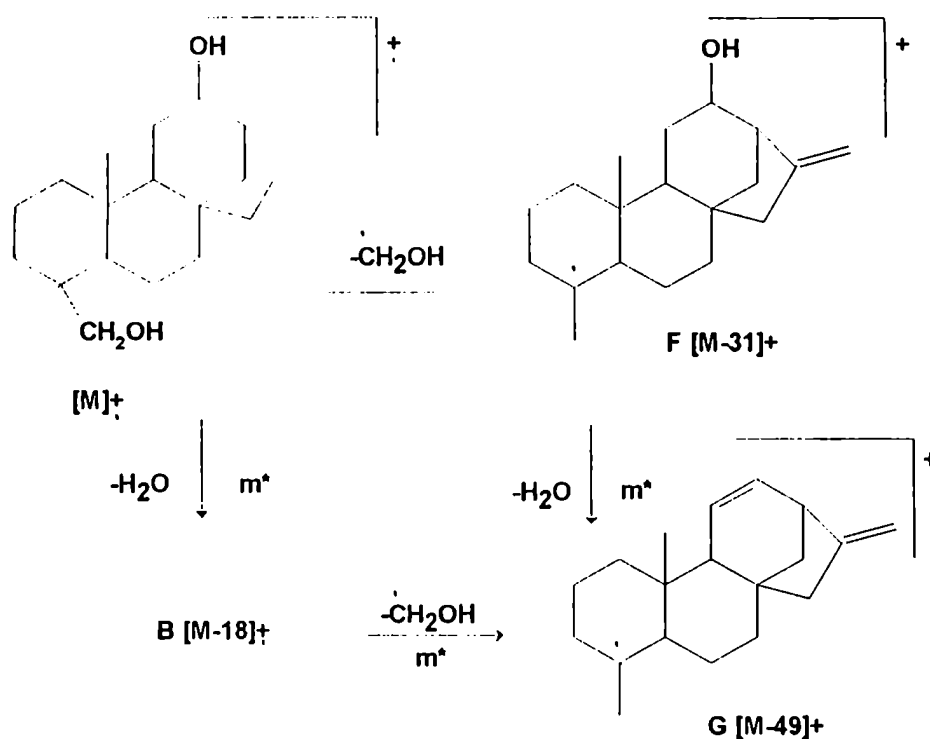


FIG 3

El ion F (M-31) se origina en los casos de (29) y (30), por pérdida de CH_2OH (ver fig 3), mientras que en (31) no aparece el ión equivalente, que correspondería a la eliminación de $\text{CH}_3\text{COOCH}_2$ (73 uma). Tanto el ión B como el F dan el G (M-31-18), que en (31) aparece por eliminación de AcOH y AcOCH_2 . Estas transiciones vienen ligadas a los correspondientes iones metaestables, con la secuencia de fragmentaciones señaladas se confirma la hipótesis anterior de que el ión M-18 procede esencialmente de la deshidratación del hidroxilo secundario.

Rupturas para el ciclo B.

Las dobles fisiones del anillo B que la bibliografía señala para diterpenos bicíclicos (Chizhov *et al.* 1969) se producen también en todos los derivados de (-)-kaurano estudiados por Rodríguez González (Rodríguez González *et al.*, 1971), siendo los iones generados en ellas de abundancia considerable. En la Fig.4 se representan estas fragmentaciones; en ella se formula la génesis del ión P a partir del ión O porque en los espectros aparecen claramente los picos metaestables que justifican la transición.

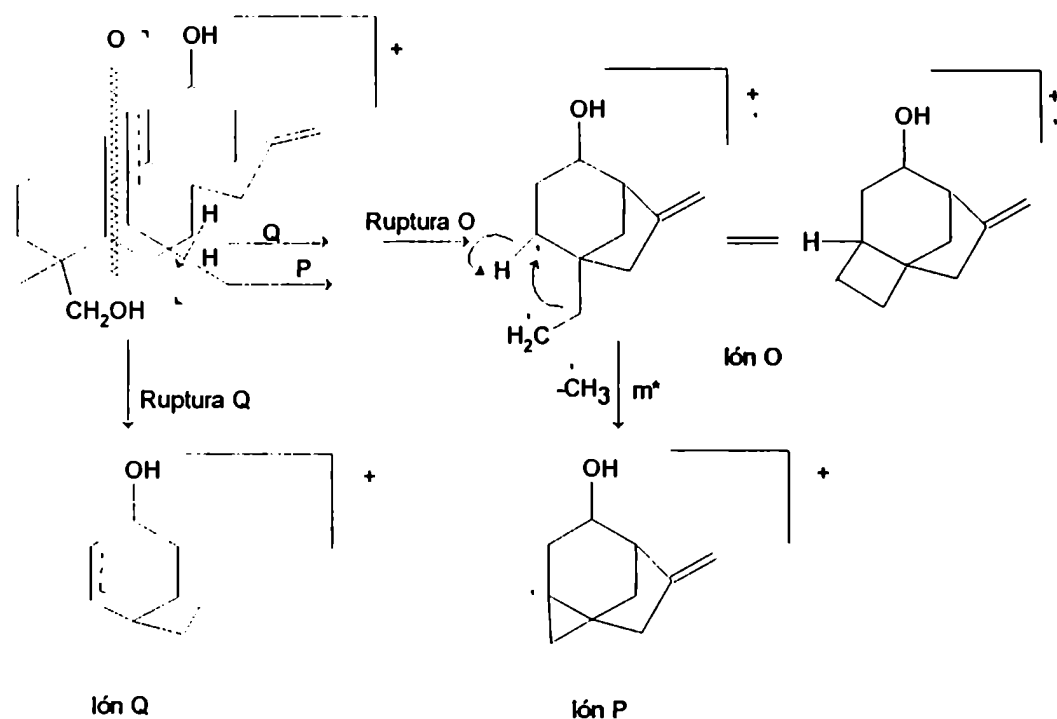
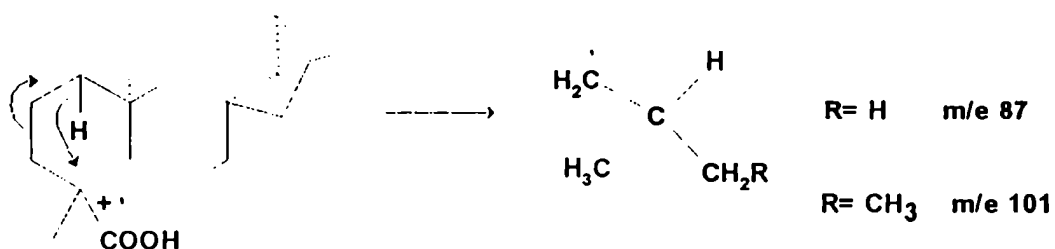


FIG 4

La existencia de un doble enlace entre los C-16 y 17 no parece inducir rupturas de importancia, ya que al comparar los espectros de (29) y (30) la única diferencia sustancial es un pico que para (29) aparece a m/z 206 con una intensidad del 4,6% que no aparece en (30).

Cuando existe sobre C-4 un carboxilato se produce una ruptura de valor diagnóstico de m/z 87 (m/z 101 en los ésteres metílicos).



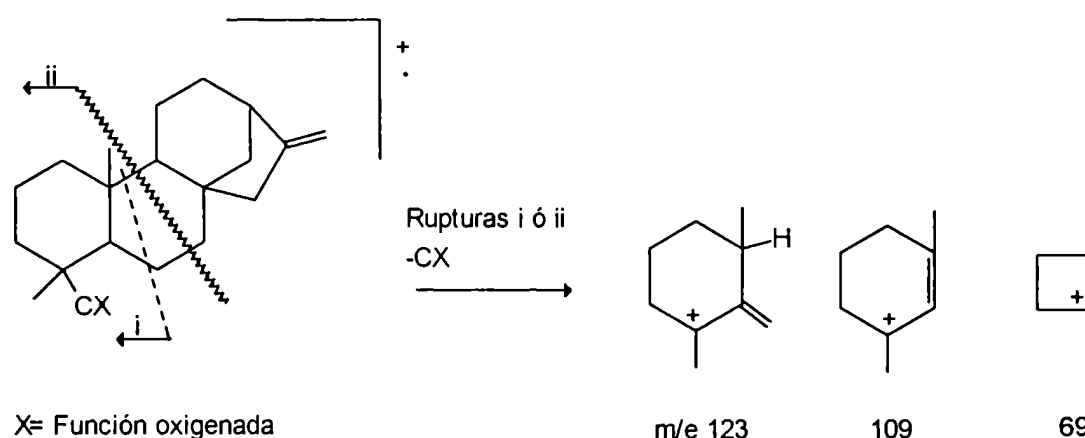
DESCRIPCION DE LA LABOR REALIZADA.

La fracción H-3 se purificó por columna de sílica gel gel obteniéndose 7 fracciones (Ver Parte Experimental). De todas ellas, la que presentaba una sola mancha por CCD era la H-3 (20-22). Revelaba violeta con ácido sulfúrico 50% y por CG daba un pico mayoritario, que al ser analizado por CG-EM presentó un M^+ a m/z 204. Se analizó por CLAR para confirmar su pureza. Se observó una agrupación de picos, posiblemente subdivisible en tres, y un cuarto pico, bien resuelto y separado de los anteriores por varios minutos. Todos ellos fueron purificados nuevamente por CLAR usando una columna de mayor resolución. El cuarto pico seguía manteniendo su individualidad. La primera agrupación fue repurificada por CLAR buscando condiciones experimentales (cambio de solvente, flujo etc.) para lograr una mejor resolución. Esta agrupación resultó estar constituida por cuatro picos, no tres como se podía suponer a través del aspecto del cromatograma obtenido previamente. Dada la poca masa de muestra inicial (6,6 mg) se decidió no continuar con el proceso de elucidación estructural de los compuestos que acompañaban al cuarto pico. Los esfuerzos se concentraron en elucidar la estructura de este último.

Por el EM se determinó que el peso molecular era de 286 (fórmula molecular $C_{20}H_{30}O$), por la cual el pico con m/z 204 que se observaba antes de la purificación por CLAR, era de las impurezas que lo acompañaban (Ver Parte Experimental, Planta salteña, pág 166).

Por su espectro de masa se determinó que el compuesto no tenía funcionalizado los carbonos que forman los ciclos, salvo posiblemente uno de los grupos metilo posicionados sobre el C-4, por lo que no se observaban muchas de las posibles rupturas que se describieron para aquellos casos. Al ser esta función oxigenada no un alcohol sino un aldehído, se observaban como fragmentos de baja intensidad la pérdida de 28 uma que puede ser adjudicada a CO. Era más importante aún la pérdida de 29 uma que se adjudicó a la pérdida de la función aldehído. De intensidad comparable a la pérdida de CO era la de un grupo metilo, que si bien en principio es inespecífica, según Rodríguez González (Rodríguez González, 1971) en compuestos deuterados de otros tipos de diterpenos con anillos A y B similares a los del kaureno, la pérdida es esencialmente la del metilo angular en C-10. El fragmento m/z 243 provenía de una pérdida de 43 uma. Para el kaur-16-eno, el M-43 se obtendría de la remoción de los carbonos 1, 2 y 3. En este caso podría provenir del mismo tipo de ruptura (Audier *et al.*, 1964 y 1966). Para este

compuesto el M^+ es más importante que el $M-Me$, mientras que para el (-)-kaur-16-eno esta relación se invierte, si bien ambos fragmentos son de baja intensidad (Rodríguez González, 1971). Esto puede deberse a que el compuesto en estudio está funcionalizado, por lo que la importancia de esta ruptura es menor. En la zona de masas bajas se apreciaba el fragmento de m/z 123 y otros presentes en casi todos los compuestos de este tipo pero variando el orden de abundancias. Esta igualdad de fragmentación provendría de aquellos trozos de estructura comunes a estos compuestos o sea los carbonos constituyentes del anillo A o parte de ellos y que no conservan la función oxigenada. Se observa el mismo tipo de espectro para la zona baja en compuestos de la familia de productos oxigenados en carbonos 6, 18, 19 y/o 20. En función de esto se pudo postular que el fragmento de m/z 123 se originaría por una ruptura del tipo de la del esquema:



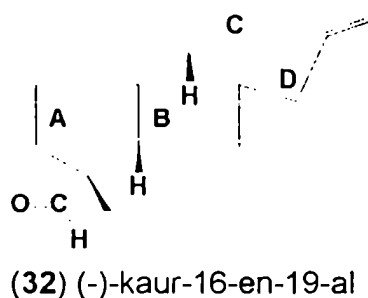
El espectro IR del compuesto en estudio presentaba tres bandas importantes a 2950, a 1730 y a 890 cm^{-1} , adjudicadas al estiramiento C-H, a una función carbonilo y a un doble enlace exocíclico respectivamente.

El espectro de $^1\text{H-RMN}$, mostró señales características de dos metilos angulares, un doble enlace exocíclico y un doblete que integraba para un hidrógeno a campos muy bajos con respecto a las demás señales presentes en el espectro, con $J = 1,5$ Hz. Todos estos datos estaban de acuerdo con la estructura de un kaur-16-en diterpeno, probablemente *enantió* como la mayoría de los aislados de las Compuestas (*Wedelia glauca*, *Sideritis canariensis*, *Calocephalus knapii*) (Oberti *et al.*, 1980; Fraga *et al.*, 1991, Jakupovic *et al.*, 1991). Esto se afirma al observar la

señal correspondiente a los hidrógenos alílicos (H-13 y 15). Estos en el filocladeno aparecen a δ 2,95 y δ 2,58 como singulete ancho y multiplete ancho respectivamente, mientras que en el kaureno aparecen a δ 2,65 y δ 2,06, ambos como singulete ancho (Henrick *et al.*, 1964). Se descartó el *ent*-beyereno y el *ent*-traquilobano porque deberían presentar un metilo más que el kaureno. En el caso particular del *ent*-beyereno es característica la señal del grupo metilo en 17, que aparece a δ 1,0 y los hidrógenos olefínicos distinguibles por formar un sistema AB característico, con $J = 6$ Hz a diferencia de los hidrógenos olefínicos geminales del kaurénico que forman un singulete ancho a δ 4,75.

No era posible adjudicar los datos al traquilobano porque aparte de no tener hidrógenos olefínicos no se observaban las señales características del ciclopropano a campos muy altos. Tampoco se podía hacerlo para el atisireno porque en éste están diferenciados los hidrógenos olefínicos dando dos señales distintas, un singulete ancho a δ 4,70 y otra a δ 4,55 como un cuarteto con $J = 2$ Hz (Pinar *et al.*, 1978).

El carbonilo debía estar sobre uno de los metilos porque era aldehídico. Si la función, en vez de carbonilo hubiera sido alcohol, hubiera aparecido un doblete característico con $J=11$ Hz. En función de los datos obtenidos se propuso como posible estructura del compuesto hallado la del **aldehido kaurénico (32)**.



Los datos encontrados en bibliografía coincidían con los determinados experimentalmente para el compuesto aislado de la planta en estudio.

La bibliografía correspondiente señala que datos registrados coincidían con los informados por Piozzi (Piozzi *et al.*, 1971), con los de Bohlmann (Bohlmann *et al.* 1973) y con Barrero (Barrero *et al.* 1988).

En el presente trabajo se informa la presencia de dos metilos terciarios y dos grupos de hidrógenos, dos hidrógenos olefínicos y la señal característica de aldehído a campos bajos, un doblete con $J=1,5$ Hz del hidrógeno aldehídico (ver Parte Experimental, pág 167).

Piozzi (Piozzi *et al.*, 1971) informa además del ^1H -RMN, su punto de fusión, su poder rotatorio, y sus espectros de masa e infrarrojo. Estos dos últimos también coinciden con los obtenidos en el presente trabajo. Según Piozzi, este grupo de datos evidencian una estructura tetracíclica kaurenoide con un grupo aldehído axial sobre C-4, como lo prueba la fragmentación en el EM y el doblete característico a δ 9,64, el triplete a δ 2,03 y la señal a δ 2,59 correspondientes a los hidrógenos alílicos de C-15 y 13 respectivamente.

El espectro de ^{13}C -RMN obtenido mostraba veinte señales de las cuales tres de ellas se presentaban a campos muy bajos. Estas eran las correspondientes a los carbonos del doble enlace entre C-16 y C-17 que aparecían a δ 158,2 y 103,1 respectivamente y la del carbono carbonílico a δ 205,5. Las señales de los dos metilos también eran claramente diferenciables, el Me-20 aparecía a campos más altos que el Me-18, pero la diferencia era aún mayor con respecto al hidrocarburo base por la sustitución en el C-19. También en este caso se podía apreciar la protección por efecto β (descrito anteriormente) de los carbonos 3 y 18 con respecto a los valores de estos carbonos en el 16-en-kaureno. Los valores obtenidos para el compuesto en estudio concordaban con los encontrados en bibliografía (Hayman *et al.*, 1990).

Dado que el kauren-19-ol y el kauren-19-al han sido informados como intermediarios en la interconversión biogénica de kaureno a ácido kaurenoico (Hedden *et al.*, 1977), la presencia de kaureno, kaurenol, kaurenal y ácido kaurenoico en la misma planta soporta la teoría de la transformación biogénica de kaureno a ácido giberélico pasando por el ácido kaurenoico. El intento de encontrar alguno de ellos no tuvo resultados positivos. Sin embargo, fueron detectados compuestos kaurenoides al analizar por CG-EM los compuestos volátiles (Ver Descripción general de la labor realizada, sección Compuestos Volátiles, pág 40).

Los datos para el producto aislado se presentan a continuación:

Espectros de masa del producto aislado de *W. poposa* y del aldehído kaurénico informados en literatura (m/z, %).

Compuesto aislado	Piozzi <i>et al.</i>	Bohlmann <i>et al.</i>
286 (M+,71)	286 (M+)	286 (M+, 100)
271 (6)	271	271 (12)
258 (8)	258	
257 (16)	257	257 (37)
243 (72)		243 (61)
123 (80)		
81 (100)		

Espectros de RMN protónico del producto aislado y del aldehído kaurénico informados en literatura (δ).

H	Compuesto aislado.	Piozzi <i>et al.</i>	Bohlmann <i>et al.</i>	Barrero <i>et al.</i>
	100 MHz, CDCl ₃	100 MHz, CCl ₄	100 MHz, CDCl ₃	80 MHz, CDCl ₃
Me-20	0,99 (s,3H)	0,97 (s)	0,96 (s)	1,02 (s)
Me-18	0,88 (s,3H)	0,89 (s)	0,87 (s)	0,90 (s)
H-15	2,07 (sa,2H)	2,03 (t,J=1Hz,2H)		2,07 (sa, 2H)
H-13	2,65 (m,1H)	2,59 (sa,2H)		2,65 (m, 1H)
H-17	4,68 y 4,73	4,74 y 4,68	4,75-4,80	4,78 (sa, 2H)
H-19	9,74 (d,J=1,5;1H)	9,64 (d,J=1,2)	9,62 (d,J=1)	9,76 (d,J=1,1;1H)

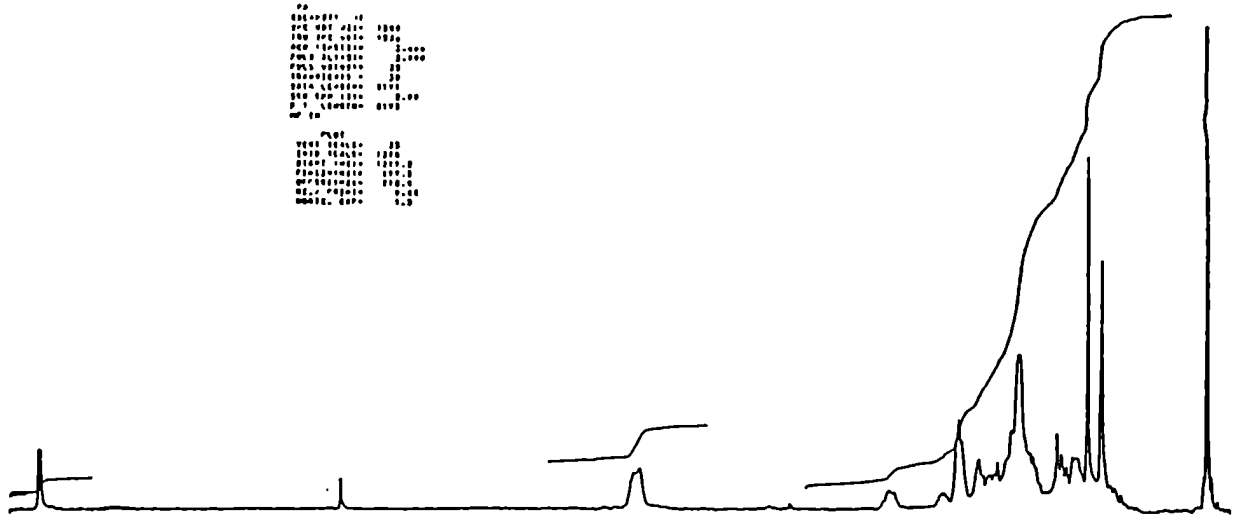
Valores de resonancia para los carbonos del producto aislado y de aquellos registrados en literatura para el aldehído kaurénico y para el hidrocarburo base.

C	Barrero <i>et al</i> *. Cl ₃ CD-TMS 20,1 MHz	Hayman <i>et al</i> [#] . Cl ₃ CD-TMS 75,4 MHz	Este trabajo Cl ₃ CD-TMS 25,2 MHz
1	40,5	39,98 (t)	29,2
2	18,7	18,47 (t)	18,3
3	42,1	34,25 (t)	34,2
4	33,3	48,55 (t)	48,4
5	56,5	54,61 (d)	56,6
6	20,3	19,93 (t)	19,8
7	41,3	41,26 (t)	41,1
8	44,3	44,14 (s)	44,0
9	56,2	56,75 (d)	54,5
10	39,4	39,43 (s)	39,8
11	18,2	18,37 (t)	18,4
12	33,3	33,02 (t)	32,9
13	44,1	43,81 (d)	43,7
14	39,9	39,90 (t)	39,3
15	49,3	49,04 (t)	48,9
16	154,0	155,63 (s)	158,2
17	102,8	103,30 (t)	103,1
18	33,3	24,38 (c)	24,2
19	21,7	206,08 (d)	205,5
20	17,6	16,43 (c)	16,3

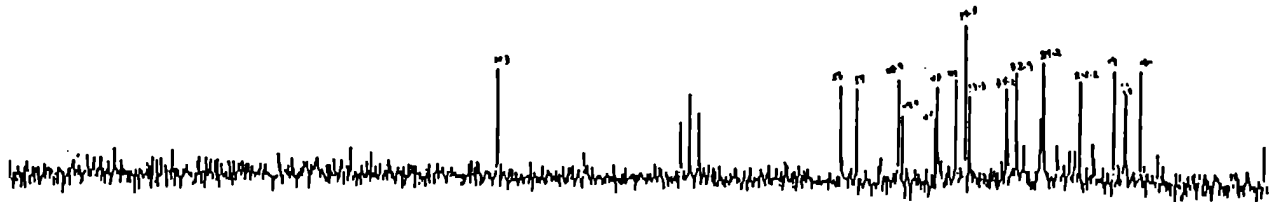
* Datos para Kaureno.

Datos para Aldehído kaurénico.

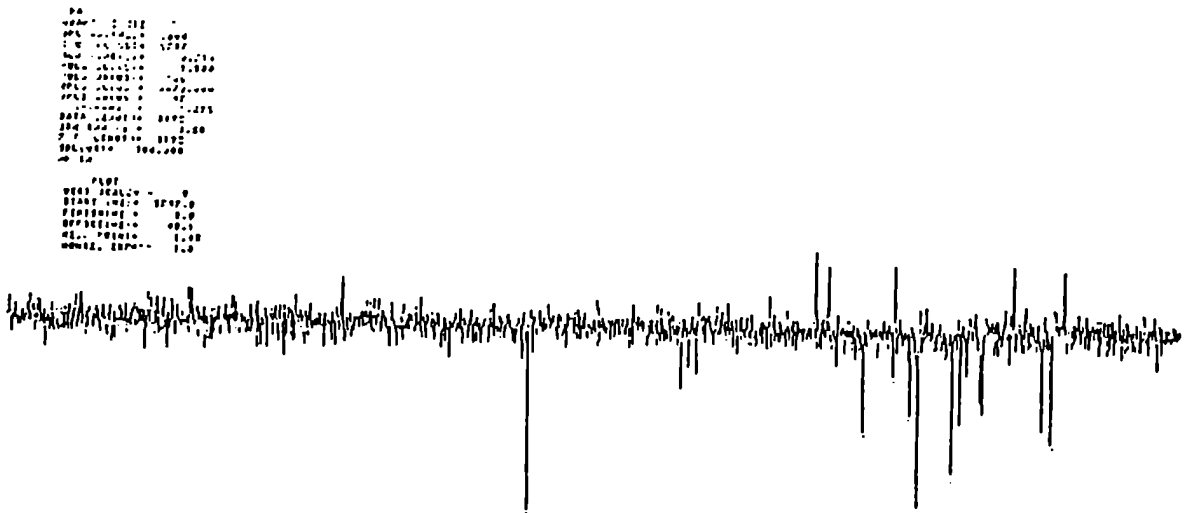
¹H-RMN (100 MHz, CDCl₃) de (-)-kaur-16-en-19-al.



¹³C-RMN (25,2 MHz, CDCl₃) de (-)-kaur-16-en-19-al.



¹³C-RMN (SPDD, 25,2 MHz, CDCl₃) de (-)-kaur-16-en-19-al.



BIBLIOGRAFIA.

- ♦ Audier, H.E., Bory, S., Fétizon, M. (1964) *Bull. Soc. Chim. France*, 1381.
- ♦ Audier, H.E., Bory, S., Defaye, G., Fétizon, M., Moreau, G. (1966) *Bull. Soc. Chim. France*, 3181.
- ♦ Barrero, A.F., Riu, M.V., Ramirez, A., Altarejos, J. (1988) *An. Quím.*, **84**, C, 203.
- ♦ Beierbeck, H., Saunders, J.K., ApSimon, J.W. (1977) *Can. J. Chem.*, **55**, 2813.
- ♦ Beierbeck, H., Saunders, J.K. (1975) *Can. J. Chem.*, **53**, 1307.
- ♦ Beierbeck, H., Saunders, J.K. (1976) *Can. J. Chem.*, **54**, 632.
- ♦ Beierbeck, H., Saunders, J.K. (1976) *Can. J. Chem.*, **54**, 2985.
- ♦ Bjeldanes, L.F., Geissman, T.A. (1972) *Phytochemistry*, **11**, 327.
- ♦ Bohlman, F., Le Van, N., (1978) *Phytochemistry*, **17**, 1957.
- ♦ Bohlmann, F., Rao, N. (1973) *Chem. Ber.* **106**, 841.
- ♦ Breitmaier, E., Voelter, W. "¹³C-NMR Spectroscopy". Verlag Chemie, Weinheim / Bergstr., 1974.
- ♦ Cannon, J.R., Chow, P.W., Jefferies, P.R., Meehan, G.V. (1966) *Aust. J. Chem.*, **19**, 861.
- ♦ Chizhov, O.S., Kessenikh, A.V., Yakovlev, I.P., Zolotarev, B.M., Petuknov, V.A. (1969) *Tetrahedron Letters*, **17**, 1361.
- ♦ Coates, R.M., Bertram, E.F. (1969) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 797.
- ♦ Crews, P., Kho-Wiseman, E. (1978) *Tetrahedron Letters*, **28**, 2483.
- ♦ Díaz, C.E., Fraga, B.M., González, A.G., Hanson, J.R., Hernández, M.G., San Martín, A. (1985) *Phytochemistry*, **24**, 1489.
- ♦ Eliel, E.L., Bailey, W.F., Kopp, L.D., Willer, R.L., Grant, D.M., Bertrand, R., Christensen, K.A., Dalling, D.K., Duch, M.W., Wenkert, E., Schell, F.M., Cochran, D.W. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 322.
- ♦ Fraga, B.M., Guillermo, R., Hernández, M.G., Mestres T., Arteaga, J.M., (1991) *Phytochemistry*, **30**, 3361.
- ♦ González, A.G., Fraga, B.M., Hernández, M.G., Hanson, J.R., (1981) *Phytochemistry*, **20**, 846.
- ♦ Hanson, J.R. (1968) "The Tetracyclic Diterpenes." Pergamon, Oxford.
- ♦ Hanson, J.R., Siverns, M., Piozzi, F., Savona, G. (1976) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 114.
- ♦ Hasan, C.M., Healey, T.M., Waterman, P.G. (1982) *Phytochemistry*, **21**, 177.

- ◆ Haslam, E. (1985) "Metabolites and Metabolism." The International Series of Monographs on Chemistry. Clarendon Press. Oxford.
- ◆ Hayman, A.R., Weavers, R.T. (1990) *Phytochemistry*, **29**, 3157.
- ◆ Hedden, P., Phinney, B.O., Mac Millan, J., Sponzel, V.M. (1977) *Phytochemistry*, **16**, 1913.
- ◆ Henrick, C.A., Jefferies, P.R. (1964) *Aust. J. Chem.*, **17**, 915.
- ◆ Jakupovic, J., Ganzer, U., Bohlmann, F., King, R.M. (1991) *Phytochemistry*, **30**, 2652.
- ◆ Jefferies, P.R., Retallack, R.W. (1968) *Aust. J. Chem.*, **21**, 2085.
- ◆ Mc Crindle, R., Martin, A., Murray, R.D.H. (1968) *J. Chem. Soc. (C)*, 2349.
- ◆ Oberti, J.C., Pomilio, A.B., Gros, E.G. (1980) *Phytochemistry*, **19**, 2051.
- ◆ Parry, R.J., Naidu, M.V. (1980). *Tetrahedron Letters*, 4783.
- ◆ Patra, A., Mitra, A.K., Mitra, S.R., Kirtaniya, C.L., Adityachaudhury, N. (1980) *Org. Magn. Res.* 14.
- ◆ Pinar, M., Rodriguez, B., Alemany, A. (1978) *Phytochemistry*, **17**, 1637.
- ◆ Piozzi, F., Passannanti, S., Marino, M.L., Sprio, V. (1972) *Can. J. Chem.*, **50**, 109
- ◆ Piozzi, F., Passannanti, S., Paternostro, M.P. (1971) *Phytochemistry*, **10**, 1164.
- ◆ Rodriguez, B., Alemany, A., Pinar, M. (1978) *Tetrahedron Letters*, 3069.
- ◆ Rodríguez González, B. (1971) *An. Quím*, 59.
- ◆ St. Pyrek, J. (1970) *Tetrahedron*, **26**, 5029.
- ◆ Stothers, J.B. (1972) "¹³C-NMR Spectroscopy." Academic Press, New York.
- ◆ Thomson, R.H., (1985) "The Chemistry of Natural Products." Blackie & Sons Ltd.
- ◆ Torsell, K.B.G. (1981) "Natural Products Chemistry." John Wiley & Sons, New York.
- ◆ Trainer, D.A., Parry, R.J., Gitterman, A (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 1467.
- ◆ Von Carstenn-Lichterfelde, C., Pascual, C., Rabanal, R., Rodriguez, B., Valverde, S. (1977) *Tetrahedron*, **33**, 1989.
- ◆ Wenkert, E. (1955) *Chem. Ind.*, 282.
- ◆ Wiseman, J.R., Krabbenhoft, H.O. (1977) *J. Org. Chem.*, **42**, 2240.
- ◆ Yamasaki, K., Kohda, H., Kobayashi, T., Kasai, R., Tanaka, O. (1976) *Tetrahedron Letters*, 1005.
- ◆ Zamir, L.O., Jensen, R.A., Arison, B.H., Douglas, A.W., Albers-Schonberg, G., Bowen, J.R. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4499.

SESQUITERPENOIDES.

Los sesquiterpenoides son compuestos formados por 15 átomos de carbono correspondientes a tres unidades de isopreno que pueden estar modificadas por reordenamientos. Presentan en algunos casos excepciones a la unión cabeza-cola postulada por la regla del isopreno (Bates *et al.*, 1965).

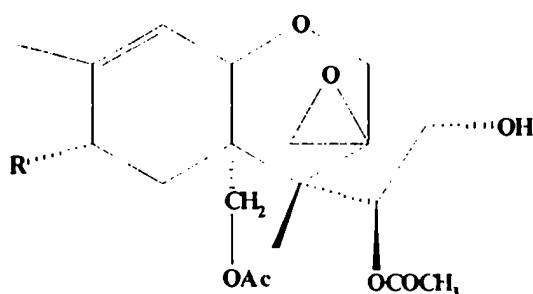
Son los compuestos más universalmente distribuidos y por ello su variación estructural es amplia habiéndose detectado compuestos acíclicos, mono, di, tri y tetracíclicos.

En virtud del gran número de compuestos de diferentes estructuras encontrados en la naturaleza, se los ha clasificado en base a sus esqueletos carbonados.

Muchos de los sesquiterpenos descritos durante los últimos veinte años han surgido como resultado de un relevamiento fitoquímico de las Compuestas.

La mayor cantidad de ellos están comprendidos dentro de los germacranólidos y guayanólidos, como lactonas. Muchas de estas lactonas contienen grupos hidroxilos esterificados por ácidos tales como isobutírico, angélico, epoxiangélico y tíglico.

La actividad biológica de estas lactonas insaturadas ha estimulado los esfuerzos sintéticos para su preparación. A diferencia de los monoterpenos, existe un gran número de sesquiterpenoides producidos por hongos. Entre ellos se puede nombrar los tricotecenos por su doble actividad como micotoxinas (1) y como agentes inhibidores de tumores (2).



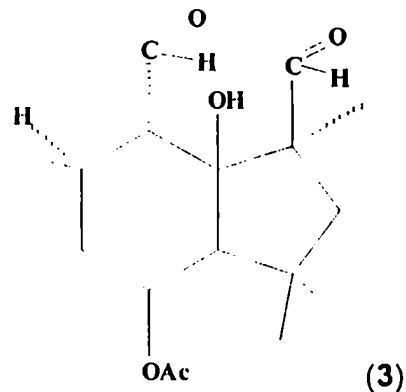
(1) R= OCOCH₂CHCH₃ (Toxina T2)

(2) R=H Diacetoxiscipenol (Anguidine)

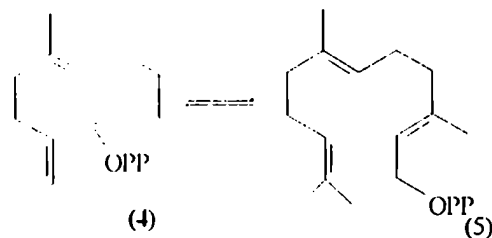
Algunos sesquiterpenoides, metabolitos de hongos, son fitotóxicos, tales como el botrydial (3), el cual es metabolito del patógeno de plantas *Botrytis cinerea*.

Desde el punto de vista biogénético, la Naturaleza ha sido extraordinariamente prolífica en la síntesis de sesquiterpenos. Existen extensos

estudios sobre la biosíntesis de sesquiterpenos y se ha profundizado en aspectos estereoquímicos.

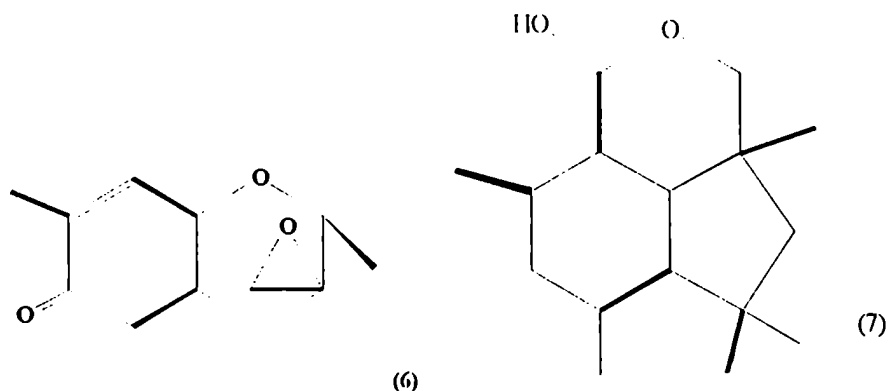


De acuerdo a las propuestas biogenéticas que de ellos han surgido, tanto el 2-*cis* (4) como el 2-*trans*-farnesil pirofosfato (5), se transforman en varios carbocationes.



Aunque la interconversión de los farnesoles procede con pérdida estereoespecífica del hidrógeno del C-1 por un proceso redox, la principal isomerización a nerolidil pirofosfato y la subsecuente ciclación de este último no implica pérdida del hidrógeno del C-1. Tanto *cis-trans* como *trans-trans* farnesil pirofosfato pueden sufrir el cierre directo con su doble enlace terminal. El doble enlace 2, 3 *trans* se isomeriza a *cis*, probablemente antes de la ciclación en conjunción con la solvólisis del pirofosfato. Varias decalinas e hidroazulenos son formados a través del sistema de anillos de diez miembros: germacrano (Thomson 1985, Haslam, 1985). Se han realizado estudios de espectroscopía de ^{13}C -RMN,

usando enriquecimiento y acoplamiento ^{13}C - ^{13}C , en experimentos partiendo de acetato y mevalonato, mediante los cuales se han definido las unidades preniladas y el plegamiento de la cadena de farnesilo en varios esqueletos sesquiterpenoides. Podemos ejemplificar con: trichothecolone (6) y dihidrobotrydial (7).

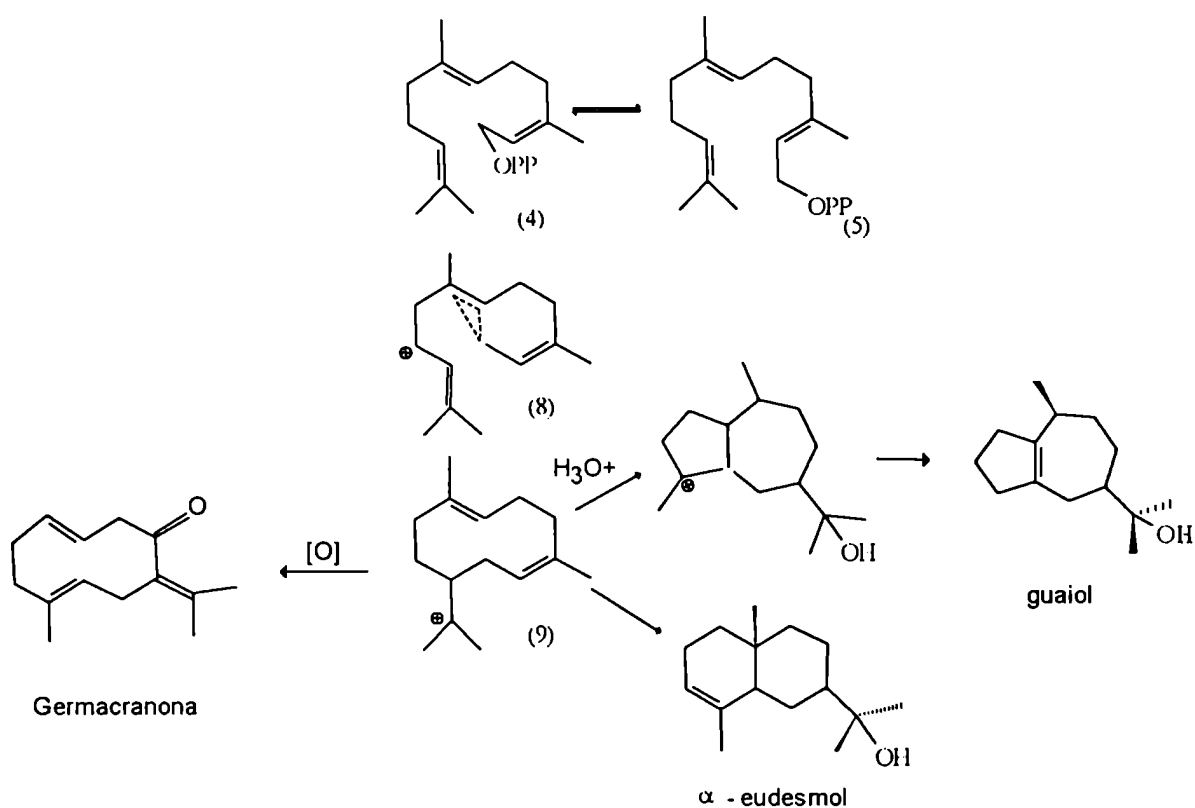


La variedad de estructuras sesquiterpenoides y en particular el número de centros asimétricos contiguos acoplados a sistemas de anillos de varias medidas y en muchos de ellos su actividad biológica, ha hecho de los sesquiterpenoides moléculas blanco para estudios sintéticos. A su vez en estos intentos han surgido nuevos métodos para la formación de anillos de ciclopentanos y α -metilén lactonas, las cuales han tenido aplicación en otras áreas. Existen estudios biomiméticos que exploran aspectos de la química del humuleno, posible precursor de los sesquiterpenoides policíclicos.

Casi todos los tipos de sesquiterpenos pueden pensarse como derivados de estos carbocationes por transformaciones químicas racionales. Deben tenerse en cuenta que la representación en estos esquemas de las especies intermediarias como carbocationes es simplemente un simbolismo conveniente. Muchas de las especies reales no se conocen, éstas podrían ser ésteres de pirofosfato o uniones a enzimas, equivalentes a los carbocationes propuestos.

Aunque muchos de los planteos no han sido comprobados experimentalmente, hay suficientes antecedentes experimentales que los avalan (Bates *et al*, 1965; Shaw *et al*, 1975).

Así entonces se puede pensar un mismo precursor para guaiol, α -eudesmol y germacranona.

