

Tesis de Posgrado

Estudio químico y toxicológico de Festuca Argentina, (Speg.), Par. y su comparación con festuca hieronymi Hackel, (familia: gramineae)

Casabuono, Adriana Cristina

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:

Casabuono, Adriana Cristina. (1994). Estudio químico y toxicológico de Festuca Argentina, (Speg.), Par. y su comparación con festuca hieronymi Hackel, (familia: gramineae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2649_Casabuono.pdf

Cita tipo Chicago:

Casabuono, Adriana Cristina. "Estudio químico y toxicológico de Festuca Argentina, (Speg.), Par. y su comparación con festuca hieronymi Hackel, (familia: gramineae)". Tesis de Doctor.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2649_Casabuono.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTUDIO QUÍMICO Y TOXICOLÓGICO DE *FESTUCA ARGENTINA* (SPEG.) PAR.
Y SU COMPARACIÓN CON *FESTUCA HIERONYMI* HACKEL (FAMILIA: GRAMINEAE)

Autor

Adriana Cristina Casabuono

Directora de Tesis

Dra. Alicia B. Pomilio

Lugar de trabajo

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Químicas

1994

Tesis
2648
Ej. 2

A Ezequiel, Agustina y Gabriel

A mis padres

Agradezco a la Dra. Alicia Beatriz Pomilio, directora de esta Tesis, por iniciarme en la investigación de los Productos Naturales; por su inteligencia, temperamento amplio y sólida formación profesional, que permitieron desarrollarme científicamente con independencia y forjarme así una gran capacidad de discernimiento.

Agradezco también:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme brindado la posibilidad de desarrollar este trabajo de investigación mediante las Becas de Iniciación y Perfeccionamiento que me fueron otorgadas.

Al PROPLAME-CONICET y al Departamento de Química Orgánica (FCEyN, UBA), como integrante de los mismos, por la infraestructura y apoyo brindado.

A UMYMFOR-CONICET por facilitarme los equipos para realizar los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) y las cromatografías gaseosas (CGL).

A LANAIS-CONICET por el equipo técnico de CGL-EM suministrado.

Al Dr. A. Vitale por su comprensión y gran colaboración brindada en la edición de esta Tesis.

A la Dra. E. Nicora (Instituto de Botánica Darwinion), Ing. A. Soriano (Facultad de Agronomía, UBA), Dr. J. Dubcovsky (INTA) y al Dr. E. Zallocchi (PROPLAME-CONICET) por el suministro e identificación del material vegetal.

Al Dr. D. Cabral (PRHIDEB-CONICET) por la determinación de endofitos en el material vegetal.

A los Dres. G. Burton, D. Doller y E. Jares, al Sr. G. Arabeheity y a la Lic. M. C. Tettamanzi por la realización de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

A las Lic. M. Rivero y M. M. Moglia (UMYMFOR-CONICET) por las cromatografías gaseosas desarrolladas.

Al Dr. R. Rofi (LAPLEX) y al Sr. J. A. Aznárez (UMYMFOR-CONICET) por la confección de los espectros de masas y CGL-EM.

A la veterinaria E. Falzoni (PROPLAME-CONICET) por los análisis histopatológicos realizados.

Al personal del Dpto de Química Orgánica, por su cordialidad y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio, Lic. Silvia Martone, por su colaboración, Doctores Adolfo Iribarren, Ricardo Rofi, Elizabeth Jares, Enrique Zallocchi y Rodolfo Biekofsky, Ing. Claudia Falabella, Licenciadas M. Cristina Tettamanzi, Giselle Ruty Solá, Adriana Stahl, Viviana Adonaylo y Mariel Murder, Bqca. Cecilia Campos Eceizabarrena, Laura Iannone y Andrés Acher por conformar un grupo humano cálido y dinámico con los que viví momentos de alegría y nos solidarizamos en las circunstancias difíciles, por su calidez.

A mis amigos, por los años compartidos...

ÍNDICE	Página
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN. OBJETIVOS.....	1
EL GÉNERO <i>FESTUCA</i>.....	4
<i>Festuca argentina</i> (Speg.) Par.....	5
<i>Festuca hieronymi</i> Hackel.....	6
CAPÍTULO 2: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LA FAMILIA GRAMÍNEAS.....	8
ALCALOIDES.....	8
COMPUESTOS CIANOGENICOS.....	10
PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS.....	11
LÍPIDOS.....	12
ESTEROLES Y TRITERPENOS.....	12
LAS AUTÉNTICAS CERAS CUTICULARES Y EPICUTICULARES.....	14
MINERALES.....	14
POLIFENOLES.....	14
FLAVONOIDES, FLAVONAS Y GLICOFLAVONAS.....	14
ANTOCIANAS.....	16
LIGNANOS.....	16
DERIVADOS DEL ÁCIDO BENZOICO Y DEL ÁCIDO CINÁMICO.....	17
HIDRATOS DE CARBONO.....	18
CAPÍTULO 3: QUÍMICA ECOLÓGICA.....	19
INTRODUCCIÓN.....	19
INTERACCIONES ANIMAL-ANIMAL.....	19
INTERACCIONES PLANTA-ANIMAL.....	20
INTERACCIONES PLANTA-PLANTA.....	21
Alelopatía.....	21
INTERACCIONES PARÁSITO-HUÉSPED.....	23
INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO.....	24
Micotoxinas.....	24

La molécula señal.....	25
Fitotoxinas.....	26
Agentes antimicrobianos.....	28
QUÍMICA ECOLÓGICA EN LA FAMILIA GRAMÍNEAS.....	29
CAPÍTULO 4: LOS LIGNANOS NATURALES.....	35
INTRODUCCIÓN.....	35
CLASIFICACIÓN DE LOS LIGNANOS.....	35
NOMENCLATURA.....	37
LIGNANOS DERIVADOS DE LOS TETRAHIDROFUROFURANOS.....	38
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS LIGNANOS.....	41
BIOSÍNTESIS DE LIGNANOS.....	42
DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS LIGNANOS.....	44
Espectrometría de masas.....	44
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica.....	47
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono trece.....	51
Efectos inducidos por la glicosidación.....	52
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	54
ESTUDIO DE <i>FESTUCA ARGENTINA</i>.....	54
ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO.....	54
Análisis de la fracción N^o 1.....	54
Análisis de la fracción N^o 2.....	55
Análisis de la subfracción 2a.....	55
Análisis de los alcoholes provenientes de la saponificación de ceras...	55
Alcoholes terpénicos.....	57
Análisis de los ácidos grasos provenientes de la saponificación de ceras	69
Análisis de la subfracción 2c.....	70
Análisis de la fracción N^o 3.....	77
Análisis de la fracción N^o 4.....	79
Análisis de la fracción N^o 5.....	75
Δ^5 -Esteroles.....	80
Δ^7 -Esteroles.....	83

Dihidroesterol.....	84
Δ^4 -Cetoesteroides.....	85
Δ^7 -Cetoesteroides.....	88
ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO.....	90
MARCHA DE ALCALOIDES.....	90
Análisis estructural de los compuestos 61 a 65.....	91
Análisis de los reineckatos.....	97
ESTUDIO QUÍMICO DEL PERCOLADO DE CLORURO DE METILENO.....	98
Análisis del compuesto 67.....	100
Análisis del compuesto 68.....	103
Análisis del compuesto 69.....	107
Análisis del compuesto 70.....	108
Análisis de los glicósidos esteroidales.....	111
ESTUDIO QUÍMICO DEL PERCOLADO METANÓLICO.....	113
Análisis del compuesto 72.....	114
Análisis del compuesto 73.....	118
Análisis del compuesto 74 y del compuesto 75.....	121
Análisis del compuesto 76.....	122
Análisis del compuesto 77.....	124
Análisis del compuesto 78.....	125
Análisis del compuesto 80.....	126
ESTUDIO DE <i>FESTUCA HIERONYMI</i>	131
ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO.....	131
Análisis de los hidrocarburos.....	131
Análisis de las cetonas.....	132
Análisis de los aldehídos.....	136
Análisis de los alcoholes.....	137
Análisis de los esteroides.....	137
ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS PRELIMINARES DE LAS DOS ESPECIES DE FESTUCA.....	146
<i>FESTUCA ARGENTINA</i> (SPEG.) PAR.....	146
Lesiones microscópicas de los órganos afectados al inocular ratones.....	146
Estudio toxicológico del extracto acuoso.....	147
Lesiones microscópicas de los órganos afectados al inocular ratones.....	148
Determinación de la naturaleza química de los componentes de la fracción tóxica de <i>Festuca argentina</i>.....	151

<i>FESTUCA HIERONYMI</i> HACKEL.....	154
Lesiones microscópicas de los órganos afectados al inocular ratones.....	154
COMPARACIÓN DE LAS LESIONES MACRO Y MICROSCÓPICAS PROVOCADAS POR AMBAS ESPECIES.....	155
CONCLUSIONES SOBRE LA TOXICIDAD DE AMBAS ESPECIES.....	156
CAPÍTULO 6: PARTE EXPERIMENTAL.....	160
MÉTODOS EMPLEADOS.....	160
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	161
REACCIONES GENERALES.....	163
ESTUDIO QUÍMICO DE <i>FESTUCA ARGENTINA</i>.....	164
Material vegetal.....	164
Extracción del material vegetal.....	164
ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO.....	165
Análisis de los hidrocarburos.....	165
Análisis de las ceras y de las terpenonas.....	166
Análisis de la subfracción 2a (ceras).....	167
Alcoholes provenientes de la hidrólisis de ceras.....	167
Acidos grasos provenientes de la hidrólisis de ceras.....	170
Análisis de las terpenonas.....	171
Análisis de los aldehídos.....	173
Análisis de los alcoholes.....	174
Análisis de los esteroides.....	175
ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO.....	178
MARCHA DE ALCALOIDES.....	178
Purificación de los alcaloides extraídos a pH= 8.....	179
Purificación de los alcaloides extraídos a pH= 11.....	179
Obtención de las bases libres a partir de los reineckatos y purificación de los alcaloides.....	180
ESTUDIO DEL PERCOLADO DE CLORURO DE METILENO.....	181
Hidrólisis enzimática de los compuestos 69 y 70.....	184
Hidrólisis ácida de los glicósidos esteroidales.....	185
ESTUDIO DEL PERCOLADO METANÓLICO.....	186
Purificación de los glicósidos de flavonoides.....	186

Purificación de las agliconas.....	187
Purificación de la fracción 6.....	187
ESTUDIO QUÍMICO DE <i>FESTUCA HIERONYMI</i>	192
Material vegetal.....	192
Extracción del material vegetal.....	192
ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO.....	192
Análisis de los hidrocarburos.....	194
Análisis de las terpenonas.....	194
Análisis de los aldehídos.....	196
Análisis de los alcoholes.....	196
Análisis de los esteroides.....	197
ENSAYOS TOXICOLÓGICOS DE <i>FESTUCA ARGENTINA</i> Y <i>FESTUCA HIERONYMI</i>	199
Preparación de las muestras.....	199
Animales de experimentación.....	199
Estudios histopatológicos.....	199
Fraccionamiento del extracto acuoso de <i>Festuca argentina</i>	200
Determinación de la naturaleza química de los componentes de la fracción tóxica de <i>F. argentina</i>	201
RESUMEN.....	203
BIBLIOGRAFÍA.....	207

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN. OBJETIVOS.

Dada la mortalidad observada en vacunos por ingestión de algunas pasturas naturales, resulta importante estudiar aquellas especies botánicas que perjudican en grado sumo a nuestra ganadería. Debe tenerse en cuenta que siendo nuestro país esencialmente agrícola-ganadero, y que la alimentación del ganado se efectúa principalmente por pasturas naturales, se estiman anualmente numerosas pérdidas o bien intoxicaciones graves de los animales, por no conocer los principios activos y por ende no contar con los antidotos adecuados.

Existe una buena cantidad de información acumulada, del país y del extranjero, con respecto a intoxicaciones producidas por ingestión de vegetales, pero también es reconocida la necesidad de una revisión y actualización de muchas de ellas, especialmente en los aspectos clínicos, bioquímicos y fisiopatológicos, en la química de los principios activos y en métodos terapéuticos y de control. Adicionalmente existe un gran número de especies vegetales sobre las cuales no existen estudios realizados y que deben ser analizadas mediante pruebas experimentales que permitan determinar sus efectos en el organismo animal y reconocer si son nocivas o no. Estas investigaciones permitirán clarificar controversias y establecer fehacientemente los efectos clínicos y bioquímicos e identificar los principios responsables de las intoxicaciones provocadas por su ingestión, consideradas riesgosas para la economía del país.

Asimismo resulta importante aislar e identificar los componentes aparentemente inocuos presentes en la planta en cuestión, especialmente aquellos correspondientes al metabolito secundario de la misma, ya que estos compuestos permitirían esclarecer no sólo los aspectos sintomatológicos de la intoxicación sino también aportar información de interés quimiotaxonómico y/o ecológico.

Vale la pena destacar, que existe una marcada y constante demanda de información en esta área, especialmente por profesionales veterinarios que en la práctica diaria se ven enfrentados a diagnósticos presuntivos de intoxicaciones, que en la mayoría de los casos no pueden aclarar. Las causas más frecuentes son el desconocimiento de las especies reconocidas como tóxicas, el hecho de confundir especies botánicas y no poseer datos químicos de sus componentes así como de sus principios activos y de su actividad patológica, y por último la falta de actualización y desarrollo de este tema

en el país.

En base a todo lo expresado, de la extensa lista de plantas nocivas para el ganado que crecen en nuestro país [RATERA, 1973], hemos seleccionado *Festuca argentina* (Speg.) Par. por pertenecer a una de las veinte especies de gramíneas de nuestro país registrada como tóxica para el ganado [PARODI, 1950], que crece en la Patagonia y de la cual no existe hasta el momento ningún estudio químico. El principal objetivo de esta Tesis ha sido el aislamiento, purificación y determinación estructural de los metabolitos secundarios (terpenoides, alcaloides, compuestos fenólicos, etc.), presentes en extractos de distinta polaridad obtenidos de esta planta, resultaran o no activos desde el punto de vista farmacológico, en los ensayos pertinentes llevados a cabo durante el transcurso de la misma. Asimismo, se realizaron los estudios toxicológicos para poder esclarecer el carácter nocivo de la planta y localizar la fracción tóxica y su comportamiento químico, en una etapa preliminar, dado que no se habían realizado anteriormente análisis de toxicidad de esta especie.

Se partió de material vegetal identificado por botánicos. La separación de los componentes de cada extracto, se realizó en base a la aplicación de sucesivas técnicas cromatográficas. El grado de pureza se determinó por cromatografía gas-líquido (CGL) y por cromatografía líquida de alta resolución analítica, y por constantes físicas. Se utilizó además cromatografía gas-líquido combinada con espectrometría de masas (CGL-EM) para el análisis de microcomponentes. Las estructuras de los compuestos puros fueron elucidadas por métodos químicos, de derivatización o hidrólisis y análisis espectroscópico (IR, UV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y EM) de los componentes naturales o derivados.

Teniendo en cuenta un estudio sobre las relaciones fenéticas en base a caracteres vegetativos y reproductivos entre las festucas del sur de nuestro país [MARTINEZ, 1988], se llega a la conclusión que *Festuca argentina* conformaría un grupo separado de los taxones patagónicos analizados y estaría más vinculada como especie con las Festucas de la zona central y norte de la República Argentina a Bolivia y Perú. Es por esta razón que se eligió con fines comparativos a una especie de *Festuca* nativa del centro-norte argentino; la especie adecuada resultó ser *Festuca hieronymi*, ya que también es una gramínea registrada como tóxica [PARODI, 1950] pero sin informe químico alguno que habita en mesetas gramíneas, valles y faldas del noroeste argentino. Así, se analiza en este trabajo de Tesis desde el punto de vista químico la

semejanza con *F. argentina*, en particular de los componentes menos polares (extracto de éter de petróleo) y de la toxicidad.

Con respecto a la toxicidad, son los lugareños los que generalmente detectan las plantas que producen letalidad o envenenamiento en los animales. En el caso de las Festucas tóxicas, fue Parodi el que registró y compiló los datos sobre intoxicaciones en nuestro país, manifestando que resultaba difícil discernir cuáles eran las plantas efectivamente dañinas en cada región. Si bien su proceder aseguró la identidad botánica de la especie, no demostró que fuese efectivamente tóxica. Es por ello que resulta útil estudiar experimentalmente las especies sospechosas a fin de discernir cuáles son efectivamente dañinas. También aunque se conocía información toxicológica sobre determinadas plantas, resultaba difícil saber a qué especies referir esos resultados.

Por eso es que en este trabajo de Tesis demostramos fehacientemente que, partiendo de materiales vegetales identificados inequívocamente por botánicos especialistas, las especies *Festuca argentina* y *Festuca hieronymi* son tóxicas y producen letalidad en ensayos con animales de experimentación. Asimismo, los síntomas y características de la intoxicación en los animales de laboratorio resultan coincidentes con los indicados en vacunos, ovinos y equinos.

En esta Tesis se localizó la fracción tóxica y la naturaleza química de los componentes tóxicos de la misma, efectuándose así un aporte a la Medicina Veterinaria. En una etapa posterior se podrá estudiar específicamente este principio, desde el punto de vista químico y/o fisiológico y el mecanismo de acción con el fin de buscar el antídoto y un tratamiento clínico adecuado, con la participación de los especialistas de cada tema.

Todos los resultados obtenidos significan además una contribución al conocimiento fitoquímico de nuestra Flora que es lamentablemente muy limitado. También, estos datos químicos son de interés botánico, sobre todo para los estudios quimiotaxonómicos, pues permiten resolver algunos problemas que no pueden solucionarse con los aspectos morfológicos o histológicos y establecer correlaciones quimiotaxonómicas con distintas especies del mismo género botánico.

Finalmente cabe destacar en este estudio químico y toxicológico de Festucas que hay que tener presente el aspecto ecológico, que hasta hace unos años se desconocía en algunos casos y no se tenía en cuenta en otros, en relación con los metabolitos secundarios asignables a determinada especie vegetal. Así, desde la década pasada [HARBORNE, 1986] está en pleno desarrollo

la Química Ecológica debido a que se concientizó sobre la importancia que significa tratar de identificar y establecer los metabolitos presentes en un vegetal que estarían involucrados en interacciones planta-animal, planta-planta (alelopatía, interacción parásito-huésped), planta-microorganismo (micotoxinas, fitotoxinas; etc.) desde el punto de vista quimiotaxonómico, industrial (control de plagas) y económico (ver cap. Química Ecológica).

Así, Hegnauer llegó a la conclusión que las características químicas son de mayor valor para la sistemática infrafamiliar de las Gramíneas [HEGNAUER, 1986] e insinuó que los agrostólogos deberán considerar, en el futuro, al dividir o combinar a los grupos en subfamilias, tribus, géneros y especies, también las características químicas, las cuales no son totalmente conocidas en esta familia. Pero aún habiendo conseguido ésto, quedarían varias dificultades por vencer, por ejemplo la frecuente presencia convergente de determinados productos naturales y grupos de productos naturales, la que está resultando más comprensible en vista de las múltiples funciones ecológicas de los metabolitos vegetales.

EL GÉNERO *FESTUCA*

Este género se encuentra dentro de la subfamilia *Festucoideae*, tribu *Festuceae* junto con otros géneros, como por ejemplo *Bromus*, *Lolium* y *Poa* a los que vulgarmente se los conoce como pastos.

El género *Festuca* comprende unas cien especies mesotérmicas, distribuidas en todo el mundo; muchas de ellas son forrajeras y varias se cultivan por la buena pastura que producen, por ejemplo, *F. arundinacea*, *F. rubra* y *F. elatior*.

En la Argentina existen unas veinticinco especies distribuidas en diversos sistemas montañosos, sobre todo en los Andes y en la estepa patagónica. Salvo algunas especies como el "lro" (*F. orthophyla*) y el colrón bravo (*F. Kurtzii*) de hojas durísimas y punzantes, muchas de las otras constituyen una buena pastura para el ganado; dos de ellas, sin embargo, han sido sindicadas como tóxicas, éstas son *F. argentina*, *F. hieronymi* y, tal vez, *F. dissitiflora*.

Varias gramíneas patagónicas son designadas con el nombre de "colrón"; los lugareños distinguen diversos colrones según su aspecto y propiedades,

pero en realidad pertenecen a distintos géneros. Así, por ejemplo, designan "coirón amargo" a *Stipa humilis* y *S. speciosa*, "coirón negro" a *F. argentina* y "coirón blanco" a *Poa huecu*.

A continuación describimos las dos especies de *Festuca* que son estudiadas en esta Tesis.

Festuca argentina (Speg.) Par.

Sus nombres vulgares son "coirón", "c. negro", "c. grande", "c. falso", "c. del huecú", "c. duro" y "Pampa Grass". Esta especie había sido descrita inicialmente bajo el género *Poa* [SPEGAZZINI, 1897] y luego fue transferida a *Festuca* [PARODI, 1935].

Es una planta perenne, densamente cespitosa, presenta macollos intravaginales que van formando matas espesas y muy arraigadas que alcanzan de 0,50 m a un metro de altura. Las hojas son duras, tiesas y punzantes. Las flores pueden ser hermafroditas, poligamas o dioicas y se disponen en espiguillas grandes, el antecio inferior mide de ocho a nueve mm presentando lemmas míticas [PARODI, 1950].

Se encuentra en estepas secas y en faldas de cerros en la zona preandina patagónica comprendida entre Catan-Lil (Neuquén) y Lago Argentino (Santa Cruz); reaparece formando la estepa gramínea que rodea al Golfo San Jorge, por la meseta de Monte Mayor y Pampa del Castillo, llegando hasta Puerto Deseado [NICORA, 1978].

En cuanto a la toxicidad de esta especie, desde principios de siglo [RICHELET, 1915] se describe una enfermedad del ganado bajo los nombres de "pataleta", "chucho" o "tembladera" que se produce por un coirón durante todo el año, principalmente en otoño y cuando escasean los pastos tiernos; por los síntomas y el área geográfica donde ocurre, se deduce que el coirón sería la *F. argentina*.

También Jones y Arnold [JONES, 1917] realizaron observaciones y experimentos de campo y concluyeron que el "tembleque", "stagers", "loco" o "huecú" es un desorden no infeccioso que afecta a caballos, vacunos y ovinos. La enfermedad se caracteriza por un debilitamiento, súbitas contracciones musculares, movimientos irregulares de la cabeza, rigidez de los miembros y parálisis motoras transitorias, acompañados por espasmos bajo excitación. Existe también un desarreglo de la visión y conjuntivitis.

El tiempo requerido para producir síntomas definitivos por ingestión de

la gramínea es variable, en promedio, es de diez días. Muchas ovejas se reponen del tembleque espontáneamente, observándose que un cambio completo en la dieta produce la cura en dos semanas.

Festuca hieronymi Hackel

Se la nombra vulgarmente como "aive". Es una planta perenne, densamente cespitosa, con macollos predominantemente intravaginales, que produce espesas matas relativamente tiernas y alcanzan una altura de sesenta a cien centímetros. Las hojas son gráciles o semiduras pero no punzantes, las láminas son muy largas, miden hasta medio metro, y terminan en una cerda; la ligula es truncada. Las flores son hermafroditas y se disponen en espiguillas medianas, presentando antecios múticos [PARODI, 1950].

Habita en estepas gramíneas, valles y faldas montañosas del noroeste argentino, entre los mil quinientos y tres mil quinientos metros sobre el nivel del mar. Es común en las quebradas semihúmedas de Salta y Jujuy, en la sierra de Aconquija, en Tucumán, en las sierras de Ambato y Ancasti en Catamarca, en las de Famatina y Velazco en La Rioja y en las de Achala y S. Chica en Córdoba.

A principios de siglo Rivas y Zanolli estudiaron una planta causante de la "tembladera" que según Parodi se podría identificar como *F. hieronymi* [PARODI, 1950]. Estos autores comprobaron que la planta tiene acción dañina en equinos (asnos, mulas y caballos), ovinos, bovinos y caprinos, siendo los asnos los animales más sensibles. Según mencionan, no lograron extraer ningún principio tóxico como glucósidos cianogénicos ni alcaloides, pero hallaron un hongo en los tejidos herbáceos que describieron parcialmente y lo designaron como *Endoconidium tembladerae* y le atribuyeron la acción tóxica. Sin embargo estos autores también detectaron una sustancia pegajosa en la mayor parte de las festucas de los parajes de tembladera, la cual podría ser una forma Sphacelia de *Claviceps purpurea*. Además mencionaron la existencia de ejemplares de esta especie que no provocaban toxicidad. Como no estaba aclarado en qué condiciones esta planta era tóxica, aconsejaron dos tratamientos: uno curativo, suministrando purgantes energéticos a los animales durante la primera fase de la enfermedad, y otro preventivo, impidiendo que el ganado comiera dicha gramínea.

Resulta evidente que la magra información química y toxicológica

referente a ambas especies, no sólo justifica su estudio en esta Tesis, sino que hace necesario realizar un análisis farmacológico exploratorio adicional, para develar si realmente son plantas tóxicas.

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LA FAMILIA GRAMÍNEAS

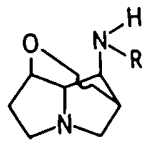
Muchas plantas beneficiosas y de utilidad para la humanidad pertenecen a esta familia, en primera línea los cereales como el trigo, maíz, arroz y caña de azúcar que son alimentos primordiales. Además las Gramíneas son las forrajeras más importantes para el ganado. También se las utiliza como césped de praderas, como materiales de construcción (paja, caña, bambú), hilados y productos técnicos (aceites esenciales, ceras, bebidas alcohólicas).

Dentro de esta familia existen pocas plantas tóxicas o medicinales. Hasta la década del sesenta [HEGNAUER, 1963] se habían investigado muy poco los metabolitos secundarios de esta familia ya que las investigaciones químicas se habían centrado en los componentes de importancia económica como los hidratos de carbono, proteínas y vitaminas. Por ello resultaba difícil caracterizar químicamente a esta familia, excepto en la acumulación de ácido silícico y de hidratos de carbono de reserva. Sin embargo, en la última década [HEGNAUER, 1986] se puso de manifiesto que la familia posee variados polifenoles muy distribuidos y además en forma esporádica o concentrados en determinados grupos se encuentran compuestos cianogénicos, alcaloides, aceites esenciales y saponinas.

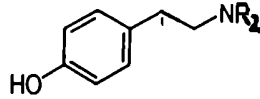
ALCALOIDES

En esta familia los alcaloides carecen de significado sistemático. Los alcaloides se encuentran muy esporádicamente y poseen distintos esqueletos base. Los más frecuentemente encontrados han sido las aminas biogénicas (ej. hordenina) y la base cuaternaria trigonelina, muy distribuida en trazas en el reino vegetal. Las aminas biogénicas (o protoalcaloides) no se encuentran en gran cantidad, y por lo tanto tiene valor la observación de su acumulación como derivados N-metilados. Junto a la gramina (derivado del triptofano) y la hordenina (N,N-dimetilderivado de la tiramina), en las Gramíneas se encuentran otras bases, pero de esqueleto pirrolizidínico, como la telepogina y los alcaloides de *Lolium cuneatum* (ej. lolina, norlolina, lolinina y lolinidina) (Fig. 1).