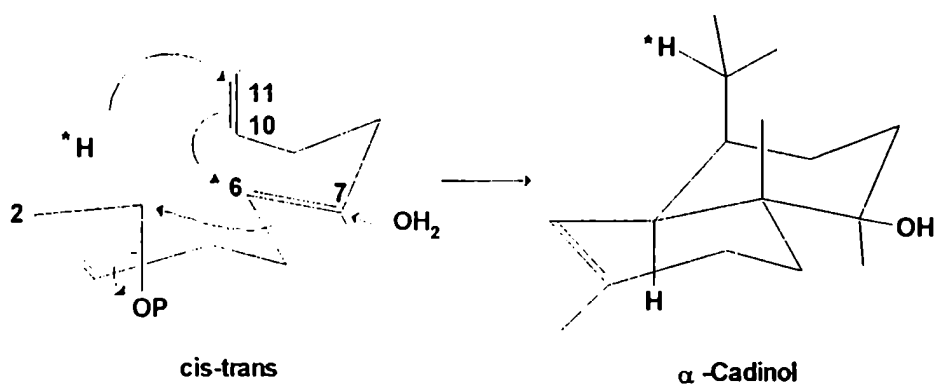


La modificación oxidativa de (9) genera los sesquiterpenos de anillo de diez miembros con el esqueleto de germacrano tales como la germacranona. Una ciclación transanular de (9) o alguno de sus derivados en el sentido Markownikoff conduce a la serie eudesmano. La ciclación anti-Markownikoff del mismo catión (o derivado) genera el esqueleto guaiano.

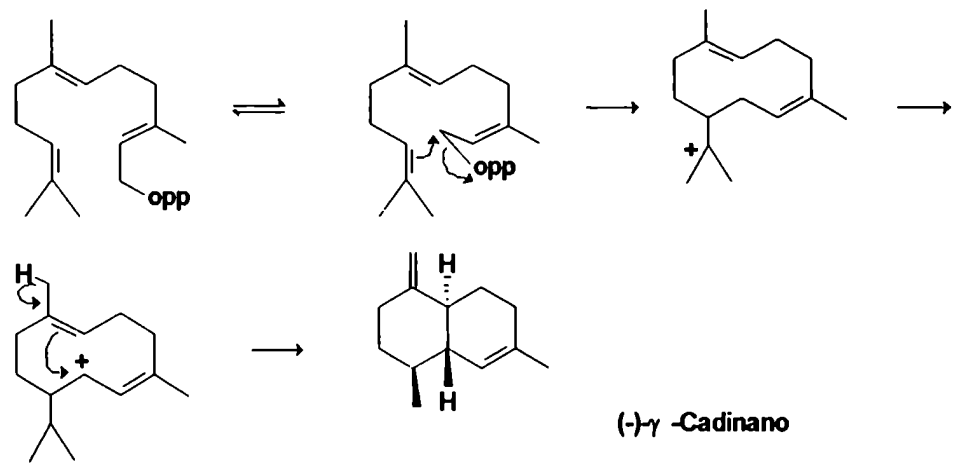
La formación de α -cadinol implica un ataque del C-1 al C-10 seguido de un corrimiento de H del C-1 para regenerar el centro reactivo en C-1, y un segundo cierre de anillo de C-1 a C-6.

El desplazamiento directo 1,3 se ha probado por marcación isotópica de los H del C-1. La unión *cis* o *trans* de los anillos ocurre según sea el plegamiento de la cadena.

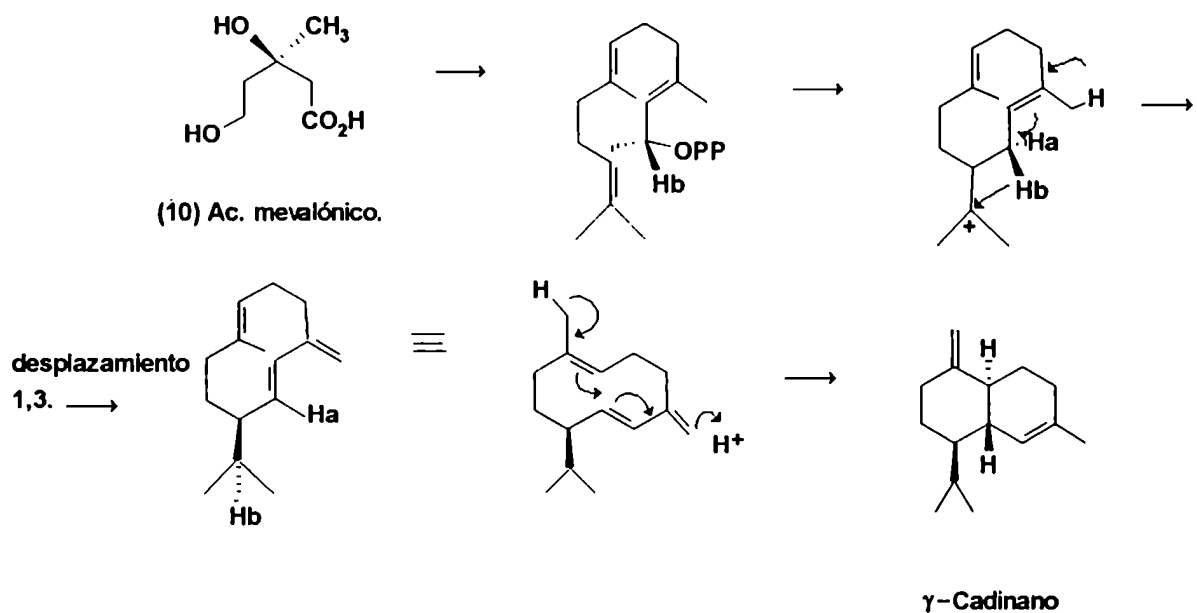
Para el caso de anillos en *trans* podemos pensar que la cadena se pliega y reacciona según el siguiente esquema:



El *trans-trans* farnesil pirofosfato produce (-)- γ -cadineno como precursor de avocetina (Arigoni, 1975).



Existen suficientes pruebas que demuestran que no se produce pérdida de H del grupo metileno terminal del farnesil pirofosfato y que la saturación del isopropilo ocurre a través de una transposición de H 1,3, de H_B específicamente.



CADINANOS.

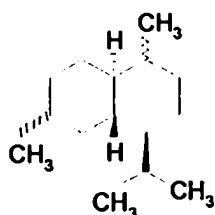
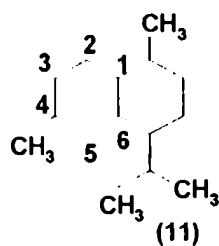
Los cadinanos y otros sesquiterpenos relacionados se encuentran frecuentemente como componentes volátiles de los aceites esenciales de las plantas superiores. Tomando en cuenta la naturaleza de la fusión de anillos y la orientación del grupo isopropilo en el C-7, han surgido cuatro clases a partir del esqueleto base (11), que se denominan: cadinanos (12), muurolanos (13), bulgaranos (14) y amorfanos (15).

Al considerar un hidroxilo en posición 10 para estos cuatro posibles esqueletos, en los cuales para todos el isopropilo se encuentra orientado β , surgen cuatro alcoholes sesquiterpénicos que son el (-)-Torreyol (16) (anillos en *cis*, hidroxilo en α), el (-)- α -Cadinol (17) (anillos en *trans* 1 α ,6 β ; hidroxilo en α), el (-)-T-Muurolol (18) (anillos en *cis*, hidroxilo en β) y el (-)-T-Cadinol (19) (anillos en *trans*, 1 α ,6 β ; hidroxilo en β) como se aprecia del gráfico. (Borg-Karlson *et al.*, 1981).

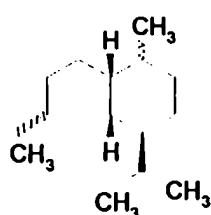
Dada la complejidad de la estereoquímica de los sesquiterpenos pertenecientes a estas clases, muchas de las asignaciones configuracionales fueron malas o incompletas. Así por ejemplo para Torreyol (16) (δ -Cadinol) fueron dadas por lo menos siete diferentes.

Torreyol (" δ -Cadinol", 10 α -hidroxi-4-muuroleno) (16): se ha encontrado en varias fuentes naturales. Se presenta en sus dos formas, dextro y levo rotatorias y ha aparecido a lo largo de 30 años entre 1940 y 1971 bajo varios nombres: Albicaulol, Pilgerol, δ -Cadinol y Sesquigoyol.

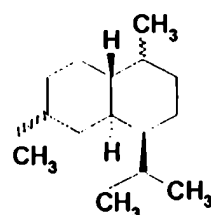
Se ha identificado como (+)-Torreyol al sólido blanco en forma de agujas, producido por el hongo *Clitocybe illudens* cultivado en agar por Nair y Anshel (Nair *et al.*, 1973), para quienes era la primera vez que un sesquiterpeno de esqueleto cadinano había sido obtenido de un hongo. Si bien compuestos similares se aislaron de algas y actinomicetes, los sesquiterpenoides de este grupo hasta ese momento eran circunscriptos a las plantas superiores.



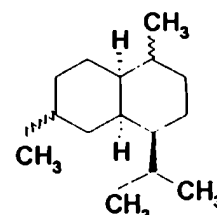
(12) Cadinano



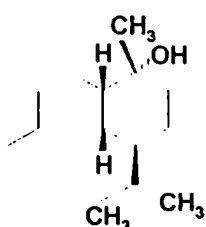
(13) Muurolano



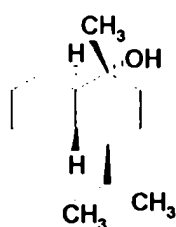
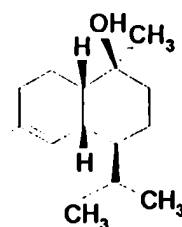
(14) Bulgarano



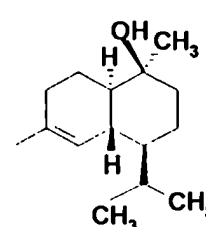
(15) Amorfanano



(16)(-)-Torreyol

(17)(-)- α -Cadinol

(18)(-)-T-Muurolol



(19)(+)-T-Cadinol

El Torreyol también se ha identificado por CG-MS en las alas de la mariposa macho *Lysandra argyrognomon* (Lycaenidae, Lepidóptera), en la que se encuentra entre otros compuestos volátiles y juega un rol importante para el cortejo de la hembra (Lundgren *et al.*, 1975).

Westfeld revisó la bibliografía existente hasta 1970 y presentó pruebas químicas que aseguraban la unión *cis* de anillos para este alcohol, concluyendo que su esqueleto base sería del tipo muurolano. En función de estos resultados propone la estructura (16) para este alcohol. (Westfeld, 1970). Aunque posteriormente otros autores en función de sus interpretaciones discreparon con Westfeld (Lin *et al.*, 1971), la estructura propuesta por él fue confirmada por síntesis proveyendo la información faltante concerniente a las configuraciones relativas de los C-1, 6 y 7 en 1979.

α -Cadinol (17) (10- α -hidroxi-4-cadinano): fue aislado por primera vez por Semmler y Sponitz en 1913 y ha sido aislado de diferentes fuentes naturales. La

estructura de este alcohol fue asignada por Motl (Motl *et al.* 1958) y por Soffer (Soffer *et al.* 1958, 1959).

El esqueleto base y las posiciones del doble enlace y del hidroxilo fueron determinados en aquellos años por métodos químicos.

T-Muurolol (**18**) (10- β -hidroxi-4-muuroleno) y T-Cadinol (**9**) (10- β -hidroxi-4-cadinano): hubo históricamente más discrepancia aún que con los anteriores para asignarles sus respectivas estructuras ya que inicialmente fueron aislados por Erdtman y Vorbrüggen en 1960 (Erdtman *et al.*, 1960) como un alcohol sesquiterpénico que denominaron X y que era en realidad una mezcla de estos dos.

Westfeld y Wickberg en 1967 encontraron que lo descrito previamente por Erdtman era una mezcla de dos compuestos a los que llamaron X1 y X2, por experimentos preliminares indicaron que X1 sería un muurolol y X2 un cadinol (fusión de anillos *cis* y *trans* respectivamente).

Borg-Karlson *et al.*, en 1981 estudiaron espectroscópicamente los cuatro cadinolos anteriormente citados utilizando la técnica de desplazamiento inducido por lantánidos (Borg-Karlson *et al.*, 1981). En 1983 Herz y Watanabe (Herz *et al.*, 1983) confirman con la misma técnica las estructuras propuestas por Borg-Karlson *et al.* para el (+)-T-Cadinol (**19**) y el (-)- α -Cadinol (**17**).

Si bien con esta técnica no se obtenían resultados concluyentes acerca de la configuración asignada para estos dos compuestos, las estructuras (**19**) y (**17**) eran las más apropiadas para los resultados químicos y espectroscópicos obtenidos hasta ese momento.

En 1991, Sanz presentó los datos espectroscópicos correspondientes a la estructura de (-)- α -Cadinol (**17**) obtenida por medio de los espectros de alta resolución de ^1H y de ^{13}C (^1H -RMN de 500 MHz). Las señales del espectro de ^{13}C fueron asignadas con la ayuda de la técnica 2D-H y experimentos de correlación de C modulados por acoplamientos a un enlace y a larga distancia (Sanz *et al.*, 1991).

Con esto entonces se resolvió el problema y quedaron confirmadas para estos compuestos las estructuras propuestas por Borg-Karlson *et al.* en 1981.

DESCRIPCION DE LA LABOR REALIZADA.

Por separación en columna seca de la fracción CM-5 se obtuvieron 5 subfracciones (ver Parte Experimental, pág 184).

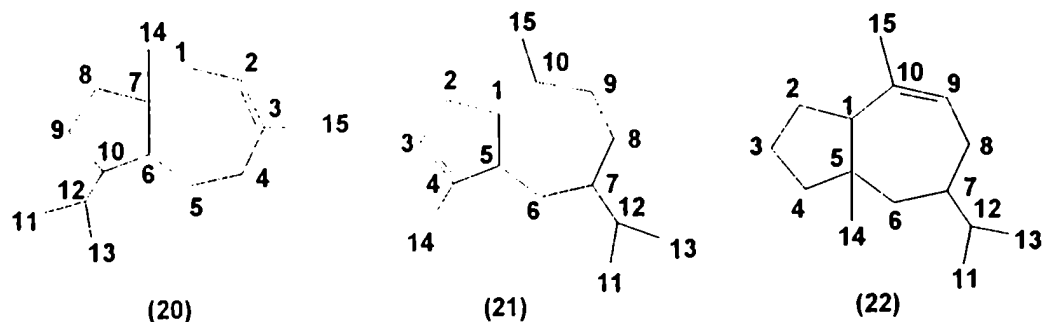
Luego de ser analizadas por CG se decidió proseguir con la purificación de la CM-5E1(6) mediante cromatografía en columna seca de sílica gel. Se obtuvieron 6 fracciones. La anteúltima, CM-5E1(6)(5), revelaba con ácido sulfúrico y calor de color violeta y por CCD era de una sola mancha en placa de sílica de alta resolución. Se volvió a purificar por columna y se obtuvieron 6 nuevas subfracciones. Al analizarlas por CCD resultó que la tercera de ellas, la CM-5-E1(6)(5)(26-34), era la que revelaba violeta con ácido sulfúrico y calor. Esta fracción se repurificó por columna de sílica gel y se obtuvieron 3 fracciones, de las cuales la de menor Rf fue repurificada por CLAR, dando 3 fracciones, A1, A2, y A3.

El compuesto A3 presentaba en su espectro de masa el ión molecular m/z 222, indicando la fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$ y por lo tanto la presencia de tres insaturaciones. También se observaron fragmentos importantes a m/z 204 (94%), 189 (25%), 161 (100%). En su espectro IR se destacaban las siguientes señales: 3595, 1455, 1370 y 1090 cm^{-1} , adjudicadas a hidroxilo terciario, y 1630 cm^{-1} , a doble enlace. Al aparecer estas señales en el IR se podía adjudicar el fragmento de m/z 204 a la pérdida de agua a partir del ión molecular, y una de las insaturaciones a un doble enlace. El espectro de 1H -RMN a 100 MHz, presentaba dos singuletes que integraban para tres hidrógenos cada uno, a δ 1,10 y 1,67, este último característico de metilo sobre doble enlace; y dos dobletes a δ 0,77 y 0,91 con $J=7$ Hz que integraban para tres hidrógenos cada uno. Estas señales hacían pensar en la presencia de un isopropilo. A δ 5,50 aparecía un singulete ancho que integraba para un solo hidrógeno, característico de un hidrógeno vinílico, lo cual se correspondía con la presencia del metilo sobre doble enlace. En el espectro ^{13}C -RMN aparecían 15 señales entre las que se destacaban las de 122,1 y 134,8 ppm y la de 72,2 ppm, correspondientes a los carbonos del doble enlace y al carbono sustituido por hidroxilo en un alcohol terciario. Dado que no aparecían otras señales indicativas de posibles insaturaciones, se atribuyeron las dos restantes a dos ciclos.

La muestra fue estudiada por espectroscopía de 1H -RMN a 200 MHz y de ^{13}C -RMN a 50 MHz (ver Parte Experimental, pág 186). Del espectro de ^{13}C -RMN secuencia DEPT, totalmente desacoplado, se obtuvo como información que el esqueleto estaba formado por carbonos tales que sus señales eran 4Q, 4T, 5D y 2

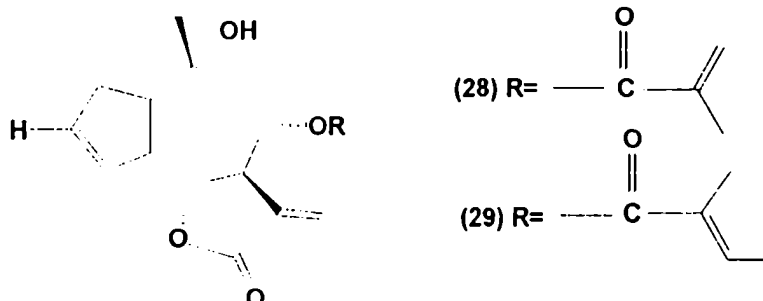
carbonos sin hidrógenos. En función de este resultado y de los datos que se tenía de los otros dos espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, tanto a 100 como a 200 MHz, se pudo postular que A3 era un compuesto bicíclico con cuatro sustituyentes: un isopropilo, dos metilos, uno de ellos sobre doble enlace y el otro sobre un carbono sobre el cual estaba un hidroxilo constituyendo por tanto un alcohol terciario. Este último metilo estaría sin embargo a campos más altos de lo que en principio se podía suponer para esta situación. Estas particularidades podían darse tanto en un compuesto cuyos dos ciclos fueran de cinco y siete miembros respectivamente como para uno cuyos ciclos fueran los dos de seis.

Considerando que se tratara de dos ciclos, uno de cinco y otro de siete miembros, se tendrían que considerar las siguientes posibilidades según los esqueletos correspondientes a las distintas familias: Carotano (20), Guaiano (21) y Pseudoguaiano (22).



Para el caso en que el esqueleto de A3 fuera el de un carotano, su espectro de ^{13}C -RMN hubiera dado las siguientes señales 4Q, 5T, 3D y 3S, en cualquiera de sus dos posibilidades: hidroxilo en C-6 o en C-10, ya que el metilo 14 siempre aparece como singulete. No sería coherente colocar al hidroxilo en C-12 ya que entonces los grupos metilos del isopropilo no aparecerían como dobletes. Esto no concordaba con los datos determinados para A3. Si sólo se hubiera contado con el espectro de RMN protónico, también se habría podido descartar esta posibilidad dado que el valor de δ para el metilo sobre doble enlace aparece a campos más bajos que lo que se observa para A3. Así, para Jaeschpeanadiol (23) (hidroxilos en C-10 y en C-5 y doble enlace hacia el C-2), el metilo sobre doble enlace resuena a δ 1,8. (Sriraman *et al.*, 1973). Análogamente, en el compuesto (24), doble enlace hacia el carbono 4, tanto el metilo como el hidrógeno vinílico se observan a campos más

aparece a campos más bajos $\delta \geq 1,8$, mientras que el valor del hidrógeno vinílico se mantiene en el valor de los no lactonizados, como singulete ancho a $\delta 5,5$ (**28** y **29**). (Bohlmann *et al.*, 1980; Macaira *et al.*, 1977)

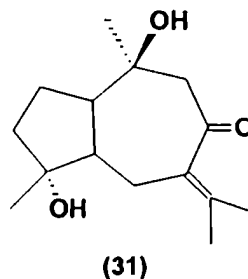
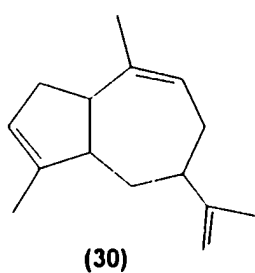


En los no lactonizados, independientemente de la funcionalización del anillo de siete miembros, el valor de resonancia del metilo sobre el doble enlace en el anillo menor y el hidrógeno vinílico sobre el mismo, se mantienen en los valores obtenidos para A3, esto es $\delta 1,6$ y $5,5$ respectivamente. Para el caso particular del compuesto (**30**), se puede ver que los sistemas de metilo sobre doble enlace en ambos ciclos son diferenciables. En el ciclo de siete miembros el metilo aparece en el mismo valor que en el anillo de cinco, pero el hidrógeno vinílico aparece a campos más altos y no como singulete. ($\delta 1,62$ y $4,99$ respectivamente). Estas diferencias justificarían que para el caso en que A3 fuera un guaianólido, se ubique el doble enlace en el anillo de cinco y no en el de siete miembros.

Otro aspecto a considerar es el de la unión de anillos, *cis* o *trans*. Si la unión de anillos es *cis*, con ambos hidrógenos α o β , de acuerdo a los valores presentes en la bibliografía, por lo menos uno de ellos debería resonar a $\delta \geq 2,3$; (Bohlmann *et al.*, 1980; Smítalová *et al.*, 1984; Bohlmann *et al.*, 1982). En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ de A3 no aparecen señales entre $\delta 2,2$ y $5,5$; por lo que se presume que la unión de los anillos debe ser *trans*. Aquí nuevamente se presentan dos posibilidades, H-1 α y H-5 β o viceversa. Para los compuestos con los ciclos unidos en *trans* se observa que el H-5 resuena a campos más bajos cuando está orientado α que cuando está orientado β , por lo que se propone que el H-5 estaría en orientación β y el H-1 en α . La bibliografía presenta un ejemplo, el compuesto (**31**) en el cual el H-1 resuena junto con el H-6 α a $\delta 1,94$ - $2,03$ y el H-5 β a $\delta 1,39$. (Kouno *et al.*, 1985).

Por consideraciones biosintéticas se propone que el grupo isopropilo está orientado β , ya que en las lactonas estudiadas, el sustituyente sobre el C-7, con el

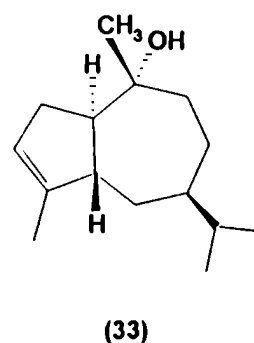
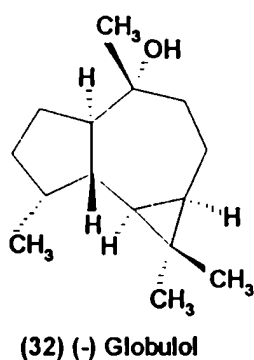
anillo lactónico tanto hacia el C-6 como hacia el C-8, está orientado β . Quedaría por fijar la orientación espacial del metilo en C-10.



En derivados de aromadendranos, en particular en el (-)-globulol (**32**) (Faure *et al.*, 1991), con el grupo metilo sobre C-10 orientado β , la señal protónica de este grupo resuena a δ 1,09 semejante al valor hallado para A3 por lo que no sería descabellado asignar esa configuración para el C-10 de A3.

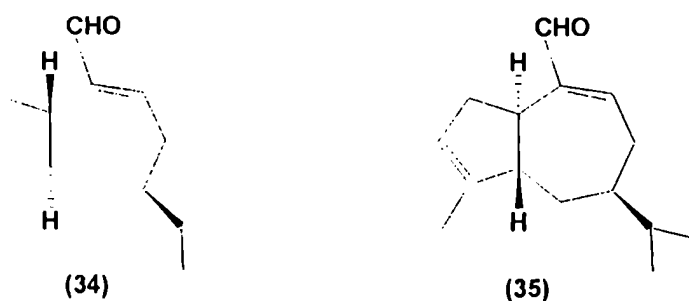
Por otra parte, en el espectro de ^{13}C -RMN de A3, una señal a δ 50,4 (d) es de difícil asignación considerando un sistema derivado del perhidronaftaleno (Bowden, 1986; Randriamiharisoa *et al.* 1986), sin embargo también podría asimilarse al C-1 de un sistema derivado del perhidroazuleno. (Faure *et al.*, 1991).

En función de todo lo anterior se podría haber propuesto para A3 la estructura (**33**).



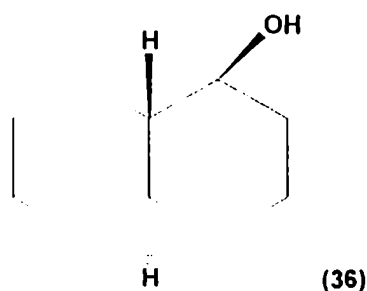
Sin embargo, llamó la atención, la diferencia encontrada para los valores de los metilos del isopropilo en el espectro protónico. Estos aparecen como dobletes con $J=7$ a δ 0,90 y 0,75 respectivamente (ver Parte Experimental, pág 186). Esto indujo a pensar que para que tomen valores tan diferentes, el isopropilo adquiriría como más estable una conformación en la cual estuviera ubicado transversalmente sobre el ciclo de 7 miembros. Esto sería algo improbable para un ciclo de 7 que

tiende a variar su conformación ya que las barreras de energía son bajas. Luego de estudiar los modelos Dreiding y de encontrar una conformación en la que el isopropilo estuviera en la forma deseada y calcular su energía se observó que el valor de la misma no era tan diferente de la que tenía cuando el grupo isopropilo estaba ubicado en posición plana, en la cual las absorciones de los metilos deberían ser prácticamente equivalentes en el espectro $^1\text{H-RMN}$. Esto significa que la interconversión entre conformeros es muy probable y lo que se apreciaría es el resultado de la misma. De hecho en la bibliografía para los compuestos de este tipo los valores de absorción de los metilos del isopropilo son muy cercanos. Así por ejemplo, para (34) y (35), cuya fusión de anillos es *trans* y en las dos posibilidades citadas anteriormente, los valores de resonancia de los metilos del isopropilo para (34) son δ 0,92 y δ 0,90, con $J=6,8$ y para (35) 0,91 y 0,90 con el mismo valor para J . (Kumonaka *et al.*, 1982). Los autores presentan también para ambos compuestos la conformación más probable en función de las constantes de acoplamiento obtenidas del espectro protónico de 400 Mhz.



Por lo dicho anteriormente se decidió estudiar como posible estructura para A3, la de dos ciclos de seis miembros. Si se estuviera en el caso de dos anillos de seis miembros unidos en *cis* como el T-Muurolol (18) o el Torreyol (16), las señales de $^1\text{H-RMN}$ de los sustituyentes isopropilo y metilo sobre doble enlace hubieran coincidido prácticamente con las obtenidas para nuestro compuesto A3. Sin embargo para el Muurolol (18) o el Torreyol (16), el hidrógeno vinílico aparece como un doblete. El otro metilo para el T-Muurolol (18), aparece como un singulete pero a δ 1,15 (Bowden *et al.*, 1986). Si se estuviera en el caso de dos anillos de seis miembros unidos en *trans*, para que la señal del hidrógeno vinílico, H-5, apareciera como singulete, el H-6 (el de la fusión de anillos), debería formar un ángulo diedro con el H-5 de aproximadamente 90° por lo cual su constante de acoplamiento tendería a 0 y esto en el espectro se traduciría en un singulete ancho (Dauben *et al.*,

1961; Karplus, 1963). Este sería el caso de (-) y (+)- α -Cadinol (**17** y **36**) y T-Cadinol (**19**) (Kalsi *et al.*, 1979 y 1987; Cheng *et al.*, 1967). Si se analizan los datos de las señales destacadas de los espectros de ^1H -RMN de estos dos últimos compuestos se aprecia que el sistema de doble enlace para el T-Cadinol (**19**), aparece con un metilo a δ 1,63 como singulete ancho y el hidrógeno vinílico a δ 5,49 también como singulete; mientras que para el (+)- α -Cadinol (**36**) si bien el hidrógeno vinílico aparece prácticamente al mismo δ , a 5,48 como singulete, el metilo aparece a campos considerablemente menores a δ 1,80, según lo informado por Kalsi en 1979 (Kalsi *et al.*, 1979). Para este compuesto el metilo que está sobre el carbono que lleva el hidroxilo terciario resuena a campos apreciablemente más bajos que lo obtenido para A3, o sea δ 1,12. Si se comparan los datos de A3 con los del T-Cadinol (**19**), se aprecia que para el compuesto A3 los grupos metilo del isopropilo aparecen como dobletes a δ 0,90 y 0,75 con $J=7$ Hz; el metilo sobre doble enlace a δ 1,66 (s); el otro metilo a δ 1,09 (s) y el hidrógeno vinílico como (sa) a δ 5,48, mientras que para el T-Cadinol (**19**) Cheng (Cheng *et al.*, 1967), informa el isopropilo como dobletes a δ 0,90 y 0,79 con $J=7$ Hz; el metilo sobre doble enlace a 1,63 (sa); el otro metilo a δ 1,18 (s) y el hidrógeno vinílico a δ 5,49 (s). Nuevamente existe una diferencia entre los valores correspondientes a los metilos sobre el carbono sustituido por hidroxilo, la diferencia de 0,1 ppm no es despreciable como para considerar que está simplemente "corrido"; si así lo estuviese, todas las demás señales deberían tener la misma desviación. Por estas razones se descartó la posibilidad de que A3 fuera T-Cadinol (**19**) o (+)- α -Cadinol (**36**).



Si la diferencia de los datos para A3 con respecto a los encontrados en bibliografía para el (+)-T-Cadinol radican en el valor obtenido para el metilo sobre C-10, se podría proponer para A3 una estructura en la cual los carbonos 1, 6 y 7

tuvieran la misma configuración que la determinada para el (+)-T-Cadinol. Esto equivale a decir con un solo centro asimétrico de diferencia, el del C-10. Se estaría entonces en el caso de (-)- α -Cadinol.

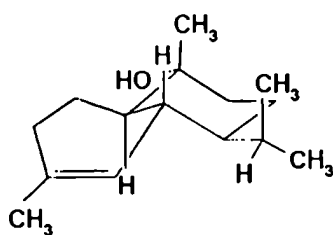
Al revisar la bibliografía se encontró que para este compuesto el metilo en posición β muestra una diferencia de 0.07 ppm con respecto al valor que se informa para el (+)-T-Cadinol.

Es de hacer notar que el valor informado por Kalsi para el metilo sobre doble enlace en el (+)- α -Cadinol está a campos anormalmente bajos y si bien los valores de las señales para los enantiómeros no son exactamente iguales como intuitivamente se pensaría, la diferencia entre ambos cadinoles es muy grande y se supone existe algún error.

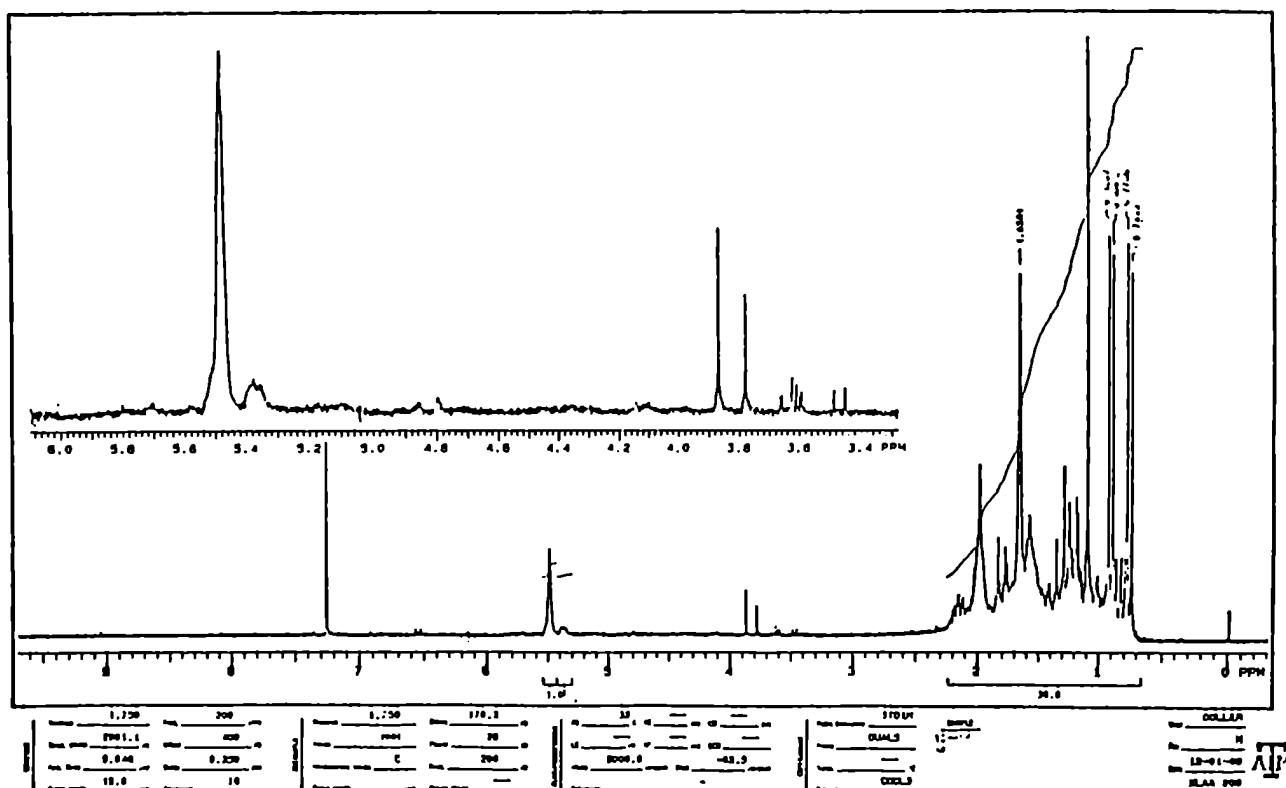
En 1991 Sanz *et al.*, informan para el (-)- α -Cadinol la asignación completa del espectro de resonancia de ^{13}C obtenido por técnicas bidimensionales 2D-H, y experimentos de correlación modulados por acoplamiento de carbonos a distancia de uno y más enlaces. También informan el espectro protónico de alta resolución hecho en un equipo de 500 MHz. Con estos últimos datos no quedaron dudas sobre la identidad de A3 y se concluyó que A3 es (-)- α -Cadinol.

Borg-Karlson (Borg-Karlson *et al.*, 1981) propone la conformación más estable para los cuatro alcoholes de la serie por ellos estudiada, y con esto se justifica también el diferente valor de resonancia para los metilos del isopropilo. También en el presente caso se realizó el estudio computacional (PC-MODEL) de la conformación de mínima energía y el valor del ángulo diedro entre el H-5 y el H-6. Se comprobó que la conformación coincidía prácticamente con lo propuesto por los que estudiaron el posible plegamiento de la cadena para la biosíntesis de cadinoles (pág 78) y con lo propuesto por Borg-Karlson. El valor del ángulo tendía al valor del ángulo recto, lo que justifica que el valor de su constante de acoplamiento tienda a 0 y que la señal del hidrógeno vinílico aparezca como un singulete ancho para los cadinoles cuya fusión de anillos es *trans*.

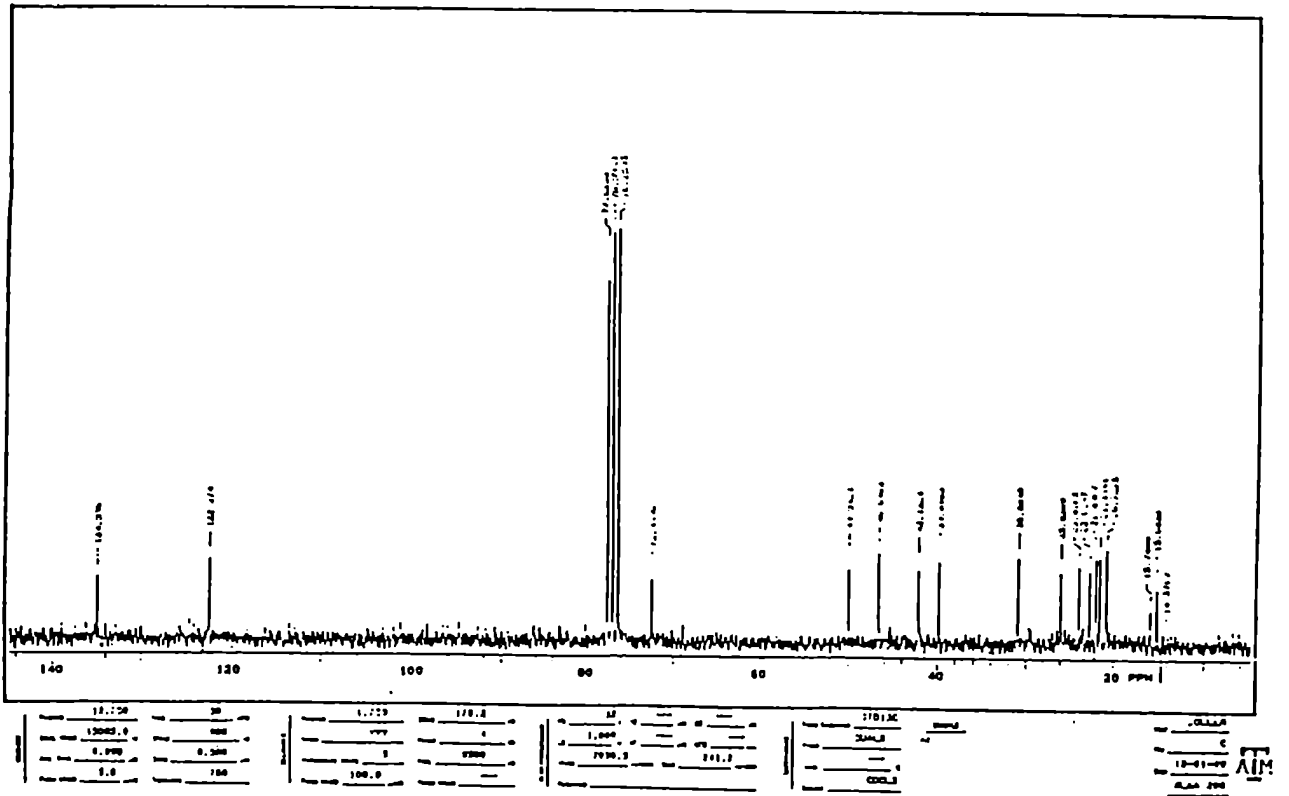
Borg Karlson, presenta como conformación más probable para el (-)- α -cadinol la representada por la figura (37), ésta justificaría los valores tan distintos observados para los dos metilos del isopropilo característica que permitió finalmente descartar la posibilidad de un esqueleto de tipo guaiano para este compuesto.

(-)- α -Cadinol (17)

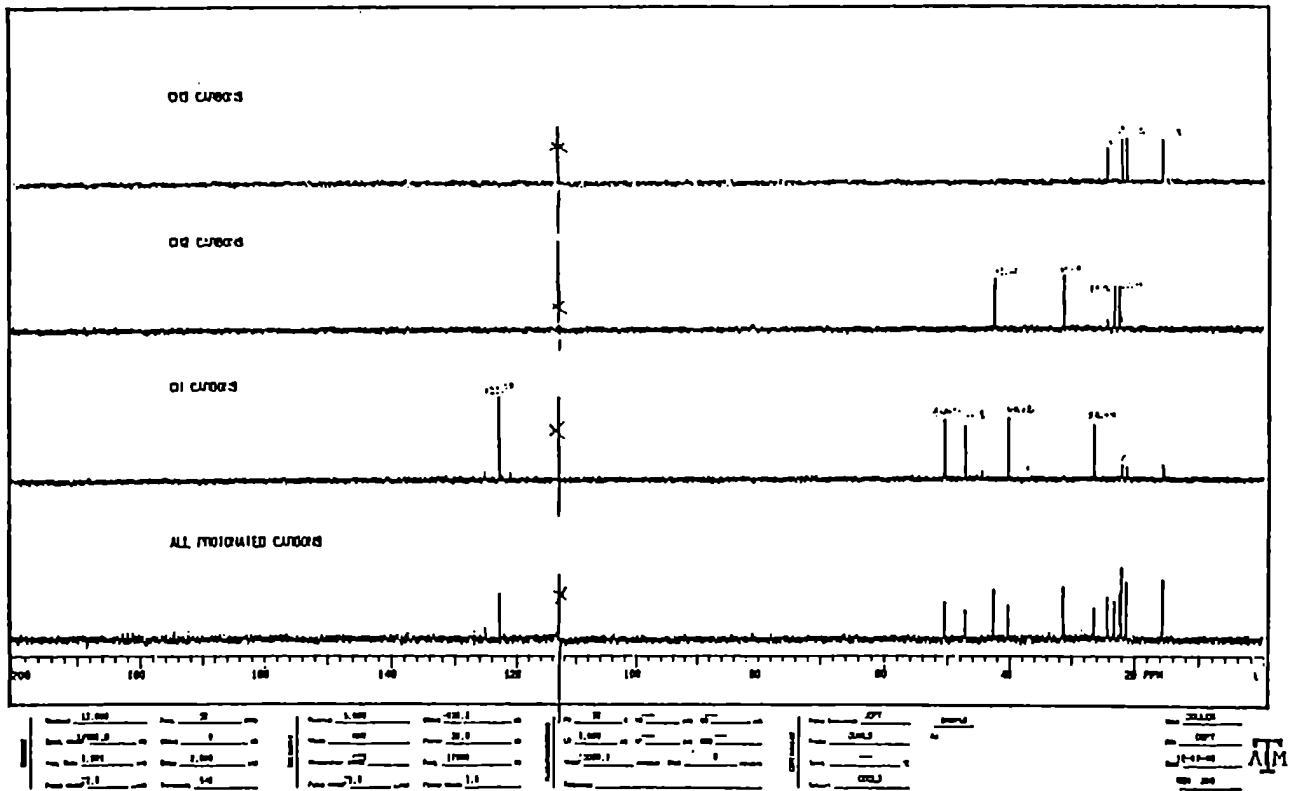
También se utilizaron programas de cálculo por computadora para el cálculo de la conformación más probable (PC-MODEL) y esta resultó ser prácticamente la misma que la informada anteriormente.

 $^1\text{H-RMN}$ (200 Mhz, CDCl_3) de (-)- α -cadinol


^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) de (-)- α -cadinol.