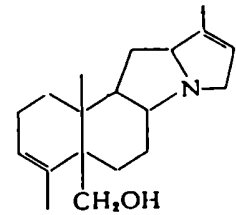
Los alcaloides de algunas gramíneas aprovechables fueron estudiados intensivamente. Por ejemplo, en *Festuca arundinacea* el contenido de alcaloides en semillas y hojas de esta apreciada gramínea forrajera está fuertemente condicionado por el cultivar; según la clase, se obtuvieron hasta once



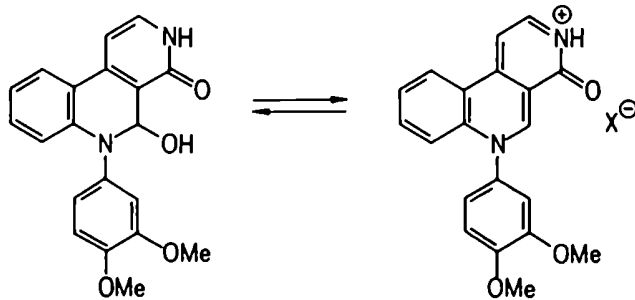
Lolina (R= Me)
Norlolina (R= H)



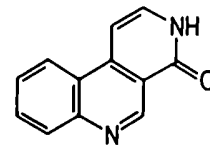
Tiramina (R= H)
Hordenina (R= Me)



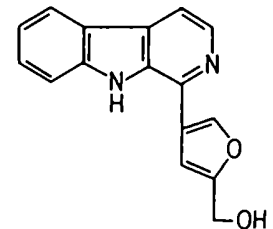
Telepogina



Dos formas de perlolina



Perlolidina



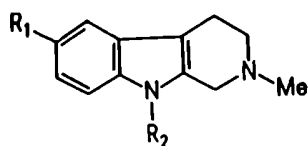
Perlolirina

Figura 1

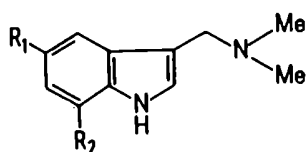
alcaloides y muy distinto contenido total de alcaloides. Curiosamente esta especie forma dos tipos de alcaloides biogenéticamente totalmente distintos: los derivados de necina del grupo lolina y alcaloides de la perlolina [TOOKEY, 1972] (Fig. 1). La lolina de *Festuca* fue originariamente descrita como festucina pero luego se corroboró que se trataba del mismo compuesto [AASEN, 1969]. De semillas de *Festuca* se obtuvieron, además de lolina, N-acetil lolina (lolinina), N-formillolina y N-acetilnorlolina [ROBBINS, 1972]. Estos alcaloides están también presentes en *Lolium* y esta concordancia entre especies de *Festuca* y *Lolium* brinda una estrecha relación entre los dos géneros.

De los granos de maíz (*Zea mays*) se aislaron trazas de N-p-cumaroil y N-feruloil triptamina [EHMANN, 1974] mientras que en las raíces de plantas germinadas de trigo (*Triticum*) se detectó el clorhidrato de hordenina.

Las especies *Phalaris arundinacea* y *P. aquatica*, forrajeras de importancia mundial, forman cantidades fuertemente variables de hordenina, gramina, derivados de triptamina y bases de tetrahidrocarbolina [FRAHN, 1971] (Fig. 2).



Alcaloides de *Phalaris*, bases de tetrahydrocarbolina
($R_1 = H$ ó MeO , $R_2 = H$ ó Me)



Derivados de gramina ($R_1 = R_2 = H$)
de *Phalaris aquatica*
(R_1 ó $R_2 = MeO$; $R_1 = R_2 = MeO$)

Figura 2

COMPUESTOS CIANOGENICOS

Actualmente se conocen, además de los glucósidos cianogénicos originados en tirosina, como durrina, taxifilina y trigloquinina, también linamarina y lotaustralina cuyos precursores biogénicos son de la familia valina-isoleucina, y la heterodendrina, biosintetizada a partir de leucina (Fig. 3). Por consiguiente, la suposición de que las monocotiledóneas sólo poseen compuestos cianogénicos derivados de la tirosina [HEGNAUER, 1963] no es más valedera.

Los compuestos cianogénicos aromáticos derivados de la tirosina se encuentran preferentemente en Hordeae, Andropogoneae y Bambusoideae. *Sorghum bicolor* (L.) Moench posee durrina, que por acción de una β -glucosidasa da glucosa y la cianhidrina del p-hidroxibenzaldehído. Esta cianhidrina por calentamiento o por una *Sorghum*-oxinitrasa específica [BOVE, 1961] produce p-hidroxibenzaldehído y cianuro de hidrógeno (Fig. 3). En las restantes gramíneas, el compuesto cianogénico principal es el seco-derivado trigloquinina. Algunos grupos forman, sin embargo, glucósidos cianogénicos de la familia valina-isoleucina como *Avena sativa* cv "Tigre" o de la familia leucina como *Holcus mollis*.

Se encontraron plantas cianogénicas y a veces tóxicas para el ganado como *Cynodon hirsutus*, *Avena byzantina* y *Lamprothyrsus hieronymi* [GALLO, 1979]. Por otro lado, Parodi mencionó en su publicación sobre gramíneas tóxicas para el ganado de la Argentina [PARODI, 1950] a plantas cianogénicas como *Stipa*

(cafirina) [WALDSCHMIDT-LEITZ, 1967]. Las prolaminas son proteínas de reserva, generalmente ricas en prolina y ácido glutámico.

Las prolaminas son relativamente pobres en triptofano y lisina, y por consiguiente, sin valor como proteínas alimenticias. Además ellas pueden producir en personas hipersensibles ciertas enfermedades intestinales conocidas como enfermedades celiacas debido a que el sistema inmune forma anticuerpos contra ciertos componentes de la fracción prolamina ocasionando molestias relacionadas con la alimentación.

Resulta interesante acotar que el ácido ferúlico en las Gramíneas es componente de la albúmina (soluble en agua fría); así, por ejemplo, se detectó en las glicoproteínas de harina de trigo, en la que se encuentra esterificado con xilosa [FAUSCH, 1963], y en la globulina (soluble en soluciones salinas neutras) de centeno como N-feruloilprolina [VAN. SUMERE, 1973].

En cuanto a los aminoácidos libres, la δ -acetilornitina, el ácido α -aminoadípico, la β -alanina y el ácido pipercolínico se encuentran en las Gramíneas. El primer aminoácido citado es muy frecuente en Festuceae. Si se tiene en cuenta la plasticidad metabólica (por ejemplo, la acumulación de prolina por sequedad en ciertos grupos), entonces el perfil de aminoácidos de las hojas resulta característico de la subfamilia [YEOH, 1982].

En lo referente a las proteínas de semillas, el contenido de proteínas, la composición de las proteínas y la composición de los aminoácidos en los hidrolizados de albúmina de semillas pueden tener significado sistemático [YEOH, 1981].

LÍPIDOS

ESTEROLES Y TRITERPENOS

Los fitoesteroles en general están ampliamente distribuidos en los vegetales; se encuentran libres, como ésteres y como glicósidos. Frecuentemente y en gran cantidad se encuentran en las gramíneas: campesterol, sitosterol, estigmasterol y avenasterol; así como también los 4-metilesteroles [KNIGHTS, 1968; OSSKE, 1965; BERRIE, 1972].

Los 3-metoxitriterpenos son componentes característicos de las ceras de hojas y tallos y de las fracciones lipídicas de los granos y rizomas de muchas gramíneas; se encuentran generalmente junto a los correspondientes alcoholes

[OHMOTO, 1970]. En principio, corresponden a triterpenos pentacíclicos con esqueleto de oleaneno, hopeno, arboreno, urseno o lupeno. Son muy frecuentes la fridelina, derivados de ferneno (por ejemplo, arundoína) y derivados de arboneno (por ejemplo, cilindrina) [OHMOTO, 1970] (Fig. 4). Es muy interesante el hecho que ciertas gramíneas pueden formar cuatro series de derivados estereoisoméricos del hopeno; por ejemplo, el cultivar "6499 GBB" de *Sorghum bicolor* forma fernenol, isoarborinol, trematol y sorgumol (Fig.4).

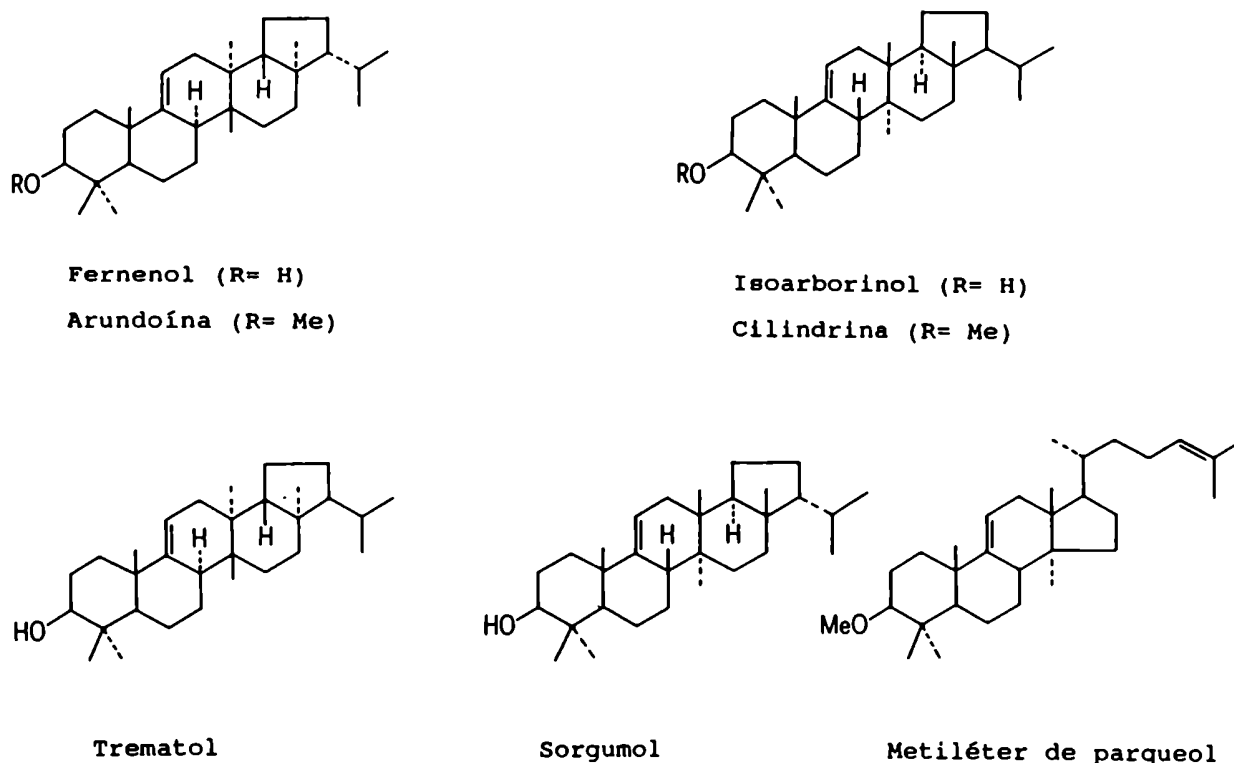


Figura 4

El contenido triterpénico de las gramíneas es en general bajo (menor de 0,05%) y muestra claras variaciones estacionales [OHMOTO, 1970]. Contrariamente a las suposiciones anteriores [OHMOTO, 1970], algunos grupos forman también 3-metoxiderivados de triterpenos tetracíclicos, como los respectivos metiléteres de cicloartenol y parqueol [RUSSELL, 1976] (Fig. 4).

Por otra parte, en los géneros *Chionochloa* [RUSSELL, 1976], *Cortaderia*, *Erianthus*, *Ripidium*, *Miscanthus* e *Imperata* [SMITH, 1978] se comprobó la utilidad taxonómica y biosistemática de las características triterpénicas.

LAS AUTÉNTICAS CERAS CUTICULARES Y EPICUTICULARES

Los alcanos, alcoholes, ácidos grasos libres, ésteres de ceras (ésteres de ácido graso-alcohol), β -dicetonas y derivados oxigenados son preponderantes en las ceras de las Gramíneas. La longitud de la cadena de los componentes y la relación en que cada uno de éstos se encuentra, resulta característico del grupo [TULLOCH, 1981]. En ciertos grupos se encuentran también aldehidos de cadena larga [LAMBERTON, 1965].

Los esteroides y triterpenos anteriormente mencionados, hasta el momento no resultaron ser componentes principales de las ceras de Gramíneas.

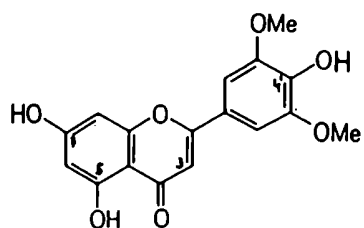
MINERALES

Las Gramíneas acumulan ácido silícico. Baker [BAKER, 1961] describió las distintas formas de almacenamiento del ácido silícico en las células de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Llamó opalfitolitos a los corpúsculos de sílice y señaló que éstos serían la causa de los daños mecánicos en los pulmones de los trabajadores de la industria de la caña de azúcar ya que el análisis de estos fitolitos mostró que estaban compuestos en un 94% por el ópalo (ácido silícico que contenía agua) y también en pequeños porcentajes por óxidos de aluminio, de hierro, de potasio, de sodio y de fósforo.

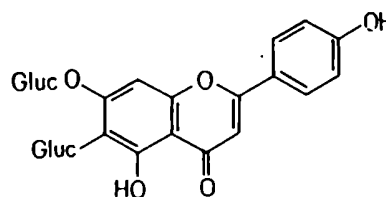
POLIFENOLES

FLAVONOIDES, FLAVONAS Y GLICOFLAVONAS

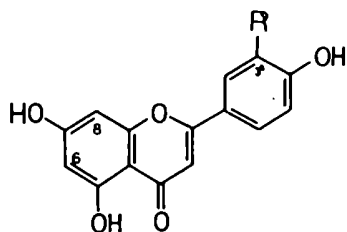
Los flavonoides de las gramíneas fueron intensivamente estudiados [WILLIAMS, 1974]. Los glicósidos de tricina, junto a pequeñas cantidades de tricina libre, y glicoflavonas como la saponarina (6-C-glucosil-7-O-glucosilapigenina), son los flavonoides principales de las hojas de Gramíneas [WILLIAMS, 1974; KANETA, 1973]. De los glicósidos de tricina se conocen: tricina-5-O-glucósido (frecuente), tricina-7-O-glucósido, tricina-7-O-neohesperidósido y tricina-7-O-glucósidosulfato [HARBORNE, 1976]. Otras flavonas que acompañan a la tricina son apigenina, luteolina y la 5-desoxiflavona: 7,3',4'-trihidroxiflavona de *Bothriochloa baldhii* [HARBORNE, 1976] (Fig. 5).



Tricina

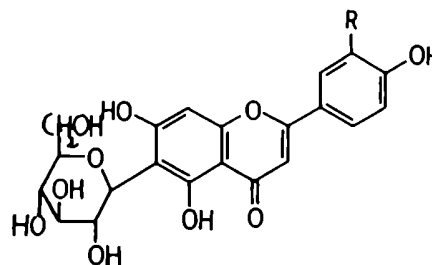


Saponarina



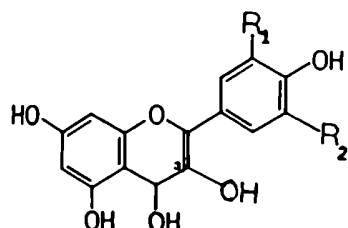
Apigenina (R= H)

Luteolina (R= OH)



Isovitexina (R= H)

Isoorientina (R= OH)



Canferol

Quercetina

Isoramnetina

R ₁	R ₂
H	H
OH	H
MeO	H

Figura 5

Los perfiles de C-glicoflavonas de Gramíneas son complejos; se encuentran 6-C- y 8-C-monoglicoflavonas y 6,8-C-diglicoflavonas, así como O-glicósidos de las glicoflavonas [WILLIAMS, 1974; KANETA, 1973; HARBORNE, 1976].

Los flavonoles y los glicósidos de los flavonoles como, por ejemplo, canferol y quercetina rara vez son los flavonoides principales; sólo en *Rottboellia exaltata* se observaron exclusivamente glicósidos de quercetina [HARBORNE, 1976].

En el caso particular de *Festuca arundinacea* los flavonoides principales

son isoramnetina-3-O-glicósidos, acompañados de quercetina-3-O-glicósidos [WONG, 1980].

En dieciseis especies del género *Briza* se detectaron tricina-5-O- y -7-O-glucósidos, canferol-3-O- y quercetina-3-O-glucósidos, vitexina (apigenina-8-C-glucósido), isovitexina (apigenina-6-C-glucósido), orientina (luteolina-8-C-glucósido) e isorientina (luteolina-6-C-glucósido). Al realizar la distribución geográfica del perfil de flavonoides se comprobó que la isovitexina y los glicósidos de flavonoles sólo se encontraban en especies eurasiáticas, mientras que faltaban en las especies sudamericanas estudiadas [WILLIAMS, 1972].

ANTOCIANAS

Las gramíneas son generalmente verdes. Las coloraciones rojas o violetas debido a antocianinas se encuentran generalmente en las flores, en los frutos y en las semillas. Por ejemplo, ciertas razas de centeno poseen en la capa aleurónica de las semillas delfinidina-3-O-rutinósido, en los coleóptilos: cianidina-3-O-rutinósido y en las hojas primarias: cianidina-3-O-glucósido [DEDIO, 1969] (Fig. 6).

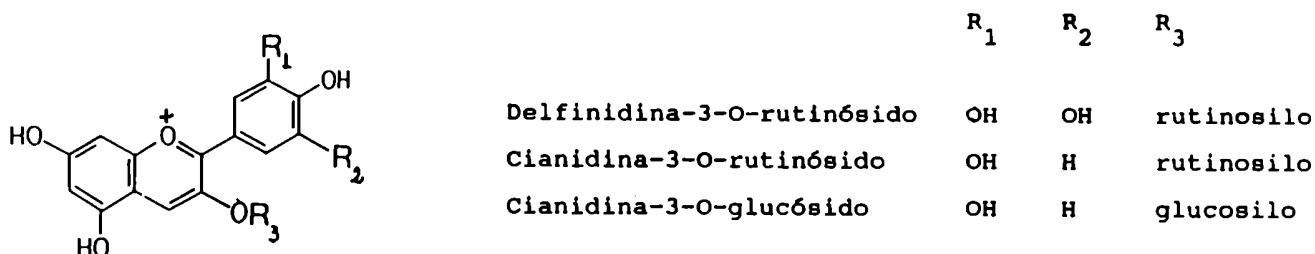
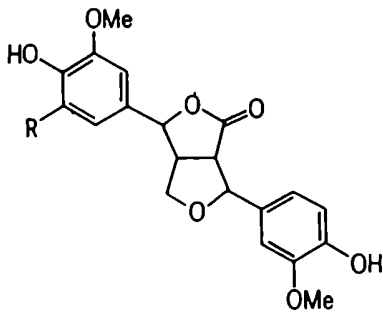


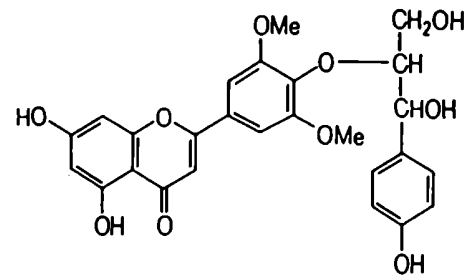
Figura 6

LIGNANOS

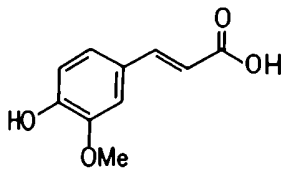
La única especie que presentó compuestos pertenecientes a esta familia fue *Aegilops ovata*, de la cual se aislaron dos epoxilignanólidos con propiedades inhibitorias de la germinación [COOPER, 1977], y el flavonoderivado aegicina (Fig. 7).



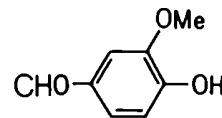
Lignanólidos de *Aegilops ovata*
(R= H ó R= MeO)



Aegicina



Ácido ferúlico



Vainillina

Figura 7

DERIVADOS DEL ÁCIDO BENZOICO Y DEL ÁCIDO CINÁMICO

En general, en las Gramíneas se encuentran los ácidos aromáticos como el ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico) (Fig. 7), el ácido p-hidroxibenzoico y el ácido p-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) en forma libre o esterificada con componentes de la pared celular. La esterificación de los grupos hidroxilo de los polisacáridos de la pared suele ocurrir con los ácidos p-cumárico, ferúlico y diferúlico [MARKWALDER, 1976].

También se encuentran en las Gramíneas p-hidroxibenzaldehído, vainillina (Fig. 7) y aldehído siríngico (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldehído) en pequeñas cantidades unidos a la pared celular [HARTLEY, 1984].

HIDRATOS DE CARBONO

Las estructuras y el metabolismo de los fructanos de Gramíneas, en particular de forrajeras y especies de cereales fueron muy estudiados, como por ejemplo *Avena sativa* [SCHLUBACH, 1965], *Festuca arundinacea* [SMITH, 1966], *F. pratensis*, *Hordeum vulgare* [SCHLUBACH, 1965], *Lolium multiflorum* [DENT, 1963] y *L. perenne* [SMITH, 1966]. En casi ninguna de las forrajeras tropicales y subtropicales (*Chloris gayana*, *Cynodon dactylon* y *Setaria italica*) se observaron fructanos, siendo el hidrato de carbono soluble más importante la sacarosa. Ciertas especies de Gramíneas no son, sin embargo, ni típicas gramíneas de fructanos, ni típicas de azúcar-almidón; ellas almacenan hidratos de carbono solubles junto con mucha sacarosa y cantidades variables de fructanos en hojas y tallos. En esa forma se comportan *Bromus mollis* (Festucoideae) [OKAJIMA, 1964] y *Panicum miliaceum* (Panicoideae) [SCHLUBACH, 1965].

Por consiguiente, la separación neta de Gramíneas indicada por Pollard [POLLARD, 1982] en formadores de fructanos (Festucoideae) y formadores de sacarosa-almidón (Bambusoideae, Eragrostoideae, Arundinoideae, Panicoideae) carece de validez, puesto que dentro de la familia se trata de una tendencia en sus características que, además, parece estar asociada en parte al tipo de fotosíntesis que realizan [JOHNSON, 1968]. Así, las gramíneas que efectúan el camino C_3 de fotosíntesis tienden a almacenar fructanos y las que tienen el camino C_4 tienden a almacenar sacarosa-almidón. Asimismo, mientras que el camino C_4 de fotosíntesis parece tener una expresa adaptación a los lugares cálidos y secos [HARBORNE, 1982], los almacenadores de fructanos en cambio se encuentran en clima frío-húmedo.

CAPÍTULO 3

QUÍMICA ECOLÓGICA

INTRODUCCIÓN

Aunque no ha habido desarrollos importantes en la química ecológica desde la compilación de Harborne en 1986 [HARBORNE, 1986], el trabajo ha continuado en la identificación de los constituyentes químicos que están involucrados en una gran cantidad de interacciones de plantas y animales que se desarrollan en el ecosistema. Por ejemplo, se identificaron un número creciente de clases de sustancias de origen vegetal (iridoides, nitrocompuestos y varios tipos de alcaloides) que serían tomadas y almacenadas por insectos con fines defensivos. Únicamente los glicósidos cianogénicos pueden ser sintetizados "de novo" dentro del insecto u originarse en una fuente dietaria.

Han recibido mucha atención tanto los estimulantes como los inhibidores de oviposición sobre la planta huésped, habiendo sido caracterizados flavonoides y bases orgánicas en las interacciones planta-Lepidópteros. La falta de volatilidad de estas señales químicas específicas es llamativa, ya que no resulta entonces claro cómo son percibidas por el insecto hembra. En cambio, las señales de alimentación son usualmente componentes volátiles, que están presentes generalmente en el néctar y en el polen.

Las interacciones planta-parásito frecuentemente involucran señales químicas, y se ha progresado notablemente en determinar la naturaleza de estas señales en las asociaciones legumbre-*Rhizobium* y *Agalinis-Striga*. La química y la bioquímica de las infecciones de las plantas provocadas por microorganismos se estudió ampliamente, describiéndose en los últimos años varias nuevas toxinas. Entre ellas se identificaron totalmente las victorinas, que son las toxinas de la enfermedad de la avena producidas por *Cochliobolus victoriae*.

INTERACCIONES ANIMAL-ANIMAL

Los alcaloides pirrolidínicos, pirrolizidínicos, pirazinas, fenoles, glicósidos cardiotónicos, glicósidos cianogénicos e iridoides son ejemplos de toxinas de plantas que una vez ingeridas por los insectos las almacenan para defensa. Por ejemplo, los iridoides (Fig. 8) son de mal sabor y amargos para los depredadores avícolas; las pirrolidonas (Fig. 8) son análogos de azúcares en los cuales el oxígeno etéreo es reemplazado por nitrógeno y así resulta ser un análogo de fructosa y un potente inhibidor de glicosidasas de animales que

podría interceptar los sistemas enzimáticos de los herbívoros.

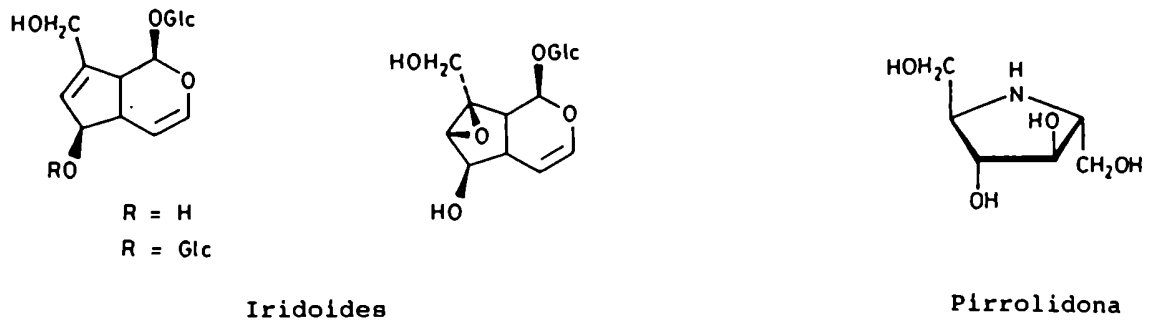


Figura 8

La retención dietaria de metabolitos secundarios por parte de insectos, no está confinada a las toxinas, ya que se pueden encontrar otras clases de sustancias de origen vegetal, especialmente en las mariposas y polillas. Por ejemplo carotenoides, para prevenir la oxidación por radicales libres de los compuestos fenólicos; flavonoides y quinonas también con función de antioxidantes.

INTERACCIONES PLANTA-ANIMAL

Se siguen realizando grandes esfuerzos en tratar de probar la hipótesis referida a que las plantas se defienden de los herbívoros por medio de su química secundaria constitutiva. Lamentablemente, no todos los experimentos han dado hasta el momento una respuesta clara.

Aparentemente, los herbívoros inferiores e intermedios no resultan peligrosos para las plantas, más aún, se considera que estos herbívoros aumentarían la productividad de la planta estimulando su crecimiento [Mc NAUGHTON, 1986]. Sin embargo, Belsky [BELSKY, 1987] examinó la evidencia experimental aducida y no le pareció satisfactoria.

Las distintas toxinas de plantas que fueron investigadas desde un punto de vista ecológico pueden considerarse químicamente bajo tres grupos: compuestos nitrogenados (alcaloides y compuestos cianogénicos; la cianogénesis protegería a las plantas contra los herbívoros a través de un mecanismo complejo), compuestos fenólicos y taninos, y terpenoides. En particular el efecto de los monoterpenos de las plantas sobre la alimentación de los rumiantes sería indirecto, ya que los compuestos no son necesariamente tóxicos para los animales pero tendrían un efecto inhibitorio en los microorganismos

del rumen si están presentes en una concentración suficiente en la planta forrajera.