^{13}C -RMN (50 MHz, DEPT, CDCl_3) de (-)- α -cadinol.



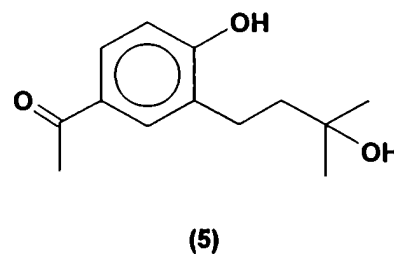
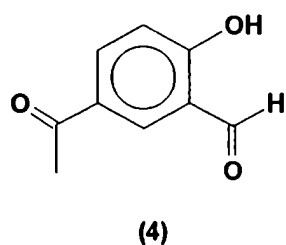
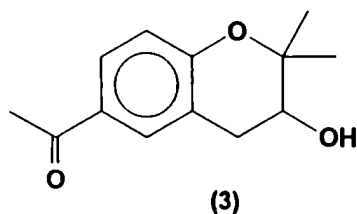
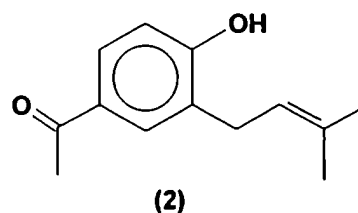
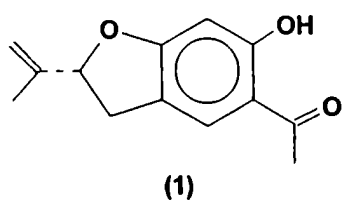
BIBLIOGRAFIA.

- ◆ Arigoni, D. (1975) *J. Pure & Appl. Chem.*, **41**, 219.
- ◆ Bates, R.B., Paknikar, S.K. (1965) *Tetrahedron. Lett.*, **20**, 1453.
- ◆ Bohlmann, F., Zdero, C., King, R.M., Robinson, H. (1980) *Phytochemistry*, **19**, 2669.
- ◆ Bohlmann, F., Gupta, R.K., Jakupovic, J. (1982) *Phytochemistry*, **21** (2), 460.
- ◆ Borg-Karlson, A.K., Norin, T. (1981). *Tetrahedron*, **37**, 425.
- ◆ Bowden, J., Coll, J.C., Willis, R.H. (1986) *Austr. J. Chem.*, **39** (10), 1718.
- ◆ Cheng, Y.S., Kuo, Y.H., Lin, Y.T. (1967) *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 565.
- ◆ Corbella, A., Gariboldi, P., Jommi, G. (1972) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 600.
- ◆ Dauben, W.G., Weinstein, B., Lim, P., Anderson, A.B. (1961) *Tetrahedron*, (15), 217.
- ◆ Díaz, J.C., Fraga, B.M., González, A.G., Hernández, M.G., Perales, A. (1986) *Phytochemistry*, **25**, 1161.
- ◆ Erdtman, H., Vorbruggen, H. (1960) *Acta Chem. Scand.*, **14**, 2161.
- ◆ Faure, R., Ramanoelina, A.R.P., Rakotonirainy, O., Bianchini, J.P., Gaydon, E.M. (1991) *Magnetic Resonance in Chemistry.*, **29**, 969.
- ◆ Haslam, E. (1985) "The International Monographs on Chemistry". Clarendon Press. Oxford.
- ◆ Herz, W., Watanabe, K. (1983) *Phytochemistry*, **22** (6), 1457.
- ◆ Ito, K., Iida, T. (1981) *Phytochemistry*, **20**, 271.
- ◆ Kalsi, P.S., Talwar, K.K. (1987) *Tetrahedron*, **43**, 2985.
- ◆ Kalsi, P.S., Arora, G.S., Ghulati, R.S. (1979) *Phytochemistry*, **18**, 1223.
- ◆ Karplus, M. (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2871.
- ◆ Klein K., Thömel, F. *Tetrahedron*, **32**, 163; (1976).
- ◆ Kouno, I., Kawano, N. (1985). *Phytochemistry*, **24** (8), 1845.
- ◆ Kumonaka, T., Kawai, Y., Yanagiya, M., Matsumoto, T. (1982) *Chem. Lett.*, 1715.
- ◆ Lin, Y.T., Cheng, Y.S., Kuo, Y.H. (1971) *Tetrahedron*, **27**, 5337.
- ◆ Lundgren L., Bergström, G. (1975) *J. Chem. Ecol.*, **1**, 399.
- ◆ Macaira, L.A., García, M., Rabi, J.A. (1977) *J. Org. Chem.*, **42** (26).
- ◆ Motl, O., Sykora, V., Herout, Y., Sorm, F. (1958) *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **23**, 1297, .
- ◆ Nair, M.S.R., Anchel, M. (1973) *Lloydia*, **36**, 106.

- ♦ Randriamiharisoa, R., Gaydon, E.M., Faure, R. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **24**, 275, (1986).
- ♦ Sanz, J.F., Marco, A. (1991) *Phytochemistry*, **30**, 2788.
- ♦ Shaw, J., Noble, T., Epstein, W.J. (1975), *Chem. Soc., Chem. Commun.*, 590.
- ♦ Smítalová, Z., Budesínský, M., Saman, D., Vasícková, S., Horub, M. (1984) *Collect. Czech. Chem. Comm.*, **49**, 852.
- ♦ Soffer, M.D., Brey, M., Fournier, J. (1958) *Chem. & Ind.*, 19.
- ♦ Soffer, M.D., Brey, M., Fournier, J. (1959) *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1678.
- ♦ Sriraman, M.C.; Nagasampagi, B.A., Pandey, R.C., Dev.S. (1973) *Tetrahedron*, **29**, 985.
- ♦ Thomson, R.H. (1985) "The Chemistry of Natural Products" Blackie & Sons Ltd.
- ♦ Westfeld, L. (1970). *Acta Chem. Scand.*, **24**, 1618.
- ♦ Willuhn, G., Pretzch, G., Wendisch, D. (1981) *Tetrahedron*, **37**, 773.

HIDROXI ACETOFENONAS PRENILADAS

La tribu Senecioneae comprende aproximadamente 1300 especies de las cuales 208 se encuentran en Chile. Dentro del género *Senecio*, la especie *graveolens*, vulgarmente llamada "chachacoma", es una especie endémica que se encuentra en el norte de Chile, a altitudes por encima de los 3.000 m. Es un arbusto altamente difundido como remedio para el mal de altura, también llamado puna o soroche. Esta planta es de uso medicinal para los lugareños. Loyola (Loyola *et al.*, 1985), informa la presencia (aislamiento y elucidación estructural) de cinco compuestos aromáticos: dihidroeuvarina (1), hallada previamente en el género *Werneria* (Lock de Ugaz *et al.*, 1984), 4-hidroxi-3-(3'-isopenten-2-il) acetofenona (2); 3-hidroxi-2,2-dimetil-6-acetilcromano (3) y dos nuevas p-hidroxi acetofenonas: 5-acetil salicilaldehído (4) y 4-hidroxi-3-(3'-hidroxi isopentil) acetofenona (5).

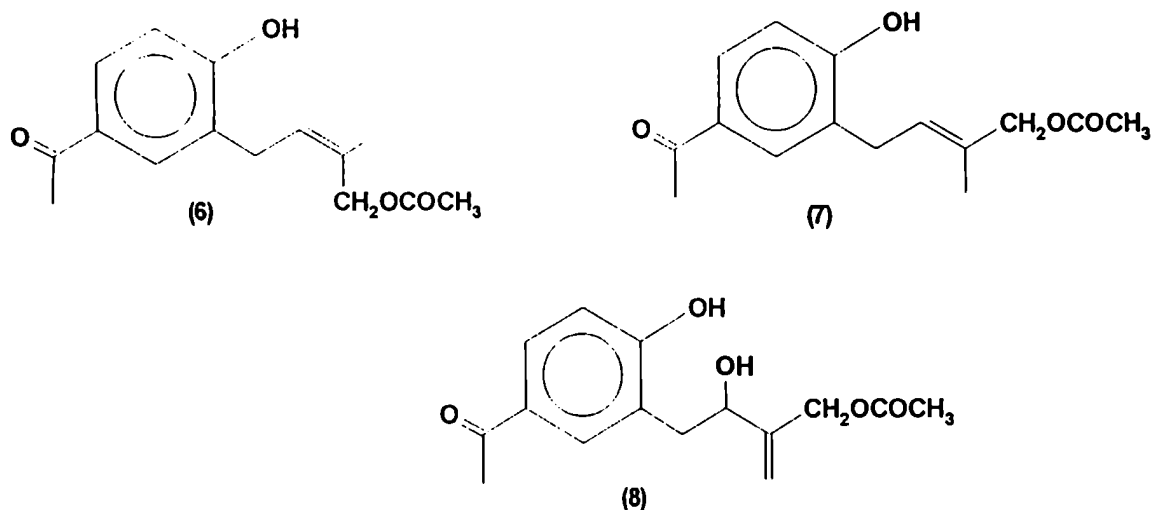


Este último compuesto coincide en sus características espectroscópicas con el hallado en este trabajo como ampliamente mayoritario en las fracciones CM-9 y CM-10 (ver Parte Experimental, pág 193-196). Con relación al uso medicinal popular

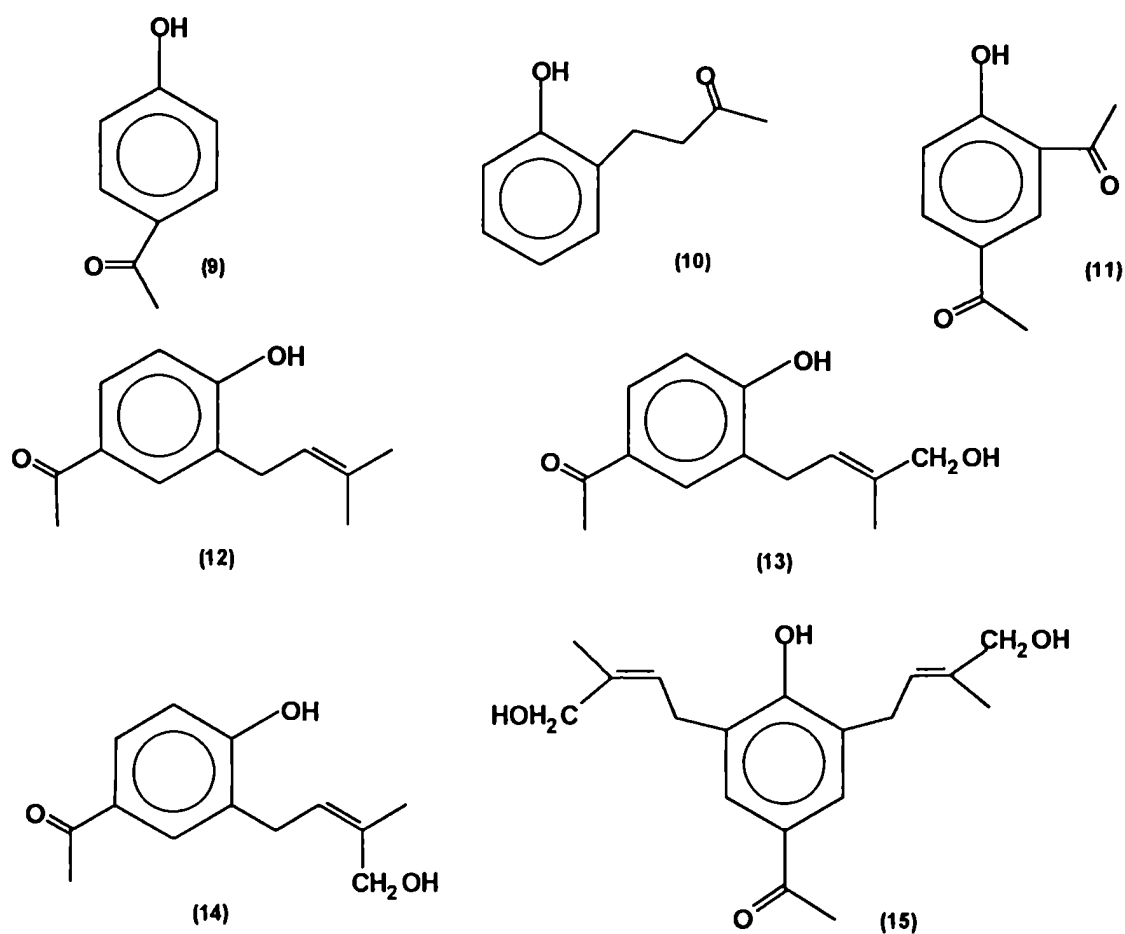
de esta planta es de interés remarcar que la dihidroeuparina ha mostrado fuerte actividad hipotensiva en ratas, en concentraciones fisiológicas.

Esta actividad biológica, podría ser extendida a las otras acetofenonas, lo cual se asociaría directamente con este uso popular.

De Pascual (De Pascual *et al.*, 1984) informa que en otra Compuesta, la *Artemisia campestris* subespecie *glutinosa*, encontraron tres nuevos derivados de acetofenona en el extracto no polar, luego de cromatografiar la fracción débilmente ácida. Estos son la 3-[4-acetoxiisopent-2(Z)-enil]-4-hidroxiacetofenona (6), la 3-[4-acetoxiisopent-2(E)-enil]-4-hidroxiacetofenona (7) y la 3-(3-acetoximetil-2-hidroxibut-3-enil)-4-hidroxiacetofenona (8).



Para esta misma planta, el mismo grupo había encontrado unos años antes, además de p-hidroxi acetofenona (9), también en la fracción débilmente ácida, cinco nuevos compuestos aromáticos: o-hidroxifenilbután-2-ona (10); 3-acetil-4-hidroxiacetofenona (11); 3-(isopent-2-enil)-4-hidroxiacetofenona (12); 3-[4-hidroxiisopent-2(E)-enil]-4-hidroxiacetofenona (13); 3-[4-hidroxiisopent-2(Z)-enil]-4-hidroxiacetofenona (14) y 3-[4-hidroxiisopent-2(Z)enil]-5-[4-hidroxiisopent-2(E)-enil]-4-hidroxiacetofenona (15).



De estos productos, el 3-(isopent-2-enil)-4-hidroxiacetofenona (12) presentaba las mismas características espectroscópicas que el compuesto encontrado en las fracciones CM-6, CM-7 y CM-8 como producto ampliamente mayoritario (ver Parte Experimental, pág 187-189), y junto con el compuesto (5) anteriormente descrito en la CM-9 del extracto no polar.

Para la *Artemisia campestris*, habían encontrado unos años antes (De Pascual *et al.*, 1980) p-hidroxi acetofenona (9) y cuatro derivados que hasta ese año no habían sido informados como productos naturales (15), (16), (17) y (18).



(16)



(17)



(18)

DESCRIPCION DE LA LABOR REALIZADA.

Se purificó la fracción CM-6 usando técnicas cromatográficas diversas (ver Parte Experimental, pág 187). Esta fracción resultó estar formada por un producto mayoritario (81%). La fracción se llamó CM-6 (E1) 6. Esta nueva fracción se purificó por sucesivos fraccionamientos cromatográficos hasta llegar al producto puro que se denominó A4.

Este compuesto revelaba violeta con ácido sulfúrico 50%, y era un sólido blanco que pasaba a amarillento con el tiempo.

El espectro IR, presentaba bandas de hidroxilo ($3400-3000\text{ cm}^{-1}$), de carbonilo conjugado (1665 cm^{-1}), de producto aromático (1590 cm^{-1}) y de doble enlace (1600 cm^{-1}).

El espectro $^1\text{H-RMN}$ mostraba un doblete con $J=7\text{ Hz}$ que integraba para dos hidrógenos a $\delta\ 3.38$ que correspondía a metileno α a doble enlace y a un anillo aromático simultáneamente; un multiplete complejo a $\delta\ 5,32$ que indicaba la presencia de un hidrógeno sobre doble enlace, lo cual corroboraba la adjudicación anterior. En la zona de campos altos, había dos señales singuletes correspondientes a metilo, una integraba para 3 hidrógenos y la otra para 6 hidrógenos. La primera, a $\delta\ 2,56$ se atribuyó a un metilo α a carbonilo y la segunda a dos metilos iguales sobre el doble enlace. Con este grupo de señales quedó armado un grupo isoprenilo y un acilo.

En la zona de campos bajos, se observaban tres señales, a $\delta\ 6,89$, $7,71$ y $7,77$ por lo que se supuso que el anillo aromático debería ser trisustituído y las constantes de acoplamiento entre ellas, $2,0$ y $8,2\text{ Hz}$, señalaban que la sustancia tenía una sustitución de tipo 1,3,4. Dado que aparecía una señal a $\delta\ 6,89$ con $J=8,2\text{ Hz}$, lo que indica hidrógenos en posición *orto*, se supuso que debería tratarse de 3-alquil-4-hidroxi acetofenona. A su vez ésta se correspondía con un doblete que presentaba 2 acoplamientos, con $J= 8,0\text{ Hz}$ (tipo *orto*) y $J=2,0\text{ Hz}$ (tipo *meta*) centrado a $\delta\ 7,77$; este último valor de J era el mismo que presentaba la señal a $\delta\ 7,71$.

El $^{13}\text{C-RMN}$ presentaba 13 señales entre las que se destacaban las pertenecientes al doble enlace a $\delta\ 121.3$ y 134.6 ppm , al carbono sustituido por el hidroxilo a $\delta\ 159,6\text{ ppm}$, y la correspondiente al carbonilo a $\delta\ 198,4\text{ ppm}$. Las demás señales podían ser agrupadas en dos grupos, las aromáticas, pertenecientes a los demás carbonos del núcleo bencénico a campos bajos entre $\delta\ 131$ y $\delta\ 115$, y a

campos altos las de tipo alifático correspondientes a los metilos y metileno restantes.

Este compuesto mostraba en su espectro de masa un M⁺ de 204 una concordante con una fórmula molecular de C₁₃H₁₆O₂. Se observaban intensidades importantes para m/z 189 (M-15, 100%) por pérdida de metilo, m/z 149 (M-55, 88%) por pérdida de la cadena lateral, ambas por ruptura β al núcleo aromático, m/z 133, (76%), m/z 115 (14%), m/z 91 (18%) y 77 (21%).

Con todos estos datos se podía postular una cetona prenilada con sustitución 1,3,4, la **4-hidroxi-3-(isopenten-2-il) acetofenona**. Los datos espectroscópicos obtenidos coincidían con lo informado en bibliografía (De Pascual *et al.*, 1980).

Para la fracción siguiente (CM-7) ocurrió algo similar. Aproximadamente el 60% del total era un único compuesto cuyas características espectrales coincidían, variando en algunos casos en unas pocas ppm, con los datos del compuesto anterior. Al compuesto obtenido en esta fracción se lo llamó A5. Se supuso que podía tratarse del mismo compuesto o quizás de un isómero de posición. Los valores de desplazamiento químico en el espectro de RMN-¹³C para un mismo carbono excedían o estaban en el límite de error del equipo y eso condujo a suponer que se estaba en presencia del mismo compuesto.

El análisis de la fracción siguiente (CM-8) condujo a una situación similar; aproximadamente el 50% de la misma era un compuesto al que se designó A6, que tenía el mismo comportamiento cromatográfico que los dos anteriores y presentaba las mismas sutiles diferencias con los dos anteriores en los espectros de ¹H-RMN y de ¹³C-RMN, (ver Parte Experimental, pág 192-193).

Para establecer la probable existencia de isómeros de posición se procedió al análisis de las mismas por coinyección en CG y CLAR.

En ambos casos se probaron diversas columnas (ver Parte Experimental, pág 187). En el caso de CG, en todas las columnas utilizadas A6 tiene un tiempo de retención menor que A4 y A5. Estos dos últimos lo tienen prácticamente igual, difieren sólo en el segundo decimal. Al inyectar una mezcla de los los tres productos no se produce separación, obteniéndose un pico bien definido con todas las columnas utilizadas.

También se analizaron por CLAR para corroborar que se trataba de un único compuesto. Para esto se usaron dos columnas analíticas (ver Parte Experimental, pág 189) y se analizaron las tres muestras por separado y coinyectándolas. Se comportaron en forma análoga a lo visto en CG, en este caso A4 y A6 son los que tienen tiempos de retención similares, mientras que A5 queda algo retrasado.

Para resolver esta cuestión se decidió finalmente hacer un espectro de ^{13}C -RMN de la mezcla de los tres productos. Se intentaba asegurar que una misma señal no apareciera por duplicado o triplicado, lo cual indicaría la presencia de isómeros y no la de un mismo compuesto tan mayoritario que aparecía en tres fracciones diferentes, como era de suponer por lo visto en CLAR y CG. Se realizó un espectro de ^{13}C -RMN de la mezcla en cantidades equimoleculares de los tres componentes y se obtuvo un espectro con trece únicas señales bien definidas.

Por esto se concluyó que pese a haber sido encontrados en distintas fracciones del extracto, correspondientes a mezclas de elución de distinta polaridad en la columna madre y repurificados a partir de las mismas usando distintos sistemas (sílica gel-solvente), eran los tres el mismo compuesto.

Siguiendo con la misma metodología se fraccionaron las fracciones CM-9 y CM-10. En ambas estaba presente el producto anterior, la **4-hidroxi-3-(isopenten-2-il) acetofenona**, pero había otro importante que también revelaba violeta con ácido sulfúrico y calor pero que tenía menor R_f en CCD y mayor tiempo de retención en CG. Este nuevo compuesto y la cetona prenilada constituían la parte mayoritaria en ambas fracciones, si bien en la CM-10 se observaba que quedaba retenida en el punto de siembra una banda amarilla importante. Esta última resultó ser de cumarinas que se analizaron posteriormente en el extracto metanólico (ver Capítulo Cumarinas, pág 150).

La fracción CM-9 se purificó usando las técnicas cromatográficas a escala preparativa por columna seca de sílica gel G, y luego a escala analítica para tener producto suficientemente puro como para analizarlo espectroscópicamente.

Su EM mostraba un M^+ a m/z 222, 18 una más que la cetona prenilada encontrada en fracciones anteriores, y un pico base de m/z 204 consecuencia de una posible deshidratación. A partir de ese fragmento se producían las rupturas β preferenciales para las cadenas sustituyentes del núcleo aromático dando los iones 204-15 y 204-55, de menor intensidad comparándolos con los producidos a partir de la cetona prenilada para la cual el M-15 era el pico base.

Los espectros de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN también presentaban diferencias. Comparando con el producto anterior, habían desaparecido señales en la zona de los alquenos y habían aparecido otras a campos altos correspondientes a carbonos alifáticos. La zona aromática presentaba las mismas características que para el compuesto anterior, una sustitución tipo 1,3,4 con $J=8,4$ Hz y 2,3 Hz para acoplamientos *orto* y *meta* respectivamente. Se apreciaban además señales a δ 1,78

t ($J= 6,8$ Hz) y a δ 2,72 que se correspondía con la anterior, también triplete y con $J=6,8$ Hz. Esto correspondería a dos metilenos vecinos. En el nuevo compuesto la señal correspondiente a agrupaciones metilo se observaba como un único singulete que integraba para seis hidrógenos. Todos estos datos indicaron que este nuevo producto estaba estructuralmente relacionado con la **4-hidroxi-3-(isopenten-2-il) acetofenona** obtenida anteriormente. Dado que prácticamente no existía variación entre los hidrógenos de la zona aromática, la diferencia entre este nuevo producto y el anterior radicaba en la modificación en los sustituyentes, en particular de la cadena isoprenoide. Se postuló como estructura probable para este compuesto la correspondiente al **4-hidroxi-3-(3'-hidroxi-isopentil) acetofenona (5)**. Esta propuesta se confirmó con lo informado por el espectro de ^{13}C -RMN, en donde aparecen doce señales, una menos que para el anterior. Las correspondientes al doble enlace a δ 121,3 y 134,6 no aparecen. Se observan hacia campos más altos, dos señales a δ 24,9 y 71,9 respectivamente, siendo esta última una señal característica de carbono sustituido por oxígeno. A campos altos se observaba una señal con el doble de la intensidad para los metilos 4' y 5', que en el compuesto anterior aparecían a diferente valor de campo por estar sobre un doble enlace.

La estructura propuesta para este nuevo compuesto coincide con lo informado en bibliografía por Loyola (Loyola *et al.*, 1985) para el aislado de *Senecio graveolans*, también perteneciente a las Compuestas. Es de hacer notar que fue la primera vez que se aisló una acetofenona y su derivado hidratado en la cadena isoprénica en una especie del género *Werneria*.

OH

O

4-Hidroxi-3-(isopenten-2-il)acetofenona

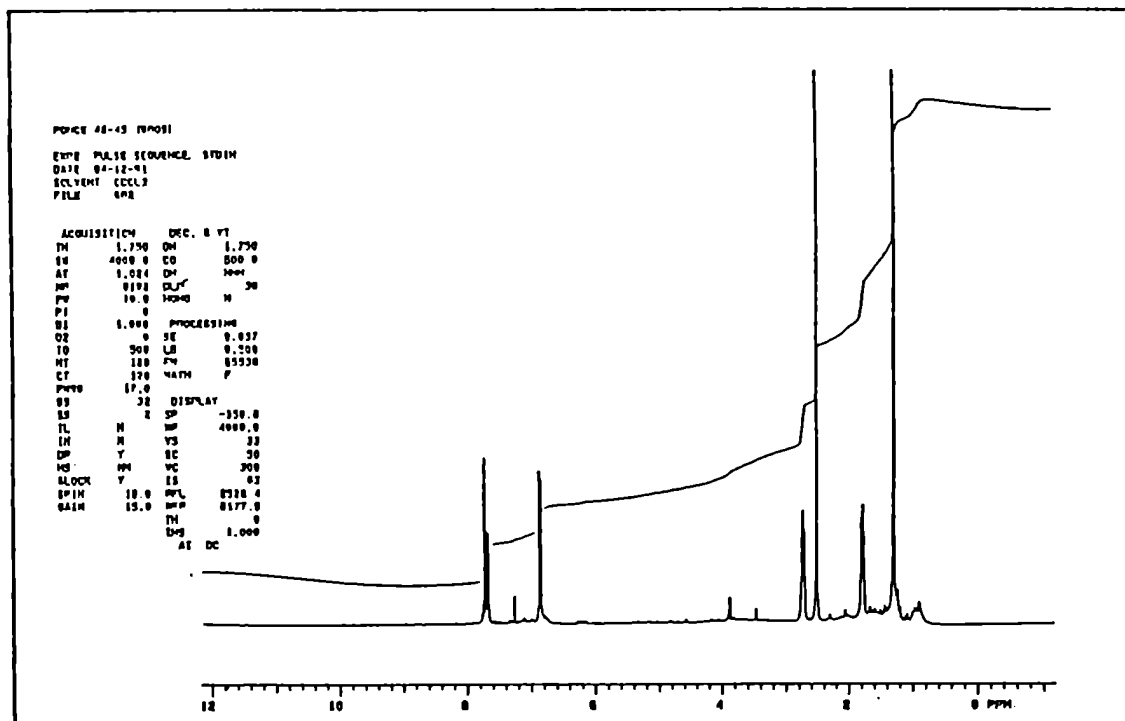
OH

O

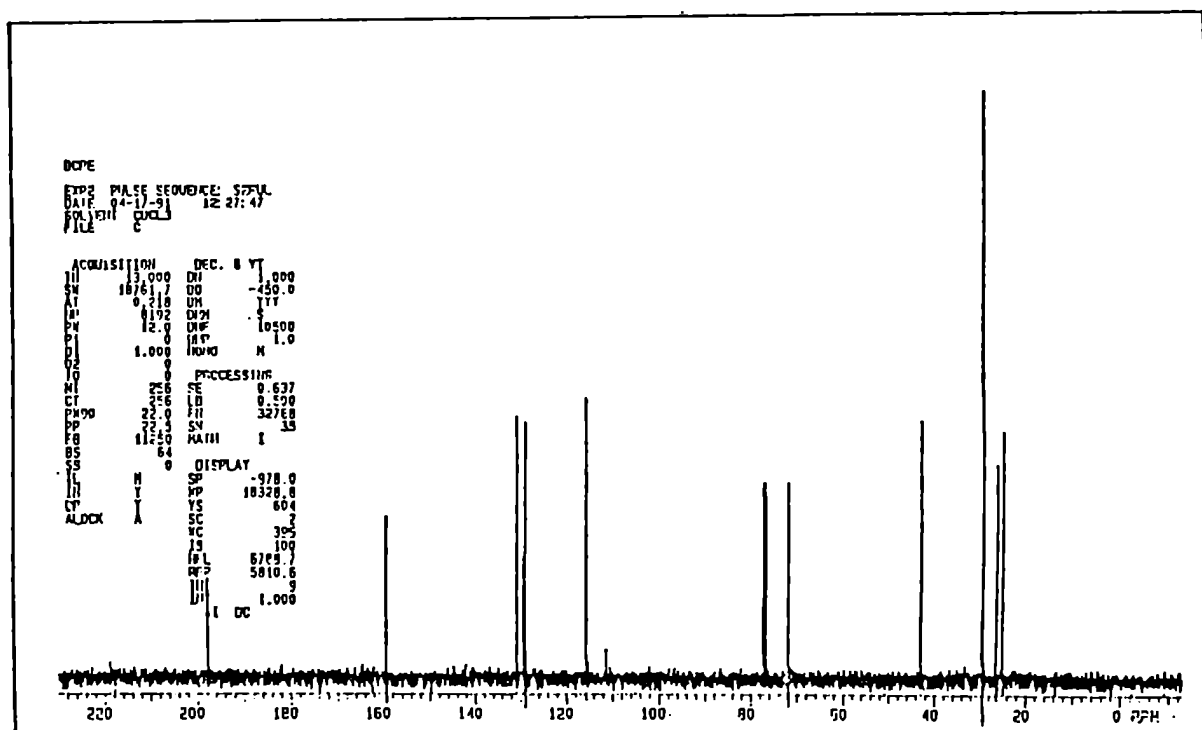
OH

4-Hidroxi-3-(3'-hidroxi-isopentil)acetofenona

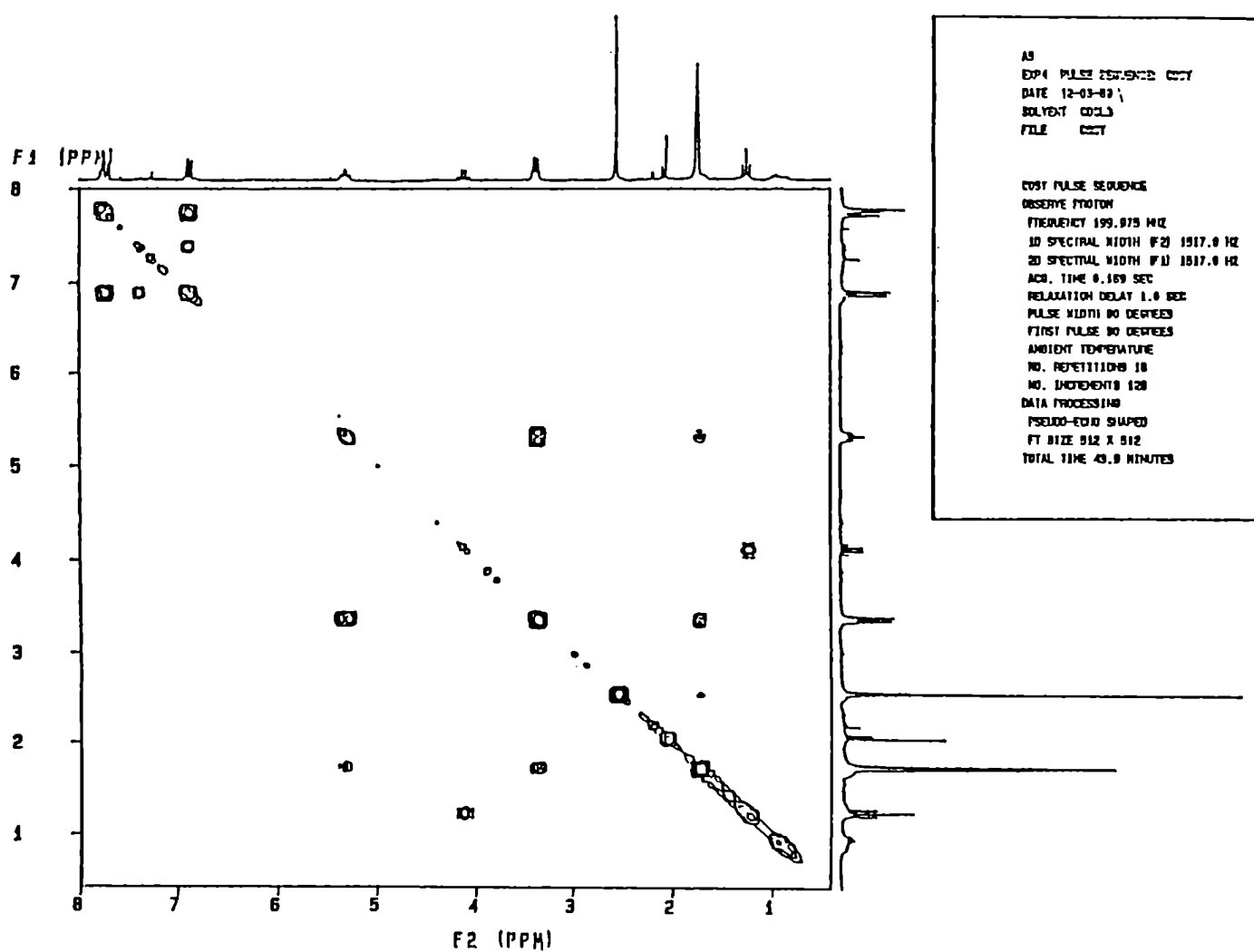
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de 4-hidroxi-3-(3'-hidroxi-isopentil) acetofenona.



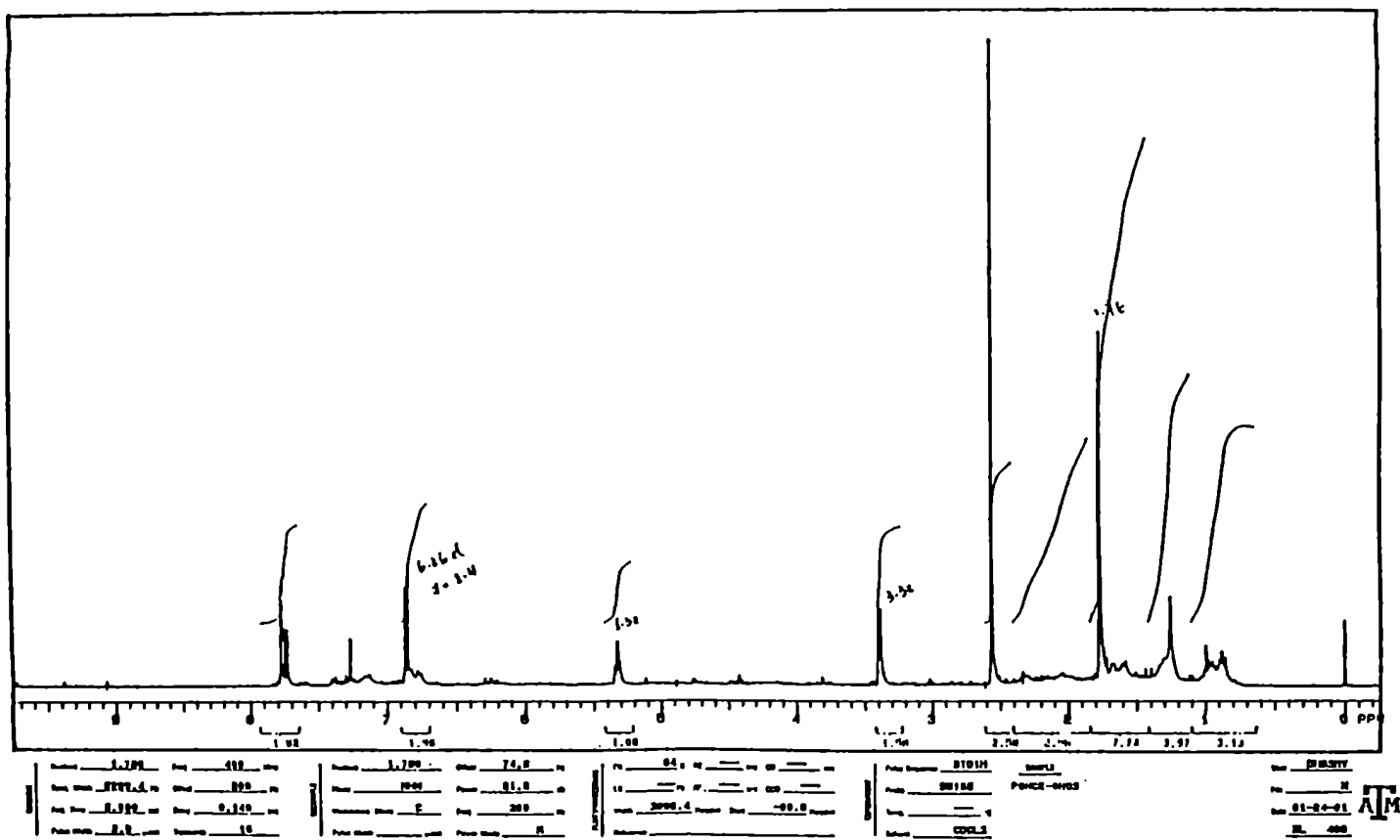
^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) de 4-hidroxi-3-(3'-hidroxi-isopentil) acetofenona.



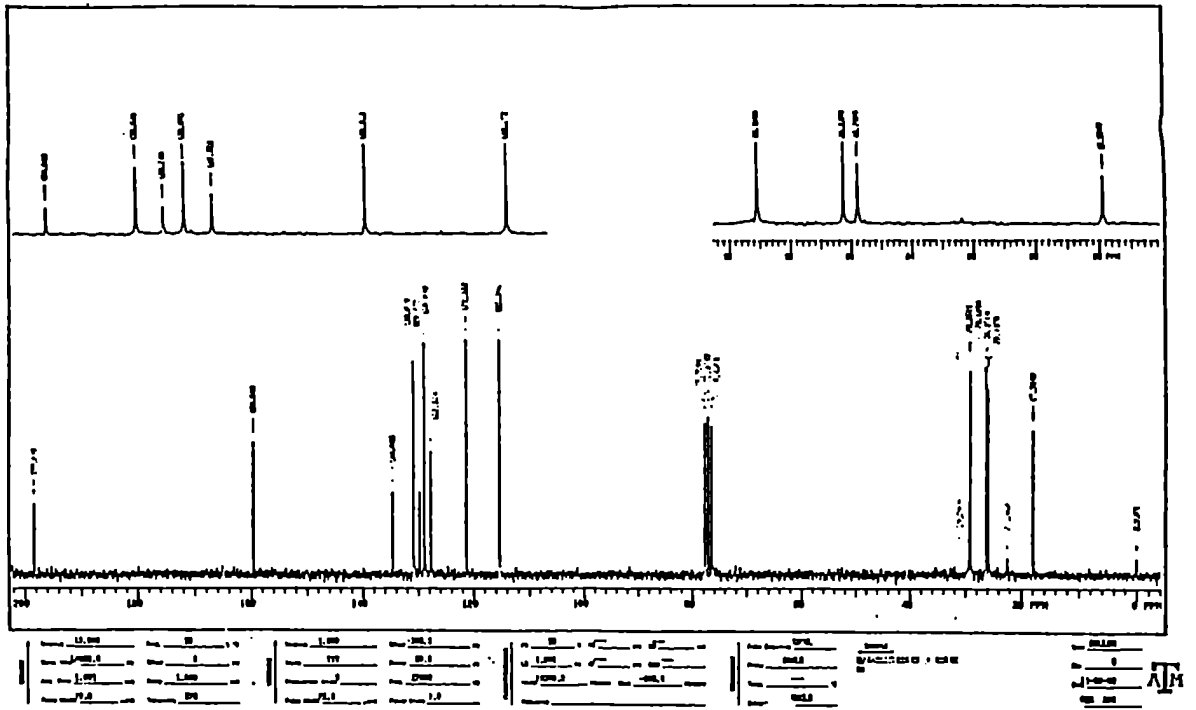
^1H -RMN (200 MHz, COSY (H-H), CDCl_3) de 4-hidroxi-3-(isopenten-2'-il) acetofenona.



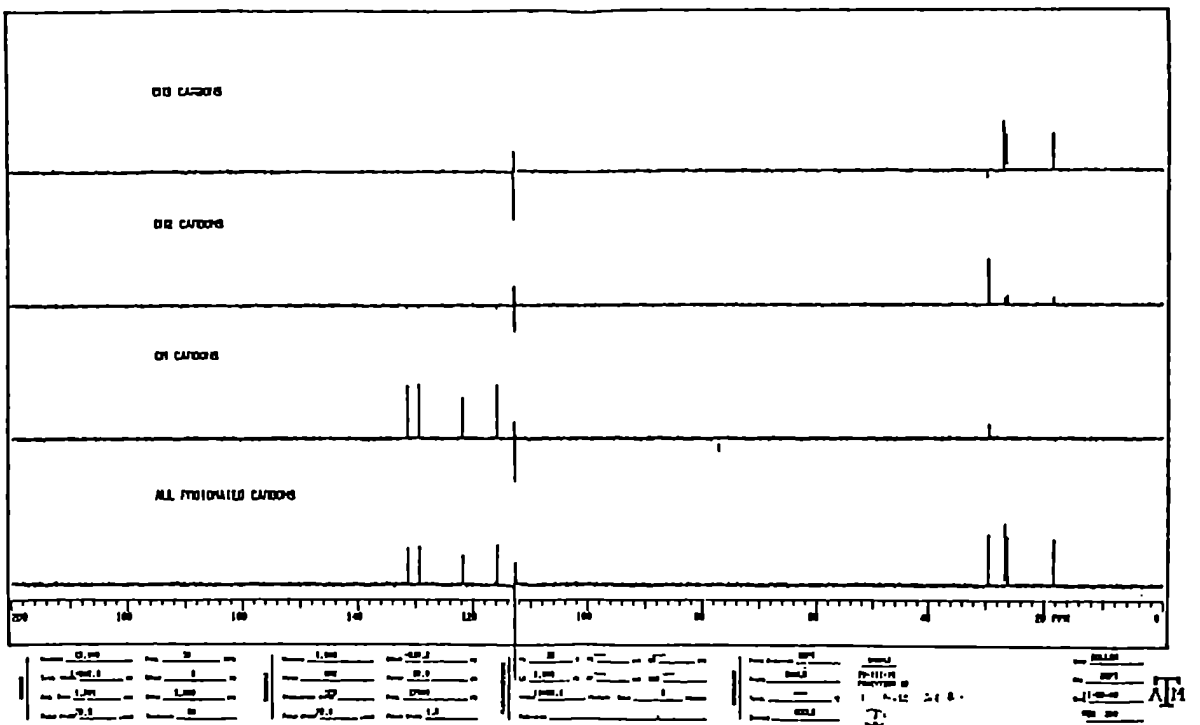
$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) de 4-hidroxi-3-(isopenten-2'-il) acetofenona.



¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) de 4-hidroxi-3-(isopenten-2'-il) acetofenona.



¹³C-RMN (50 MHz, DEPT, CDCl₃) de 4-hidroxi-3-(isopenten-2'-il) acetofenona.



BIBLIOGRAFIA.

- ◆ De Pascual, T.J., Bellido, I.S., González, M.S., Muriel, M.R. y Hernández., J.M. (1980) *Phytochemistry* **19**, 2781.
- ◆ De Pascual, T.J., González, M.S., Muriel, M.R. y Bellido, I.S. (1984) *Phytochemistry*, **23**, 1819.
- ◆ Lock de Ugaz, O., Hjar, A., Borges del Castillo, J., Seligmann, O. y Wagner, H. (1984) *Fitoterapia*, **55**, 248.
- ◆ Loyola, L.A., Pedreros, S. y Morales, G., (1985) *Phytochemistry*, **24**, 1600.

FLAVONOIDES.

Esta familia de metabolitos secundarios es una de las más distribuidas dentro de las plantas superiores. Se caracterizan todos ellos por tener un esqueleto común, de 15 carbonos, que puede esquematizarse como $C_6-C_3-C_6$, cada C_6 simboliza un anillo aromático. Ambos anillos aromáticos están unidos por 3 C, que a su vez forman un tercer anillo heterocíclico al ciclarse con uno de los anillos aromáticos a través de un átomo de oxígeno. Los anillos aromáticos se denominan A y B y el heterocíclico, C. A esta fórmula general responden un número grande de compuestos; los principales son: flavonas, flavonoles, chalconas, flavanonas, auronas e isoflavonas.

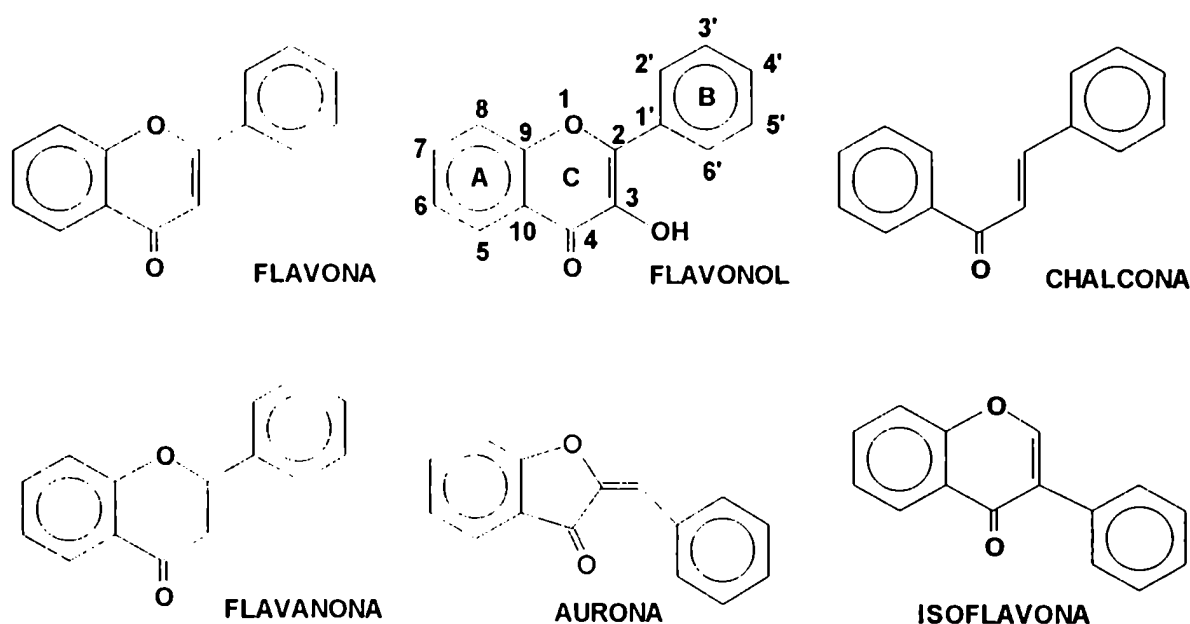


FIG 1

Hasta el presente se conocen más de 2.000 flavonoides, los compuestos más abundantes dentro de este grupo son las flavonas y flavonoles (3-hidroxi flavonas), muchos de ellos se encuentran como glicósidos. Estos son solubles en agua y se encuentran preferentemente en el líquido celular. Se conoce también un gran número de flavonoides libres (agliconas).

Los flavonoides aún con más de 5 hidroxilos son escasamente solubles en agua. Sus derivados metilados, al aumentar el grado de metilación, se vuelven cada vez más liposolubles encontrándose con otros productos de esta naturaleza en zona de excreción de la planta.

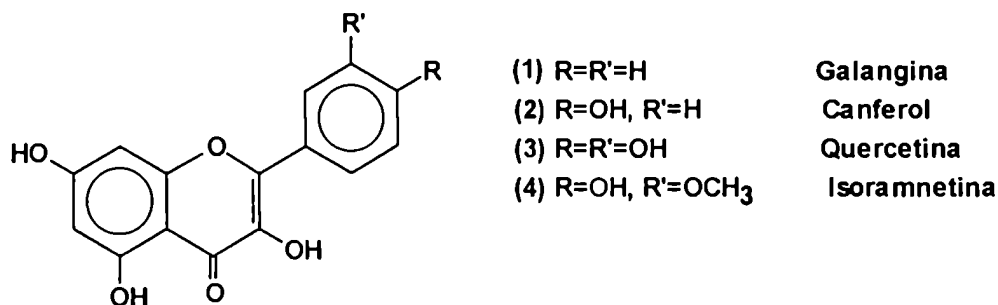


FIG 2

Los monometiléteres, como isoramnetina (4), aparecen frecuentemente como glicósidos. A su vez, la isoramnetina (4) y el canferol (2) están ampliamente distribuidos como agliconas. Su naturaleza lipídica no permite su acumulación en el líquido celular, sino en zonas extracelulares, por ejemplo, glándulas oleosas en cáscaras de *Citrus*.

Se supuso que debía haber una correlación entre la presencia de agliconas libres y ciertas estructuras vegetales. Hänsel (Steinegger *et al.*, 1972) estableció ciertas correlaciones entre actividades metabólicas y el desarrollo de estructuras anatómicas especializadas por medio de las cuales ciertos productos pueden ser excretados.

Así Hänsel llegó a las siguientes conclusiones:

1- Flavonoides glicosidados:

Se encuentran en las vacuolas como pigmentos disueltos en el líquido celular.

2- Hidroxiflavonoides libres:

Se encuentran en plantas leñosas, preferentemente en tejidos muertos, como excreciones de la madera.

3- Flavonoides lipofílicos:

Poseen un número bajo de hidroxilos y un número grande de metoxilos. Se encuentran principalmente en cavidades o excreciones celulares, o como constituyentes de las ceras epicuticulares de las hojas, (Wollenweber *et al.*, 1981; Steinegger *et al.*, 1972).

En algunos casos las agliconas de flavonoides también se localizan abundantemente en la parte externa de las hojas, como ejemplo se pueden citar las harinas externas de helechos de las *Gimnograminoideae*, especialmente las pertenecientes a los géneros *Cheilantes*, *Notholaenan*, *Pityrogramnea* y harina de especies de *Primula*. En el caso del género *Larrea* (*Zygophyllaceae*) las agliconas son constituyentes de una resina que cubre las hojas y ramas (Sakakibara *et al.*, 1976). Se encontraron también flavonoides en la capa epicuticular de hojas de *Eucaliptus* (*Myrtaceae*), entre los numerosos ejemplos de flavonoides depositados externamente.

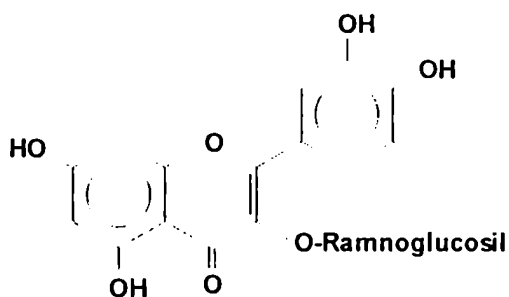
Como las sustancias fenólicas generalmente tienen una actividad antibacteriana significativa, se supuso que su acumulación en tejidos tendría como fin actuar como barrera contra la invasión de microorganismos. Esto está de acuerdo con lo postulado por Swain (Wollenweber *et al.*, 1981) respecto a que los flavonoides metilados lipofílicos serían una protección adecuada contra microorganismos a causa de la facilidad que presentan para atravesar membranas. El hecho de que hayan sido encontrados, al menos en trazas, en las capas epicuticulares de una variedad de vegetales parece favorecer esta hipótesis.

ACCION FARMACOLOGICA.

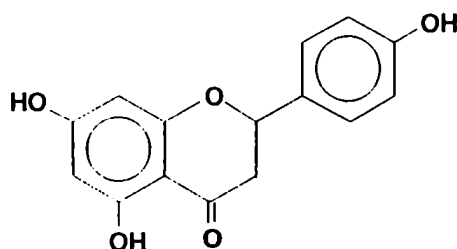
EFFECTO Y USO DE DROGAS CON FLAVONOIDES:

No se logró con los flavonoides correlacionar totalmente las observaciones en animales de experimentación con las experiencias clínicas. Independientemente de que los flavonoides sean compuestos muy activos, o sustancias poco activas, se trata de un grupo de compuestos con una gran variación estructural y con un comportamiento físico-químico diferencial (coeficientes de partición). Midiendo la toxicidad de las sustancias sobre animales inferiores (lombrices, gusanos, insectos) se muestra la relación estrecha entre coeficientes de partición y toxicidad. Dentro de una serie homóloga de compuestos, los menos solubles en agua son los que presentan mayor toxicidad. Así, los derivados hidroxilados son menos tóxicos que los correspondientes metoxilados, y los derivados no sustituidos son más tóxicos comparados con los compuestos hidroxilados. Existen ejemplos de estrecha especificidad estructural sobre la acción. Los glicósidos de flavonoles y flavanonas tipo rutina (5) y naringenina (6) son inocuos, no presentando efectos tóxicos aún después de administrar en humanos más de 60 mg de rutina por día durante cinco años y aún

con dosis masivas.

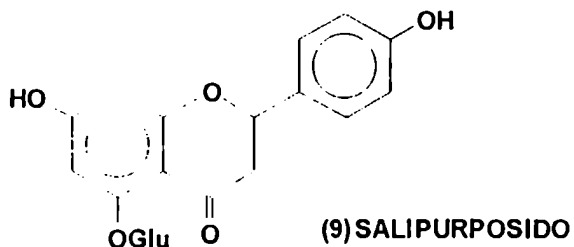
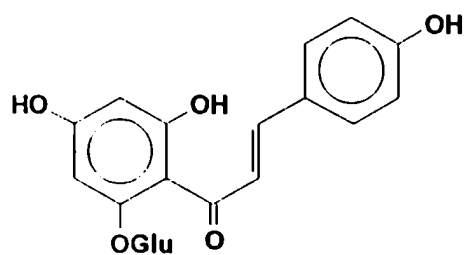
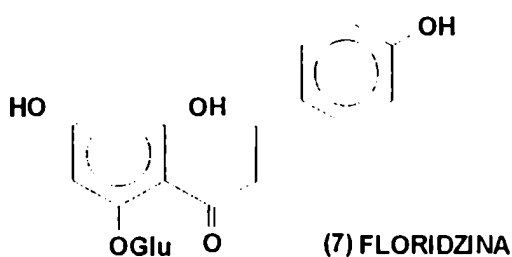


(5) RUTINA



(6) NARINGENINA

En cambio la floridzina (7) que es un glicósido de dihidrochalcona, comparable en solubilidad con la rutina (5), presenta una acción llamativa pues conduce a un cuadro similar a una diabetes renal; disminuye el umbral de glucosa en los riñones y sobreviene un aumento patológico de eliminación de glucosa en orina. Otros compuestos relacionados con los anteriores como isosalapurpósido (8) y salipurpósido (9), componentes de *Helichrysum arenarium*, no presentan acción renal (Steinegger et al., 1972).



Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción de flavonoides puros aún no está aclarado, el problema se complica más cuando se emplean extractos de plantas medicinales. En cuanto a la responsabilidad de los flavonoides en la acción de drogas o plantas medicinales debe tenerse en cuenta:

- 1- Contenido total de flavonoides.
- 2- Posible presencia de flavonoides activos acompañantes no comprobables analíticamente, pero sí desde el punto de vista farmacodinámico.
- 3- Posible presencia de otros componentes desconocidos pero farmacodinámicamente no inertes (sinergistas).

Aunque existen pocos datos, llama la atención que plantas con acción diurética y tonificante venosa tienen como sustancias secundarias saponinas (*Aesculus*, *Solidago*, *Betula*); por ello las experiencias en animales con soluciones modelo de flavonoides puros son menos activas que extractos de plantas con igual concentración de flavonoides (Steinegger *et al.*, 1972).

METODOS ESPECTROSCOPICOS EN LA ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES.

ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Los espectros ultravioleta-visible de flavonas y flavonoles en solución metanólica exhiben los picos de mayor absorción en la región de 240 a 400 nm. Estos picos se conocen como Banda I (entre 300 y 380 nm) y Banda II (entre 240 y 280 nm). (Mabry *et al.*, 1970). Se considera que la Banda I está asociada al anillo B, incluido en el sistema cinamoilo y la Banda II se debe a la absorción del sistema benzoilo del anillo A.

La Banda I proporciona información sobre el tipo de flavonoide y su patrón de oxidación. Por esto es posible distinguir entre flavonas y 3-hidroxi flavonas, ya que para flavonas se encuentra entre 304-385 nm mientras que para flavonoles aparece a mayores longitudes de onda entre 352-385 nm. En el caso de que este hidroxilo esté sustituido (metilado o glicosidado), la Banda I aparece solapando la zona de la Banda II en flavonas y la forma general de las curvas es parecida a la de las flavonas.

Cuando se produce un incremento en el grado de oxidación del anillo B en flavonas y flavonoles se produce un corrimiento batocrómico por cada uno de los

oxígenos involucrados. Por otra parte al producirse modificaciones en el grado de oxidación del anillo B en flavonas y flavonoles, normalmente no se produce corrimiento de la Banda II. La Banda II a su vez puede aparecer como uno o dos picos, IIa y IIb, siendo IIa el de mayor λ lo cual depende del patrón de oxidación del anillo B. Así las flavonas y flavonoles oxigenadas en 3' y 4' muestran dos picos de absorción (o uno con un hombro del lado de mayor λ del pico) entre 250 y 275 nm, mientras que los equivalentes oxigenados en 4' tienen un solo pico.

El aumento en el grado de hidroxilación del anillo A en flavonas y flavonoles produce un corrimiento batocrómico importante para la Banda II y uno pequeño para la Banda I. La presencia o ausencia de la unión puente de hidrógeno del hidroxilo en 5 tiene un efecto marcado en ambas bandas. Cuando éste está ausente, ambas bandas aparecen a menor λ que en sus equivalentes 5 hidroxilados.

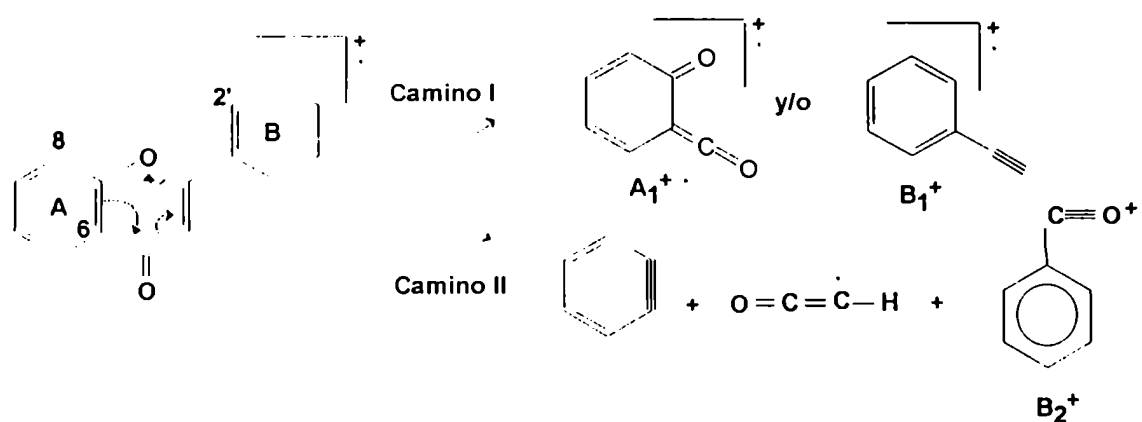
ESPECTROMETRIA DE MASA.

La espectrometría de masa con ionización por impacto electrónico fue aplicada exitosamente a todas las clases de agliconas de flavonoides puras o en mezclas, y a un número de glicósidos, tanto C-glicosil como O-glicosil flavonoides (Mabry, 1975).

La mayoría de las agliconas de flavonoides presentan intensos picos correspondientes al ión molecular (M^+), que es a menudo pico base. La derivatización no es necesaria salvo que se efectúe una cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM), en cuyo caso la trimetilsililación (Pellizari *et al.*, 1969) o la permetilación (Schmid *et al.*, 1973) proporcionan una adecuada volatilidad.

En el caso de glicósidos de flavonoides no derivatizados, el ión molecular es raramente observado y los derivados permetilados o peracetilados producen fragmentos de baja intensidad. Son particularmente útiles los derivados trimetilsililados de glicósidos, ya que dan una idea de la secuencia de unión de los azúcares presentes en el mismo (Schiels *et al.*, 1977; 1978).

Las fragmentaciones más útiles en cuanto a identificación estructural de agliconas son las que involucran la formación de fragmentos que contienen intactos a los anillos A y B, que se designan como camino I y camino II en la siguiente figura:



Es de notar que el camino I produce normalmente dos iones, A_1^+ y B_1^+ , cuya relación es indicativa de la distribución de carga en el ión molecular. En cambio, el camino II muestra predominantemente una sola especie cargada B_2^+ .

Kingston apreció que estos dos caminos son competitivos y que las intensidades combinadas de B_2^+ y B_2-CO^+ son aproximadamente inversamente proporcionales a A_1^+ y B_1^+ . (Kingston, 1971). Excepto en el caso de chalconas, los caminos de fragmentación más importantes que sufren las agliconas de flavonoides (flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y dihidroflavonoles) son similares (Mabry, 1975) (FIG 3 y 4).

Fragmentaciones con valor diagnóstico en los espectros de masa de diferentes tipos de agliconas de flavonoides.

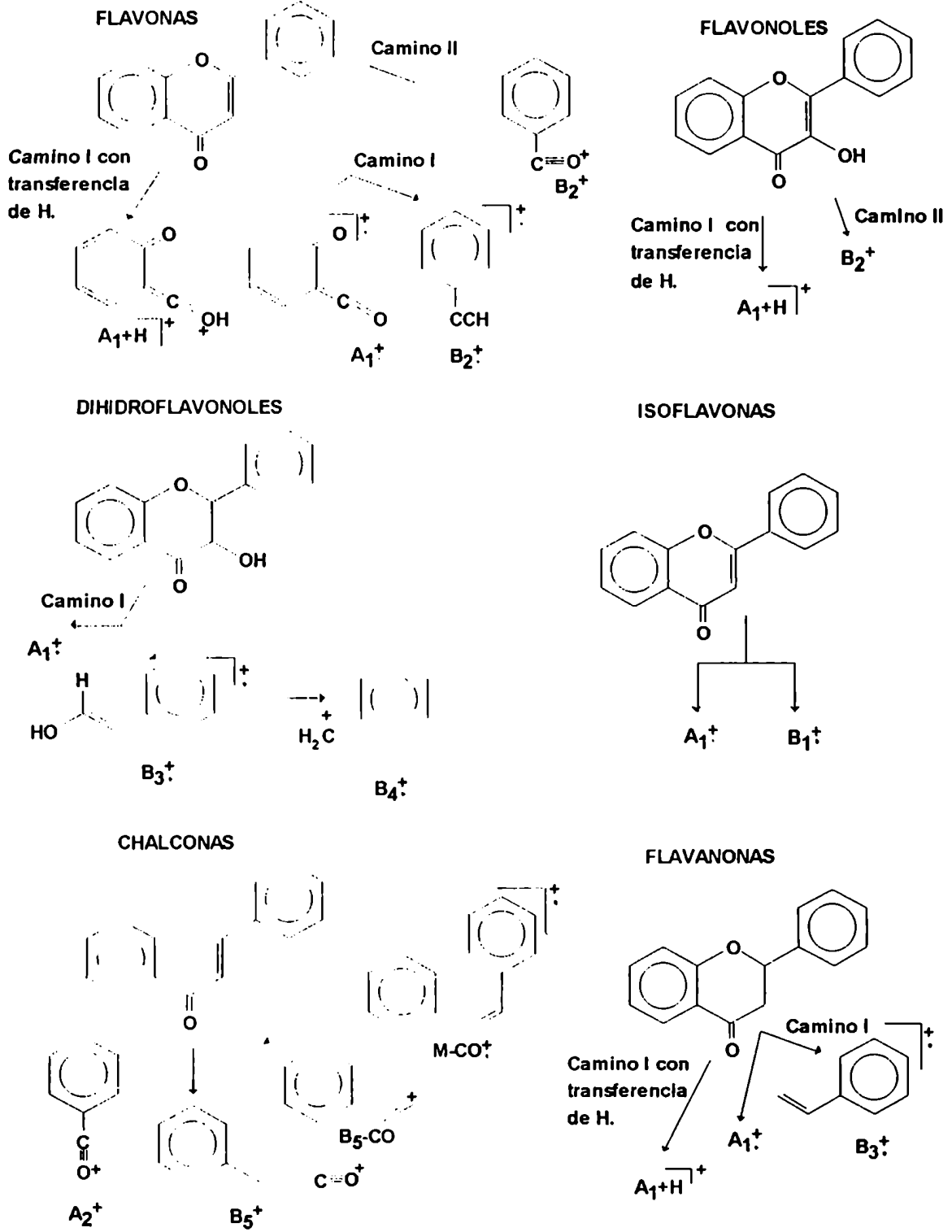


FIG 3

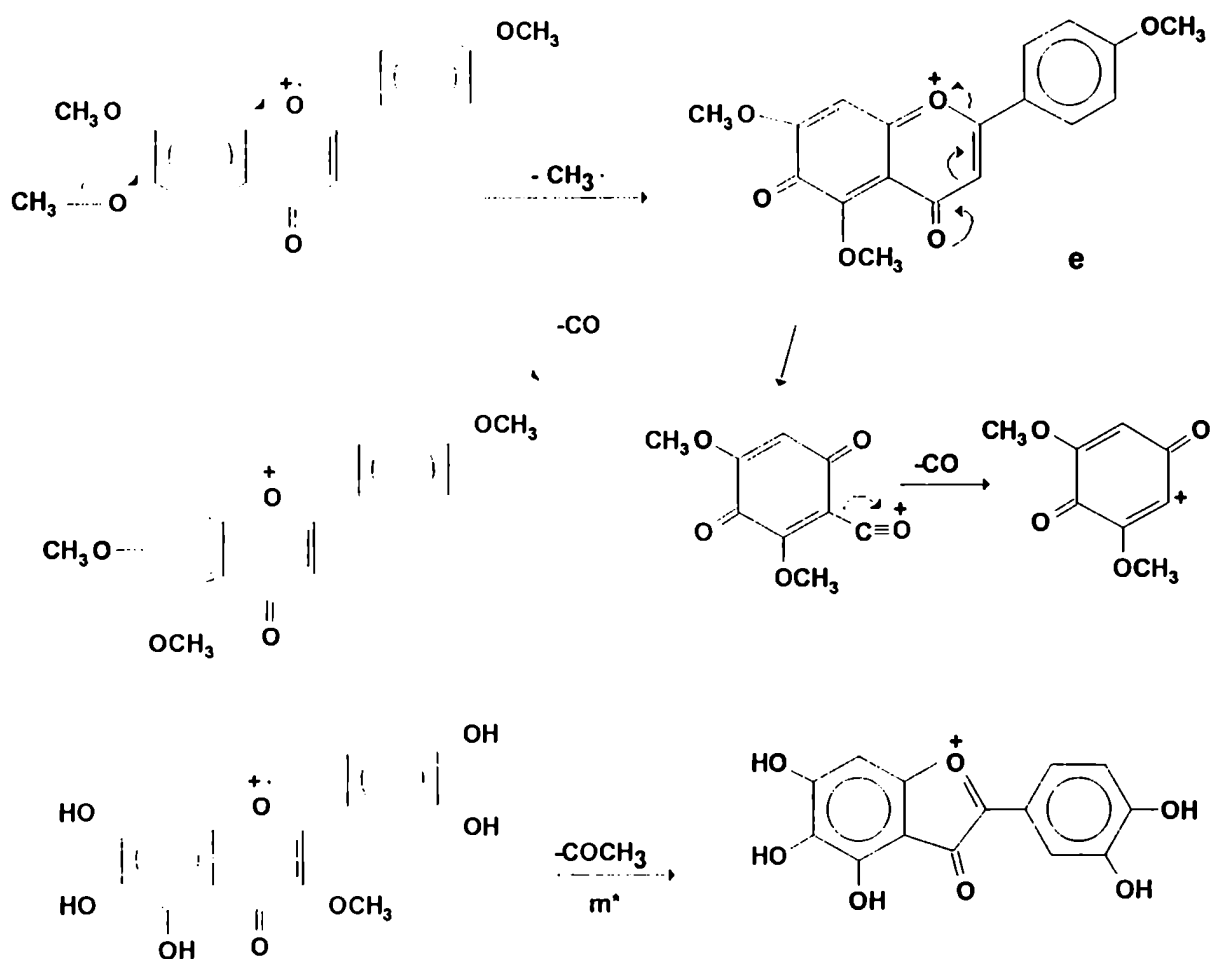


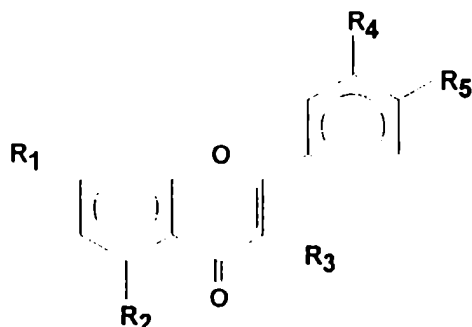
FIG 4

FLAVONAS Y FLAVONOLES.

Las flavonas no poseen un centro o sitio de fácil ruptura, por lo tanto el ión molecular es siempre intenso en el espectro de masa de estos compuestos.

Las flavonas con menos de 4 grupos hidroxilo, muestran iones de moderada intensidad para los fragmentos correspondientes a la ruptura retro Diels-Alder (Flavonoide $^{+}$ --- A_1^{+} + B_1^{+}), por ej.: flavona (10), apigenina (11) y acacetina (12); en cambio, éstos son de menor importancia en compuestos altamente sustituidos como la isoramnetina (4). En el caso de flavonas como estas, con cuatro o más sustituyentes

oxigenados (hidroxilos y metoxilos) no se observan prácticamente los picos correspondientes a la ruptura retro Diels-Alder y en el espectro dominan los iones M, (M-Me), (M-CO-Me).

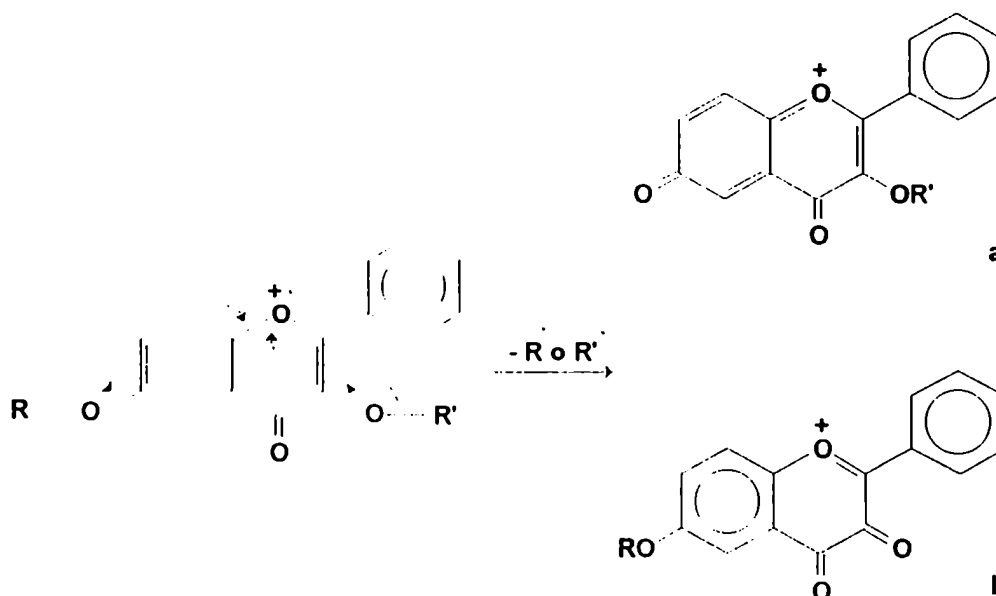


- 10- R₁=R₂=R₃=R₄=R₅=H
- 11- R₁=R₂=R₅=OH; R₃=R₄=H
- 12- R₁=R₂=OH; R₅=OCH₃; R₃=R₄=H
- 4- R₁=R₂=R₃=R₅=OH; R₄=CH₃O-

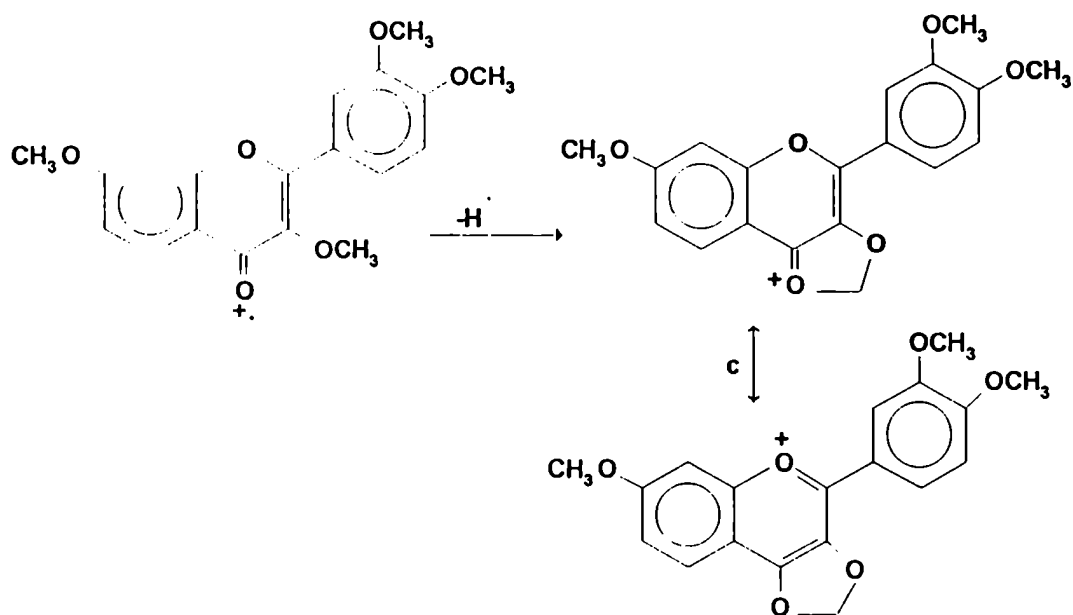
FRAGMENTOS PRINCIPALES.

M-H: Esta pérdida es significativa en dos situaciones distintas:

1- La presencia de un hidroxilo unido a C-3 o C-6 produce la pérdida de H a partir del ión molecular, lo cual se racionaliza suponiendo la formación de los iones tipo quinona (a y b).

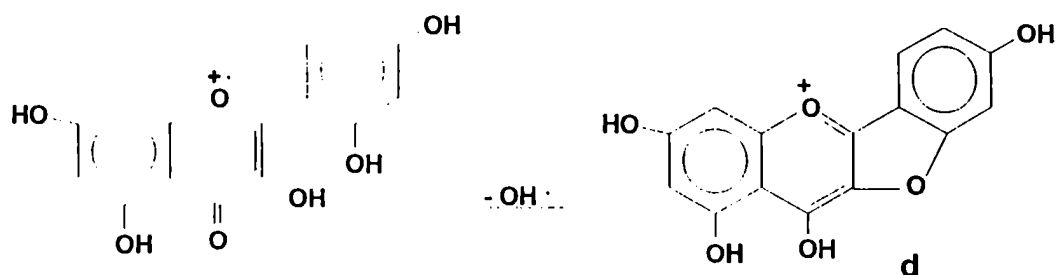


2- Los flavonoides que poseen un metoxilo en C-3 o C-5 pierden un átomo de hidrógeno. Kingston (Kingston, 1971) propone que el carbonilo ionizado desplaza a un átomo de hidrógeno de uno de esos grupos formando un catión estabilizado c.



M-Me: Este ión es abundante en todos los espectros de masa de las 6- u 8-metoxiflavonas, pues esta pérdida está favorecida debido a la formación del catión tipo quinona **a** (o el isomérico derivado de una 8-metoxiflavona). Este proceso compite con fragmentaciones como M-H, que se ve muy reducida; por ejemplo, en la 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona, en la que el ión base es el fragmento M-Me, no se observa M-H. Las 3-metoxiflavonas también presentan un fragmento M-Me de moderada intensidad, presumiblemente debido a la formación de un catión del tipo **b**. Sin embargo, en este caso es importante la formación del ión M-H reduciéndose la intensidad del M-Me. La presencia de (M-Me)⁺ intenso es diagnóstico de 3-, 6-, u 8-metoxiflavonas, mientras que la ausencia de este pico no excluye la presencia de un metoxilo en posición 3.

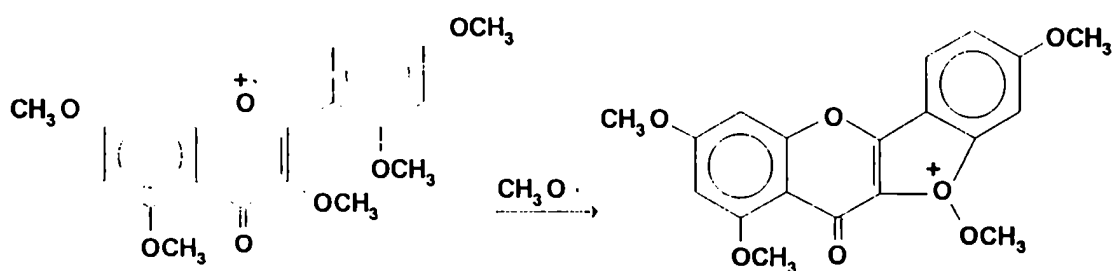
M-OH: Este tipo de pérdida es muy importante en el caso de 3,2'-dihydroxiflavonas y es el pico base en el espectro de masa de la 3,5,7,2',4'-pentahydroxiflavona.



M-H₂O: Se demostró que todas las flavonas que tienen grupos metoxilos unidos a C-5 exhiben picos a M-17 y M-18. Sin embargo un número suficientemente grande de compuestos sin este grupo también presentan pérdidas significativas de hidroxilo y H₂O. Por lo tanto, no resulta claro el proceso de esta pérdida.

M-H₃O: Se observó que los compuestos con metoxilos en C-3 y C-5 presentan este pico. Si bien no se conoce su génesis, puede ser útil como diagnóstico.

M-OCH₃: Este ión es el pico base en el espectro de masa de 3,5,7,2',4'-pentametoxiflavona, indicando que la fragmentación característica de 3,2'-dihidroxi-flavonas se mantiene en sus metiléteres. Otras metoxiflavonas presentan este ión pero con intensidad moderada.



M-MeCO: Este tipo de ión es significativo en las 6- y 8-metoxiflavonas. Evidencias por iones metaestables y medidas hechas en alta resolución indican que estos iones se forman por pérdida de CO a partir de M-Me. También presentan fragmentos M-MeCO moderados las 3-metoxiflavonas, donde la pérdida de metilo seguida de CO proviene presumiblemente de la posición 3 (Bowie *et al.*, 1966; Budzikiewicz *et al.*, 1967). Por lo tanto, la observación de un ión M-43 intenso es diagnóstico de 3-, 6- u 8-metoxiflavonas, pero no es concluyente en el caso de tener picos pequeños.

FRAGMENTOS PROVENIENTES DE LA FRAGMENTACION TIPO RETRO DIELS-ALDER.

A_1^+ , $A_1+H)^+$: Como se mencionó previamente, estos fragmentos no son importantes en flavonas con más de cuatro sustituyentes oxigenados.

$A_1-Me)^+$: Los espectros de masas de 6- u 8-metoxiflavonas muestran estos picos con moderada o gran intensidad.

$A_1-MeCO)^+$: Este ión, así como A_1-Me , es intenso en el espectro de 6- y 8-metoxiflavonas y presumiblemente proviene de la pérdida de CO a partir del ión A_1-Me (Kingston, 1971).

B_1^+ : Así como el fragmento A_1^+ , no es importante en flavonas con más de cuatro sustituyentes oxigenados.

B_2^+ , $B_2-CO)^+$: Estos iones son moderadamente intensos en las flavonas y su abundancia es aproximadamente inversamente proporcional a la de los fragmentos A_1^+ , $A_1-Me)^+$, y B_1^+ : dan información de la sustitución en el anillo B y por diferencia, de la composición del anillo A. En el caso de flavonas totalmente metiladas que no presentan picos intensos de RDA, las relaciones m/e que puede presentar el fragmento B_2^+ son limitadas; por ejemplo: 105, 135, 165 y 195 para flavonas no sustituidas, mono-, di- y trisustituidas en el anillo B. En este caso, si se limita la atención a los iones con esos valores de m/z, el ión más intenso será el que corresponda al ión B_2^+ . Lo mismo se puede hacer con flavonas parcialmente metiladas. En todos los casos, la presencia del ión $B_2-CO)^+$ sirve como confirmación.

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA.

La primera correlación de las señales de los protones aromáticos, se realizó utilizando como solvente cloroformo deuterado (Massicot *et al.*, 1962). Sin embargo, como la mayoría de los flavonoides con un hidroxilo ubicado en una posición distinta de C-5 son insolubles en este solvente, no pudieron estudiar flavonoides polihidroxilados.

En 1964 se introdujo como solvente dimetilsulfóxido deuterado (Batterham *et al.*,

1964) que tiene las siguientes ventajas:

- 1- Disuelve tanto a agliconas como a glicósidos, evitando de esta manera la preparación de derivados.
- 2- Las señales protónicas debidas al solvente parcialmente deuterado, siempre presentes aunque en pequeña proporción, aparecen en la banda de 2,4 a 2,6 ppm, *fuera* de la región donde muchos de los flavonoides absorben.
- 3- Si está realmente anhidro puede utilizarse para observar protones de hidroxilos fenólicos a $\delta \geq 9,5$.

También presenta ciertas desventajas:

- 1- Tiene un punto de ebullición de 189°, lo cual hace dificultosa la recuperación de la sustancia.
- 2- Absorbe agua rápidamente y la señal de la misma que aparece alrededor de δ 3,5 puede enmascarar o incluir señales del propio flavonoide.
- 3- Algunos flavonoides se descomponen en DMSO.

Simultáneamente, se investigó la utilidad de los derivados trimetilsililados para obtener los espectros de ^1H -RMN de los flavonoides que no eran solubles en cloroformo (Mabry *et al*, 1965; Waiss *et al*, 1964) Estos derivados presentan importantes ventajas:

- 1- La derivatización, así como la hidrólisis para recuperar al compuesto original se efectúan cuantitativamente y en condiciones suaves. Debe tenerse particular cuidado en el caso de compuestos con hidroxilos unidos a C-5, ya que pueden hidrolizarse espontáneamente por efecto de la humedad ambiente.
- 2- Los derivados trimetilsililados son solubles en cloroformo y en tetracloruro de carbono en todas las proporciones.
- 3- Los metilos del grupo trimetilsililo absorben entre 0,0 y 0,5 ppm por lo que no interfieren con otras señales del espectro.
- 4- De la comparación de los espectros de ^1H -RMN de los flavonoides parcial o totalmente sililados se puede obtener información sobre los H-3, H-6, H-8, H-2' y H-6'.

PROTONES DEL ANILLO A : La asignación de las señales es inmediata en base a las constantes de acoplamiento. Los protones unidos a C-6 y C-8 en flavonas, flavonoles e isoflavonas con sustitución 5,7-dihidroxi dan lugar a dos dobletes ($J=2,5$ Hz) en el rango de 6,0 y 6,5 ppm, apareciendo a campos mayores el H-6. Para las 5,7-dimetoxiflavonas estos hidrógenos aparecen a 6,36 y 6,57 ppm, mientras que en la 7-metoxiflavona los H-6 y H-8 se observan a 6,97 y 6,91 ppm respectivamente (Massicot *et al.*, 1962).

PROTONES DEL ANILLO B: Estos se observan usualmente entre 6,7 y 8,0 ppm, a campos más bajos que los correspondientes al anillo A. El esquema de señales observado para estos protones es característico del sistema de sustitución de este y además sugiere el estado de oxidación del anillo C.