INTERACCIONES PLANTA-PLANTA

Alelopatía

Actualmente, aun existen problemas no resueltos en los bioensayos que frecuentemente se usan para analizar los efectos de inhibición de los compuestos aleloquímicos sobre la germinación de semillas. Así, Weidenhamer y col. [WEIDENHAMER, 1987] mostraron que el volumen de solución del aleloquímico y el número de semillas a los cuales se aplica pueden alterar notablemente los resultados obtenidos. Concentraciones fitotóxicas bajas de juglona o ácido ferúlico por ejemplo, pueden producir efectos de inhibición equivalentes o mayores que concentraciones más altas, dependiendo de la disponibilidad del compuesto para su captación por semilla. Esto significa que, en el campo, los efectos alelopáticos pueden ser más pronunciados que en los experimentos *in vitro* debido a las condiciones edafológicas.

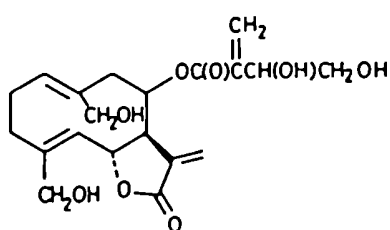
El ácido ferúlico, junto con otros compuestos fenólicos, fueron considerados agentes alelopáticos producidos por el bambú *Phyllostachys edulis*, la conífera *Cryptomeria japonica* y la gramínea *Setaria faberii*. Se intentó mejorar las técnicas de bioensayo para analizar los efectos de los compuestos fenólicos sobre la germinación de las semillas o en el crecimiento de las semillas germinadas, usando ácido ferúlico como compuesto modelo. Fue necesario controlar la temperatura de estos ensayos ya que los efectos alelopáticos del ácido ferúlico sobre el crecimiento de las semillas germinadas de sorgo y soja aumentan al aumentar la temperatura [EINHELLIG, 1984]. También la escala de tiempo del experimento debió ser controlada cuidadosamente, ya que, a menos que se mantuviesen condiciones estériles, el ácido ferúlico podía sufrir degradación microbiana a ácido vainillínico y ácido protocatéquico durante el transcurso del bioensayo [BLUM, 1985].

Los ácidos grasos de cadena larga, saturados e insaturados, también fueron implicados en la alelopatía de plantas superiores, al ser formados por la maleza *Polygonum aviculare* para suprimir alelopáticamente al pasto de Bermuda (*Cynodon dactylon*) [ALSAADAWI, 1983].

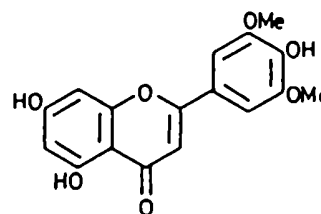
En experimentos de laboratorio se comprobó que los terpenos de *Trichostema lanceolata* producían efectos alelopáticos sobre los pastos. Sin

embargo resultó difícil demostrar alelopatía medible en las condiciones de campo [HEISEY, 1985]. La fitotoxicidad de los terpenoides en el suelo dependerá claramente de cuánto tiempo persistan y también de su efecto en la microflora del suelo. Por ejemplo, el suelo que se había tratado con los aceites esenciales de otras tres labiadas fueron examinados, encontrándose que las bacterias aumentaron en número, pues utilizaban los terpenos como sustratos, mientras que los efectos fungistáticos de los aceites redujeron la población fúngica [VOUKOU, 1984]. Se sugirió que el rol ecológico primario de las toxinas de las plantas en la Naturaleza sería regular la velocidad de descomposición de la materia orgánica en el suelo, a través de la inhibición de su ruptura microbiana [MIDDLETON, 1984].

En los últimos años se describieron nuevos aleloquímicos. Así por ejemplo, la lactona sesquiterpénica cnicina (Fig. 9) se identificó como un agente alelopático en *Centaurea maculosa* y es el responsable de la inhibición del crecimiento en especies competitivas. Análogamente, la tricina (Fig. 9) sería el compuesto alelopático de *Agropyron repens*, que la libera provocando un efecto adverso en el crecimiento de la raíz de sus competidores [WESTON, 1987].



Cnicina



Tricina

Figura 9

La 2-heptanona y el 2-heptanol racémico son los compuestos alelopáticos volátiles de *Amaranthus palmeri*. Los vapores de estos dos compuestos, en concentraciones de una ppm, inhiben la germinación de las semillas de las cebollas y las zanahorias, y son además autotóxicas para las semillas de *Amaranthus* [CONNICK, 1987].

También se caracterizó al alcaloide purínico cafeína como agente autotóxico. Se detectó en el suelo y en las hojas en las plantaciones de café, observando que ejerce un efecto deteriorante en las nuevas plantas, probablemente porque se intercambia lentamente en el suelo. La cafeína, además

de ser autotóxica en el café, inhibiría la germinación de las semillas de varias especies herbáceas, tales como *Amaranthus speciosus*, y no tendría efecto sobre el arbusto *Vigna mungo*, por lo que podría resultar útil como herbicida selectivo [HARBORNE, 1989].

INTERACCIONES PARÁSITO-HUÉSPED

Existen más de tres mil especies de plantas superiores que tienen la habilidad de formar órganos intrusivos especializados llamados haustoria, mediante los cuales pueden unirse a otras plantas superiores para alimentarse de ellas. Es decir, parasitan a su planta huésped dependiendo total o parcialmente de su huésped para sus necesidades nutricionales.

Para una parasitación exitosa se requiere que las raíces de la planta huésped manden dos mensajes químicos distintivos; uno para estimular la germinación de las semillas del parásito y el otro para inducir la formación de los haustoria en la nueva semilla, tal que pueda unirse al huésped.

Se encontró una interacción inusual parásito-huésped con el pasto *Imperata cylindrica* que parasita parcialmente a los bulbos de *Pancratium biflorum* (Amaryllidaceae); se desarrolla una zona roja necrótica en el bulbo alrededor del punto de unión y el huésped produce unos compuestos fenólicos nuevos (un derivado de flavilio y una chalcona) (Fig. 10) en respuesta a la unión parásita [GHOSAL, 1986]. Se producen también algunas alteraciones en el metabolismo de los alcaloides, ya que la licorina se encuentra como 1-glucósido y 1-palmitilglucósido en los tejidos de los bulbos sanos, mientras que en el tejido necrótico aparece licorina libre.

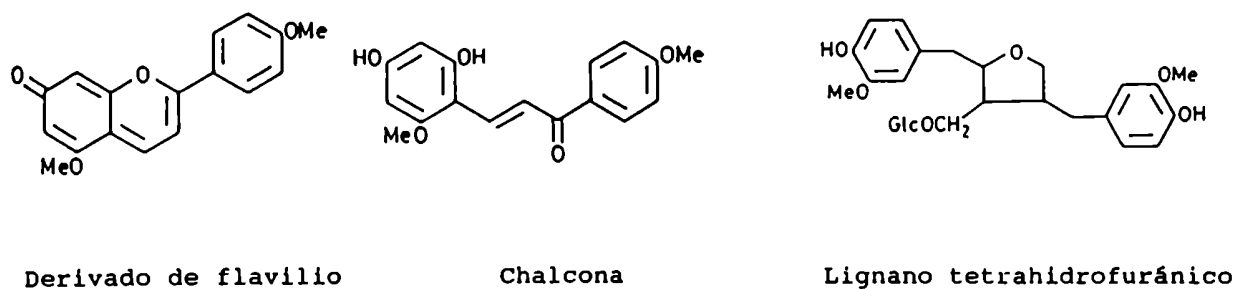


Figura 10

La infestación de una planta por nematodos puede ponerla bajo estrés y causar cambios en su metabolismo secundario. Así, el nematode de la papa (*Globodera rostochiensis*) induce la producción en raíces y estolones, pero no

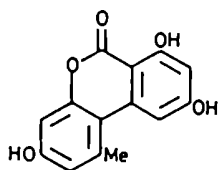
en tubérculos, de un lignano tetrahidrofuránico (Fig. 10) [YOSHIKARA, 1982]. Este compuesto se formaría como un mecanismo de defensa en respuesta a la invasión de tipo fitoalexina. Si fuese así, resulta interesante el hecho que esta sustancia es estructuralmente muy distinta a la típica fitoalexina de la papa que es de naturaleza sesquiterpénica.

INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO

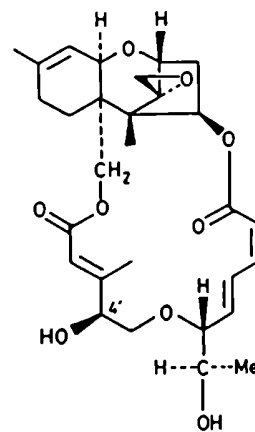
Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios, de origen fúngico, que contaminan ciertas plantas (granos, cereales molidos) como resultado de la infección, y resultan a su vez una amenaza para los animales pues tienden a ser altamente venenosas por ingestión.

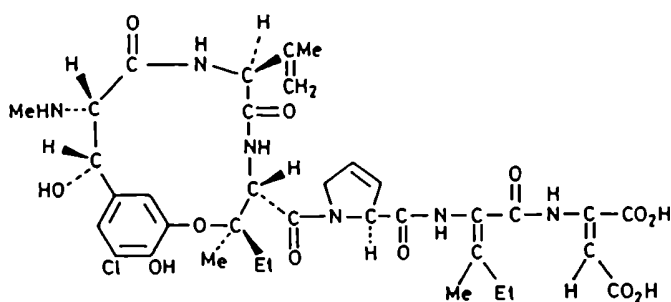
El grupo más conocido de micotoxinas es el de las aflatoxinas que son producidas por *Aspergillus flavus* y causan efectos tóxicos en animales. Las aflatoxinas, como la cercosporina, son fototóxicas en su actividad contra mamíferos y también el alternariol (Fig. 11), que es una micotoxina derivada de dibenzopirona, de las especies de *Alternaria*, es un agente fotosensibilizante [DI COSMO, 1985].



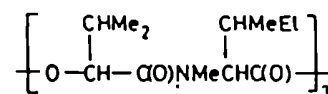
Alternariol



Toxina macrocíclica



Fomopsina A



Eniatina A

Figura 11

Un nuevo aspecto de la investigación sobre micotoxinas se basa en que estas toxinas de origen microbiano pueden sufrir modificaciones químicas por las enzimas vegetales, después de haber sido absorbidas dentro de la planta y subsiguientemente transportadas [SCHOENTAL, 1984]. Por ejemplo, las raíces del arbusto *Baccharis coridifolia* (Compositae) pueden infectarse con los hongos microscópicos del suelo, *Myrothecium roridum* y *M. verrucosum*, haciendo que la planta produzca toxinas macrocíclicas (Fig. 11) volviéndose así venenosa para el ganado [HABERMEHL, 1984].

Un ejemplo de hongo productor de micotoxinas que confiere resistencia a los insectos en una planta huésped, parece ser el de *Fusarium avenaceum* sobre el foliaje del abeto balsámico (*Abies balsamea*), lo cual permite explicar el inesperado cese de infestación del árbol por el gusano *Choristoneura fumiferana* [STRONGMAN, 1988]. Así, el ciclohexadepsipéptido eniatina A (Fig. 11) proveniente de *F. avenaceum* fue encontrado en el foliaje del abeto, siendo tóxico para las larvas en una concentración del 0,04%.

Finalmente, también fue caracterizada la micotoxina que es responsable de la lupinosis, una enfermedad hepática de ovejas y vacas, como un raro hexapéptido parcialmente cíclico [MACKAY, 1986] llamado fomopsina A (Fig. 11). Éste es un metabolito del hongo *Phomopsis leptostromiformis*, que infecta las especies de lupines.

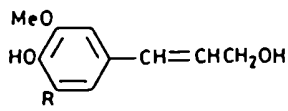
La molécula señal

En muchas interacciones del tipo planta-microorganismo, existe una etapa en la que el microorganismo detecta a una susceptible planta huésped en base a que este huésped factible libera uno o varios compuestos que actúan como señal química. Tal señal produce una respuesta inmediata en el microorganismo, que usualmente involucra la expresión de los genes que son necesarios para provocar una infección. Actualmente ya se caracterizaron las señales químicas tanto de la infección "crown gall" de las dicotiledóneas como de la conocida simbiosis leguminosa-*Rhizobium* (bacteria).

Spencer y Towers [SPENCER, 1988] demostraron que el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico son activos, así como la acetosiringona y la α -hidroxisiringona (Fig. 12), en causar la transferencia de ADN-t en *Agrobacterium tumefaciens*, lo cual luego conduce al desencadenamiento de los síntomas de la enfermedad "crown gall" en el huésped. En particular la lesión

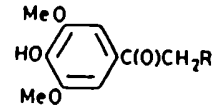
en el tejido vegetal de las raíces del tabaco estimula la síntesis de las acetosiringonas.

Como también un rango de sustancias relacionadas que contienen grupos guayacilo o siringilo presentan cierta actividad, estos autores proponen que



Alcohol coniferílico (R= H)

Alcohol sinapílico (R= MeO)



Acetosiringona (R= H)

α -Hidroxisiringona (R= OH)

Figura 12

el *Agrobacterium tumefaciens* sería capaz de detectar las células de las plantas que están realizando la síntesis de ligninas o la reparación de paredes celulares, y que varios tipos de precursores de ligninas podrían proveer la señal para atacar.

Un sistema de señales aun más llamativo es el de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* ya que ciertos metabolitos secundarios de la familia de los flavonoides pueden tanto estimular como reprimir la expresión de genes nodulantes de especies de *Rhizobium* [PETERS, 1986]. Esta regulación de la expresión sería importante para la planta huésped, ya que el inicio de muchos nódulos en la raíz podría ser un drenaje excesivo de recursos nutricionales de la planta y resultar tan dañino como una nodulación insuficiente.

Los compuestos señal son específicos de la especie de *Rhizobium* que interviene en la simbiosis, pero en general son agliconas de flavanonas, flavonas (ej. luteolina) e isoflavonas, o la cumarina umbeliferona.

Fitotoxinas

Las investigaciones sobre estos metabolitos microbianos, que son responsables de los síntomas de enfermedad en las plantas infectadas, muchas veces se discontinuaron debido a las dificultades en su aislamiento y

caracterización. En los años recientes ha habido una gran dedicación a la elucidación estructural de las victorinas, que fueron descritas por primera vez hace ya tres décadas. Estas sustancias son las toxinas más importantes en cuanto a selectividad de huésped para *Cochliobolus victoriae*. La victorina C (Fig.13) resultó ser un péptido cíclico, basado en seis subunidades de ácido glioxílico, 3-hidroxileucina, 5,5-dicloroleucina, 3-hidroxilisina, deshidrocloroalanina y victalanina (es un nuevo análogo pentacíclico de la fenilalanina. Otras tres victorinas (B, D y E) también se caracterizaron de este hongo y todas tienen estructuras muy similares [HARBORNE, 1989].

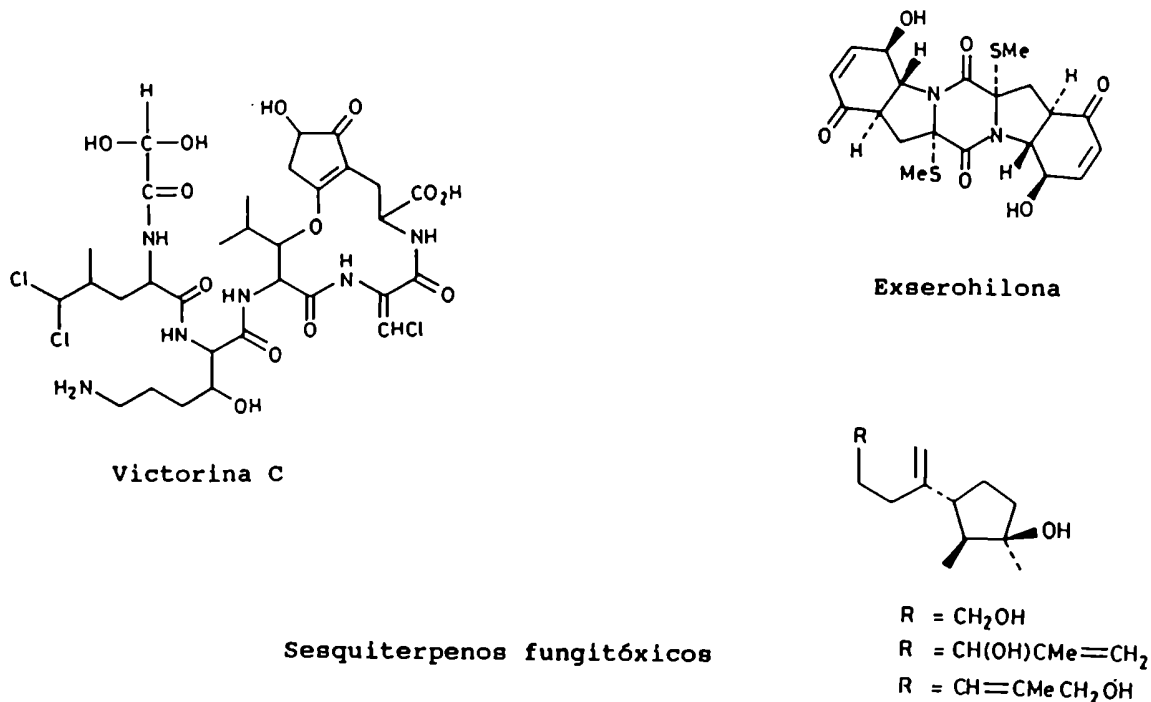


Figura 13

En cuanto a las toxinas no específicas para el huésped, aparentemente la fitotoxina más simple sería el ácido 3-metilpropiónico. Este compuesto es producido por el agente patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* y es efectivo en producir los síntomas característicos de la acción bacteriana en hojas infectadas artificialmente [PERREAUX, 1986].

Una nueva e interesante fuente de fitotoxinas es la correspondiente a los hongos patógenos de los pastos salvajes. Estos compuestos son obviamente potenciales herbicidas para el control de las malezas. Así, por ejemplo, la exserohilona (Fig. 13) es una nueva toxina de *Exserohilum holmii*, siendo éste un hongo patógeno de la gramínea *Dactyloctenium aegyptium*. Esta sustancia

produce lesiones necróticas, con un borde marrón rojizo, en las hojas de varias especies de plantas cuando se aplica en concentraciones de 10^{-4} a 10^{-5} M [SUGAWARA, 1985].

El modo de acción de muchas fitotoxinas sobre las plantas huésped todavía no resulta claro; se ha analizado la posibilidad que las fitotoxinas de un hongo patógeno tengan otros efectos además de dañar la planta-huésped. Así, ellas podrían por ejemplo proteger una planta infectada de una infección fúngica posterior. Esto ocurre en el caso de *Epichloe typhina*, un patógeno del pasto *Phleum pratense*, el cual sintetiza tres sesquiterpenos fungitóxicos (Fig. 13) que previenen a la planta de una posterior infección por *Cladosporium phlei* que es otro agente patógeno potencial de este pasto [HARBORNE, 1986].

Agentes antimicrobianos

Como una consecuencia de la coevolución de las plantas con sus parásitos microbianos, las plantas han elaborado una serie compleja de barreras defensivas que le proveen resistencia a las enfermedades. Además de las variadas clases de agentes antimicrobianos de bajo peso molecular que pueden estar presentes en la superficie de las plantas o en sus capas epidérmicas, existen también barreras macromoleculares. Las sustancias antifúngicas más recientemente detectadas en plantas son las lectinas que poseen actividad de quitinasa [DIXON, 1986]. Los sistemas defensivos también pueden ser inducidos en el vegetal por una invasión microbiana, siendo el mecanismo de defensa más conocido el de la respuesta de fitoalexina. Sin embargo, un incremento de la lignificación, síntesis de glicoproteínas o producción de extensina también pueden ser una respuesta a una infección.

Se ha debatido extensamente el tema sobre si los alcaloides de las plantas proporcionan resistencia a las enfermedades en las angiospermas. Roddick considera probable que ésto ocurra con los alcaloides esteroidales de las Solanaceae, puesto que, como la tomatidina y la solanina pueden desestabilizar a las membranas, resultarían probablemente muy dañinas para los agentes patógenos (*Phytophthora infestans*) de las papas [HARBORNE, 1989].

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) son producidas en las plantas cuando éstas reaccionan hipersensiblemente a las diversas infecciones provocadas por virus u otros agentes patógenos. Si bien estas proteínas podrían estar involucradas en la resistencia a enfermedades, su rol preciso

aún no ha sido esclarecido. Usualmente, las proteínas se encuentran en pequeñas cantidades en las hojas y hay un aumento dramático luego de una inducción apropiada. Por ejemplo, si las hojas de tabaco se tratan con el virus del mosaico del tabaco, ellas producen aproximadamente trece proteínas separables, aumentando en este caso la concentración hasta veinte mil veces [PIERPOINT, 1986].

QUÍMICA ECOLÓGICA EN LA FAMILIA GRAMÍNEAS

Se conocen numerosas sustancias con propiedades fungitóxicas o insecticidas del tipo de fitoalexinas. Algunos metabolitos de Gramíneas probablemente ecológicamente significativos resultan ser, por ejemplo, las saponinas de la avena, los alcaloides de *Triticum aestivum* y los flavonoides de defensa ante insectos.

Las benzoxazolinonas y sus precursores glucosídicos se han estudiado detalladamente en *Coix lacryma-jobi* y *Zea mays* [HOFMAN, 1973]. En las plantas se encuentran preferentemente 2-O-glucósidos de 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona y derivados; si el N-4 lleva un hidrógeno o un hidroxilo se trata de una lactama o de ácidos hidroxámicos cíclicos. Los ácidos hidroxámicos, originados por ruptura de los glucósidos son inestables, se ciclan con pérdida de ácido fórmico dando benzoxazolinonas (Fig. 14). Los glucósidos son sustancias de almacenamiento; en realidad las verdaderas sustancias de ataque son las agliconas, las cuales inhiben a los hongos y son tóxicas para muchos insectos.

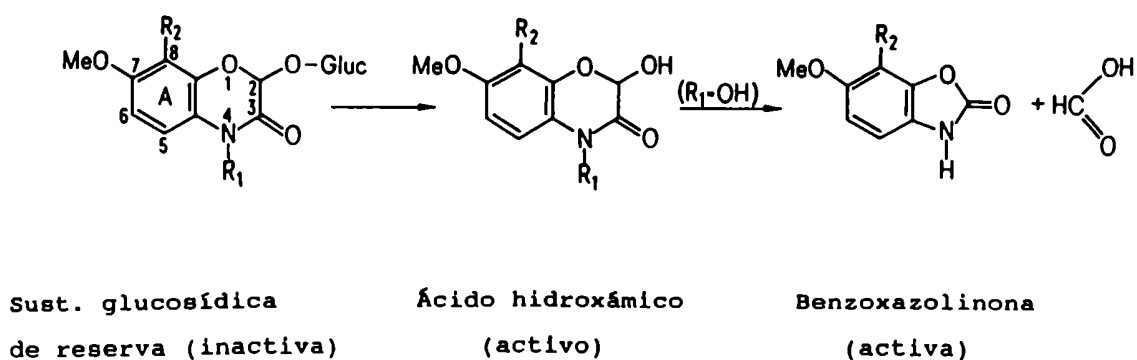


Figura 14

De las dieciséis especies de Gramíneas estudiadas, sólo seis presentaron ácidos hidroxámicos libres en hojas jóvenes [ZÚÑIGA, 1983]: *Chusquea cumingii* (Bambuseae), *Arundo donax* (Arundineae), *Elymus gayanus*, *Secale cereale* y *Triticum durum* (Hordeae) y *Zea mays* (Maydeae). Es poco evidente la relación entre la clasificación de las Gramíneas y la formación de estas benzoxazin-3-onas, puesto que estas sustancias parecerían estar presentes en plantas jóvenes de ciertos géneros, siendo reemplazadas en géneros relacionados, mediante otros sistemas de defensa. Por ejemplo, en el género *Hordeum* la mayoría de las especies forman en los brotes jóvenes hordatina-A, -B y -M que son dímeros del tipo lignanos de p-cumaroilagmatina y feruloilagmatina (Fig. 15), los cuales también se acumulan como glucósidos. Las hordatinas son sustancias básicas inhibitorias de la germinación de esporas y del crecimiento de hifas de hongos fitopatógenos [STOESSL, 1966a y b].

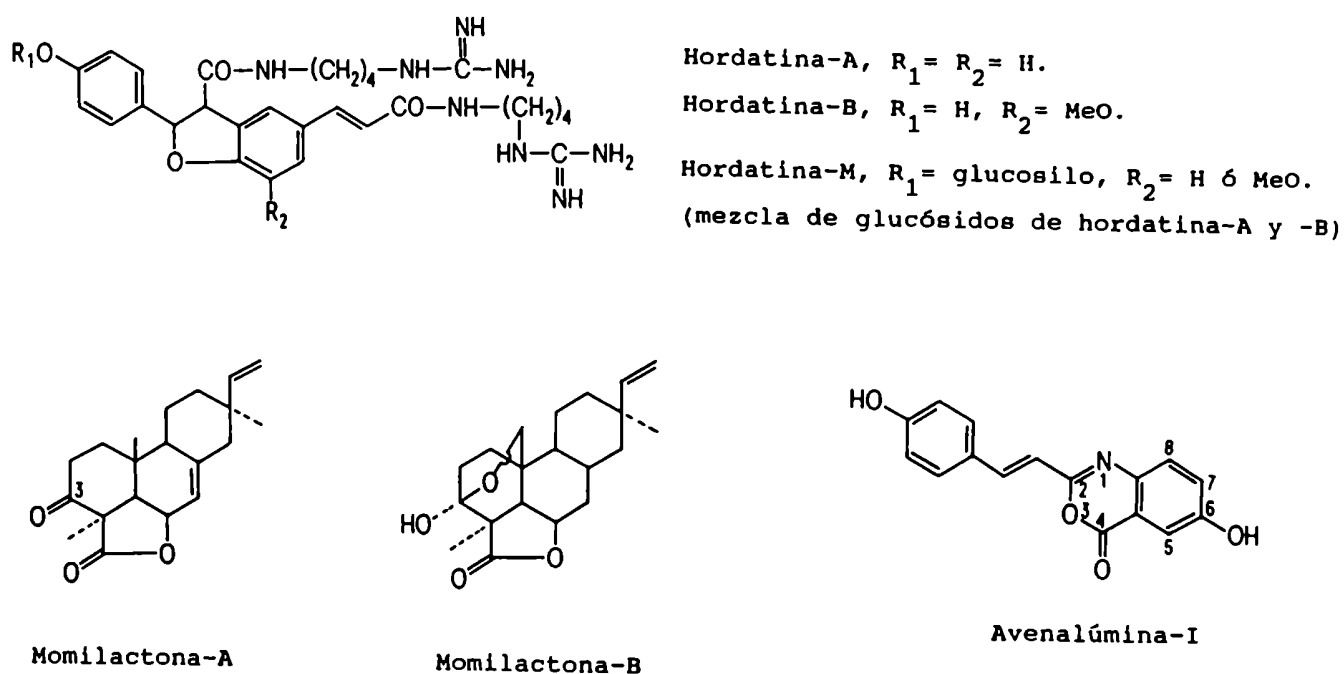


Figura 15

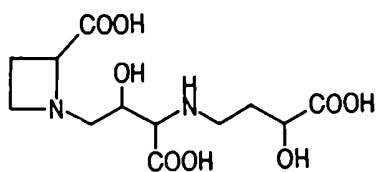
Otras sustancias de defensa de las Gramíneas son los ácidos benzoico y salicílico, que inhiben el desarrollo de parásitos y de hongos del arroz y la antraquinona presente en la cera epicuticular de *Lolium perenne* que actuaría como barrera para insectos [ALLEBONE, 1971]. También los ácidos grasos insaturados, como los ácidos linolénico y epoxilínolénico, participan en la

resistencia de ciertos cultivares de *Oryza sativa* contra *Pyricularia oryzae*; además forma después de ser atacada el ácido 9,12,13-trihidroxi-10-*trans*-15-*cis*-octadecadiénico con propiedades fungistáticas, que posee naturaleza de fitoalexina. En *Aegilops*, *Agropyrum* y *Triticum* la resistencia contra infecciones de *Puccinia* parece estar asociada con un alto contenido de fenoles en las hojas, en particular de ácido clorogénico. En las plantas de maíz (*Zea mays*) existe también un alto contenido de fenoles, como la umbeliferona y los ácidos p-hidroxibenzoico, vainillínico, siríngico, p-cumárico y ferúlico, que actúan en la resistencia contra micodestrucciones.