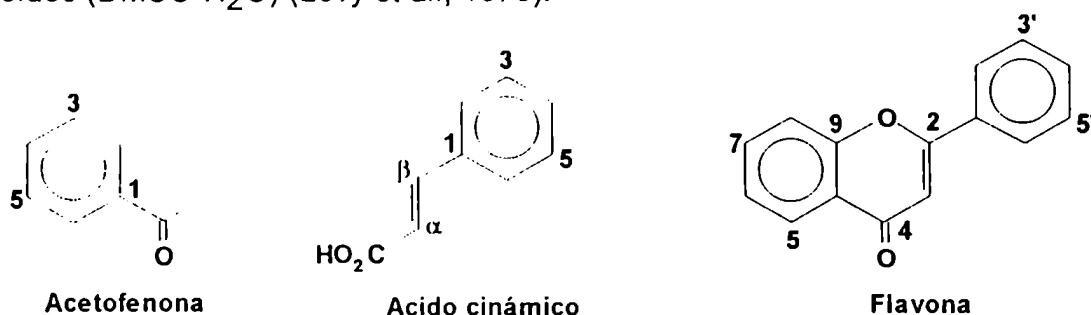
En el caso de flavonas no sustituidas en este anillo, los protones aparecen como dos grupos de señales mal resueltos a 7,83 y 7,50 ppm que integran para 2 y 3 hidrógenos respectivamente y se asignan fácilmente a los protones 2', 6', y 3', 4' y 5' respectivamente (Massicot *et al.*, 1962).

Cuando el anillo está oxigenado en las posiciones 3' y 4', el esquema de señales es más complejo. El H-5' en flavonas y flavonoles trimetilsililados aparece como doblete centrado entre 6,70 y 7,10 ppm con $J=8,5$ Hz. Las señales correspondientes a H-2' e H-6' usualmente se superponen apareciendo entre 7,20 y 7,90 ppm (Massicot *et al.*, 1962; Mabry *et al.*, 1970).

EFFECTO DE SUSTITUCION EN EL ANILLO C : Se encontró considerable variación entre las distintas clases de flavonoides en relación a los H del anillo C dependiendo del estado de oxidación del mismo, pudiendo usarse este hecho como diagnóstico (Massicot *et al.*, 1962).

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO.

Con el objeto de proveer conclusiones de base para el estudio de otros compuestos más complejos, se realizó un estudio sobre flavonoides hidroxilados (Ternai *et al.*, 1976). Como trabajo preliminar se estudiaron acetofenonas y ácidos cinámicos modelos en el mismo sistema de solventes utilizado en el estudio de flavonoides (DMSO-H₂O) (Levy *et al.*, 1976).



FLAVONAS y FLAVONOLES:

Tanto para flavonas como para flavonoles los C-2 y C-3 son carbonos cuaternarios que resuenan entre 133,5 y 151,2 ppm. La asignación de los mismos se realiza considerando que el C-2 usualmente resuena a campos más bajos (5,0-13,0 ppm) que el C-3. Generalmente la señal que aparece a 140,0-151,2 ppm corresponde a C-2 mientras que la señal que aparece entre 133,5-140,0 ppm corresponde a C-3 (Agrawal *et al.*, 1989).

La presencia de un sustituyente oxigenado sobre el C-2' causa un desplazamiento hacia campos más bajos (0,9-2,3 ppm), mientras que el C-3 no se afecta (Barron *et al.*, 1987).

Los flavonoles con C-5 no sustituido o sustituido con grupo metoxilo presentan la señal de carbonilo a $172,4 \pm 1,4$ ppm; cuando en la posición 5 está presente un hidroxilo esta señal se corre hacia campos más bajos ($177,3 \pm 1,5$ ppm). Se observa un corrimiento de la misma hacia campos más altos cuando la posición 3 está acetilada y la 5 metoxilada (Pomilio *et al.*, 1977).

En los flavonoles 5,7-dihidroxiados el C-6 resuena a campos más bajos que el C-8 (98,7 y 94,9 ppm respectivamente). Si ambas posiciones están sustituidas con grupos metoxilo esta diferencia subsiste pero es menos significativa (3,2 ppm) (Roitman *et al.*, 1985).

Cuando la posición 8 está sustituida se desprotege notablemente el C-8 mientras que el C-6 prácticamente no se afecta (Aritomi *et al.*, 1986).

DESCRIPCION DE LA LABOR REALIZADA

En la cuarta fracción de extracto metanólico (Me-4) (ver esquema general de fraccionamiento en pág 33), se observaba a simple vista un sólido amarillo, el cual luego de separado se purificó por cromatografía en columna seca. Para esto se buscaron previamente condiciones de CCD y se observó que quedaba retenido en el origen de la zona de siembra aún con cloruro de metileno puro, aumentaba el Rf por agregado de distintas proporciones de metanol, pero se obtenían manchas con cola, lo cual se evitó al agregar una pequeña cantidad de ácido acético. En estas condiciones se lograron manchas con Rf alrededor de 0,5. Los compuestos aislados después de realizada la columna no eran de naturaleza terpénica ya que no revelaron color violeta con ácido sulfúrico al 50%. Los colores variaban de amarillo a naranja indicando una posible característica de flavonoides. La fracción que se consideró suficientemente pura como para ser estudiada en detalle [Me-4 Sólido B] presentaba un color amarillo ocre. El análisis elemental confirmaba la posibilidad de un compuesto altamente oxigenado. Su comportamiento por CG, corroboraba que se trataba de un compuesto polar ya que no eluía de columnas de uso común. El análisis por EM (introducción directa) indicó un M⁺ de m/e 316 lo cual confirmaría la posible fórmula derivada del microanálisis, C₁₆H₁₂O₇. El espectro infrarrojo mostró absorciones en la zona de 3200-2500 cm⁻¹ indicando la presencia de hidroxilos, otra a 1645 cm⁻¹ correspondiente a carbonilo conjugado, otra a 1600 cm⁻¹ de aromático o insaturación, otras a 1280-1250 cm⁻¹ y 1080-1050 cm⁻¹ señales de tensiones C-O, y varias bandas entre 900 y 700 cm⁻¹ correspondientes a anillos aromáticos sustituidos. Todas estas bandas eran concordantes con la presunción de que era un compuesto de tipo flavonoide, lo cual fue confirmado al ser analizado por espectroscopía U.V..

Para la obtención de los espectros U.V. y su comportamiento y variaciones por el agregado de los distintos reactivos se siguió la técnica descrita (Mabry *et al*, 1970).

Se preparó una solución estándar del compuesto a estudiar en metanol grado espectroscópico. La concentración luego se ajustó en caso de ser necesario, tal que la densidad óptica de la absorción máxima del pico entre 250 y 400 nm era legible entre 0,6 y 0,8.

Al estudiar los espectros U.V. del supuesto compuesto flavonoide, se observó el siguiente comportamiento: el espectro en metanol puro presentó una Banda I a 370 nm que sufrió un corrimiento batocrómico de 52 nm por agregado de metóxido de sodio, y una Banda II a 254 nm. Por el agregado del metóxido de sodio, no solo se produjo el

desplazamiento indicado sino que adicionalmente aparecieron bandas a 330 y 276 nm.

Si bien el agregado de metóxido de sodio a flavonas y flavonoles en metanol normalmente produce corrimientos batocrómicos en todas las bandas de absorción, un desplazamiento importante de 40 a 65 nm sin disminución de intensidad, es diagnóstico para la presencia de un hidroxilo libre en posición 4'. En aquellos flavonoles que no tienen ese hidroxilo libre se observa el desplazamiento señalado, pero normalmente decrece en intensidad. En estos casos el desplazamiento se produce principalmente por la presencia de hidroxilo en C-3. La presencia de un hidroxilo en C-4' se corroboró con el corrimiento con acetato de sodio. Cuando se trata de un flavonol que presenta hidroxilos en posiciones 3 y 4' se observa que el espectro de la solución en metanol por el agregado de metóxido de sodio se descompone a los pocos minutos. Esto último es lo observado para el compuesto en discusión, por lo cual se supone que de los cuatro hidroxilos que deberán ubicarse en el esqueleto del flavonol, uno correspondería a la posición 3 y el otro a la 4'.

Por agregado de tricloruro de aluminio se observó un desplazamiento batocrómico importante de 60 nm para la banda I y de 14 nm para la Banda II. Esto indicaría la presencia de un hidroxilo libre en C-3 o C-5 que en conjunción con el carbonilo de C-4 formaría un complejo estable con el $AlCl_3$. Al agregar ácido clorhídrico no se observaron variaciones. El hecho de que los desplazamientos batocrómicos no sufrieran variaciones con el agregado de HCl, descartó la posibilidad de un hidroxilo sustituyendo al núcleo bencénico en posición *orto* ya que estos se destruyen en medio ácido. Cuando esto último ocurre se debe a la presencia en el flavonoide de hidroxilo libre en posición 3 y/o en 5. Cuando se obtiene un espectro igual al registrado con metanol puro es indicativo que ambos posibles hidroxilos en 3 y/o 5 están ausentes o sustituidos. En función de este resultado se puede considerar que el tercer hidroxilo se ubicaría en C-5.

El acetato de sodio es una base más débil que el metóxido y como tal ioniza sólo los hidroxilos más ácidos tanto en flavonas como en flavonoles. La ionización del hidroxilo en C-7 afecta principalmente la Banda II, mientras que la de los hidroxilos en C-3 y C-4' principalmente afecta la Banda I. El acetato de sodio es particularmente útil para la detección de los hidroxilos en posición 7. Los corrimientos batocrómicos diagnósticos que se observan con este reactivo son de 5 a 20 nm para la Banda II.

Algunos compuestos 3',4'-dioxigenados presentan corrimientos de 20 a 35 nm para la Banda IIb. Las flavonas y flavonoles que poseen un hidroxilo en posición 4' y otro sustituido en C-3 o C-7, presentan un hombro pronunciado en la zona de mayor

longitud de onda de la Banda I, en presencia de acetato de sodio. Un corrimiento de la Banda I, similar al observado con metóxido de sodio se produce cuando están libres los hidroxilos en 7 y 4'.

En nuestro caso, el agregado de acetato de sodio provocó desplazamiento batocrómico de 38 nm de la Banda I, por lo que podría tratarse de hidroxilo en 7 y 4', ya que el corrimiento es similar al observado por tratamiento con metóxido de sodio. Para la Banda IIb, se observa un corrimiento batocrómico de 18 nm y para la IIa, de 32 nm. Los corrimientos observados para la Banda II hacen suponer la presencia de un derivado dihidroxilado en el anillo B en posiciones 3' y 4'.

En presencia de acetato de sodio, el ácido bórico se compleja con los hidroxilo en *orto* en cualquier posición del núcleo menos los C-5 y C-6. Los complejos formados son probablemente del tipo de los descritos en la bibliografía (Mabry *et al.*, 1970). Las flavonas y flavonoles que contienen un sistema *orto* di-hidroxilado en el anillo B muestran un consistente corrimiento batocrómico de la Banda I de 12-30 nm. Análogamente, sistemas *orto* di-hidroxilados del anillo A podrían ser detectados pero el corrimiento observado es menor, entre 5 y 10 nm.

Por el agregado de ácido bórico se observó un desplazamiento hipsocrómico de 8 nm con respecto a lo observado con acetato de sodio por lo que concluyó que el compuesto en estudio no posee agrupación *orto* di-hidroxilado en el anillo B y tampoco en el A.

Por lo anterior se postuló que el flavonoide aislado era la **isoramnetina (4)**.

Se aplicó la misma metodología para una muestra auténtica de quercetina con el fin de observar la diferencia de comportamiento frente a los reactivos utilizados al tener la sustitución conocida del compuesto, esto es, 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona.

En este caso se observa claramente la disminución de la magnitud del corrimiento batocrómico al agregar ácido clorhídrico, como consecuencia de la destrucción del complejo formado con el aluminio por los hidroxilos en 3' y 4' del anillo B. Por el agregado de AlCl_3 se produce un corrimiento de 80 nm, el cual se reduce a 58 nm al serle añadido ácido clorhídrico. Esta última magnitud es comparable con lo observado en nuestro compuesto para el cual proponemos la sustitución ya indicada. En el caso de la quercetina, por el agregado de HCl disminuye la magnitud del corrimiento pero no vuelve a lo obtenido inicialmente en metanol. Fue entonces considerado que uno de los dos posibles complejos de Al se destruye por el HCl y éste sería el formado por los hidroxilos de 3' y 4'.

También se pudo apreciar el corrimiento de 12 nm de la Banda I por el agregado

de H_3BO_3 , lo cual confirma lo propuesto según lo observado con AlCl_3 .

En el caso en estudio, al permanecer tal cual el corrimiento luego del agregado de HCl y no producirse un corrimiento entre 12 y 20 nm para la Banda I luego del agregado de H_3BO_3 , se confirmó la propuesta de la no existencia de hidroxilos en *orto* en el anillo B.

ABSORCIONES EN EL ULTRAVIOLETA DE QUERCETINA E ISORAMNETINA (λ máx, nm).

Soluciones	Isoramnetina	Quercetina
MeOH	370, 254, 206.	368, 256.
+ NaMeO	422, 330, 276, 208.	414, 330.
+ AlCl_3	430, 268, 206.	448, 272.
+ AlCl_3/HCl	428, 266, 206.	426, 362, 268.
+ NaAcO	408, 224.	394, 336.
+ NaAcO/ H_3BO_3	378, 222.	380, 260.

Como tanto por los resultados del microanálisis como por los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN el compuesto en estudio debe poseer un metoxilo, éste se ubicó, luego de analizar el comportamiento de la quercetina, en el anillo B en posición 3', ya que la existencia de hidroxilo libre en 4' fue detectada por el comportamiento del flavonoide con AcONa y con MeONa .

El punto de fusión y el espectro ^1H -RMN coinciden con lo informado para **isoramnetina** (Pavanasasivam *et al.*, 1975 ; Mabry *et al.*, 1970), por lo cual con este conjunto de evidencias se concluyó que el indicado es el producto en cuestión.

La estructura propuesta se confirmó posteriormente también por espectroscopía de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, coincidiendo los espectros obtenidos con los presentes en la literatura para la estructura propuesta. (Mabry *et al.*, 1970; Agrawal *et al.*, 1989).

En el espectro ^1H -RMN se observa a campos altos la señal correspondiente a metoxilo a δ 3,84 que integra para tres hidrógenos. A campos bajos, ya dentro de la zona aromática se pudieron distinguir dos tipos de señales. A campos altos, los hidrógenos correspondientes al anillo A, dos dobletes a δ 6,21 con $J = 2$ Hz para el H-6 y δ 6,49 con el mismo valor de J para el H-8. Luego con un $J = 8$ Hz (*orto*) a δ 6,94

aparece un doblete correspondiente al H-5' del anillo B. Por último aparecen las señales de los protones más desprotegidos de este anillo, H-6' y H-2'. El H-6' con un $J=8$ Hz (*orto*) y el H-2' a δ 7,78.

La señal correspondiente a estos dos últimos protones del anillo B no se presenta bien resuelta y en ella no se distinguen los acoplamientos *meta* entre H-2' y H-6'. Sin embargo, el espectro obtenido en DMSO- d_6 presenta el mismo aspecto que el informado en Cl_4C por Mabry (Mabry *et al.*, 1970).

El ^{13}C -RMN presenta 14 señales principales, entre las cuales se distingue la correspondiente al carbono carbonílico a δ 176,0, dentro del rango informado (Agrawal *et al.*, 1989). Las señales correspondientes a los carbonos comunes a los anillos A y C, resuenan a δ 155,9 (C-9 sustituido por O) y a δ 102,7 (C-10 sustituido por el carbono carbonílico). También se pudo notar la diferencia entre los carbonos sustituidos por oxígeno del anillo A y del anillo B. Para este último se encuentran más protegidos hallándose el C-3' sustituido por metoxilo a campos más bajos que el C-4' sustituido por hidroxilo.

En el anillo A, ambos carbonos están sustituidos por hidroxilos y aparecen a campos más bajos que los dos anteriores, el C-7 a δ 163,9 y el C-5 a δ 160,2. Estos datos coinciden prácticamente con lo informado en bibliografía. Debe aclararse que no hubiera sido posible identificar este compuesto sólo por este espectro ya que es muy parecido al de su isómero ramnetina (Ver tabla adjunta.) (Agrawal *et al.*, 1989).

Fueron de gran utilidad las otras técnicas complementarias (UV y 1H -RMN) aplicadas.

El espectro de masa produce un M^+ a m/z 316 con una intensidad del 2,9%, lo cual coincide con la fórmula propuesta por el resultado del microanálisis y presenta fragmentos correspondientes a: (M-MeO), (M-17), (M-18). También se observan los iones provenientes de la fragmentación tipo *retro* Diels-Alder: A_1^+ , $(A_1-MeCO)^+$; B_1^+ ; B_2^+ ; y el B_2-CO^+ , anteriormente descritos.

La diferencia entre ramnetina e isoramnetina es la posición del metoxilo, en la primera se encuentra en el anillo A y en la segunda en el B. Esto no puede deducirse fácilmente del espectro y/o valores de los espectros de RMN tanto de carbono-13 como protónico, pero sí puede deducirse comparando los espectros UV de este compuesto con los de la quercetina (muestra auténtica) ya que ésta tiene hidroxilos en las mismas posiciones que la ramnetina.

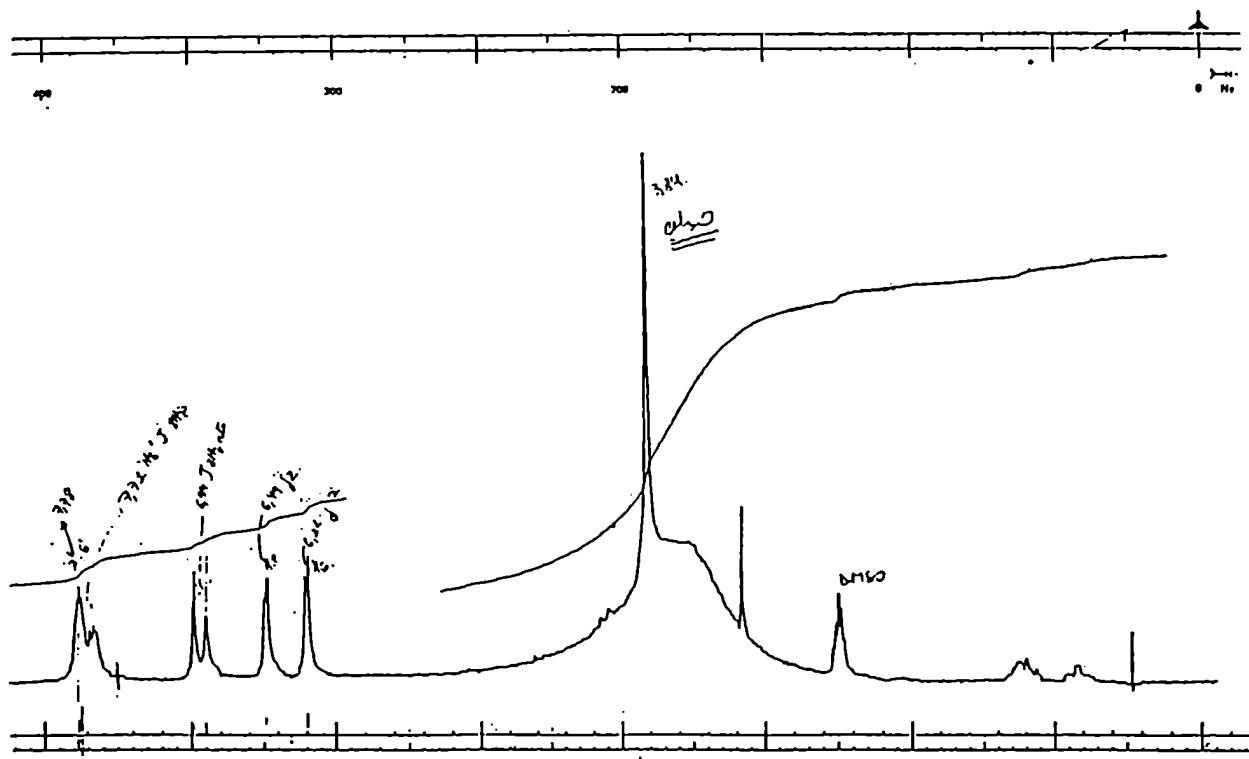
El aspecto de la zona aromática en el espectro 1H -RMN es diferente para ramnetina e isoramnetina (Mabry *et al.*, 1970), pero esto no es concluyente. Menos aún

es factible asignar sin ambigüedad por el aspecto del ^{13}C -RMN como se puede deducir de los siguientes datos (Agrawal *et al.*, 1989) :

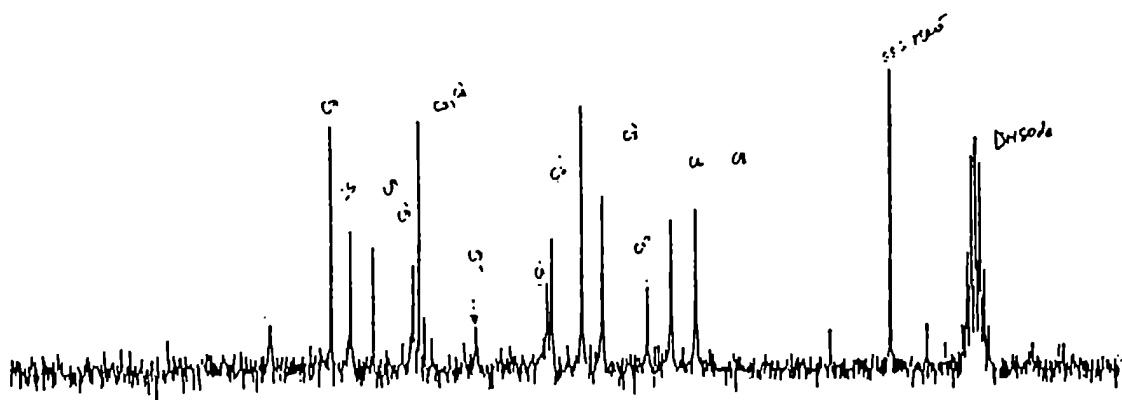
ESPECTROS DE RMN DE CARBONO-13 DE QUERCETINA, RAMNETINA E ISORAMNETINA. (δ)

C	Quercetina	Ramnetina	Isoramnetina
2	147,5	147,3	147,1
3	136,5	136,0	136,1
4	176,5	175,9	176,3
5	161,0	160,4	161,2
6	99,5	97,4	98,6
7	166,0	164,9	164,4
8	94,5	91,8	93,9
9	156,7	156,0	156,8
10	104,0	103,7	103,5
1''	123,0	121,9	122,6
2'	116,0	115,2	112,7
3'	145,7	145,0	149,4
4'	148,1	147,8	147,9
5'	116,5	115,6	116,0
6'	121,0	120,1	122,2

^1H -RMN (100 MHz, DMSO- D_6) de isoramnetina.



^{13}C -RMN (25,2 MHz, DMSO- d_6) de isoramnetina.



BIBLIOGRAFIA.

- ♦ Aritomi, M., Komori, T., Kawasaki, T. (1986) *Phytochemistry*, **25**, 231.
- ♦ Agrawal, P.K., Thakur, R.S., Bansal, M.C. (1989) "Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids". Agrawal P.K. Editor. Elsevier: Amsterdam.
- ♦ Barron, D., Ibrahim, R.K. (1987) *Tetrahedron*, **43**, 5197.
- ♦ Batterham, T.J., Highet, R.J. (1964) *Austr. J. Chem.*, **17**, 428.
- ♦ Bowie, J.H., Cameron, D.W. (1966) *Austr. J. Chem.*, **19**, 1627.
- ♦ Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D.H. (1967) "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden Day, San Francisco.
- ♦ Kingston, D. G. I. (1971) *Tetrahedron*, **27**, 2691.
- ♦ Levy, G.C., Nelson, G.L. (1976) "Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C para Químicos". Ediciones Bellaterra S.A., Barcelona.
- ♦ Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970) "The systematic identification of Flavonoids". Springer-Verlag, Berlin.
- ♦ Mabry, T.J., Kagan, J., Posler, H. (1965) *Phytochemistry*, **4**, 487.
- ♦ Mabry, T.J. (1975) *Rev. Latinoamer. Quím.*, **6**, 105.
- ♦ Massicot, J., Macthe, P. (1962) *Bull. Soc. Chim.* 1962.
- ♦ Pavanasasivam, G., Sultanbawa, M.U.S. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1127.
- ♦ Pellizari, E.D., Chuang, C.M., Kuc, J., Williams, E.B. (1969) *J. Chromatog.*, **40**, 285.
- ♦ Pomilio, A., Ellmann, B., Kunstler, K., Schilling, G., Weinges, K., (1977) *Leibigs Ann. Chem.*, 588.
- ♦ Roitman, J.N., James, L.F. (1985) *Phytochemistry*, **24**, 835.
- ♦ Sakakibara, M., di Feo, D., Nakatani, N., Timmermann, B., Mabry, T.J., (1976) *Phytochemistry*, **15**, 727.
- ♦ Schiels, H., Zinsmeister, H.D., Pleger, K. (1977) *Phytochemistry*, **16**, 1019.
- ♦ Schiels, H., Zinsmeister, H.D., Pflieger, K. (1978) *Phytochemistry*, **17**, 523.
- ♦ Schmid, R.D., Harborne, J.B. (1973) *Phytochemistry*, **12**, 2269.
- ♦ Steinegger, E., Hänsel, R. (1972) "Lehrbuch der Pharmakognosie", Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- ♦ Ternai, B., Markham, K.R. (1976) *Tetrahedron* **32**, 565.
- ♦ Waiss, A.C., Wudin, R.E., Sterra, D.J. (1964) *Tetr. Lett.*, 513.
- ♦ Wollenweber, E., Dietz, V.H. (1981) *Phytochemistry*, **20**, 869.

CUMARINAS.

La cumarina (1) y muchos de sus derivados tienen efectos fisiológicos destacables como su activa hipotoxicidad, carcinogenicidad, acción anticoagulante y actividad antibiótica (Abu-Eittah *et al.*, 1985).

El grupo de Link (Overman *et al.*, 1974) examinó 106 muestras de 4-hidroxi-cumarinas, y encontraron que el dicumarol (2) presentaba mayor actividad anticoagulante que cualquiera de las cumarinas sintéticas ensayadas. El requerimiento estructural mínimo para esta actividad era un residuo intacto de 4-hidroxi-cumarina. La cumarina cichoriin (6-glucosil-esculetina) (3) presenta un efecto anticoagulante significativo en las pruebas de coagulación y en los test de sangría. Se puede suponer en función de estos resultados que aquellas plantas que poseen compuestos pertenecientes a esta familia podrían ser utilizadas como productoras de drogas anticoagulantes naturales. En plantas del género *Launaeae* (Sarg *et al.*, 1987), fue encontrada la 3,4-dihidroescopoletina. Se informó que estas plantas eran usadas por los egipcios para el tratamiento de heridas infectadas.

Las cumarinas presentan un efecto inhibitorio variable para las enzimas. La estructura de la cumarina es responsable de la inhibición específica de la enzima.

La umbeliferona (7-hidroxi cumarina) no presenta efecto inhibitorio a diferencia de la 4-hidroxi cumarina (Dadak *et al.*, 1967; Zboril *et al.*, 1970). Los derivados dihidroxilados son más efectivos que los monohidroxilados, especialmente cuando los hidroxilos ocupan posiciones vecinales.

Los procesos de transporte de electrones también son inhibidos por las dihidroxicumarinas. Wald y Fuer (Wald *et al.*, 1971) encontraron una relación entre estructura y actividad para la cumarina y nueve de sus derivados naturales o sintéticos, para inducir la metabolización de drogas por enzimas en hígado de rata. Calcularon densidades σ y π en varias posiciones del núcleo de cumarina y relacionaron la inducción enzimática con los valores calculados.

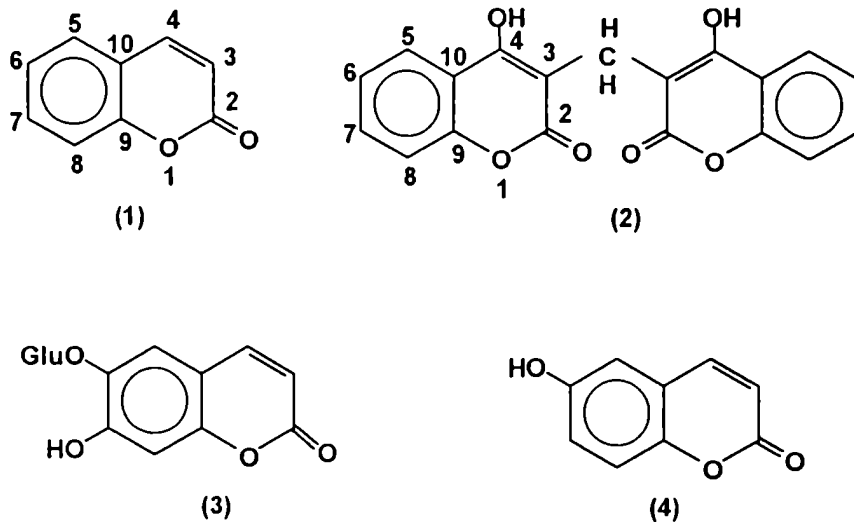
Se han efectuado estudios que demuestran que las cumarinas simples presentan actividad antitumoral. La cumarina misma ha sido informada como un inhibidor moderadamente potente de la neoplasia (Wattenburg *et al.*, 1979) inducida por agentes químicos carcinogénicos. Otras cumarinas relacionadas tienen acción antitumoral (Cassady *et al.*, 1979 ; Finnegan *et al.*, 1972).

Quizás el mayor interés bioquímico es el efecto fotosensibilizador de ciertas furanocumarinas lineales sobre células, lo cual está íntimamente asociado con el

entrecruzamiento de las cadenas de DNA (Heathcote *et al.*, 1974).

Una de las principales aplicaciones de las cumarinas es la obtención de "laser dyes" (Schmitschek *et al.*, 1974; Hammond *et al.*, 1975; Schmitschek *et al.*, 1976), láseres de colorantes en los cuales la fuente emisora es una cumarina que tiene un hidroxilo o un amino en posición 7. El efecto de los sustituyentes sobre las características laser de estos compuestos ha sido informado, así como también el efecto de los sustituyentes sobre la fluorescencia máxima y el rendimiento cuántico de fluorescencia (Schulman *et al.*, 1979).

Es sabido que las cumarinas en el estado electrónico excitado invierten su población, razón por la cual son usadas en láseres de colorantes. La energía que emiten es de la región visible y la especie emisora es la cumarina. La presencia de las cumarinas modifican la absorción y la emisión de diferentes cromóforos. Al agregarlas a la solución, se modifica tanto el λ de absorción como el de emisión. La modificación de esta última permite obtener distintos laser monocromáticos.



METODOS ESPECTROSCOPICOS EN LA ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE CUMARINAS.

ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV).

El espectro electrónico de absorción en etanol de las cumarinas que tienen un hidroxilo en posición 7, presenta, entre otras, una banda cuyo máximo se encuentra

entre 325 y 352 nm, (Horowitz *et al.*, 1960), que sufre un marcado corrimiento batocrómico por el agregado de AcONa e NaOH. Cuando tienen un hidroxilo libre en posición 6 y un hidroxilo protegido en posición 7, el espectro cambia (con respecto al obtenido de etanol puro) por el agregado de NaOH, pero no por añadido de AcONa, mientras que en presencia de hidroxilos libres en posiciones 6 y 7 se produce corrimiento con cualquiera de los tres reactivos: AcONa, NaOH y AcONa/H₃BO₃. No se observan cambios en cumarinas que no tengan al menos un hidroxilo libre.

Así como en flavonas y flavonoles, el grupo hidroxilo de posición 7 en las cumarinas, es suficientemente ácido como para ionizarse con AcONa, mientras que el hidroxilo en posición 6, solo es afectado por una base fuerte como el NaOH. El efecto observado sobre la esculetina por el AcONa/H₃BO₃ sería consecuencia de una quelación del H₃BO₃ con los hidroxilos en posición *orto*.

De acuerdo a lo dicho anteriormente, es posible aplicar en forma sistemática estos reactivos para estudiar la presencia y posición de estos grupos en este tipo de cumarinas. Así entonces se puede agrupar los resultados obtenidos para una serie de compuestos de este tipo en la siguiente tabla (Horowitz *et al.*, 1960):

ABSORCION EN EL UV DE DISTINTAS CUMARINAS Y DESPLAZAMIENTOS OBSERVADOS POR EL AGREGADO DE CIERTOS REACTIVOS (λ máx, nm).

COMPUESTO	EtOH	AcONa	NaOH (c)	AcONa/H ₃ BO ₃
Umbeliferona (7-OH cumarina)	325	373	374	326
Esculetina (6,7-diOH cumarina)	352	376	39	370
Esculina (6-glu, 7-OH-cumarina)	336	379	382	339
Escopoletina (6MeO-, 7-OH-cumarina)	345	391	393	346

(c): 1 gota de NaOH 1% agregada a 2,5 ml de etanol absoluto.

Los corrimientos observados para la esculetina encontrada usando como solvente etanol absoluto fueron:

Δ AcONa= 24 nm

Δ NaOH =41 nm

Δ AcONa/H₃BO₃=18 nm

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA.

En este tipo de espectrometría, el uso de técnicas de desplazamiento por solventes (Gigg *et al.*, 1966), permitió determinar la posición de grupos metilo, metoxilo y protones aromáticos en cumarinas y se convirtió en una herramienta para la elucidación estructural de este tipo de compuestos. Los desplazamientos inducidos por benceno deuterado respecto a deuterio-cloroformo medidos en δ (ppm), se definen como δ C₆D₆- δ Cl₃CD (Gigg *et al.*, 1966).

Trabajos previos en cetonas indican que aquellos protones que se encuentran por detrás de un plano de referencia están desprotegidos con respecto a los que se encuentran por delante del mismo (estructuras **5** y **6**).

Esta tendencia general también se observa para cumarinas pero en este caso es evidente que este plano de referencia está levemente desplazado por el átomo de oxígeno (Hammond *et al.*, 1975; Schmitischek *et al.*, 1976).

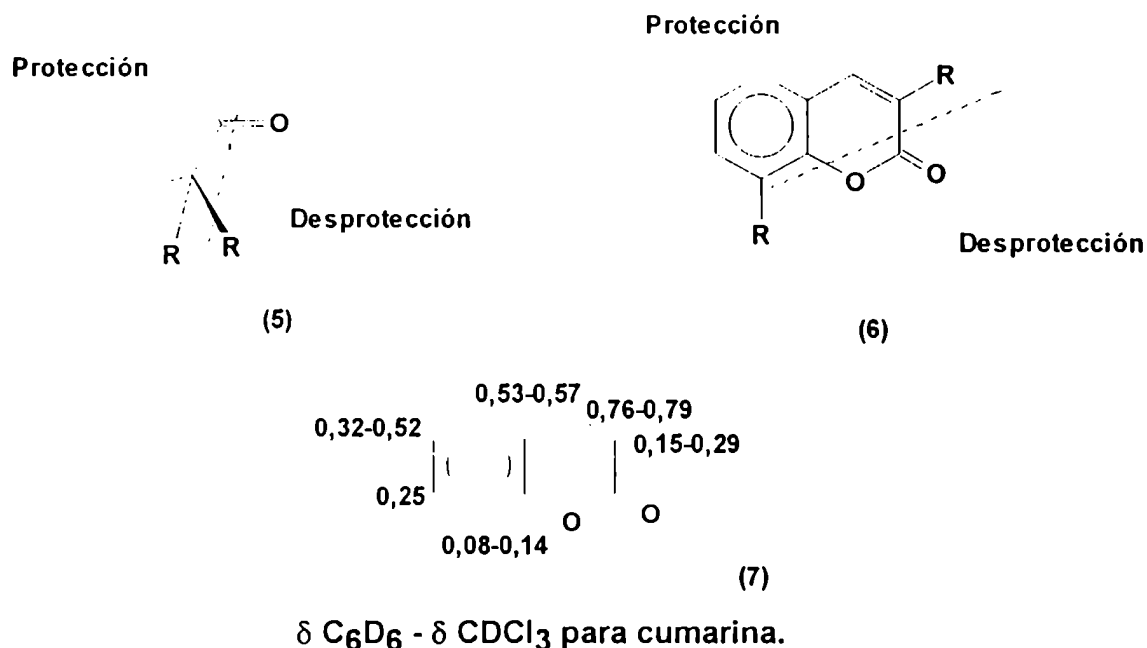
La magnitud del corrimiento inducido por el solvente es mayor que para las cetonas alicíclicas y se observa un marcado efecto posicional.

El corrimiento de las señales protónicas fue investigado en numerosas cumarinas usando como solventes benceno y cloroformo deuterados. En la cumarina sin sustituir todos los protones se protegen en benceno deuterado frente a cloroformo deuterado, pero el máximo desplazamiento se produce para el hidrógeno de C-4 (1,06 ppm).

En general el corrimiento de los protones aromáticos se correlaciona estrechamente con el de un grupo metilo en la misma posición, lo que provee información estructural utilitaria. El máximo corrimiento por el solvente se produce para el H-4 y el mínimo para los H-3 y H-8 (Cassady *et al.*, 1979) (**7**).

La solvatación asimétrica que conduce a los corrimientos es obviamente un equilibrio dinámico, pues el estudio de modelos en conjunto (Johnson *et al.*, 1958), indica que la caja de solvente es más "ajustada" en C-4 donde la distancia entre la

cumarina y el anillo es de sólo 3 Å. Los marcados desplazamientos (se producen para todos los hidrógenos) observados en cumarinas comparadas con cetonas alicíclicas se deberían a la planaridad de la molécula de cumarina.



El uso de la "técnica de reemplazo por metilo" y de la aproximación de la teoría de orbitales moleculares a los niveles INDO y CNDO/2 se ha utilizado para la elucidación de los mecanismos de acoplamiento en los compuestos de anillo simple. Este método se ha usado también para la determinación de las constantes de acoplamiento en la cumarina (Rowbotham *et al.*, 1973).

Se efectuaron comparaciones con datos experimentales de naftaleno, una molécula aromática fusionada y con datos teóricos de estireno, un compuesto aromático de un solo anillo.

En general, el protón olefínico H-3 resuena a campos más altos que los H aromáticos, mientras que el H-4 resuena a campos menores. Sin embargo en la 3-metil cumarina el H-4 se solapa con los H aromáticos cuando se obtiene su espectro en Cl_3CD o $\text{Bz}(\text{d}_6)$. En acetona deuterada estos picos se separan bien. Variaciones en la concentración disminuyen el solapamiento de hidrógenos aromáticos, H-5 y H-7 normalmente aparecen a 20-25 Hz hacia campos más bajos que los H-6 y H-8.

Los signos de las constantes de acoplamiento fueron determinados en lo posible mediante experimentos de débil irradiación y sus signos se adjudicaron en

forma relativa a los signos de los acoplamientos vecinales que se sabía que eran positivos así entonces ${}^6J_{36}/{}^3J_{56} \geq 0$, ${}^3J_{34}/{}^4J_{45} \leq 0$ y ${}^7J_{37}/{}^4J_{57} \geq 0$ (Rowbotham *et al.*, 1973).

CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO INTRA-ANILLO:

Las constantes de acoplamiento en el anillo aromático están de acuerdo (con una variación de aprox 0,2 Hz) con los valores calculados al considerar la aditividad de los efectos de los sustituyentes sobre el benceno, cuando éstos son metoxilo y vinilo. La constante de acoplamiento olefínica ${}^3J_{34}$ en cumarina es más pequeña que en los derivados de estireno pero del valor esperado a la diferencia observada en este acoplamiento entre propenoato de metilo y etileno.

CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO A LARGA DISTANCIA ENTRE ANILLOS:

Resultados del reemplazo de H por Me (Rowbotham *et al.*, 1973).

Según Hoffman (Hoffman, 1958), la contribución de los electrones π a la constante de acoplamiento entre H puede ser estimada por la sustitución de uno de los protones acoplados por un grupo metilo. Al no haber acoplamiento seguro entre H y Me, lo que se mide es la contribución π a la J H-H. Cuando se usa considerando que la ${}^4J_{H,CH_3}$ y la ${}^5J_{H,CH_3}$ pueden contener contribuciones σ residuales, la técnica es de gran aplicabilidad.

COMPARACION CON ACOPLAMIENTOS A LARGA DISTANCIA EN NAFTALENO:

Los acoplamientos entre anillos siguen la misma tendencia en cumarina y en naftaleno. Estas varían en alrededor de 0,2 Hz en los dos compuestos y la suma algebraica de las mismas está entre los 0,05 Hz.

La unión éter en la cumarina redistribuye las interacciones a larga distancia, pero no las altera radicalmente comparándolas con naftaleno.

También hay que considerar el tipo de unión de los átomos involucrados.

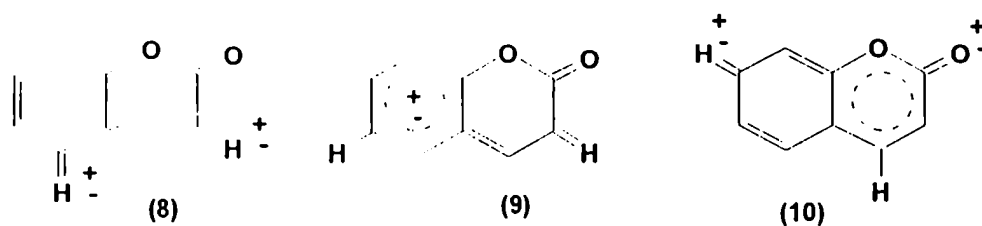
Los electrones π contribuyentes a los acoplamientos a larga distancia pueden considerarse dentro de tres grupos:

1- Cuando una estructura de resonancia puede ser escrita en términos de dobles enlaces en ambos anillos (Finnegan *et al.*, 1972), contribución π : 0,3 Hz (8).

2- Cuando puede unirse por un simple enlace uno de los protones en el anillo aromático, (Heathcote *et al.*, 1974; Schmitschek *et al.*, 1976) contribución π : -0,1 Hz (9 y 10).

3- Cuando no puede escribirse una estructura resonante que no involucre los orbitales p del oxígeno de la unión eter, contribución π : 0

La contribución σ es 0, excepto para un camino de acoplamiento *trans* donde es de 0,65 y 0,20 Hz respectivamente para 5 ó 6 enlaces.



ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO.

La cumarina es el miembro más simple de una importante familia de compuestos que contienen el sistema de anillos llamado "2-H-1-benzopirán-2-ona" (Cussans *et al.*, 1975, b).