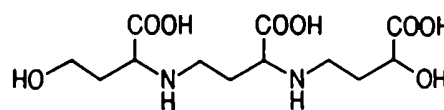
Además de las sustancias preformadoras de resistencia, cuya síntesis se intensifica después de una infección, también se conocen verdaderas fitoalexinas obtenidas de Gramíneas en su estadio más joven. En el caso de *Oryza sativa* se trata de diterpenos derivados de pimarano como las momilactonas A y B (Fig. 15) [CARTWRIGHT, 1981], los cuales se obtienen de plantas de arroz después de una infección con *Pyricularia oryzae*.

En la avena (*Avena sativa*) se observaron fitoalexinas con diferente estructura química, como la fuertemente fluorescente avenalúmina-I (Fig. 15) [MAYAMA, 1981].

También los factores de estrés abiótico provocan en las Gramíneas la formación y almacenamiento o liberación de determinados metabolitos. Ante la falta de hierro algunas Gramíneas forman quelantes, en el caso de *Hordeum* ácido mugineínico, y en el caso de la avena, ácidos avenínicos-A y -B (Fig. 16) [FUSHIYA, 1980]. Ante la falta de agua (sequía o suelo muy salino) determinadas Gramíneas producen grandes cantidades de osmoreguladores; se trata de aminoácidos como prolina, glutamina, acetilornitina y asparragina en *Puccinellia maritima* y glicinbetaina en las *Hordeae*.



Ácido mugineínico



Ácido avenínico-A

Figura 16

Un ejemplo de la interacción parásito-huésped sería el parasitismo de las especies de *Striga* que causan una peste agrícola muy seria sobre el sorgo. El primer estimulante natural de las semillas de las especies de *Striga* se aisló de las raíces de *Sorghum bicolor* [CHANG, 1986] y resultó ser un *p*-difenol simple con una cadena lateral alifática insaturada, fácilmente oxidable a la correspondiente *p*-quinona que es inactiva (Fig. 17). Desde el punto de vista de las especies de *Striga*, este compuesto es un mensajero ideal. Estaría en la forma activa de quinol cuando emerge de las raíces del sorgo, pero a medida que se va alejando de éstas gradualmente se oxidaría con el oxígeno del suelo y se volvería inactivo. En consecuencia sólo serán incitadas a germinar las semillas que están lo suficientemente cerca de la raíz del sorgo como para que la raíz del parásito se agarre a ella.

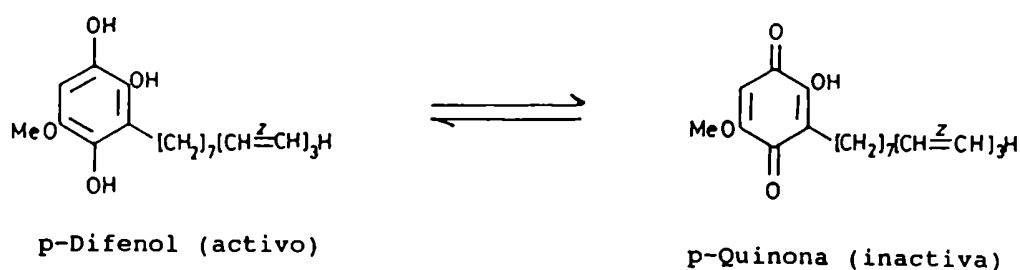


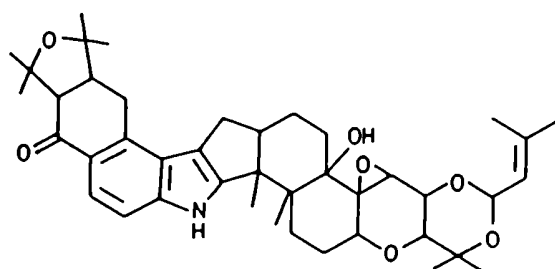
Figura 17

También se identificó el segundo mensajero de la interacción *Striga-Sorghum*, que actúa como inductor de haustoria con una estructura de quinona simple, la 2,6-dimetoxi-benzoquinona. Aparentemente esta sustancia se liberaría de la superficie de las raíces del huésped por acción enzimática y luego incitaría la formación de haustoria en el parásito.

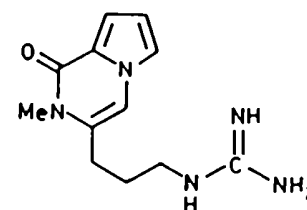
Ciertas poblaciones de gramíneas producen sustancias tóxicas para el ganado luego de ser infectadas por determinados microorganismos (interacción planta-microorganismo). La tembladera ("ryegrass staggers") es una enfermedad neurológica que afecta al ganado ovino y bovino y que frecuentemente en las zonas en que predomina el *Lolium perenne* como pastura. Los agentes tremorgénicos involucrados son las micotoxinas lolitrema B (Fig. 18) y estructuras relacionadas. Estas potentes neurotoxinas sólo son producidas en *L. perenne* si un hongo endofítico, el *Acremonium loliae*, infecta el pasto. La erradicación de este hongo de la planta sería deseable desde el punto de vista de la agricultura, ya que erradicaría una potencial amenaza para la ganadería.

Sin embargo, tal operación es problemática porque la presencia del hongo no sólo aumenta el vigor del pasto sino que también lo protege contra pestes provocadas por insectos. Rowan y col. [ROWAN, 1986] demostraron que la resistencia de la planta infectada al ataque por insectos se debe a que el endofito sintetiza un alcaloide novedoso, la peramina (Fig. 18).

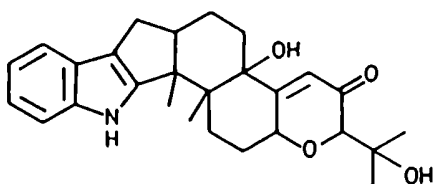
La peramina es de origen fúngico, ya que se detectó en el micelio de *A. loliae*. Biosintéticamente se postula su formación por ciclación de la prolina con arginina, mientras que la neurotoxina lolitrema B se originaría por otro camino. De cultivos de *A. loliae* y de *Lolium* infectado se aisló un indol isoprénico, la paxilina (Fig. 18), que es probablemente un precursor de la lolitrema B [WEEDON, 1987].



Lolitrema B



Peramina



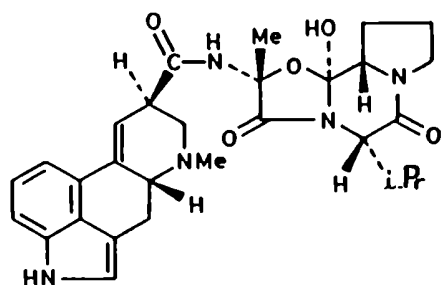
Paxilina

Figura 18

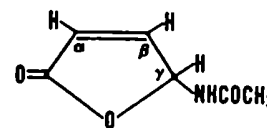
Otro grupo de micotoxinas, las corinotoxinas, se identificaron como los principios venenosos del *Lolium rigidum*, infectado por la bacteria *Corynebacterium rathayi*. La toxicidad se debe a la interacción de tres organismos distintos, ya que la infección bacteriana es introducida en la planta vía un nematode, *Anguina agrostis*, que transporta a la bacteria y produce una vesiculación de las semillas del pasto donde se multiplicará

posteriormente produciendo las toxinas que son muy venenosas para las ovejas. Las cornotoxinas son glicolípidos que contienen N-acetilglucosaminil-tunicaminiluracilo con unión amida con distintos ácidos grasos [FRAHN, 1984].

Los alcaloides del ergot, producidos por el hongo del ergot *Claviceps purpurea* que infecta al centeno, es uno de los grupos más conocidos de micotoxinas que fueron hallados por primera vez en la festuca alta (*Festuca arundinacea*) [LYONS, 1986]. El endofito fúngico es *Acremonium coenophialum*, y su infección en festuca alta causa varios síntomas tóxicos diferentes en el ganado de pastoreo, siendo uno el "pie de festuca" que consiste en una gangrena en las extremidades del animal llegando a veces a la pérdida de los cascos. La ergovalina (Fig. 19) resultó ser el principal alcaloide del ergot en la festuca infectada, siendo el contenido total de alcaloides entre 1,5 y 14 mg por kg de tejido vegetal. El origen fúngico de los alcaloides del ergot en festuca alta fue demostrado al obtener los mismos compuestos a partir de cultivos puros de *A. coenophialum*. Sin embargo, existen controversias sobre este tema ya que según Yates y col. [YATES, 1967] la toxicidad de esta festuca puede deberse al γ -acetamidobutenólido (Fig. 19) producido mediante *Fusarium nivale*.



Ergovalina



γ -Acetamidobutenólido

Figura 19

Todo lo expuesto indica que resulta de valor desarrollar un estudio concienzudo y a su vez comparativo de las distintas especies de *Festuca*. Lo realizado en esta Tesis es un aporte en este sentido, especialmente teniendo en cuenta la distinta problemática en los géneros tóxicos de Gramíneas y en particular entre las especies del género *Festuca*. Es por ello que resulta de importancia analizar química y toxicológicamente a ambas especies, *Festuca argentina* y *Festuca hieronymi*, de las cuales sólo se conocían descripciones agro-botánicas.

CAPÍTULO 4

LOS LIGNANOS NATURALES

INTRODUCCIÓN

El término lignano fue utilizado originariamente por Haworth [HAWORTH, 1936] para describir a un grupo de productos naturales los cuales, al menos formalmente, se formarían por unión de ciertos derivados de *n*-propilbenceno a través de los átomos de carbono beta de las cadenas laterales. Por otro lado, los dímeros de dos unidades de C_6-C_3 unidos de cualquier forma, distinta de $\beta-\beta'$, se denominan neolignanos [GOTTLIEB, 1972]. Es por ello que actualmente se los considera dentro de la familia de los fenilpropanos.

Los anillos aromáticos de los lignanos naturales están siempre oxigenados con grupos hidroxilo, metoxilo, o metilendioxilo, en general en posición *para* y *meta*; son muy raros los casos de monosustitución. Además, es común que ambos anillos aromáticos posean los mismos sustituyentes, aunque hay casos de sustitución asimétrica.

En este amplio grupo de compuestos las cadenas laterales pueden tener distinto grado de oxidación, y en algunos casos, además, estar modificadas por ciclación a derivados de tetrahidrofurano o tetrahidronaftaleno.

También, los hidroxilos fenólicos y alicíclicos pueden estar glicosidados. Son muy comunes los diglucósidos y menos frecuentes los mono-, tri- y tetra-glicósidos.

Los lignanos están ampliamente distribuidos en Angiospermas y Gimnospermas, pero no en criptógamas. Massanet y col. [MASSANET, 1989] hicieron una revisión sobre los lignanos indicando su presencia en especies pertenecientes a setenta familias diferentes. Se aislaron de todas las partes de las plantas; son constituyentes importantes en los árboles de Gimnospermas y Angiospermas, cuya corteza y exudados resinosos podrían ser una buena fuente de lignanos.

Posteriormente se detectaron lignanos en mamíferos, incluido el hombre, y se ha sugerido una posible actividad hormonal [SETCHELL, 1980] aunque otros autores sugieren que son de origen dietario o productos metabólicos de la microflora intestinal [AXELSON, 1982].

CLASIFICACIÓN DE LOS LIGNANOS

Todos los lignanos contienen uno o más carbonos asimétricos y son

ópticamente activos. Como la estereoquímica de muchos de ellos no se estableció hasta mucho tiempo después de su aislamiento, en general se designaron con nombres triviales.

Los lignanos se pueden clasificar en base a la estructura formada por las cadenas laterales de las dos unidades combinadas de propilbenceno en cinco grupos principales: 1,4-diarilbutanos, 2,3-dibencilbutirolactonas, tetrahidrofuranos, tetrahidrofurofuranos y 4-ariltetrahidronaftalenos (Fig. 20).