Para asignar sin ambigüedad las señales obtenidas a sus correspondientes carbonos, se trató de obtener información consistente en forma interna sobre la magnitud de los corrimientos producidos por la sustitución, ya que la inducción de estos corrimientos no siempre es de magnitud comparable.

Para lograr estos datos se usaron datos de constantes de acoplamiento y la información obtenida a través de experimentos de desacople de H (single frequency off resonance).

Se aplicó esta metodología a la cumarina y a cinco de sus derivados bromados (Cussans *et al.*; 1975, b). Se eligió *a priori* un sustituyente como el bromo ya que su efecto sobre el corrimiento de las señales de los carbonos aromáticos es muy pequeña aún en el mismo sitio de sustitución. Así entonces no cambia la posición de la señal pero es fácilmente identificable por la pérdida del aumento del efecto nuclear Overhauser en un espectro desacoplado convencional.

La señal en un espectro protónico también sería característica ya que el

acoplamiento C-H grande (160-180 Hz) se ha perdido, mientras que los acoplamientos por interacciones de larga distancia, que tienen magnitudes características del número de enlaces involucrados siguen estando y dan información diagnóstica.

El espectro a 20 MHz de la cumarina posee 8 líneas. La línea que aparece a campos más altos (115,8 ppm) está compuesta por dos resonancias superpuestas (C-3 y C-8) y puede observarse una separación parcial de las señales porque el acoplamiento de la unión simple C-H y el desdoblamiento de las señales no son los mismos. Las otras tres señales son de mucha menor intensidad debido a la pérdida del incremento por efecto nuclear Overhauser. Estas señales pueden ser asignadas correctamente a carbonos cuaternarios. La que se encuentra a campos más bajos (159,8 ppm) es debido a un carbono carbonílico de lactona, (C-2), el valor de la señal es muy cercano al observado en metil ésteres insaturados. La estructura fina de esta señal en un espectro acoplado también posee valor de diagnóstico. En todos los compuestos estudiados las líneas son muy finas y muestran acoplamientos sólo con los hidrogenos de C-3 y de C-4. La ${}^3J(C_2H_4)$ es de 11,5 Hz y por lo tanto mucho más grande que la ${}^2J(C_2H_3)$ que es de 4,5 Hz. Esta magnitud es similar a la observada en acoplamientos a larga distancia en C-H aromáticos. Las otras dos señales de baja intensidad a 153,3 y 118,2 ppm, pueden asignarse a los C-9 y 10 respectivamente.

Como el efecto del sustituyente oxigenado -O-C-OR es desplazar la señal del C sobre el cual se encuentra en el sistema bencénico y la influencia del grupo vinílico es mucho menor, las posiciones relativas de estas señales pueden ser explicadas adecuadamente.

Para la asignación de los carbonos remanentes del núcleo se usó la ayuda de experimentos de desacople fuera de resonancia.

Cuando esta frecuencia desacoplada se centra en distintas posiciones desde campos altos a bajos a través del espectro protónico, el primer multiplete que colapsa a singulete es el de 142,8 ppm. Dado que la señal de protón que aparece a campo más bajo se sabe es la de H-4, este carbono debe ser el C-4. La señal que aparece a 115,8 ppm permanece desplegada cuando todas las demás han colapsado a singuletes. Esto indica la posición del C-3, dado que se sabe que el H-3 resuena a campo más alto que cualquiera de los otros.

Las otras cuatro señales pueden ser clasificadas como α (C-5,C-8) y β (C-6 y C-7), según la extensión del método usado para asignaciones similares en bencenos

simétricos *orto* disustituídos o sistemas similares (Cussans *et al.*, 1975 a; Jikeli *et al.*, 1974), mientras que la forma de las bandas obtenidas en experimentos desacoplados fuera de resonancia son absolutamente características de las posiciones sustituidas. Así entonces las señales a 115,8 ppm y a 127,4 ppm se consideran α mientras que las que aparecen a 123,8 y a 131,1 ppm se atribuyen al entorno β .

Los C-5 y C-8 muestran el típico acoplamiento a tres enlaces a un H *meta* en el anillo bencenoide cuando tanto H-6 como H-7 no están sustituidos.

Para asignar las señales β en forma absoluta se aplica el efecto de los sustituyentes observados en bencenos monosustituidos, lo cual sugiere que el C-7 estaría a campo levemente más bajo, pero como la influencia de los grupos en la unión de anillos es *meta* y *para*, esta asignación es muy tentativa (al sustituirse las posiciones 6 y 7 por bromo se observa que sólo una señal, la del carbono con el sustituyente halogenado es la que se corre a campos más altos).

El efecto de los solventes sobre las señales presentadas por la cumarina es muy pequeño.

El valor de ^{13}C -RMN de las señales de los carbonos del esqueleto de cumarina se modifica a medida que las distintas posiciones son ocupadas por sustituyentes, como se puede observar en las tablas (Gottlieb *et al.*, 1979).

Se ha demostrado que los corrimientos en las moléculas polisustituidas pueden ser predichos a través de los efectos de los sustituyentes en derivados más simples. Cuando se extiende esta aproximación a ciertos derivados glicosidados simples, se observa que no sólo la configuración anomérica sino también la ubicación exacta del sustituyente puede ser determinada por medio de los datos de ^{13}C -RMN.

Existe una gran cantidad de productos naturales que poseen el esqueleto de cumarina, y casi todas estas sustancias tienen como sustituyentes uno o más hidroxilos (Cussans *et al.*, 1975 c).

En un trabajo anterior (Cussans *et al.*, 1975 a), los mismos autores describen con bastante detalle el método para la completa asignación de las señales y correlaciones de constantes de acoplamiento para la cumarina y algunos de sus derivados simples.

Posteriormente, la aplicación de este método se extendió a una serie de importantes cumarinas hidroxiladas, metoxiladas y glicosiladas, demostrando que esta aproximación general sirve para la adecuada asignación de estructuras más

complejas (Cussans *et al.*, 1975 c).

El efecto de un grupo hidroxilo presente en el anillo bencenoide es bastante característico. La resonancia del nuevo carbono cuaternario así obtenido se desplaza hacia campos más bajos (aprox 30 ppm) con respecto al valor observado en la propia cumarina. Los C *orto* y *para* al sustituyente se desplazan ambos a campos más altos entre 11-15 y 7-10 ppm respectivamente, mientras que aquellos que se encuentran en posición *meta* lo hacen con menor magnitud (0,3-2,3 ppm) pero siempre hacia campos más bajos.

El reemplazo de un H por un hidroxilo introduce cambios en las constantes de acoplamiento dentro del anillo bencénico. La constante de acoplamiento C-H para el carbono *orto* al sustituido disminuye en 2-3 Hz, y la constante de acoplamiento *meta* C-H a través de un carbono unido a oxígeno también disminuye en esta proporción, mientras que a diferencia de lo anterior, las constantes de acoplamiento *meta* que involucran el carbono sustituido por oxígeno aumentan en 2-3 Hz.

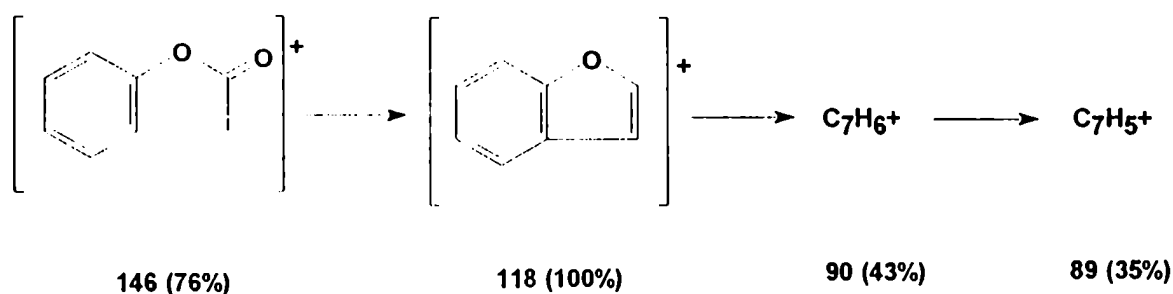
ESPECTROMETRIA DE MASA.

La espectrometría de masa ha sido empleada para cumarinas desde hace cerca de 30 años.

En el año 1964, Barnes (Barnes *et al.*, 1964) informó que existían más de 80 compuestos que poseían el esqueleto de cumarina y que éstos estaban ampliamente distribuidos en plantas superiores.

La fragmentación característica que sufren por impacto electrónico es la pérdida de CO desde el anillo pirona para formar un ión que posee la estructura de benzofurano, seguida de una posterior pérdida del oxígeno remanente, otra vez como CO.

La cumarina, compuesto que posee el esqueleto base, presenta un ión molecular importante (M^+ 146; 76%) y un pico base con 28 uma menos (m/z 118; 100%) formado directamente desde el M^+ a través del metaestable 95,4 debido a la transición $146^+ \rightarrow 118^+ + 28^+$.



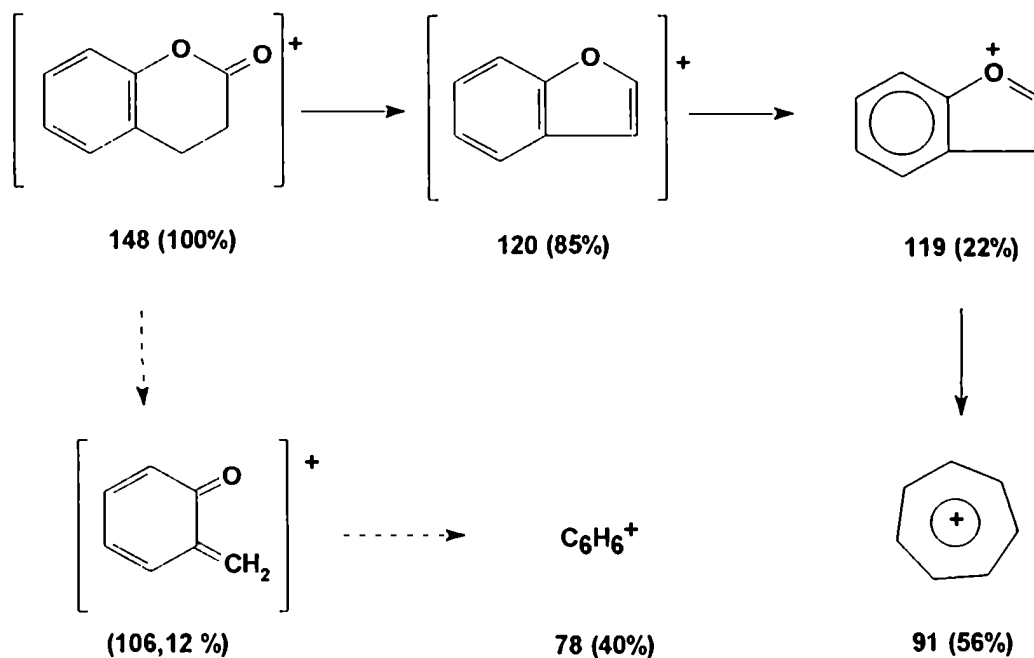
La aseveración que el ión con m/z 118 tiene la estructura de benzofurano está comprobado por la similitud de los espectros de las dos sustancias hasta masas de m/z 118. En ambos la fragmentación del ión de m/z 118 es la pérdida de CO.

Otro pico importante (m/z 89, 35%) en el espectro de cumarina proviene de la pérdida del átomo de hidrógeno del ión de masa 90, ($90^+ \rightarrow 89^+ + 1$). El mismo tipo de eliminación de hidrógeno de un carbono de anillo aromático que está unido a oxígeno se ha visto también en fenoles y difenil éteres. Subsiguientes rupturas producen picos de menor intensidad debido a iones hidrocarbonados (63, 24%; 51, 9%; etc.)

La reducción del doble enlace del anillo pirona produce melilitol (dihidrocumarina) el que también es un producto natural.

Existen algunas analogías entre los espectros de masa de cumarina y su dihidroderivado; ambos dan dos pérdidas consecutivas de 28 uma, presumiblemente debidas a la pérdida de los átomos de oxígeno como CO. Sin embargo en este caso, la presencia de dos grupos metileno ofrecen la posibilidad que una de las pérdidas se deba a la remoción de una molécula de etileno.

También puede plantearse un segundo camino, análogo a lo esperado para un fenil ester alquil-sustituído (Barnes *et al.*, 1963). La fisión de los dos enlaces β al anillo bencenoide producen un ion de m/z 106 (12%), capaz de eliminar posteriormente CO dando el ión benceno (40%).



Las investigaciones de los fragmentos obtenidos por EM/IE comprenden varias categorías dentro de las cumarinas naturales. Entre ellas podemos citar:

1- Aquellas sustituidas sólo en el anillo aromático (Abdel-Hay *et al.*, 1967 a; Vulfson *et al.*, 1963; Shipchandler *et al.*, 1968; Fisher *et al.*, 1965).

2- Furanocumarinas (Barnes *et al.*, 1964; Shapiro *et al.*, 1965; Shipchandler *et al.*, 1968, Aplin *et al.*, 1967; Lee *et al.*, 1969 a; Lee *et al.*, 1969 b).

3- Dihidrofuranocumarinas (Barnes *et al.*, 1964; Furuya *et al.*, 1967; Fisher *et al.*, 1965;

Abdel-Hay *et al.*, 1967 b; Schneider *et al.*, 1967).

4- Piranocumarinas (Barnes *et al.*, 1964; Fisher *et al.*, 1965).

5- Dihidropiranocumarinas (Fisher *et al.*, 1965; Schneider *et al.*, 1967).

6- Cumarinas sustituidas en el anillo pirona (Johnson *et al.*, 1964, Johnstone *et al.*, 1966).

Una de las fragmentaciones características de todas las cumarinas enumeradas en la clasificación anterior es la pérdida de CO, pudiendo ser el pico base del espectro el ion molecular o el M^+-28 .

Cumarinas de sustitución simple.

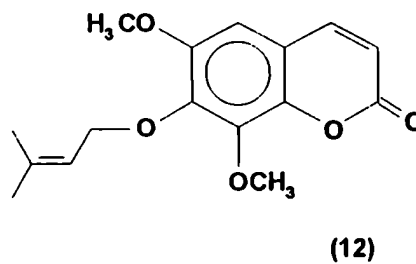
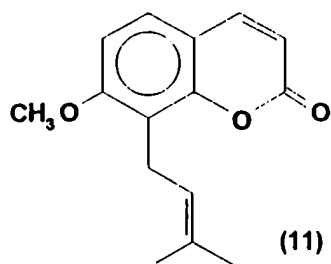
La 7-hidroxycumarina (umbeliferona) muestra una intensa señal para el M^+ a m/z 162, siendo el pico base el $(M-CO)^+$ correspondiente a m/z 134; cada uno de los oxígenos restantes se eliminan como CO o CHO. El espectro de 7-metoxicumarina (hernianina) se diferencia del de umbeliferona porque el grupo metilo del metoxilo se pierde desde el fragmento a m/z 148.

En las metoxiladas, no ocurre la pérdida de un grupo metoxilo por ruptura del enlace oxígeno-fenilo. En este tipo de cumarinas se ve favorecida la pérdida de un radical metilo que da un pico de intensidad importante (Barnes *et al.*, 1963; 1964).

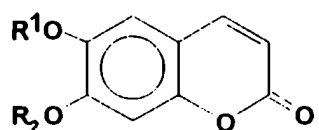
En las cumarinas simples el pico $(M-15)^+$ indica la sustitución metoxilo en posición 6. Así el espectro de masa de la 7-metoxicumarina no presenta un pico para $(M-15)^+$. Este pico también está ausente en los espectros de 5,7-dimetoxicumarina y 6-hidroxi-7-metoxicumarina; mientras que los espectros de masa de 6,7-dimetoxicumarina; 6-metoxi-7-hidroxycumarina y 6-metoxi-7,8-metilendioxicumarina exhiben abundantes iones para las masas correspondientes a $(M-15)^+$. (Aplin *et al.*, 1967).

Las cumarinas con el grupo isoprenilo como sustituyente en el anillo aromático como el osthol (11) sufren una ruptura inicial con la pérdida de un radical metilo para dar principalmente un $(M-15)^+$ en lugar de dar como pérdida principal la escisión de CO. Pese a que el espectro de masa del osthol presenta como picos principales M^+ , $(M-15)^+$, $(M-31)^+$ y $(M-55)^+$, presenta también el $(M-CO)^+$ pero con una abundancia relativa muy pequeña, de sólo el 2% (Talapatra *et al.*, 1975; Dominguez *et al.*, 1977).

Los éteres de cumarina con una larga cadena alquílica como grupo sustituyente producen sólo pequeños picos en la región de altas masas. Para la puberulina (12) se observa un M^+ de baja abundancia, el grupo prenilo a m/z 69 (95%), y la unidad de cumarina a m/z 222 (Finkelstein *et al.*, 1976).



FRAGMENTACIONES PRINCIPALES DE CUMARINAS 6,7- DISUSTITUIDAS (Aplin *et al*, 1967).



VI R¹= CH₃, R²=H

VII R¹=H, R²=CH₃

VIII R¹=R²=CH₃

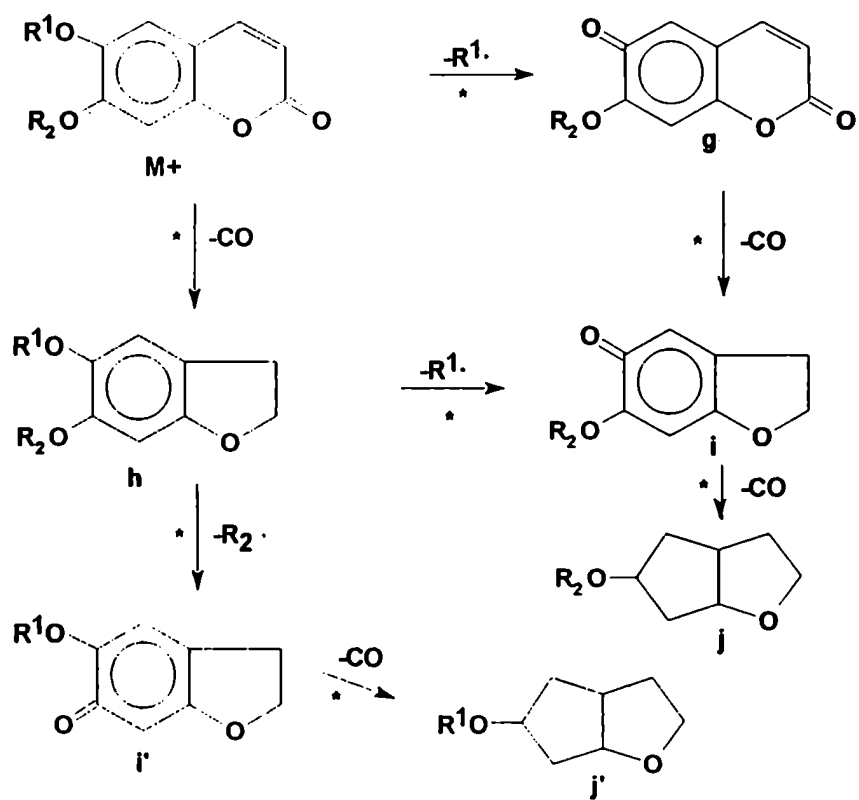
C	M+		g		h		i		i'		j		j'	
	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%
VI	192	100	177	52	164	17	149	26			121	9		
VII*	192	100	191	5	164	40	163	3	149	53	135	2	121	14
VIII	206	100	191	46	178	27	163	38†			135	22‡		

Referencias : C: compuesto

* M-15 (m/e 177; 11%)

† (i + i')

‡ (j + j')



* Picos metaestables observados.

DESCRIPCION DE LA LABOR REALIZADA.

La fracción M-5 (un sólido pastoso amarillo; ver esquema general del extracto metanólico, pág 33), se purificó por cromatografía en columna seca usando sílica flash como adsorbente y mezclas de hexano-acetato de etilo-metanol como eluyente. La fracción presentaba dificultades en cuanto a su solubilización. Finalmente se usó con este fin una mezcla de acetona-metanol. El tipo de compuestos presentes en la misma no era de naturaleza terpénica, ya que no revelaban color violeta con ácido sulfúrico al 50%. Luego de subfraccionarla y agrupar convenientemente, se obtuvieron cuatro fracciones en las cuales se encontraba mayoritariamente la misma mancha variando su grado de pureza. Estas fracciones fueron llamadas Me-5 A, B, C, y D. Luego de ser estudiadas por espectroscopía de $^1\text{H-RMN}$, y por CCD, se resolvió estudiar en detalle la fracción Me-5 C. Esta fracción mostraba un espectro más limpio; las señales principales también estaban presentes en los espectros de las restantes, pero en éstas con más ruido.

El espectro de IR de esta fracción mostró absorciones intensas en la zona de $3400\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ indicando la presencia de hidroxilo, otra a 1660 cm^{-1} correspondiente a un carbonilo conjugado, otra a 1600 cm^{-1} , aromático o insaturación, y un conjunto de señales a 1570 , 1400 , 1280 y 1080 cm^{-1} correspondiente a las absorciones fuertes típicas de los bencenos sustituidos.

Todas estas bandas, de acuerdo a lo encontrado en la fracción anterior (ver pág 31), eran concordantes con la presunción de que se trataba de compuestos de tipo flavonoide o relacionados.

Luego de ser recristalizado cuatro veces con distintas mezclas de solventes, se obtuvo un compuesto puro y se procedió a su análisis y a su estudio por espectroscopía UV.

El resultado del microanálisis permitió proponer como fórmula mínima $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$. Para el estudio por espectrometría UV, se siguió la técnica descrita (Mabry *et al.*, 1970) tal cual se había utilizado para el caso de flavonoides.

El espectro obtenido en MeOH presentaba tres bandas, una a 348 nm , de doble intensidad que las otras dos que estaban a 300 y 258 nm respectivamente. Con el agregado de MeONa, se producía un corrimiento batocrómico de 42 nm que permanecía tal cual luego de 10 min a diferencia de lo que ocurría con el flavonoide.

Al agregar el AlCl_3 se producía un corrimiento batocrómico de 28 nm solamente, análogo al observado para la quercetina que posee hidroxilos en *orto* en

el anillo B. Al agregar HCl, el espectro volvía a ser idéntico al obtenido con MeOH.

Con el agregado de AcONa se produjo un corrimiento batocrómico de 50 nm, mucho mayor al observado tanto para la quercetina (26 nm) como para la isoramnetina (38 nm). Por el agregado de H₃BO₃, se observa un corrimiento hipsocrómico con respecto al anterior de 38 nm. Lo explicado anteriormente coincide con lo visto para la esculetina (13) en etanol (Horowitz *et al.*, 1960).

En el espectro UV del producto incógnita, en MeOH, con AcONa se produjo un Δ de 50 nm; con MeONa, de 42 nm y con AcONa/H₃BO₃ de 12 nm. Es posible observar que el corrimiento producido con NaOH/EtOH es comparable con el producido en MeONa/MeOH y lo son entre sí los desplazamientos producidos con AcONa/H₃BO₃. Resulta anormalmente grande el producido por AcONa en MeOH comparándolo con el visto para AcONa/EtOH, esta diferencia puede adjudicarse a la presencia de agua o de impurezas en el solvente.

Con estos resultados y el número de carbonos reportado por microanálisis, se planteó como posible estructura la de una cumarina con dos hidroxilos en posición *orto*.

Luego de recristalizar hasta punto de fusión constante con una mezcla de acetona-metanol-agua, se obtuvo un valor de 267-268 °, con ablandamiento a 262 °. El microanálisis de este mismo producto dió nuevamente resultados tales como para confirmar la fórmula mínima propuesta. La literatura consultada indicó como probable a la **esculetina** (13) (6,7-dihidroxicumarina), como producto mayoritario de la mezcla inicial. La otra cumarina que poseía esta misma fórmula mínima era la 7,8-dihidroxi cumarina, **daphnetin**, cuyo punto de fusión está informado como 255-256 °. La 7,8-dihidroxicumarina se podía descartar al comparar la zona aromática del espectro de ¹H-RMN.

De acuerdo con la estructura propuesta, **esculetina**, era de esperar que en el ¹H-RMN se vieran en la zona aromática los hidrógenos del doble enlace con el correspondiente valor de un acoplamiento *orto* y dentro de estas dos señales, con un valor de J pequeño, las señales correspondientes a los hidrógenos de las posiciones 5 y 8 ubicados en *para*.

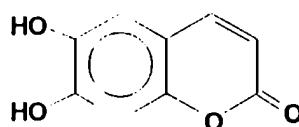
El espectro de ¹H-RMN presentó tal cual se había supuesto, dos dobletes, uno a campos más bajos a δ 7,87, con J=11 Hz que correspondía a H-4 del doble enlace acoplado al otro H del doble enlace, H-3, que resonaba δ 6,17 como doblete con J=11 Hz. Entre éstas, se encontraban dos señales correspondientes a los H del anillo aromático, a δ 7,00 y 6,76 ambas con J=1 Hz, que se adjudicaron a H-5 y H-8

respectivamente.

El espectro de ^{13}C -RMN presentaba 9 líneas entre las cuales se destacaban la correspondiente a carbono carbonílico a 161,4 ppm, a los carbonos del doble enlace a 144,9 y 111,8 ppm para C-4 y C-3 respectivamente. Si bien la mayor orientación provino de los espectros de UV, IR y ^1H -RMN, por el valor de δ del carbono carbonílico se confirmaba también la familia de compuestos en la que se ubicaba la sustancia aislada, ya que para los flavonoides este valor se encuentra entre 170 y 185 ppm (Agrawal *et al.*, 1989).

Su comportamiento en CG hacía suponer que se trataba de un compuesto muy polar ya que al igual que el flavonoide encontrado en la fracción anterior no eluía de columnas de uso común. El espectro de masa mostró M^+ y pico base de 178 uma, con pérdida subsiguiente de 28 uma correspondiente a CO, dando un pico importante a m/z 150, (97%). La zona aromática de los espectros de RMN de ^1H - y de ^{13}C , tanto a 100 como a 200 MHz, coincidían con lo informado en la bibliografía, para la esculetina glicosidada en 7 (Pouchert, 1974) y para **esculetina** respectivamente (Chang *et al.*, 1977; Cussans *et al.*, 1975 c).

Por todo lo anterior se concluyó que el producto incógnita era **esculetina**.



(13)

Del líquido sobrenadante de la primera recristalización, se obtuvo **fraxetina** (14). Su punto de fusión y su espectro de masa coincidía con lo informado para ésta en bibliografía (Karrer, 1958; Campbell *et al.*; 1979; Barnes *et al.*, 1964; Marques *et al.*, 1990; Faini *et al.*, 1980). En el espectro de masa se observaba un M^+ 208, (64%) y como pérdidas importantes las que resultaban de la ruptura β del metoxilo en posición 6 (M-15) m/z 193 (19 %), y las pérdidas características de las cumarinas de dos unidades de CO en forma sucesiva dando (M-CO) a m/z 180 (14%) y el m/z 152 (11%).

El estudio por CG-EM del sobrenadante de recristalización tanto de esta fracción (Me-5C) como de las correspondientes a Me-5 A y B cuyos precipitados resultaron ser básicamente, como en la fracción C, **esculetina**, permitió corroborar

que la impureza que poseía un metoxilo, presente en el espectro de resonancia magnética de hidrógeno y de carbono de la esculetina hallada, se encontraría en mayor proporción aún en los sobrenadantes correspondientes.

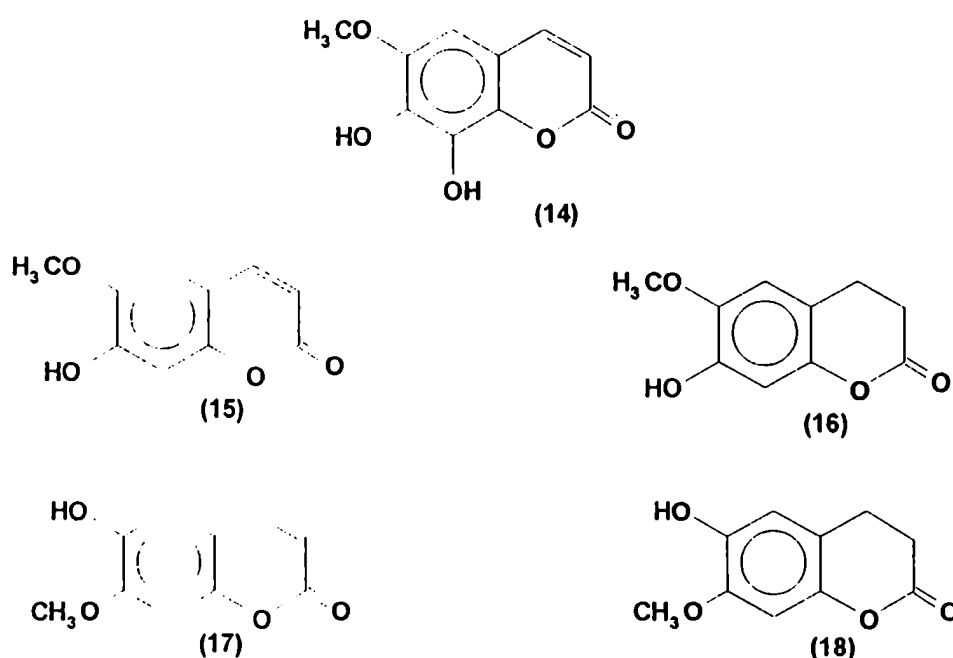
Para la fracción A, se observaban dos picos, los cuales eran la 4-hidroxi-3-(isopenten-2-il) acetofenona (A4) en mucho menor proporción que el 4-hidroxi-3-(3'-hidroxiisopentil) acetofenona (A5), ampliamente mayoritario (ver Capítulo Descripción de la labor realizada, pág 32). En la fracción B aparte de los dos presentes en la A, el pico mayoritario era un posible propil benceno. A la presencia de estos compuestos se debían las manchas de $> R_f$ que se observaban por CCD, que revelaban violáceas con ácido sulfúrico al 50%, y eran francamente mayoritarias frente al producto que revelaba amarillo y era de igual R_f en las cuatro fracciones de la Me-5.

En el sobrenadante de recristalización de Me-5 C, se detectaron dos principales productos con señales de intensidad comparable, cuyos M^+ eran de 192 y 194 una respectivamente. En función de estos valores se pudo calcular como fórmulas mínimas $C_{10}H_8O_4$ y $C_{10}H_{10}O_4$. Las posibilidades podrían ser entonces, escopoletina (15) y dihidroescopoletina (16) o isoescopoletina (17) y dihidroisoescopoletina (18) respectivamente. Por comparación con los correspondientes espectros de masa de literatura se estableció que el espectro del compuesto correspondiente a M^+ 194 era igual al de la **isoescopoletina** (Shafizadeh *et al.*, 1970; Sarg *et al.*, 1987).

Los espectros de masa de escopoletina e isoescopoletina se diferencian entre sí porque para la escopoletina la pérdida de metilo a partir del M^+ es de importancia equivalente a la de CO, característica de las cumarinas de sustitución simple, con metoxilo en posición 6 (Barnes *et al.*, 1964; Aplin *et al.*, 1967). En este caso particular M^+ , (M-CO) y (M-Me) tenían intensidades comparables (29%, 27% y 24% respectivamente). Para la isoscopoletina el M^+ presenta el 100% de intensidad y la pérdida de CO se ve favorecida frente a la de metilo, (25% y 10% respectivamente) lo que ratifica que el metoxilo no está sobre C-6, por lo tanto se trataría de **isoescopoletina**. El espectro obtenido coincide con el aparecido en bibliografía para la metilesculina (6- β -D-glucosil-7-metoxi-cumarina (Shafizadeh *et al.*, 1970). En este caso el espectro de masa obtenido es idéntico al de isoscopoletina porque se produce la escisión de la unidad de glucosa y el espectro resultante es el de la aglicona correspondiente.

Como el espectro presente en bibliografía para dihidroescopoletina era

distinto al obtenido para el pico de M^+ 194, y como este compuesto se encontraba en el mismo sobrenadante en donde se encontraba la isoescopoletina, se atribuyó el espectro con M^+ 194 a la **dihidroisoescopoletina**. Las diferencias entre los espectros de dihidroescopoletina, informado por Sarg (Sarg *et al.*; 1987) y el obtenido en este trabajo para el compuesto de M^+ 194 eran las mismas que las observadas para la escopoletina y la isoscopoletina. Para la **dihidroescopoletina** el M^+ y el (M-15) son de baja intensidad, 28% y 5% respectivamente, mientras que en este caso el M^+ a m/z 194 (100%) y al igual que para la isoscopoletina, la pérdida de metilo y de CO son menos importantes que su ion molecular.

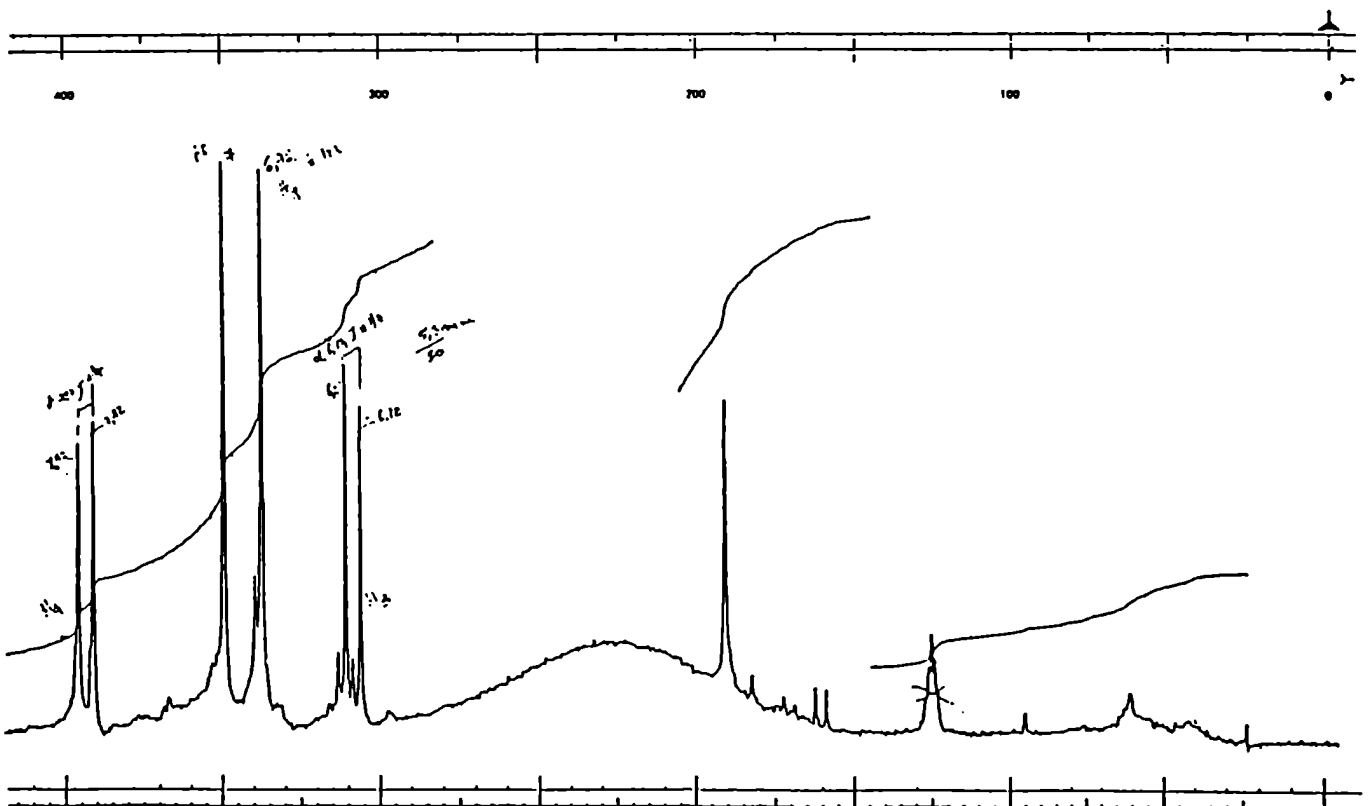


En los espectros de RMN tanto protónico como de carbono de la esculetina aparecía una señal perteneciente a un metoxilo de una intensidad tal que correspondía a una impureza. Se había identificado **fraxetina** en el sobrenadante de la primera recristalización y pese a haber llegado a la esculetina con punto de fusión constante, la señal de metoxilo, aunque de menor intensidad, persistía a 55,89 ppm. De las tres cumarinas posibles presentes en bibliografía, 6-hidroxi-7-metoxi; 6-metoxi-7-hidroxi y 7-hidroxi-8-metoxi, podíamos descartar la tercera ya que la señal de metoxilo para ésta aparece a 60,6 ppm. Para la primera, escopoletina, aparece a

55,9 ppm y para la segunda, isoescopoletina a 56,2. Sólo con este dato no era posible identificar la impureza por lo que se resolvió estudiar por CG-EM los sobrenadantes de recristalización. Con columna HP-1 (5 m), (ver Parte Experimental, pág 200) se obtuvieron dos señales a tr 11,0 y 11,5 min respectivamente. El espectro de masa obtenido para la primera señal coincidía con el que correspondería a 3,4-dihidroisoescopoletina, y el segundo más retenido correspondía a la isoescopoletina informada en bibliografía.

Se concluyó entonces que ambas, la **3,4-dihidroisoescopoletina** y la **isoescopoletina** estaban presentes en esta fracción del extracto metanólico.

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, DMSO- d_6) de esculetina.



^{13}C -RMN (50MHz, DMSO- d_6) de esculetina.

BIBLIOGRAFIA.

- ♦ Abdel-Hay, F.M., Abu-Mustafa, E.A., Fayez, M.B.E. (1967 a) *Rec. Trav. Chim.*, **86**, 920.
- ♦ Abdel-Hay, F.M., Abu-Mustafa, E.A., El-Tawil, B.A.H., Fayez, M.B.E., Barnes, C.S., Occolowitz, J.L. (1967 b) *Indian J. Chem.*, **5**, 89.
- ♦ Abu-Eittah, R.H., El-Tawil, B.A.H., (1985) *Canadian J. Chem.*, **63**, 1173.
- ♦ Agrawal, P.K. (1989) "Studies in Organic Chemistry. 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids." Elsevier, Amsterdam.
- ♦ Aplin, R.T., Page, C.B. (1967) *J. Chem. Soc. C*, 2593.
- ♦ Barnes, C.S., Occolowitz, J.L. (1963) *Austr. J. Chem.*, **16**, 219.
- ♦ Barnes, C.S., Occolowitz, J.L. (1964) *Austr. J. Chem.*, **17**, 975
- ♦ Campbell, W.E., Cragg, G.M.L. (1979) *Phytochemistry*, **18**, 688.
- ♦ Cassady, J.M., Ojima, N., Chang, C.-J., McLoughlin, J.L. (1979) *J. Nat Prod*, **42**, 274
- ♦ Chang, C.J., Floss, H.G., Steck, W. (1977) *J. Org. Chem.*, **42**, 1337.
- ♦ Cussans, N.J., Huckerby, T.N. (1975 a) *Tetr. Lett.*, **31**, 2445.
- ♦ Cussans, N.J., Huckerby, T.N. (1975 b) *Tetrahedron*, **31**, 2587.
- ♦ Cussans, N.J., Huckerby, T.N. (1975 c) *Tetrahedron*, **31**, 2719.
- ♦ Dadak, V., Zboril, P. (1967) *Collect. Czech Chem. Commun.*, **32**, 4118.
- ♦ Dominguez, X.A., Cano, G., Luna, I., Dieck, A. (1977) *Phytochemistry*, **16**, 1096.
- ♦ Faini, F., Torres, R., Delle Monache, F., Marini Bettólo, G.B., Castillo, M. (1980) *Planta Médica*, **38**, 128.
- ♦ Finkelstein, N., Rivett, D.E.A., (1976) *Phytochemistry*, **15**, 1080.
- ♦ Finnegan, R.A., Merkel, K.E., Back, N. (1972) *J. Pharm Sci.*, **61**, 1599.
- ♦ Fisher, J.F., Nordby, H.E. (1965) *J. Food. Sci.*, **30**, 869.
- ♦ Furuya, T., Kojima, H., Sato, H. (1967) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **15**, 1362.
- ♦ Gigg, R., Knight, J.A., Roffey, P. (1966) *Tetrahedron*, **22**, 3301.
- ♦ Gottlieb, H.E., Alves de Lima, R., delle Monache, F. (1979) *J. Chem. Soc. Perkin II*, 435.
- ♦ Hammond, P.H., Fletcher, A.N., Henry, R.A., Atkins, R.L. (1975) *Appl. Phys.*, **8**, 311, 315.
- ♦ Heathcote, J.G., Hibbert, J.R. (1974) *Biochem. Soc. Trans.* **2**, 301.
- ♦ Hoffman, R.A. (1958) *Mol. Phys.* **1**, 326.
- ♦ Horowitz, R.M., Gentili, B. (1960) *J. Org. Chem.*, **25**, 2183.

- ◆ Jikeli, G., Herrig, W., Günther, H. (1974) *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 323.
- ◆ Johnson, A.P., Pelter, A., Barber, M. (1964) *Tetr. Lett.*, 1267.
- ◆ Johnson, C.E., Bovey, F.A. (1958) *J. Chem. Phys.*, **29**, 1012.
- ◆ Johnstone, R.A.W., Millard, B.J., Dean, F.M., Hill, A.W. (1966) *J. Chem. Soc. C*, 1712.
- ◆ Karrer, W. "Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe". (Exclusive Alkaloide) (1958) Birkhäuser Verlag.
- ◆ Lee, K.H., Soine, T.O. (1969 a) *J. Pharm. Sci.*, **58**, 675.
- ◆ Lee, K.H., Soine, T.O. (1969 b) *J. Pharm. Sci.*, **58**, 681.
- ◆ Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970) "The systematic identification of Flavonoids" Springer-Verlag, Berlin.
- ◆ Marques, M.O.M., Yoshida, M. (1990) *Química Nova*, **4**, 13.
- ◆ Overman, R.S., Stahmann, M.A., Huebner, C.F., Sullivan, W.R., Spero, L., Doherty, D.G., Ikawa, M., Graf, L., Roseman, S., Link, K.P. (1974) *J. Biol. Chem.*, **153**, 5.
- ◆ Pouchert, C.J., Campbell, J.R. (1974) "The Aldrich Library of NMR Spectra" **7**, 47 B.
- ◆ Rowbotham, J.B., Schaefer, T. (1973) *Can. J. Chem.*, **51**, 953.
- ◆ Sarg, T.M., Ateya, A.M., Dora, G.A. (1987) *Fitoterapia*, **18**, 133.
- ◆ Schmitischek, E.J., Trias, J.A., Hammond, P.R., Henry, R.A., Atkins, R.L. (1974) *Opt. Comm.*, **11**, 352
- ◆ Schmitschek, E.J., Trias, J.A., Hammond, R., Atkins, R.L. (1976) *Opt. Comm.*, **16**, 313.
- ◆ Schneider, G., Müller, H., Pfaender, O. (1967) *Arch. Pharm.*, **73**, 300.
- ◆ Schulman, S.G., Rosenberg, L.S. (1979) *J. Phys. Chem.*, **83**, 447.
- ◆ Shafizadeh, F., Melnikoff, A.B. (1970) *Phytochemistry*, **9**, 1131.
- ◆ Shapiro, R.H., Djerassi, C.J. (1965) *J. Org. Chem.* **30**, 955.
- ◆ Shipchandler, M., Soine, T.O. (1968) *J. Pharm. Sci.* **57**, 747.
- ◆ Talapatra, S.K., Mukhopadhyay, S.K., Talapatra, B. (1975) *Phytochemistry* **14**, 836.
- ◆ Vulfson, N.S., Zaretskii, V.I., Zaikin, V.G. (1963) *Inv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.* **12**, 2215, (1964) *Chem. Abstr.* 60, 10040 a.
- ◆ Wald, R.W., Fuer, G. (1971) *J. Med Chem.* **14**, 1081.
- ◆ Wattenburg, L.W., Lam, L.K.T., Fladmore, A.V. (1979) *Cancer Research*, **39**, 1651.

EXPERIMENTAL.

Los puntos de fusión fueron determinados con un aparato de Fisher Johns y no están corregidos.

Los espectros de absorción en el infrarrojo (IR) se realizaron utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 710 B, colocando la muestra como película entre pastillas de NaCl en el caso de aceites o en suspensión en Nujol. También se utilizaron pastillas de KBr con los compuestos mayoritarios del extracto metanólico (flavonoides y cumarinas).

Los espectros de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) de flavonoides y cumarinas fueron realizados en soluciones metanólicas en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8451 A con detector por arreglo de diodos.

Los espectros de masa (EM), fueron realizados a 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 Data System 166 con teletipo Tektronix 4010-1 e impresor Tektronix 4631 y en un VG-TRIO-2 / 2000.

Las cromatografías gas-líquido combinadas con espectrometría de masa (CG-EM) fueron realizadas en un sistema compuesto por un cromatógrafo gaseoso Varian 1400 acoplado a un espectrómetro de masa Varian Mat CH7-A o en un equipo VG-TRIO-2 / 2000 acoplado a un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN) fueron realizados a 100.1 MHz en un espectrómetro Varian XL-100-15. El solvente empleado se indica en cada caso utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresaron en δ (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Las señales se indican como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c) y multiplete (m).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C -RMN) fueron realizados a 25.2 MHz. en un espectrómetro Varian XL-100-15 utilizando pulsos de 45° y velocidad de repetición de pulsos de 0,71 seg.

Los espectros ^{13}C -RMN totalmente desacoplados de hidrógeno fueron obtenidos por irradiación a la frecuencia central de 4 ppm del espectro ^1H -RMN. La multiplicidad de las señales en ^{13}C -RMN fue determinada mediante la técnica de APT (Attached Proton Test).

Los espectros a 200 MHz y con secuencias HETCOR y COSY fueron

realizados en un instrumento Varian Gemini-200 (Texas A&M University) a excepción del de esculetina realizado con un equipo Bruker AC 200. Los espectros a 300 MHz fueron realizados en un Bruker-300.

Todos los solventes utilizados fueron purificados por destilación. La evaporación de los solventes fue efectuada a presión reducida. Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (v/v).

METODOS CROMATOGRÁFICOS.

a) Cromatografía en capa delgada (CCD):

Se utilizaron las siguientes cromatoplasmas:

- silicagel 60 preparadas sobre hojas de aluminio (Merck), espesor: 0,2 mm, con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F₂₅₄).
- silicagel 60 sobre hojas de poliéster (Aldrich o Sigma), espesor: 0,2 mm, con indicador F₂₅₄.
- silicagel 60 de alta resolución (HPTLC-Merck), con indicador F₂₅₄.
- fase reversa de alta resolución C-18 (HPTLC-Merck), con indicador F₂₅₄.

Los agentes de revelado utilizados fueron los siguientes:

- vapores de I₂.
- ácido sulfúrico-agua (1:1) y posterior calentamiento en estufa.
- Reactivo de Draggendorf.

b) Cromatografía en capa preparativa:

Para masa de muestra menor de 40 mg se utilizaron cromatoplasmas de silicagel 60 (Merck o Sigma) sobre vidrio, de 20x20 cm de superficie y 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F₂₅₄).

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 20x20 cm de superficie.

c) Cromatografía "flash" en columna seca:

Este método fue empleado para un fraccionamiento rápido y eficiente de los extractos y para algunas separaciones cromatográficas (diferencia de R_f entre las sustancias no menor de 0,2).

La técnica utilizada fue la siguiente: Se utilizaron embudos cilíndricos con placa filtrante de vidrio sinterizado de 10 ml a 2 l según la masa de muestra a tratar. Se utilizó silicagel 60 G ó H (Merck). Se colocó la sílica gel en el embudo y se compactó golpeando suavemente el vástago del embudo sobre una superficie de madera. El embudo con la sílica gel compactada en su interior se colocó en un kitasato. Se distribuyó el extracto (generalmente en forma de pastilla con silicagel) homogéneamente sobre la superficie de sílica y finalmente se colocó un disco de papel de filtro sobre la pastilla a fin de no erosionar la superficie de la misma por el agregado de solventes. Se agregó el primer solvente (elegido adecuadamente según CCD) y se eluyó aplicando succión al kitasato por medio de una trompa de agua, llevando a sequedad. Se trasvasó el eluido a un recipiente adecuado y se repitió el procedimiento descripto agregando sucesivamente solventes de polaridad creciente.

En el caso de los extractos crudos se colectaron fracciones de 200 ml y se utilizaron mezclas de hexano-acetato de etilo-metanol. Con esta metodología se logró un fraccionamiento aceptable de 150 g de extracto en una jornada de trabajo (9 hs).

d) Cromatografía en columna:

Se utilizaron como adsorbentes silicagel H (Merck) y silicagel 60 Merck (mesh 230-400) para cromatografía "flash". En estos casos, las cromatografías fueron realizadas a mediana presión utilizando nitrógeno.

e) Cromatografía gaseosa (CG):

Las cromatografías gaseosas (CG) fueron realizadas en cromatógrafos Hewlett-Packard 5840-A y 5890.

Ambos equipos contaban 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:

Columnas empacadas:

1) SE-30 3%, long. 6 pies, 2 mm d.i., soporte Chromosorb WAW DMCS 80-100.

- 2) SE-30 3%, long . 4 pies, 2 mm d.i., soporte Chromosorb WAW DMCS 80-100.
- 3) OV-101 2%, long 4 pies, 2 mm d.i., soporte: Chromosorb WAW DMCS 80-100.
- 4) OV-17 3%, long 6 pies, 2 mm d.i., soporte Chromosorb WAW DMCS 80-100.

Columnas capilares:

- 1) SP-2100, long. 12 m, 0,25 mm.
- 2) SP-2250, long 15 m, o,25 mm.
- 3) SP-2340, long 30 m, 0,25 mm.
- 4) HP-1, long 5m, 0,53 mm.
- 5) HP-5, long. 25 m, 0,32 mm.
- 6) Carbowax 20 M, long 50 m, 0,32 mm.

F) Cromatografía líquida de alta resolución:

Las cromatografías líquidas de alta resolución (CLAR) fueron realizadas en un cromatógrafo Micromeritics equipado con un detector de índice de refracción modelo 771 y un inyector manual Micromeritics 730. Las columnas cromatográficas utilizadas en los distintos casos fueron las siguientes:

- Alltech R-Sil C-18 (High Load) (10 μ , 250 x 10 mm.)
- Altex Ultrasphere ODS (5 μ , 250 x 10 mm.)

La 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 en todos los casos.

Werneria poposa ORIGINARIA DE LA PROVINCIA DE SALTA.

El material estudiado fue recolectado en San Antonio de los Cobres, Provincia de Salta. Fue secado, molido y extraído en Soxhlet usando como solventes de extracción hexano, cloruro de metileno y metanol sucesivamente.

De 116 g de planta se obtuvieron 12,1 g de extracto a partir de hexano; 9,8 g de extracto a partir de cloruro de metileno y 27,6 g de extracto a partir de metanol.

EXTRACTO NO POLAR (H, hexano).

Para fraccionar este extracto se realizó una cromatografía en columna seca. La pastilla de extracto fue de aprox. 1/3 de la columna total. Se eluyó con mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo-metanol según se detalla en la tabla. En la misma se indica la masa de los respectivos residuos obtenidos por la evaporación del solvente.

Cada una de estas fracciones fue eluída con 200 ml de solvente o mezclas de solvente de polaridad creciente.

FRACCION	SOLVENTE	MASA DEL RESIDUO
H-1	hexano	1,5 g.
H-2	hexano-acetato de etilo 99:1	350 mg.
H-3	hexano-acetato de etilo 98,5:1	728 mg.
H-4	hexano-acetato de etilo 97:3	1,5 g.
H-5	hexano-acetato de etilo 95:5	1,5 g.
H-6	hexano-acetato de etilo 90:10	700 mg.

La fracción H-1 (1,5 g) se subfraccionó en 11 fracciones, usando sílica gel flash como adsorbente y hexano como único solvente.

Se obtuvieron las siguientes fracciones:

H-1	(1-6)	(7)	(8)	(9)	(10)
(mg)	22	98	480	84	129

(11)	(12+13)	(14)	(15+16)	(17)	(18-30)
21	59	49	73	64	325

Las fracciones H-1(1-6), H-1(7), H-1(8), H-1(18-30), sólidos blancos, fueron estudiados por CG en paralelo contra hidrocarburos patrones (C-12 a C-40).

Se utilizó una columna empacada SE-30, 4 pies con la cual no se consiguió la identificación completa de los componentes de las mezclas aisladas.

HIDROCARBUROS. Tabulación de tiempos de retención.

PATRON HIDROCARBUROS ALIFATICOS DESDE C-12 a C-40.

log tr.	n° de C
0,037	23
0,146	24
0,262	25
0,382	26
0,506	27
0,633	28
0,763	29
0,893	30
1,025	31

Datos de la recta de calibración (Método de cuadrados mínimos, programa LOTUS, versión 2.)

Constante	22.84284
Desviación estándar	0,084554
R Cuadrada	0,999165
N° de mediciones	9
Grados de libertad	7

MEZCLA 1-6			MEZCLA 7		
log tr	n° de C	área %	log tr	n° de C	área %
0,061	23,33	8,119	0,037	23,14	1,489
0,100	23,65	1,589	0,155	24,09	8,149
0,167	24,19	3,356	0,285	25,14	7,983
0,299	25,25	8,219	0,409	26,14	8,868
0,417	26,20	1,988	0,547	27,25	78,377
0,549	27,26	8,355	0,667	28,21	7,371
0,668	28,22	1,833	0,817	29,42	54,695
0,800	29,28	8,259	1,054	31,33	0,924
0,922	30,27	8,519	1,066	31,43	0,433

MEZCLA 8			MEZCLA (18-30)		
log tr.	n° de C	área %	log tr.	n° de C	área %
0,037	23,14	2,113	0,097	23,62	0,052
0,155	24,09	0,892	0,173	24,24	7,063
0,285	25,14	9,752	0,217	24,59	12,256
0,409	26,14	1,608	0,303	25,28	0,767
0,547	27,25	29,515	0,428	26,29	11,074
0,667	28,21	2,8	0,552	27,29	0,714
0,817	29,42	45,248	0,665	28,20	2,874
1,054	31,33	0,101	0,801	29,29	8,988
1,066	31,43		0,978	30,72	8,888

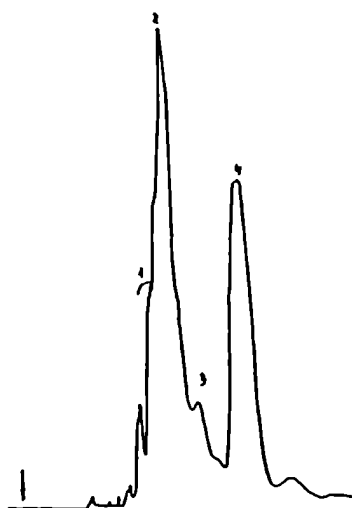
H-3.

Analizada por CCD (sílica gel H, hexano-cloruro de metileno (1:1), ácido sulfúrico-agua 1:1 y calor, como adsorbente, solvente de desarrollo y revelador respectivamente), presentaba a Rf 0,5 una zona que revelaba rojo. Se subfraccionó por columna de sílica gel flash usando mezclas de hexano-cloruro de metileno de polaridad creciente. Se obtuvieron las siguientes fracciones:

FRACCION	MASA (mg)
H-3// (1-7)	74
(8)	5
(9)	28
(10+11)	1755
(12-19)	221
(20-22)	93
(23-30)	23

Se estudiaron las siete fracciones obtenidas por CCD usando como solvente de desarrollo hexano-benceno 1:1. La fracción H-3(20-22) presentó una mancha que revelaba rojo con ácido sulfúrico y su espectro ^1H -RMN presentaba una señal a $\delta=9$ con J 1,5 característica de aldehído (ver fig 1H-RMN de aldehído kaurénico, Capítulo Diterpenoides, pág 71). Se purificó por CLAR. Para esto se empleó una columna de fase reversa Rp-18 de 10 μ y como solvente de trabajo metanol. Se detectaron inicialmente cuatro compuestos. De estos el cuarto presentaba un solo pico por CG (ver Fig 1) y fue analizado nuevamente por CLAR con columna Rp-18 de 5 μ confirmándose la presencia de un solo compuesto que resultó ser el **aldehído kaurénico**.

Fig 1: CLAR de la fracción H-3(20-22).



El espectro de masa presentaba los siguientes fragmentos:

Nuestro compuesto.	Piozzi et al*.	Bohlmann et al*.
MS (m/z,%)	MS (m/z)	MS (m/z,%)
286 (M+,71)	286 (M+)	286 (100%)
271 (6) (M-Me)	271 (M-15)	271 (12) (-CH ₃)
258 (8) (M-CO)	258 (M-28)	257 (37) (-CHO)
257(16)(M-COH)	257 (M-29)	243 (61) (271-CO)
243 (72) (M-43)		
123 (80)		
81 (100)		

En la siguiente tabla se presentan los datos de los espectros de ¹H-RMN para el compuesto hallado y los descritos en bibliografía para el aldehído kaurénico:

H	Compuesto hallado. (100 MHz, Cl ₃ CH)	Piozzi et al* (100 MHz, CCl ₄)	Bohlmann et al* (100 MHz, Cl ₃ CD, Cl ₄ C)	Barrero et al* (80 MHz, Cl ₃ CH)
Me-20	0,99 (s,3H)	0,97 (s)	0,96 (s)	1,02 (s)
Me-18	0,88 (s,3H)	0,89 (s)	0,87 (s)	0,90 (s)
H-15	2,07 (brs,2H)	2,03 (t, J=1Hz,2H)		2,07 (sa, 2H)
H-13	2,65 (m,1H)	2,59 (sa,2H)		2,65 (m,1H)
H-17	4,68 y 4,73	4,74 y 4,68	4,75-4,80	4,78 (sa, 2H)
H-19	9,74 (d,1H,J=1,5Hz)	9,64 (d,J=1,2Hz)	9,62 (d,J=1)	9,76 (d, J=1, 1Hz, 1H)

(*) ver Capítulo Diterpenoides (pág 69).

En la siguiente tabla se presentan los espectros de RMN -¹³C del 19-al-16-en-kaureno obtenido por Hayman y el medido en este trabajo como así también el espectro del hidrocarburo base.

C	Nuestro compuesto	Barrero et al. (*) (hidroc. base)	Hayman et al. (*)
	Cl ₃ CD-TMS/50,2 MHz	Cl ₃ CD-TMS/20,1MHz	Cl ₃ CD-TMS/75,4MHz
1	29,2	40,5	39,98 (t)
2	18,3	18,7	18,47 (t)
3	34,2	42,1	34,25 (t)
4	48,4	33,3	48,55 (t)
5	56,6	56,5	54,61 (d)
6	19,8	20,3	19,93 (t)
7	41,1	41,3	41,26 (t)
8	44,0	44,3	44,14 (s)
9	54,5	56,2	56,75 (d)
10	39,8	39,4	39,43 (s)
11	18,4	18,2	18,37 (t)
12	32,9	33,3	33,02 (t)
13	43,7	44,1	43,81 (d)
14	39,3	39,9	39,90 (t)
15	48,9	49,3	49,04 (t)
16	158,2	154,0	155,63 (s)
17	103,1	102,8	103,30 (t)
18	24,2	33,3	24,38 (q)
19	205,5	21,7	206,08 (d)
20	16,3	17,6	16,43 (q)

Los valores de δ tanto para ^1H -RMN como para ^{13}C -RMN están dados en ppm.

(*) Ver capítulo Diterpenoides (pág 70).

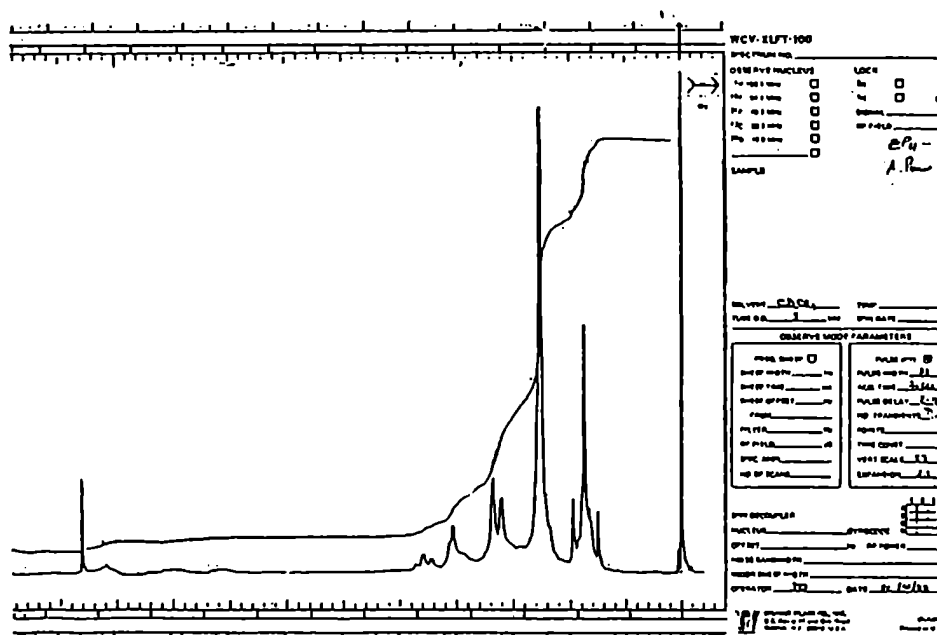
H-4.

Luego de ser analizada por CCD, se subfraccionó por columna, con sílica gel flash como adsorbente y cloruro de metileno como único solvente de desarrollo. Se obtuvieron inicialmente 5 fracciones:

FRACCION	MASA (mg)
H-4// (1-6)	64
(7-9)	442
(10-12)	249
(13-15)	104
(16-26)	80

Las fracciones fueron estudiadas por CCD. De éstas sólo la H-4(16-26), revelaba violeta con ácido sulfúrico y calor. El espectro ^1H -RMN de H-4(1-6) indicaba la probable presencia de una cera. (Ver fig 2)

Fig 2: ^1H -RMN de la fracción H-4(1-6).



La H-4 (16-26) mostraba por ^1H -RMN señales a $\delta > 9$ del tipo de la H-3 (20-22), por esto se la repurificó por columna y se agruparon aquellos fracciones que revelaban violeta con ácido sulfúrico y calor, en H-4(16-26)(1+2) y H-4(16-26)(3-12). Estas nuevas fracciones se purificaron por CLAR, se usó columna de tipo Rp-18 10 μ con metanol como solvente y se obtuvieron para la primera 3 picos y para la segunda 5. De éstos, por su masa, los picos 1, 3 y C se analizaron usando columna con fase Rp-18 de 5 μ y volvieron a subdividirse. (Ver Fig 3 a) y b))

Fig 3 a)

CLAR de las fracciones

H-4(16-26)/(1+2)

(3-12)

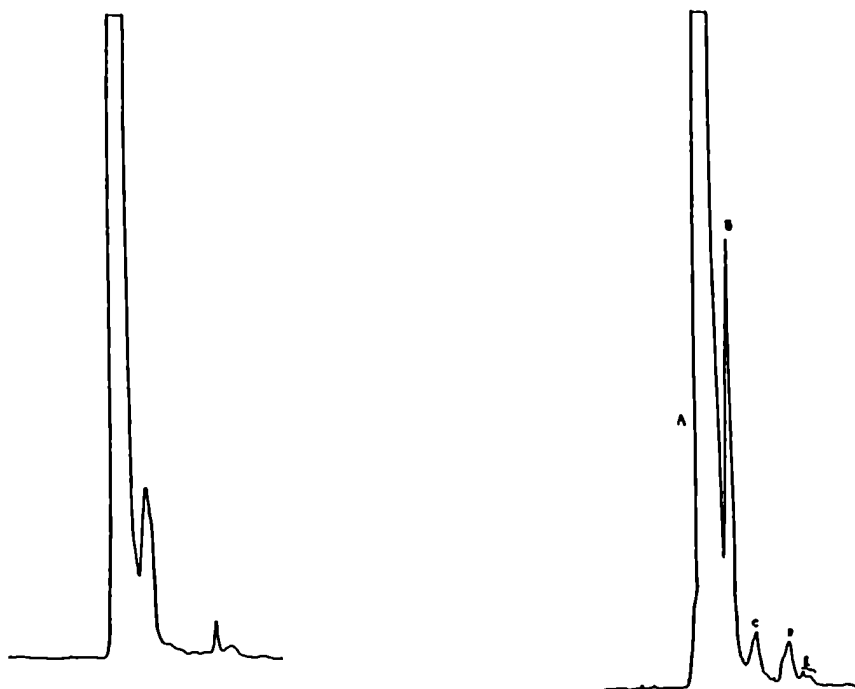


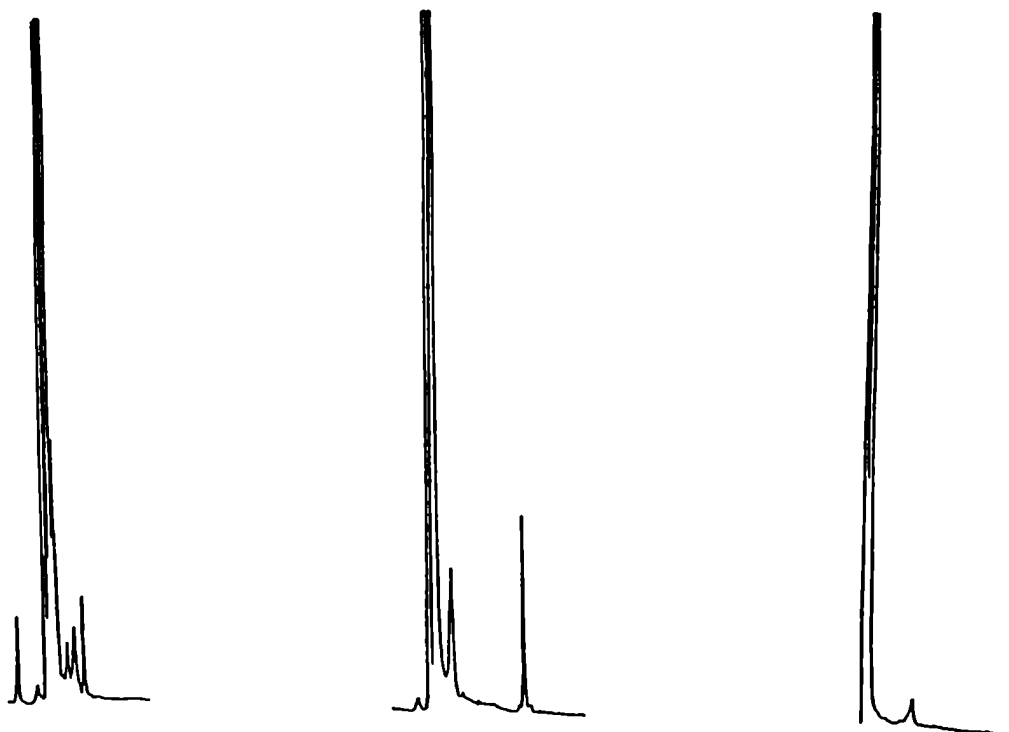
Fig 3 b)

CLAR de las fracciones

H-4(16-26)/(1+2)(1)

(1+2)(3)

(3-12) (c)



(ver Capítulo Descripción general de la labor realizada, pág 14).

H-5.

Esta fracción (1,2 g) se subfraccionó usando sílica gel flash (60 g) y se obtuvieron 8 subfracciones al eluir con mezclas de polaridad creciente de hexano-cloruro de metileno-metanol controlando el cambio de solventes por CCD.

FRACCION	MASA (mg)
H-5// (1-9)	53
(10-12)	38
(13-17)	91
(18-20)	123
(21-25)	237
(26-34)	310
(35-40)	102
(41-final)	179

De éstas se analizó la H-5(21-25), la cual se volvió a fraccionar por cromatografía en columna y se obtuvieron nuevamente 6 fracciones:

FRACCION	MASA (mg)
H-5 (21-25)// (1-4)	38
(5)	40
(6)	68
(7-9)	92
(10)	35
(11-14)	11

Se observó que estas fracciones por CCD tienen $R_f < 0,5$ con solvente de desarrollo cloruro de metileno-hexano 75:25. De éstas se analizó la H-5 (21-25) (7-9), (92mg), por CLAR con columna RP-18, de 10 μ usando metanol-agua 90:10

obteniéndose 4 picos. Los dos últimos picos (3 y 4) fueron analizados posteriormente por CLAR con columna RP-18 de 5 μ obteniéndose de cada uno de ellos dos picos (3(1) y 3(2) y 4(1) y 4(2)). El solvente de desarrollo para pico 3 fue metanol-agua 95:5, mientras que para el pico 4, se utilizó como solvente de desarrollo metanol-agua 80:20.

Cada uno de los picos presentes en los cromatogramas (ver Fig 4, 5 y 6) fue analizado posteriormente por CG con columna capilar HP-1, con el siguiente programa estándar: Temperatura inicial:80°C; Velocidad de calentamiento: 10°/min hasta 200°C y 60°/min hasta 280°C. Como se obtuvo el mismo tiempo de retención para todos ellos, con columna HP1, se decidió usar una columna SP-2250. Se observaron numerosos picos y se estudiaron por CG-EM (ver Capítulo Descripción de la labor realizada, sección Compuestos Volátiles, pág 15).

Ejemplificaremos con los gráficos de cromatogramas del mismo pico CLAR RP-18 (2 (5 μ)) del CLAR RP-18 (3 (10 μ)) al analizarlos en distinta columna. HP-1 y SP-2250 (Fig 7 y 8).

Fig 4

CLAR H-5(21-25)(7-9).

Fig 5

CLAR H-5(21-25)(7-9)(3).

Fig 6

CLAR H-5(21-25)(7-9)(4).

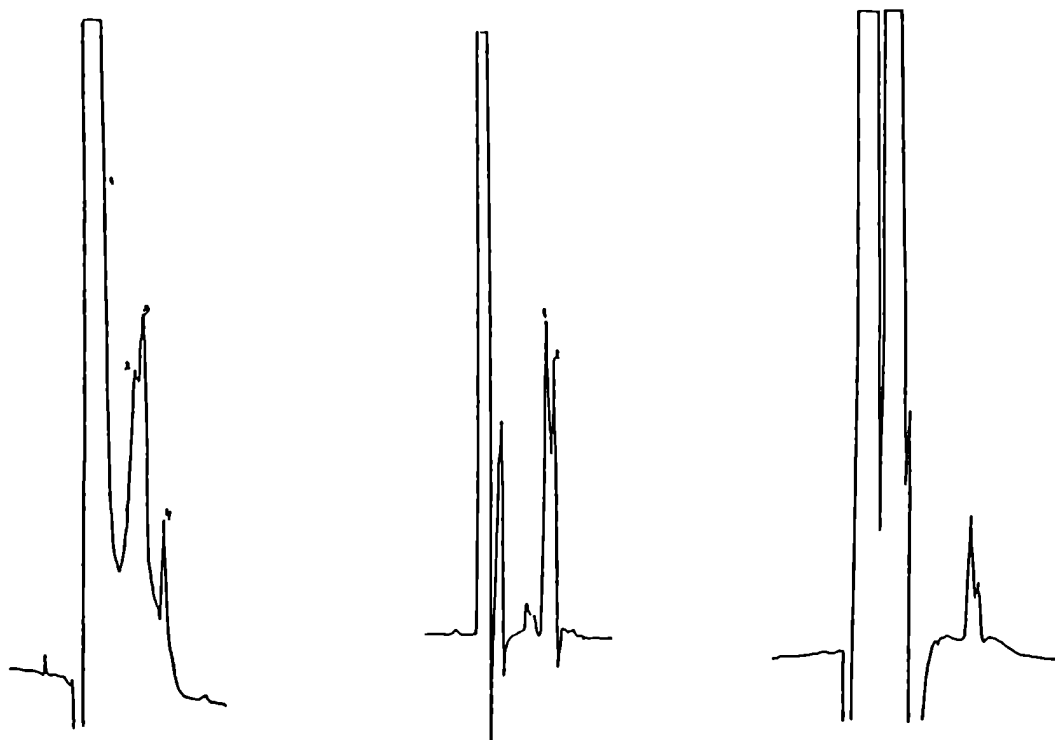


Fig 7: CG de la fracción H-5(21-25)(7-9)(3)(2) con columna HP-1.

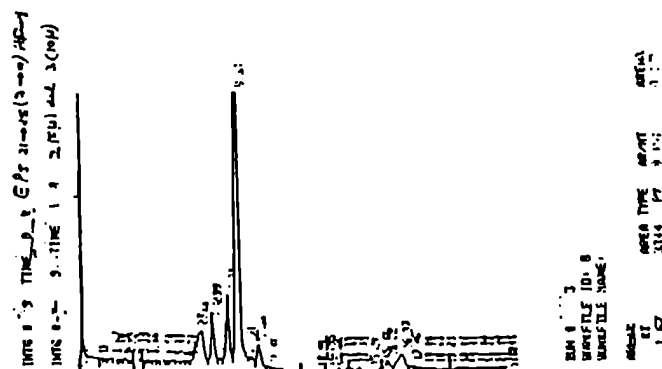
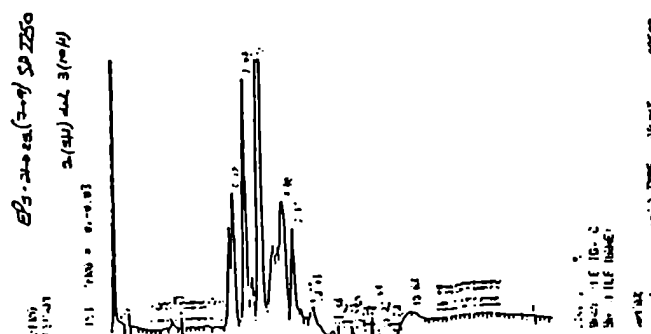


Fig 8: CG de la fracción H-5(21-25)(7-9)(3)(2) con columna SP-2250.



H-6.

Se subfraccionó por columna de sílica gel H, con mezclas de polaridad creciente de cloruro de metileno-acetato de etilo. Se obtuvieron 8 fracciones:

FRACCION	MASA (mg)
H-6// (1-5)	14
(6)	14
(7)	22
(8-10)	119
(11-14)	53
(15-17)	93
(18-20)	41
(21- final)	82

Se prosiguió con el estudio de la H-6(11-14). Se la subfraccionó por columna de sílica gel H con mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo. Se obtuvieron 6 fracciones:

FRACCION	MASA (mg)
H-6 (11-14) //(1-5)	14
(6)	19
(7)	24
(8+9)	45
(10+11)	15
(12-15)	12

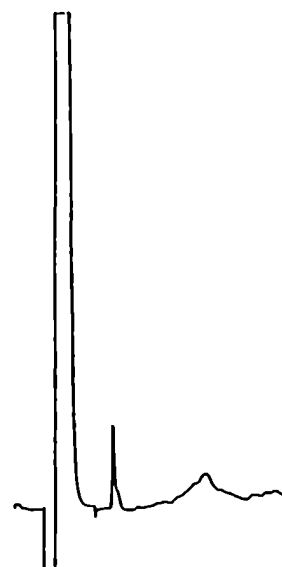
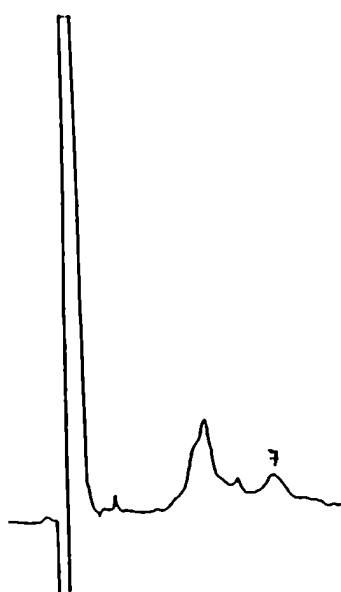
Se estudiaron por CCD y CG con la misma columna y programa estándar y dado que las 3 últimas presentaban una sola mancha y un solo pico a tiempo de retención 11,7 min se decidió estudiar por CLAR (RP 18 de 10 μ y 5 μ con MeOH-H₂O 90:10) de la H-6 (11-14) //(8+9) por ser la de mayor masa. De ésta se obtuvieron 7 picos, de los cuales el de mayor masa era el 7 (24 mg). Se analizó por CLAR por columna de 5 μ , obteniéndose nuevamente más de un pico (Fig 9 y 10).

Fig 9:

CLAR de la fracción H-6(11-14)(8+9)

Fig 10:

CLAR de la fracción H-6(11-14)(8+9)(7)



ESTUDIO DE PRODUCTOS VOLATILES

PARTE EXPERIMENTAL.

El extracto obtenido de la destilación por arrastre con vapor de 80 g de planta fue de 1,55 g. Por cromatografía en columna seca de sílica gel G eluyendo con mezclas de polaridad creciente de cloruro de metileno-acetato de etilo, se obtuvieron inicialmente 8 fracciones (AV 1 a 8 respectivamente)

FRACCION	SOLVENTE	MASA (mg)
1	Hexano	(despreciable)
2	Hexano-Cloruro de metileno 9:1	44
3	Hexano-Cloruro de metileno 7:3	42
4	Hexano-Cloruro de metileno 1:1	22
5	Hexano-Cloruro de metileno 1:4	17
6	Cloruro de metileno.	13
7	Cloruro de metileno-acetato de etilo 1:1	148
8	Acetato de etilo	11

Todas éstas se estudiaron por CCD y CG. La AV3 presentaba por CCD una zona en común con la AV2. Se purificó de modo tal que la zona en común pasó toda a la AV2 que se llamó AV2'.

La AV2' se fraccionó por columna seca de sílica gel G y se obtuvieron 5 fracciones:

FRACCION	MASA (mg)
AV2'// (1-5)	10
(6-11)	57
(12-15)	5
(16-19)	5
(20-24)	3

De estas fracciones por sus masas y complejidad por CCD y CG, se resolvió purificar por CLAR la AV2'(6-11). Se utilizó columna RP-18 10 μ con MeOH:H₂O 95:5 como solvente. Se obtuvieron 3 picos principales, de los cuales para el tercero, que presentaba un único pico por CG capilar con columna HP-5 (Programa estándar.), se reconfirmó su pureza por CLAR con columna RP 18 con partículas de 5 μ .

Este resultó ser un artefacto, el dímero proveniente de la condensación aldólica de la acetona: (4-hidroxi-4-metil-2-pentanona) utilizada como componente de la mezcla con que se solubilizó la muestra para ser estudiada por CLAR.

Datos espectroscópicos de 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona:

IR (cm⁻¹): 3200-3600 (OH banda ancha), 1640-1700 (CO)

EM (m/z (int. rel.)): 116 [M⁺] (7), 102 (82), 101 [M-CH₃] (52), 98 [M-H₂O] (83), 83 (88).

¹H-RMN (100 MHz, Cl₃CD) δ : 1,27 (6H, s), 2,18 (3H, s), 2,64 (2H, s), 3,2 (1H, sa).

¹³C-RMN (25,2 MHz, Cl₃CD) δ : 210,52 (C-2), 69,52 (C-4), 53,78 (C-3), 31,68 (C-1), 29,23 (C-6 y CH₃-C-4)

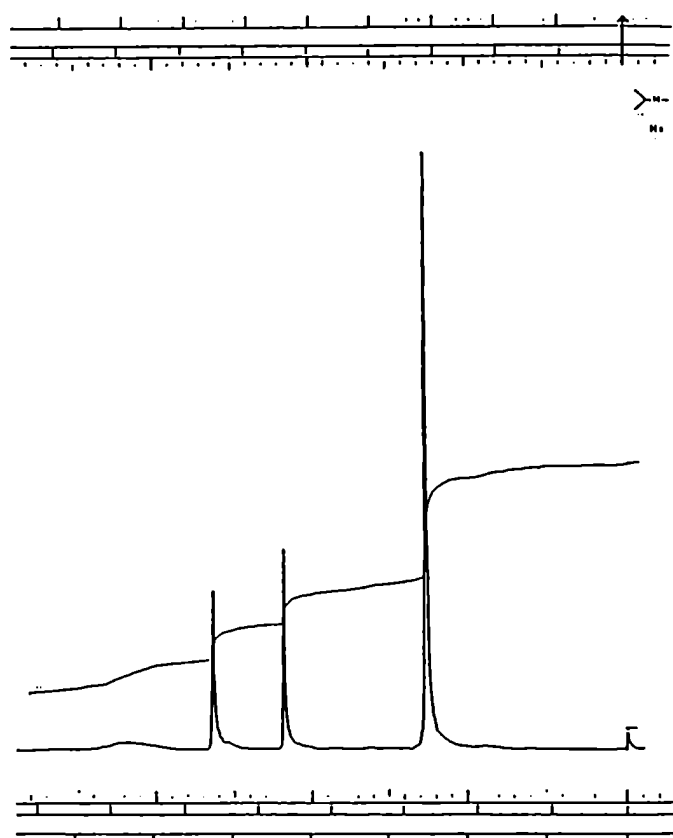
Fracción AV7.

Análogamente la AV7 fue subfraccionada por columna de sílica gel G con mezclas de hexano-acetato de etilo, y se obtuvieron 6 fracciones:

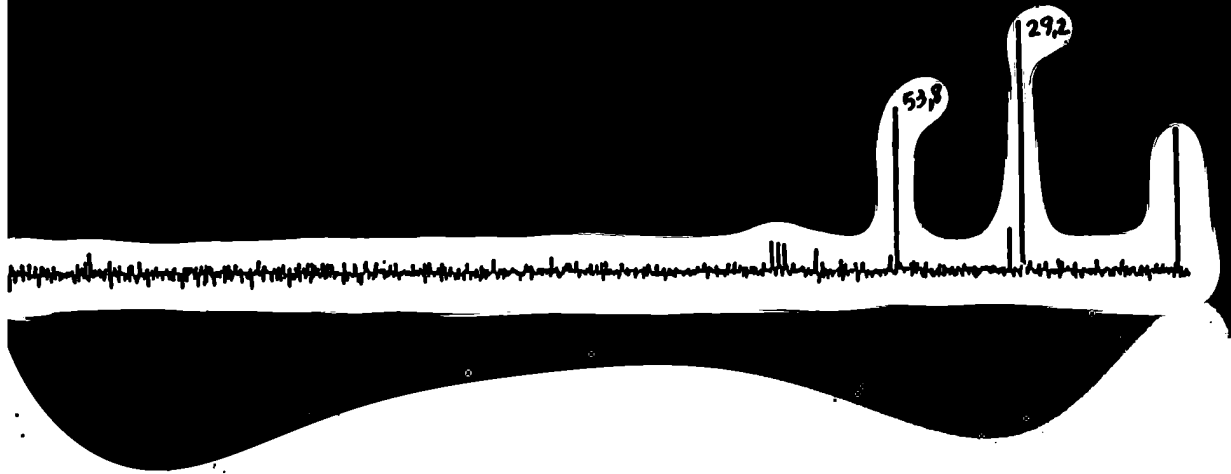
FRACCION	MASA (mg)
AV 7// (1-3)	3
(4)	1,5
(5)	10
(6)	38
(7+8)	32
(10)	8

Las AV7// (6) y (7+8) se estudiaron por CLAR dado que revelaban violeta con ácido sulfúrico y calor y presentaban un solo pico por CG utilizando el programa estándar. Dentro de lo analizado hasta ese momento eran las primeras fracciones que se comportaban de este modo en este extracto. La CLAR para esta muestra con columna RP 18 con partículas de 10 μ y como solvente metanol-agua 80:20 proporcionó numerosos picos y satélites para cada una de ellas. No se continuó con esta forma de estudiar los compuestos volátiles porque era altamente ineficiente.

$^1\text{H-RMN}$ (100, MHz, Cl_3CD) de 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona



^{13}C -RMN (25,2 MHz, Cl_3CD) de 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona.



Werneria poposa ORIGINARIA DE LA PROVINCIA DE JUJUY.

El material fue secado, molido, y extraído en Soxhlet en forma análoga al procedimiento efectuado con la planta salteña obteniéndose dos extractos uno de cloruro de metileno (CM) y otro de metanol (M).

EXTRACTO DE CLORURO DE METILENO.

Luego de obtener, a partir de 2 kg de planta, 338 g de extracto con cloruro de metileno, mediante una extracción en Soxhlet, se subfraccionó por columna seca de sílica gel G. Se usaron mezclas de hexano-acetato de etilo-metanol según el siguiente orden:

FRACCION	SOLVENTE	MASA (g)
CM-1	hexano	25
CM-2	hexano-acetato de etilo 99:1	30
CM-3	hexano-acetato de etilo 95:5	12
CM-4	hexano-acetato de etilo 90:10	39
CM-5	hexano-acetato de etilo 80:20	47
CM-6	hexano-acetato de etilo 70:30	43
CM-7	hexano-acetato de etilo 60:40	53
CM-8	hexano-acetato de etilo 1:1	62
CM-9	acetato de etilo	33
CM-10	acetato de etilo-metanol (98:2 hasta 80:20)	35.

CM-1

Del primer fraccionamiento de la CM-1 (25 g) se obtuvieron por cromatografía en columna seca con sílica gel G las siguientes subfracciones:

FRACCION	MASA (g)
CM-1 E1// (1)	3
(2)	8
(3-5)	7
(6-8)	0,3

Luego de analizar éstas por CCD se resolvió subfraccionar la CM-1E1(3-5) por presentar por CCD zonas en común con las fracciones posterior y anterior. Se obtuvieron entonces:

FRACCION	MASA (g)
CM-1 E1 (3-5) E2// (1+2)	3,5
(3-5)	2
(6-8)	46

Se reagruparon de la siguiente forma: CM-1(E1)(3-5)(E2)(1) quedó tal cual, la (2) se juntó con la CM-1(E1)(2); la CM-1(E1)(3-5)(E2)(3-5) quedó tal cual y la CM-1(E1)(3-5)(E2)(6-8) se juntó con la CM-1(E1)(6-8).

Luego de fraccionar los hidrocarburos de la fracción CM-1, quedaron entonces, las siguientes subfracciones: CM-1(E1)(1), (2,79 g); CM-1(E1)(E2)(2), (8,15 g); CM-1(E1)(E2)(3-5), (1,96 g); CM-1(E1)(E2)(6-8), (2,35). Todas ellas fueron estudiadas por CG-EM (ver Capítulo Descripción de la labor realizada, sección Compuestos Volátiles, pág 36 y 37).

CM-2.

Se subfraccionó por cromatografía de columna seca con sílica gel G usando hexano como solvente y se obtuvieron inicialmente 8 fracciones que se agruparon según lo visto en CCD en:

FRACCION	MASA (g)
CM-2 E1 // (1)	2,5
(2)	1,8
(3-5)	1,9
(6-8)	0,2

Todas estas fracciones volvieron a estudiarse por CCD y CG. La CM-2E1(6-8) era por CCD una sola mancha. Para el estudio de estos hidrocarburos por CG se eligió utilizar la columna HP-1 capilar, aplicando el siguiente programa Ti 220°C, velocidad de calentamiento 20°C/min, Tf 300°C, tf 10 min.

Se eligió este programa porque en condiciones isotérmicas a 220°C, los componentes mayoritarios del patrón de hidrocarburos C₂₉-C₃₁, tenían altos tiempos de retención, entre los 10 y 20 min de corrida, y por lo tanto las señales eran muy anchas.

Por su parte, para la separación de los hidrocarburos por CLAR se tomó la fracción CM-2(E1)(6-8) y luego de buscar condiciones en columna de sílica gel, se usó hexano como solvente. Con placa de sílica gel de alta resolución se esbozan por lo menos cuatro componentes. Se la purificó entonces por CLAR con columna de sílica gel, con un flujo de 4ml/min y con detector de índice de refracción. Se obtuvo un cromatograma de un solo pico francamente mayoritario llamado CM-2(E1)(6-8)CLAR 2, el eluido proporcionó 41 mg de un producto, el cual resultó ser luego de analizarlo por CG por coinyección con patrón y CG-EM, una mezcla de hidrocarburos lineales de número de carbono impar C₂₉-C₃₁-C₃₃ (Ver Fig 11).

A su vez, las CM-1(E1)(E2)(6-8) y CM-2(E1)(3-5), fueron purificadas por cromatografía en columna seca para eliminar aquellas sustancias que quedaban retenidas en origen cuando se usaba cloruro de metileno para desarrollar la cromatografía. Se hicieron dos cortes, uno con hexano y otro con cloruro de metileno, quedando entonces las CM-1(E1)(E2)(6-8) y CM-2(E1)(3-5) separadas en dos nuevas fracciones cada una de ellas, las: CM-1(E1)(E2)(6-8)//hex y Cl y las CM-2(E1)(3-5)//hex y Cl respectivamente que fueron estudiadas posteriormente por CG-EM (ver Capítulo Descripción general de la labor realizada, sección Compuestos

CM-4.

Se subfraccionó por cromatografía de columna seca con sílica gel G y como solventes mezclas de hexano-acetato de etilo. Se obtuvieron 7 fracciones que luego se estudiaron por CCD y se reagruparon en 5 fracciones principales: CM-4// (1), (136 mg), se descarta; (2), (0,7 g); (3), (1,53 g); (4), (7,14g); (5+6), (15,96 g); (7+8), (13,20).

Como ninguna de ellas revelaba color violeta con ácido sulfúrico y calor se prefirió continuar con el estudio de las subsiguientes dejando éstas para CG-EM (ver Capítulo Descripción general de la labor realizada, sección Compuestos Volátiles, pág 40).

CM-5.

Dada la elevada masa de esta fracción (47 g), se efectuó una separación por columna seca de sílica gel G, en una relación 2:1 de adsorbente-pastilla de muestra. Se obtuvieron 8 fracciones eluyendo con mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo-metanol, que luego de ser estudiadas por CCD se reagruparon como:

FRACCION	MASA (g)
CM-5 E1// (1-3)	2,2
(4+5)	1,1
(6)	3,2
(7)	3,7
(8)	27,5

Luego de estudiar los CG correspondientes se decidió proseguir con el estudio de la CM-5(E1)(6). Se purificó ésta por columna usando como solvente de desarrollo mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo desde el 5 al 15%. Luego de analizar las fracciones por CCD se agruparon como:

FRACCION	MASA (mg)
CM-5(E1) (6)//(1)	13
(2)	29
(3)	360
(4)	285
(5)	1.430
(6)	1.340

La CM-5(E1)(6)(5) se purificó por cromatografía en columna con sílica gel flash desarrollando con mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilometanol. Se obtuvieron las siguientes subfracciones:

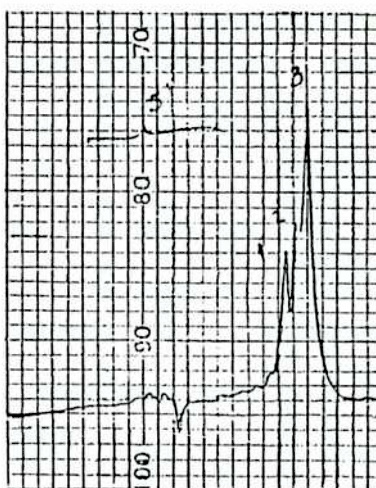
FRACCION	MASA (mg)
CM-5(E1)(6)(5)//(1-16)	45
(17-25)	740
(26-34),	579
(35-37)	22
(38)	se descarta;
(39 hasta el final)	10

Las CCD de estas fracciones en conjunto fueron desarrolladas con hexano-acetato de etilo 3% y reveladas con sulfúrico y calor. La fracción (26-34) reveló violeta y pesó 579 mg. De la fracción (26-34) por cromatografía en columna con sílica gel H, usando como solvente de desarrollo hexano puro y hexano-acetato de etilo 1%, se obtuvieron 3 fracciones principales llamadas:

FRACCION	MASA (mg)
CM-5(E1)(6)(5)(26-34)//(1-9)	210
(9-11)	314
(12-final)	59

Por CCD se observó una sola mancha para la (12-final). El análisis por CLAR (Fig 12) (columna de sílica gel y solvente hexano, con flujo de 4,5 ml/min y detector índice de refracción) indicó que contenía tres componentes A1, A2 y A3, de los cuales el tercero (A3), era aparentemente mayoritario. A3 resultó ser (-)- α -Cadinol y A1 y A2 fueron estudiadas por CG-EM (ver Capítulo Descripción general de la labor realizada, sección Compuestos Volátiles, pág 41) por ser mezclas complejas.

Fig 12: CLAR de la fracción CM-5E1(6)(5)(26-34)(12-final).



(-)- α -Cadinol: Aceite incoloro.

IR (film, cm^{-1}): 3595, 1455, 1090, (OH), 1370, 1630, (doble enlace).

EM m/z (int. rel.): 222 [M⁺] (20), 204 [M-H₂O] (94), 189 [M-H₂O-Me] (25), 164 (67), 161 [M-H₂O-isop] (100), 121 (87), 95 (79).

¹H-RMN (200 MHz, Cl₃CD): δ 5,48 (br s, H-5), 1,65 (3H, br s, H-15), 1,08 (3H, s, H-14), 0,90 (3H, d, J=7 Hz, H-12 ó 13), 0,75 (3H, d, J=7 Hz, H-13 ó 12).

¹³C-RMN (50 MHz, Cl₃CD, C-1 a C-15), δ (ppm): 50,4 (d, C-1), 22,4 (t, C-2), 31,4 (t, C-3), 134,9 (s, C-4), 122,8 (d, C-5), 40,3 (d, C-6), 47,2 (d, C-7), 23,1 (t, C-8), 42,6 (t, C-9), 72,5 (s, C-10), 26,4 (d, C-11), 15,6 (c, C-12), 21,2 (c, C-13), 22,0 (c, C-14), 24,3 (c, C-15).

CM-6.

Se fraccionó la CM-6, (42 g), por cromatografía de columna seca a través de sílica gel G. Se usaron mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo y se lavó con acetato de etilo-metanol. Inicialmente se obtuvieron 7 fracciones:

FRACCION	MASA (g)
CM6(E1)/(1)	0,108
(2)	0,552
(3)	1,3
(4)	0,7
(5)	6,1
(6)	17,2
(7)	17,4

Luego de analizarlas por CG se decidió agrupar las fracciones en (2+3) y en (6+7). Para el estudio de las mismas por CG se usó columna capilar HP-5, Split 1/50 (20 psi), Ti 100°C, ti 2 min, velocidad de calentamiento 10°C/min, Tf 250°C, tf 0 a 30 min según aspecto del cromatograma. Por el aspecto de los cromatogramas se decidió proseguir con el estudio de la (6+7). Esta se purificó usando la misma metodología, adsorbente y solvente de desarrollo que para la fracción madre. Se obtuvieron 8 fracciones:

FRACCION	MASA (g)
CM-6(E1)(6+7)/(1)	0,035
(2)	0,002
(3)	0,004
(4)	1,16
(5)	4,1
(6)	7,9
(7)	1,78
(8)	0,407

De estas fracciones se prosiguió con el estudio de la CM-6(E1)(6+7)(6). Se la purificó nuevamente en forma análoga usando como único solvente hexano-acetato de etilo 10%. Se obtuvieron 8 fracciones: CM-6(E1)(6+7)(6)// (1) a (8) que se analizaron por CG con SP-2250. La CM-6(E1)(6+7)(6)/(8), que se llamó A4, presentaba un único pico a tr: 11,8 min. Se estudió espectroscópicamente y resultó ser una p-hidroxi acetofenona prenilada. (ver Descripción de la labor realizada del Capítulo p-hidroxi acetofenonas preniladas, pág 99)

CM-7.

La masa de la fracción era de aprox 50 g. Se observó que presentaba un comportamiento parecido a la CM-6 tanto por CCD como por CG. La CCD de la fracción total usando como solvente de desarrollo hexano-acetato de etilo 30%, y revelado con sulfúrico y calor presentaba una mancha roja francamente mayoritaria a Rf 0,4. Se fraccionó por columna seca con sílica gel G y mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo desde 95:5 hasta 25:75 respectivamente. Así se obtuvieron 12 fracciones, entre las cuales al igual que con la CM-6, las dos últimas eran francamente mayoritarias.

Las fracciones obtenidas fueron:

FRACCION	SOLVENTE	MASA (g)
CM-7/1	hexano-acetato de etilo 95:5	0,060
CM-7/2	hexano-acetato de etilo 90:10	0,016
CM-7/3	hexano-acetato de etilo 85:5 (1)	0,164
CM-7/4	hexano-acetato de etilo 85:5 (2)	0,224
CM-7/5	hexano-acetato de etilo 80:20	0,160
CM-7/6	hexano-acetato de etilo 75:25	0,071
CM-7/7	hexano-acetato de etilo 70:30	0,060
CM-7/8	hexano-acetato de etilo 60:40	0,039
CM-7/9	hexano-acetato de etilo 1:1	0,134
CM-7/10	hexano-acetato de etilo 75:25	0,330
CM-7/11	acetato de etilo	7,8
CM-7/12	acetato de etilo	22,1

Las fracciones anteriormente descritas se analizaron por CG con columna SP-2250, observándose un solo pico compuesto por una única sustancia, ampliamente mayoritario para las dos últimas. El tiempo de retención del pico principal fue de 10 min, con un programa de Ti:100°C; ti:2 min; Tf:240°C; tf:20 min.

Este compuesto se llamó A5 y sus espectros resultaron ser análogos a los de A4 (ver Descripción de la labor realizada del Capítulo p-hidroxi acetofenonas preniladas, pág 100).

CM-8.

Se subfraccionó la CM-8 (38g) por cromatografía en columna seca con sílica gel G y como solvente de desarrollo, cloruro de metileno-acetato de etilo (3:2). Se observaron por CCD tres manchas principales. En estas condiciones al reaccionar con ácido sulfúrico, la mancha de menor Rf revelaba rojo. Se decidió purificar esta fracción en columna seca a través de sílica gel G con mezclas de polaridad creciente de cloruro de metileno-acetato de etilo-metanol. Inicialmente se obtuvieron 8 fracciones, que se analizaron por CCD y se agruparon en 4 fracciones principales:

FRACCION	MASA (g)
CM-8(E1)/(1)	13
(2-5)	12,5
(6)	16,5
(7)	23,6

La última revelaba violeta con ácido sulfúrico y calor y presentaba una sola mancha por CCD. Se tomó parte de la CM-8E1(7) y se la purificó a través de sílica gel G en columna seca, nuevamente con mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo-metanol. Se obtuvieron varias fracciones de las cuales por su masa y su aspecto por CCD sólo importaron la CM-8(E1)(7)/(E2)50%(4-6) y la //(E2)(75%)(1-3) de 3g y 638 mg respectivamente. Estas fueron analizadas por CG y resultaron ser mezclas, la primera más compleja que la segunda, pero con un compuesto francamente mayoritario, 52%, por CG. (HP-5 capilar Ti 100°C, ti 2 min,

Tf 10 min, velocidad de calentamiento 10°C/min, P:20 psi)

Nuevamente se tomó parte de la (4-6) y se purificó por columna con sílica gel H.

Se obtuvieron fundamentalmente 4 fracciones con mezclas de hexano-acetato de etilo-metanol como solvente. Estas fueron:

FRACCIONES	MASA (mg)
CM-8(E1)(7)E2(50%)(4-6)// (1-26)	62
(26-28)	180
(30-33)	560
(34-40)	200

De éstas la (26-28) presenta una sola mancha por CCD y un solo pico por CG y se la llamó A6. Presentaba espectros análogos a los de A4 y A5, por eso se resolvió estudiarlos en forma conjunta para poder compararlos.

ANALISIS POR CG DE FRACCIONES A4, A5 y A6.

Se probaron las columnas HP-1; HP-5, SP-2250.

Para la HP-1 (15m) se usó el siguiente programa: Ti 120°C, ti 2 min, velocidad de calentamiento de 10°C/min, tiempo total de corrida 15 min. El tiempo de retención de A4 fue de 7,12 min, el de A5 de 7,35 min y el de A6 de 7,06 min. Se obtuvo un único pico a 7,15 min al coinyectarlas.

Para la HP-5 (25 m), se usó el siguiente programa: Ti 120°C, velocidad de calentamiento de 5°C/min, P:20 psi. Se obtuvo para A4 un tiempo de retención de 8,97 min para A5 de 8,99 min, y para A6 de 8,84 min. Al coinjectar las tres se vió un único pico a 8,93 min.

Para la SP-2250 (25m), se usó el siguiente programa Ti 120°C, ti 2 min, velocidad de calentamiento 5°C/min, Tf 240°C, P:20-25 psi. Se observó para la A4 un tr de 11,32 min, para la A5 de 11,36 min y para la A6 de 11,24 min. Al coinjectarlas se obtuvo un único pico con un tr de 11,12 min.

Para la HP-1 (5m) se usó el programa Ti 120°C, ti 2 min, velocidad de

calentamiento de 10°C/min, Tf 240°C y tf 10 min. Se obtuvo para la A4 un tr de 5,30 min, para la A5 de 5,35 min, y para la A6 5,28 min. Al coinyectarlas se obtuvo un único pico a 5,38 min.

COLUMNA	TIEMPOS DE RETENCION (min)			
	A4	A5	A6	Mezcla
HP-1 (5m)	5,30	5,35	5,28	5,38
HP-1 (15m)	7,12	7,35	7,06	7,15
HP-5 (25m)	8,97	8,99	8,84	8,93
SP-2250 (25m)	11,32	11,24	11,12	11,12

ANALISIS POR CLAR DE FRACCIONES A4, A5 y A6.

Para corroborar que se trataba de un único compuesto, se analizaron las tres muestras por CLAR, por separado y coinyectándolas. Se buscaron condiciones de trabajo para usar la columna analítica de fase reversa Zorbax ODS, de 4,6 mm x 25 cm. Se usó con un flujo de 1 ml/min a una presión de 3,6 psi, con una mezcla de metanol-agua, en la proporción 60:40. Se utilizó como patrón benzofenona cuyo tr fue de 22,4 min.

Se observó que A4 y A6 tenían prácticamente el mismo tr, entre 15,11 y 15,14 min respectivamente, mientras que A5 salía un poco más retrasado entre 15,28 y 15,33 min. Cuando se coinyectó la mezcla de los tres se obtuvo un único pico a tr 15,2 min.

Análogamente con lo realizado en CG, se buscaron condiciones para otra columna analítica. Se utilizó la C563, 250 x 4,6 mm con partículas de 5 μ , con un flujo de 1 ml/min a una presión de 4,62 psi. Se trabajó también con metanol-agua 60:40 y se obtuvo el mismo resultado que con la anterior pero con tr mas retrasados, si bien el patrón de benzofenona sólo difirió con la corrida de la columna anterior en 1 min (tr de benzofenona patrón: 23,63 min).

Para A4, el tr fue de 20,28 min, el de A5 de 20,02 y el de A6 de 20,18 min. El tr de la coinyección fue de 20,03 min.

COLUMNA	TIEMPOS DE RETENCION (min).			
	A4	A5	A6	Mezcla.
Zorbax ODS	15,11	15,31	15,14	15,20
C563	20,28	20,02	20,18	20,03

COLUMNA	TIEMPOS DE RETENCION (min, relativos a benzofenona)		
	A4	A5	A6
Zorbax ODS	0,674	0,683	0,687
C563	0,858	0,847	0,853

Con el mismo propósito se registraron los espectros de RMN tanto protónico como de carbono-13 sobre cada una de las muestras. Los valores obtenidos fueron:

^{13}C -RMN (CDCl_3 -TMS), δ (ppm)

C	A4	A5	A6
1	129,7	129,8	129,8
2	128,8	129,3	127,4
3	127,7	128,6	130,8
4	159,6	160,4	159,3
5	115,3	115,6	115,3
6	130,8	131,3	129,8
1'	29,3	29,2	29,2
2'	121,3	121,9	121,1
3'	134,6	134,4	134,8
4'	17,9	18,3	17,8
5'	26,3	26,6	25,7
C=O	198,4	199,3	198,0
Me-CO	25,8	26,2	26,2

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{CDCl}_3\text{-TMS}$), δ (ppm)

H	A4	A5	A6
2	7,71 d(2,3)	7,70 d(2,3)	7,77 d(2,3)
5	6,89 d(8,2)	6,91 d(8,4)	6,86 d(8,4)
6	7,77 dd(8,0;2,0)	7,77 dd(8,4;2,1)	7,74dd(8,3;2,1)
1'	3,39 d(7,1)	3,38 d(7,3)	3,38 d(7,0)
2'	5,32tqq(7,0;1,0;1,0)	5,32tqq(7,2;1,4;1,1)	5,32tqq(7,3;1,4;1,3)
4'	1,74 d(1,0)	1,74 d(1,4)	1,76 d(1,3)
5'	1,75 d(1,0)	1,73 d(1,1)	1,75 d(1,4)
Me	2,56 s	2,56 s	2,56 s

Se concluyó que A4, A5 y A6 eran el mismo producto caracterizado como:

4-Hidroxi-3-(isopenten-2-il) acetofenona: Cristales blancos, PF: 80-82°.

EM (m/z, %): 204 (M+, 72), 189 (100), 149 (88), 133 (76), 115 (14), 91 (18), 77 (21).

Este fue analizado por métodos COSY y HETCOR-RMN confirmando la estructura propuesta (ver Descripción de la labor realizada del Capítulo p-hidroxi acetofenonas preniladas, pág 105 y 106).

CM-9.

Esta fracción (33,4 g) fue fraccionada siguiendo la metodología anterior con mezclas de polaridad creciente de cloruro de metileno-acetato de etilo-metanol, obteniéndose 9 subfracciones, que luego de ser analizadas por CCD se redujeron a 4 fracciones principales:

FRACCION	MASA (g)
CM-9 (1-3)	0,128
CM-9 (5+6)	5,5
CM-9 (7)	22,6
CM-9 (8)	3,8

Las fracciones (5+6) y (7), resultaron ser mezclas por CCD. La fracción (8) mostró por CCD una mancha mayoritaria roja al desarrollar la placa con acetato de etilo-metanol y por CG capilar con columna HP-5 con un programa de Ti 100 °C, ti 5 min, tf 5 min, Tf 280 °, y velocidad de calentamiento de 10 °C/min se obtuvo un pico mayoritario de 60% a tr 13,70 min. Se decidió subfraccionarla con la misma metodología aplicada para la columna madre. Así entonces surgieron:

FRACCION	MASA (mg)
CM-9(8)// (1-38)	245
(39-41)	422
(42-45)	272
(46-final)	346

Se analizaron estas fracciones por CG, usando el mismo programa que citamos anteriormente resultando ser las (1-38) y (46-final) mezclas y las (39-41) y (42-45) el mismo compuesto con más de 90% de pureza a tr:13,62 min. Luego de estudiarlo espectroscópicamente se concluyó que éste es el derivado hidratado en la cadena isoprénica correspondiente a la p-hidroxi acetofenona prenilada encontrada en las fracciones anteriores, o sea:

4-Hidroxi-3-(3'-hidroxiisopentil) acetofenona: Aceite incoloro.

EM (m/z, %): 222 (M+,23), 204 (100), 189 (36), 161 (12), 149 (20).

A continuación se muestran las tablas con los datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear obtenidos para este compuesto.

^1H -RMN de 4-hidroxi-3-(3'-hidroxiisopentil) acetofenona (200 MHz, CDCl_3 -TMS)

H	δ (ppm)
2	7,73 d (J=2,1)
5	6,85 d (J=8,4)
6	7,68 dd (J=8,4; 2,1)
1'	2,72 t (J=6,8)
2'	1,78 t (J=6,8)
4'	1,29 s
5'	1,29 s
CH_3	2,51 s

^{13}C -RMN de 4-hidroxi-3-(3'-hidroxiisopentil) acetofenona, (50,2 MHz, CDCl_3 -TMS)

C	δ (ppm)
1	129,3
2	130,8
3	128,9*
4	159,4
5	115,7
6	128,8*
1'	42,9
2'	24,9
3'	71,9
4'	29,3
5'	29,3
C=O	197,8
$\text{CH}_3\text{CO-}$	26,3

* estos valores pueden ser intercambiados.

Ambos compuestos también fueron analizados por métodos COSY y HETCOR-RMN confirmando las estructuras propuestas.

CM-10.

Siguiendo con la metodología anterior (columna seca con sílica gel G con mezclas de cloruro de metileno-acetato de etilo-metanol) se fraccionaron los 35 g en 5 fracciones:

Fracción	Solvente	Masa (g)
CM-10(1)	cloruro de metileno-acetato de etilo 1:1	1,7
CM-10(2)	cloruro de metileno-acetato de etilo 25:75	4,1
CM-10(3)	acetato de etilo	5,1
CM-10(4)	acetato de etilo-metanol1:1	12,4
CM-10(5)	metanol	5,7

Se analizaron por CCD y CG con columna HP-5. La fracción estaba constituida fundamentalmente por los constituyentes de la CM-9, más un sólido amarillo que quedaba fuertemente retenido en el origen. Su estudio se llevó a cabo conjuntamente con los productos obtenidos en la extracción con metanol.

EXTRACTO METANOLICO.

Se separaron los 164 g por cromatografía de columna seca con sílica gel G y mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo-metanol.

Se obtuvieron 5 fracciones que se llamaron M-1 a M-5 respectivamente.

FRACCION	SOLVENTE	MASA (g)
M-1	hexano puro	2,3
M-2	hexano-acetato de etilo 75:25	2,7
M-3	hexano-acetato de etilo 50:50	7,4
M-4	hexano-acetato de etilo 25:75	13,7
M-5	acetato de etilo	18,6

Las fracciones M-1 y M-2, no se estudiaron por estar constituidas por compuestos presentes en el extracto anterior.

Por CG en columna HP-5, se obtuvieron cromatogramas con el programa estándar usado para las últimas fracciones del extracto de cloruro de metileno, (P 20 psi, Ti 100°C, ti 5 min, velocidad de calentamiento 10 °C/min, Tf 280°C, tf 10 min). En función de este comportamiento se supuso que las 5 fracciones contienen compuestos del tipo ya encontrados en el extracto anterior, quizás algunos en su forma más polar como producto mayoritario. Los compuestos más polares se encuentran en las 3 últimas. Así se detectó mayor proporción de la 4-hidroxi-3-(3'-hidroxiisopentil) acetofenona.

M-3.

Esta fracción por CCD desarrollada con acetato de etilo, presentaba dos bandas principales, una que revelaba violeta con sulfúrico y calor con $R_f > 0,5$, y la otra amarillo con $R_f < 0,1$.

Estas bandas se separaron por cromatografía en columna seca con mezclas de hexano-acetato de etilo-metanol, obteniéndose inicialmente 14 fracciones.

MEZCLAS UTILIZADAS	Nº DE FRACCIONES OBTENIDAS	Nº DE FRACCION
M-3/Hexano-Acetato de etilo 75:25	(1) a (7)	(1 a 7).
M-3/Hexano-Acetato de etilo 60:40	(1) y (2)	(8) y (9)
M-3/Hexano-Acetato de etilo 50:50	(1)	(10)
M-3/Hexano-Acetato de etilo 30:70	(1)	(11)
M-3/Acetato de etilo	(1)	(12)
M-3/Acetato de etilo-Metanol 50:50	(1)	(13)
M-3/Metanol puro	(1)	(14)

Luego de ser estudiadas por CCD se redujeron a 5 fracciones: M-3// (1+2), (3+4), (5+6), (7-9) y (10-14), que se llamaron M-3 // A, B, C, D y E respectivamente.

De éstas, la E, sólido amarillo, queda fuertemente retenida por CCD. Las M-3/ A, B, C eran mezclas. En la M-3 D, el producto mayoritario, (>88,8%), era la p-hidroxi acetofenona prenilada. Se decidió pasar a estudiar la M-4.

M-4.

La fracción no era totalmente soluble en acetato de etilo-metanol 50:50. Se filtró a través de embudo sinterizado, y se analizaron por separado el sólido y el líquido obtenidos. A partir de 13,9 g de fracción se obtuvieron un sólido amarillo (M-4 S), y un líquido del cual al evaporar quedaban 11,8 g (M-4 L).

M-4 L.

Se separó por cromatografía en columna seca con sílica gel flash como adsorbente y mezclas de hexano-acetato de etilo-metanol como eluyente.

Se obtuvieron inicialmente 13 fracciones:

MEZCLAS UTILIZADAS	Nº DE FRACCIONES OBTENIDAS	Nº DE FRACCION
M-4/Hexano-acetato de etilo 1:1	(1),(2),(3), y (4)	[1, 2, 3, 4]
M-4/Hexano-acetato de etilo 25:75	(1),(2) y (3)	[5, 6 y 7]
M-4/Acetato de etilo	(1)	[8]
M-4/Acetato de etilo-acetona 1:1	(1)	[9]
M-4/Acetona	(1)	[10]
M-4/Acetona-metanol 1:1	(1)	[11]
M-4/Metanol	(1) y (2)	[12] y [13]

Las primeras 4 fracciones se estudiaron aparte porque eluían con el frente de solvente.

Las restantes se agruparon:

FRACCION	MASA (g)
M-4 L/(5+6)	0,929
(7)	2,8
(8)	1,7
(9)	1,1
(10-13)	1,3

Al estudiar las primeras 4 fracciones por CCD, se observó que usando como solvente de desarrollo mezclas de hexano-acetato de etilo, la primera presentaba una gran cantidad de sustancias, la segunda era una mezcla de dos productos principales y la tercera un producto prácticamente puro. En la cuarta nuevamente se apreciaban dos productos principales.

La CG de la tercera fracción con columna HP-5, con el programa anteriormente citado, mostraba un pico mayoritario de 85,5% a tr 8,03 min, mientras que la cuarta mostraba el par de señales a tr 7,86 y 9,54 en relación 2:1 entre otros picos de menor proporción. Por coinyección estos resultaron ser la 4-hidroxi-3-(isopenten-2-il) y la 4-hidroxi-3-(3'-hidroxiisopentil) acetofenona, respectivamente.

Al evaporar el solvente de la última se obtuvo un sólido amarillo oscuro y se decidió estudiar directamente la M-4 S. El resultado de la separación en M-4 L y M-4 S fue extraer de la M-4 los compuestos presentes en el extracto anterior.

M-4 S.

Se purificó por cromatografía en columna seca, con sílica gel flash como adsorbente y mezclas de hexano-cloruro de metileno-acetona-metanol. Se obtuvieron inicialmente 13 fracciones según las siguientes mezclas usadas:

MEZCLAS UTILIZADAS.	Nº DE FRACCIONES OBTENIDAS.	Nº DE FRACCION.
M-4 S/Hexano-cloruro de metileno 1:1	(1)	[1]
M-4 S/Hexano-cloruro de metileno 25:75	(1),(2),(3) y (4)	[2],[3],[4] y [5]
M-4 S/Cloruro de metileno	(1)	[6]
M-4 S/Cloruro de metileno-acetona 40:60	(1) y (2)	[7] y [8]
M-4 S/Cloruro de metileno-metanol 75:25	(1)	[9]
M-4 S/Acetona-metanol 1:1	(1),(2),(3) y (4)	[10], [11], [12] y [13]

Estas se estudiaron por CCD y se reagruparon en 5 fracciones M-4 S// (1-6), (7+8), (10) y (11-13). La (9) se descartó. Se estudiaron las 3 últimas que se llamaron A, B y C. Estas 3 eran fundamentalmente idénticas, pero la M-4 S B era la que estaba en mejores condiciones para ser estudiada espectroscópicamente. El producto aislado presentaba:

PF: 294°. Sólido amarillo.

Microanálisis: %C: 57,87; %H: 3,6; %O: 38,5; lo cual indicaba que podía tener una fórmula mínima $C_{16}H_{12}O_8$, un flavonoide que fue identificado como ISORAMNETINA (ver Capítulo Flavonoides, pág 128).

Esto fue confirmado con los siguientes estudios espectroscópicos:

IR (cm⁻¹, KBr): 3200 a 2500 (OH banda ancha), 1645 (CO), 1600 (aromático e insaturación), 1265, 1065, 900, 700.

EM: m/z (int. rel.): 316 [M⁺] (3), 285 [M-MeO] (8), 152 [A₁[·]] (7), 151 [B₂^{·+}] (1), 148 [B₁^{·+}] (2) (ver Capítulo Flavonoides, pág 115).

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 3,84 (MeO- de 3'), 6,21 (1H, d, J=2Hz, H-6), 6,49 (1H, d, J=2Hz, H-8), 6,94 (1H, d, J=8Hz, H-5'), 7,78 (1H, d, J=2Hz, H-2'), 7,71 (1H, J=8 y 2 Hz, H-6').

¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ: 147,06 (C-2, C-4'), 136,15 (C-3), 176,01 (C-4), 160,25 (C-5), 98,18 (C-6), 163,92 (C-7), 93,43 (C-8), 155,89 (C-9), 102,71 (C-10), 122,12 (C-1'), 111,37 (C-2'), 148,25 (C-3'), 115,32 (C-5'), 55,61 (MeO- C-3').

M-5.

Para fraccionarla se aplicó una metodología análoga a la utilizada para M-4 S. Se obtuvieron inicialmente 12 fracciones:

MEZCLAS UTILIZADAS	Nº DE FRACCIONES OBTENIDAS.	Nº DE FRACCIONES.
M-5/Hexano-acetato de etilo 1:1	(1)	[1]
M-5/Hexano-acetato de etilo 25:75	(1) y (2)	[2] y [3]
M-5/Acetato de etilo (1) y (2)	(1) y (2)	[4] y [5]
M-5/Acetato de etilo-metanol 75:25	(1)	[6]
M-5/Acetato de etilo-metanol 50:50	(1) y (2)	[7] y [8]
M-5/Acetato de etilo-metanol 25:75	(1)	[9]
M-5/Metanol	(1) y (2)	[10] y [11]
M-5/Metanol-Acético 90:10	(1)	[12]

Estas se llamaron M-5/ [1] a [12] respectivamente. Luego de estudiarlas por CCD y CG se reagruparon y descartaron: M-5/ 1 y 2 por poseer sustancias que se desplazaban con el frente de solvente. Las restantes se agruparon de la siguiente manera:

M-5/ [3] y [4], (3,1 g); M-5/ [5] y [6], (7,2 g); M-5/ [7], [8] y [9], (3,5 g); y se llamaron: A, B y C respectivamente.

Estas, al igual que las M-4 S/ A, B y C, eran básicamente lo mismo pero con distinto grado de pureza (presentaban diferente rango de punto de fusión). Se estudió en particular la M-5 C.

El resto M-5/ [10],[11] y [12] se descartó por presentar en CCD manchas en el origen, es decir Rf 0, con solventes orgánicos.

M-5 C.

El punto de fusión de este producto, luego de la cuarta recristalización, fue de 267-268°C.

El microanálisis de este producto indicó una fórmula mínima de C_{2,3}; H_{1,6}; O₁; lo cual indicaba que podía ser C₉H₆O₄ y tal como se indicó en el capítulo Cumarinas (pág 151) fue identificado como ESCULETINA.

EM (m/z, %): 178 [M+] (100), 150 [M-CO] (86), 122 (3).

IR (cm⁻¹): 3200, 1610, 1660, 1570, 1400, 1280, 1205, 1175.

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 6,17 (1H, d, J=11Hz, H-3), 6,76 (1H, d, J<1Hz, H-8), 7 (1H, d, J<1Hz, H-5), 7,87 (1H, d, J=11Hz, H-4).

¹³C-RMN: 161,4 (C-2), 111,8 (C-3), 144,9 (C-4), 112,77 (C-5), 143,4 (C-6), 151,0 (C-7), 103,1 (C-8), 111,2 (C-9), 149,04 (C-10).

UV (λ máx, nm):

MeOH: 348,300,258.

NaMeO: 390.

AlCl₃: 376,270.

AlCl₃-HCl: 348,300,258.

NaAcO: 398.

NaAcO-H₃BO₃: 360.

Del líquido sobrenadante de la primera recristalización se recuperó un sólido amarillo de PF: 227-228°. Se recristalizó de mezcla de acetato de etilo-metanol-agua. Su espectro de masa y punto de fusión coincidía con lo informado en bibliografía para FRAXETINA.

EM (m/z, %): 208 [M+] (64), 193 [M-15] (20), 180 [M-28] (15).

El estudio por CG-EM de los sobrenadantes de recristalización restantes dió dos sustancias cuyos EM eran (ver Descripción de la labor realizada, Capítulo Cumarinas, pág 153):

EM (m/z, %): 194 [M+] (100), 179 [M-Me] (15), 166 [M-CO] (5), 151 [M-CO-Me] (73).

EM (m/z, %): 192 [M+] (100), 177 [M-Me] (60), 164 [M-CO] (22), 149 [M-Me-CO] (57).

Estos datos concordaban con lo informado en bibliografía para DIHIDROISOESCOPOLETINA e ISOESCOPOLETINA respectivamente.

ESTUDIO FITOQUIMICO DE *Werneria Poposa* Philippi

RESUMEN

Aproximadamente 40 especies del género *Werneria* se encuentran distribuidas en América del Sur, a lo largo de la cordillera de los Andes. Las *Wernerias* argentinas son 12 a saber: *W. heteroloba*, *W. rosenii*, *W. pseudodigitata*, *W. incisa*, *W. poposa*, *W. villosa*, *W. pigmaea*, *W. denticulata*, *W. aretioides*, *W. cochlearis*, *W. apiculata* y *W. spathulata*. De las especies de este género presentes en la Argentina, la única estudiada fitoquímicamente, la *Werneria poposa* Philippi, es la que se informa en este trabajo.

***Werneria Poposa* Philippi, Clasificación:**

CLASE: DICOTILEDONEAE
SUBCLASE: SYRUPETALAE
ORDEN: CAMPANULALES
FAMILIA: COMPOSITAE
SUBFAMILIA: ASTEROIDEAE
TRIBU: SENECEONEAE
SUBTRIBU: OTHONNINAE
GENERO: WERNERIA
ESPECIE: POPOSA

La planta presenta caracteres generales y específicos que están relacionados con el ambiente en el que vive. El altiplano jujeño, con los cordones montañosos y los macizos aislados que se levantan por sobre su nivel, es un paisaje abierto que rara vez cubre totalmente el suelo. El género estudiado posee especies que se presentan como cojines.

Se denomina cojín a una planta muy achaparrada con entrenudos muy cortos donde la porción epigia sobresale poco sobre el nivel del suelo, con profusa cantidad de raíces. En el caso particular de *Werneria poposa* Philippi se trata de una masa de raíces adventicias cuyo origen son las ramas del cojín.

Los cojines forman generalmente comunidades definidas y en superficies limitadas, representan hasta un 70-80% de la vegetación del área y se presentan

como manchas verde vivo, gris verdoso o casi blanco. Se destacan nítidamente sobre el fondo de las piedras o se confunden entre la sal y la tierra húmeda de los bordes de las salinas.

Se vinculó siempre a las plantas en cojín con las floras de las regiones áridas y se consideró a dicha forma biológica como un ejemplo típico de las mismas. En la Puna jujeña las cojines se hallan distribuidos entre las regiones fitogeográficas puneña y altoandina. Su presencia depende de la altitud ya que no se encuentra ninguna de estas especies por debajo de 3400 m s.n.m. y el límite superior coincide con la línea de las nieves, lo que equivale en la zona a 5000-5100 m s.n.m.. Todas las especies se hallan sometidas a una serie de condiciones extremas que comprenden heladas nocturnas, vientos fuertes, intensa radiación durante gran parte del año y escasas precipitaciones limitadas al verano. El medio donde crecen es muy árido y el suelo excesivamente pobre en materia orgánica. Desde hace muchos años, los géneros *Senecio*, *Werneria* y *Chersodoma*, han sido empleados en la farmacopea herbolaria de la medicina folklórica del noroeste argentino como "drogas antirreumáticas", y como remedios para la hipertensión, el mal de altura y desórdenes de tipo digestivo (contra los cólicos).

Para su presentación, el trabajo fue dividido en los siguientes capítulos:

- 1) - Introducción.
- 2) - Descripción general de la labor realizada.
- 3) - Diterpenoides.
- 4) - Sesquiterpenoides.
- 5) - Hidroxiacetofenonas preniladas.
- 6) - Flavonoides.
- 7) - Cumarinas.
- 8) - Parte Experimental.

En cada uno de los capítulos mencionados, exceptuando el 2 y el 8, se presentan: la parte descriptiva de la tarea realizada, los resultados obtenidos y la correspondiente bibliografía.

Se utilizó material vegetal proveniente de las provincias de Salta y Jujuy, recolectados durante el período de floración.

Experimentalmente se aplicó el siguiente procedimiento general:

Las partes aéreas de planta seca (secada a temperatura ambiente, en estufa de aire) se molieron y extrajeron en Soxhlet utilizando tres solventes para la planta salteña, éter de petróleo, cloruro de metileno y metanol respectivamente y dos

solventes, cloruro de metileno y metanol para la planta jujeña. Para la realización del rastreo fitoquímico de la misma se utilizaron métodos cromatográficos, combinando diferentes técnicas (cromatografía en columna seca, cromatografía en columna, cromatografía en capa preparativa, cromatografía gaseosa y cromatografía líquida de alta resolución).

Fueron estudiados, el extracto de eter de petróleo de la planta salteña y ambos de la planta salteña. También se realizó un extracto por arrastre con vapor de material vegetal tal cual, que se fraccionó y estudió análogamente.

Los compuestos aislados fueron: hidrocarburos, ceras, **aldehído kaurénico**, **(-)- α -cadinol** y las acetofenonas preniladas **4-hidroxi-3-(isopenten-2-il) acetofenona** y **4-hidroxi-3-(3'-hidroxi-isopentil) acetofenona**, el flavonoide **isorhamnetina** y las cumarinas **esculetina**, **isoescopoletina** y **dihidroisoescopoletina**.

Ninguno de estos compuestos había sido informado previamente para este género. Para su identificación se utilizaron técnicas de espectroscopía IR, UV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y EM.

Por su parte, las mezclas de compuestos, como así también los productos volátiles que acompañaban a los compuestos aislados de las fracciones del extracto no polar de planta jujeña, fueron analizados por CG-EM.

La búsqueda de identidad para cada una de las señales en los cromatogramas fue efectuada comparando los respectivos espectros de masa contra datos de espectros almacenados en memoria (NBS Library, LAB BASE, VG Analytical) utilizando las técnicas de búsquedas provistas por el software del instrumento. De esta manera se detectó la presencia de 35 componentes que sólo fueron caracterizados tentativamente por sus espectros de masa.



Dr. EDUARDO G. GROS