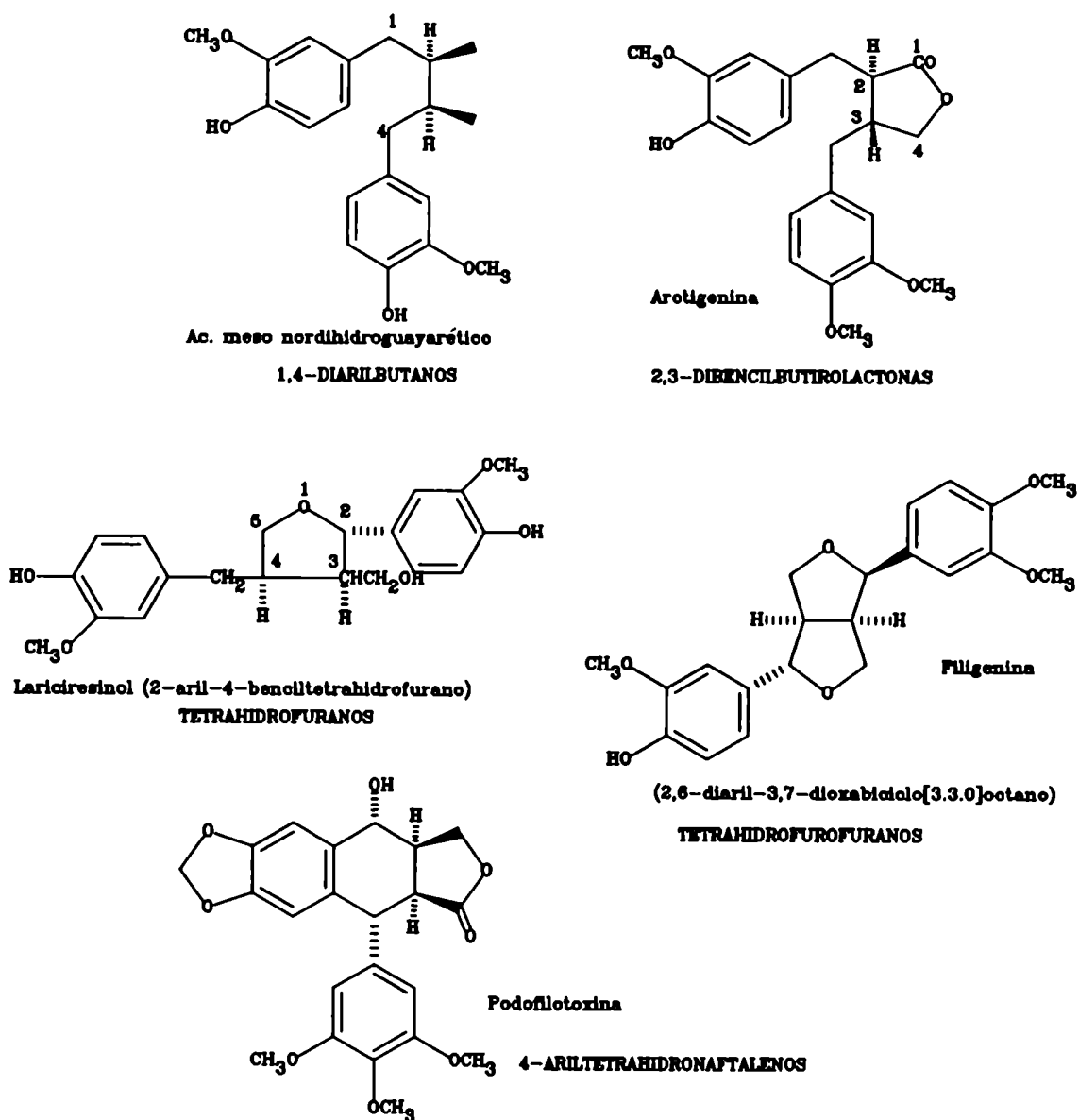


Figura 20

NOMENCLATURA

Debido a la gran variedad de estructuras presentes en esta familia de compuestos, desde hace varias décadas se está buscando una sistematización y nomenclatura para los lignanos.

En la década del sesenta, Freudenberg y Weinges [FREUDENBERG, 1961] intentaron realizar una comprensible y simple sistemática y nomenclatura de lignanos. Para ello los subdividieron en dos clases: los lignanos (I) y los ciclolignanos (II) (Fig. 21).

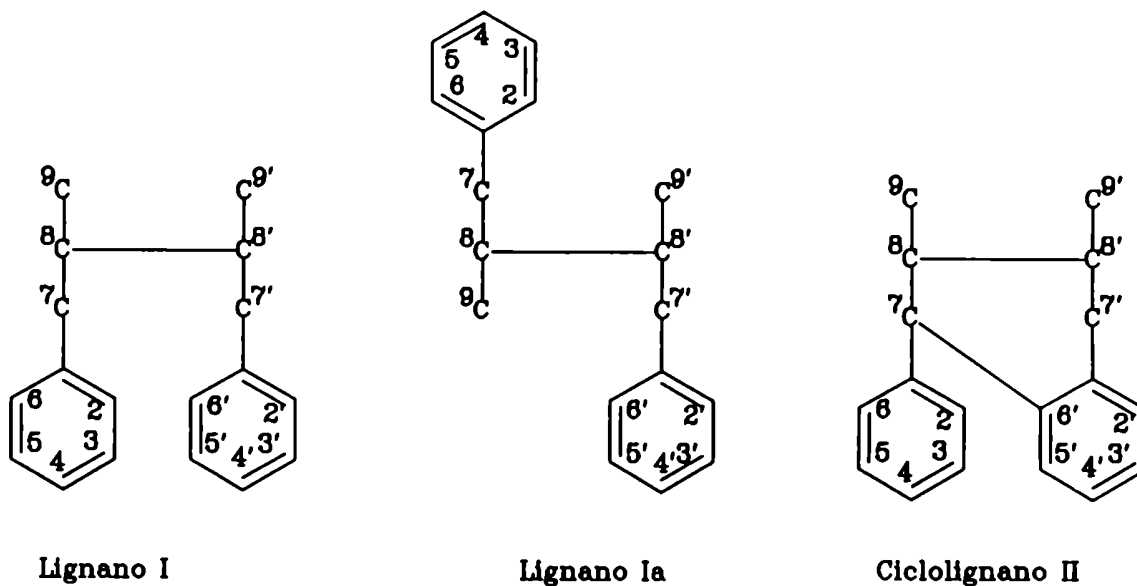


Figura 21

Ambas unidades de C_6-C_3 correspondientes cada una a la mitad de la molécula se escriben verticalmente una al lado de la otra. Si en un lignano (I), debido a la formación de éter o lactona, una mitad de la molécula debe girar por el eje 8-8', se obtendrá la forma antiparalela (Ia). Los ciclolignanos (II) siempre deberán escribirse de manera tal que el núcleo bencénico que forma parte del sistema tetrahidronaftaleno esté a la derecha. Así, puede ser mantenida la numeración común en los núcleos bencénicos y se numera el núcleo bencénico hacia el resto y en la mitad derecha en la misma forma, pero con primas. En la numeración de una lactona (-ólido), el grupo carbinol tiene prioridad. Si en el lignano hay un anillo etéreo se debe girar la mitad de la molécula a través del eje 8-8', en particular se gira la mitad

izquierda y se hacen los cambios necesarios de posición de sustituyentes del carbono quiral para mantener la configuración.

Actualmente se conoce una propuesta [IUPAC, 1989] para una nomenclatura sistemática de lignanos pero aun no ha sido internacionalmente aceptada. Según esta propuesta, los lignanos tipo dibencilbutirolactonas se considerarían como derivados de lignan-9,9'-ólidos, y los lignanos tipo furofuranos como derivados de 7,9': 7',9'-diepoxilignanos (Fig. 22). Así, el sistema de numeración sería similar para las dos unidades de fenilpropano, y esto tendría la ventaja de permitir una comparación directa entre distintas clases de estructuras de lignanos. En esta Tesis, usaremos esta numeración para los lignanos, pero se los nombrará sistemáticamente tomando como base el 3,7-dioxabicyclo[3.3.0] octano, siguiendo la tendencia actual.

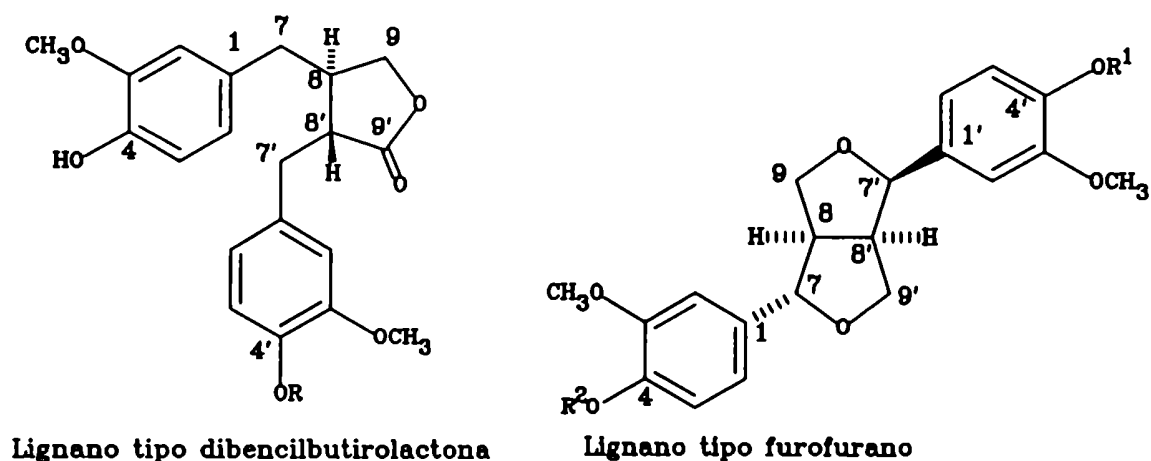


Figura 22

LIGNANOS DERIVADOS DE LOS TETRAHIDROFUROFURANOS

Los 2,6-bisaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octanos comprenden uno de los grupos más numerosos de lignanos. En general tienen los dos grupos arilo idénticos (simétricos), aunque también se aislaron no simétricos. La sustitución en los arilos puede ser: 3-metoxi-4-hidroxilo, 3,4-dimetoxilo, 3,4,5-trimetoxilo, 3,4-metilendioxilo, 3,5-dimetoxi-4-hidroxilo y, menos frecuentemente, 4-hidroxilo y 3,4-dihidroxilo.

El ligbalinol (Fig. 23), aislado en la década de los ochenta [KOBAYASHI, 1983], fue el primer lignano natural que presentó anillos aromáticos monooxigenados. Luego en esta década, Cuenca y col. [CUENCA, 1991] hallaron un

análogo del pinoresinol (Fig. 23) de *Mikania saltensis* con uno de los arilos monooxygenado.

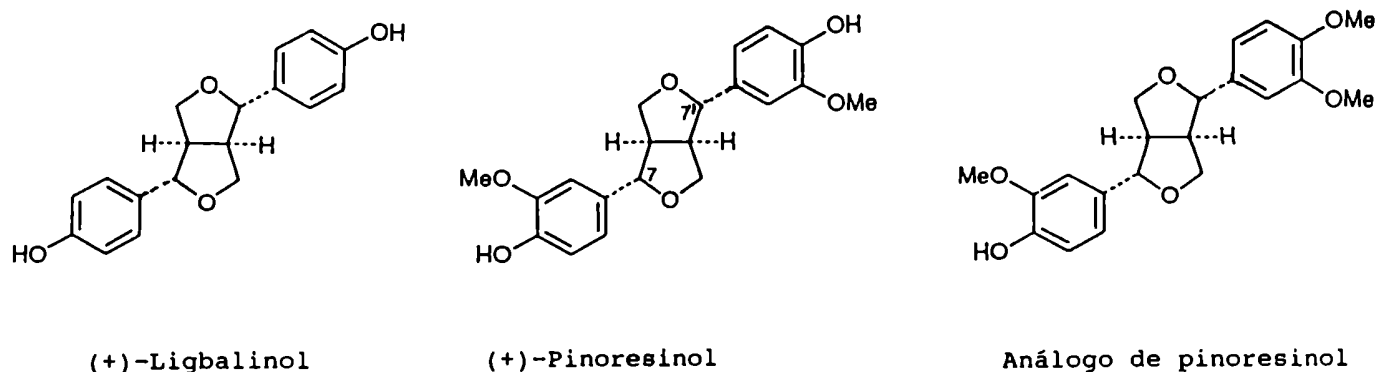
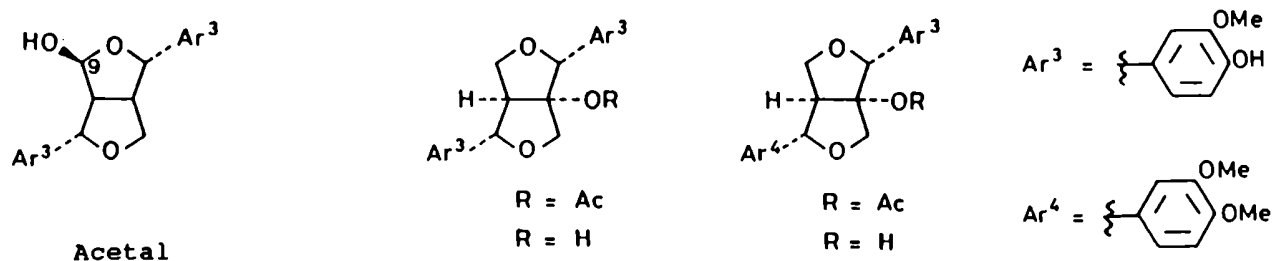


Figura 23

Los tetrahidrofuranos están fusionados en *cis* para dar el bíciclo, pero los arilos que los sustituyen en C-7 y C-7' pueden adoptar una disposición *ecuatorial*, *axial* (serie *dia*) o estar uno *axial* y otro *ecuatorial* (series *epi*).

Además el bíciclo puede estar oxigenado en C-8' con un grupo hidroxilo o acilo o en C-9 con un hidroxilo dando lugar a un acetal. Así, algunos nuevos miembros de este grupo incluyen un acetal (Fig. 24) encontrado en la parte aérea de *Lonicera hypoleuca* [KHAN, 1985], y los derivados 1'-oxigenados de pinoresinol de *Olea europea L.* y *O. africana* Mill [TSUKAMOTO, 1984] (Fig. 24).



Derivados 1'-oxigenados de pinoresinol

Figura 24

También se hallaron lignanos glicosidados tanto en los hidroxilos fenólicos como en los del bíciclo. El monosacárido más común es la glucosa. Se han encontrado diglucósidos como (+)-pinoresinol-di-O-β-D-glucopiranosido, (+)-medioresinol-di-O-β-D-glucopiranosido (Fig. 25), lirioidendrina

((+)-siringaresinol -di-O-β-D-glucopiranósido) (Fig. 25) [DEYAMA, 1983] y

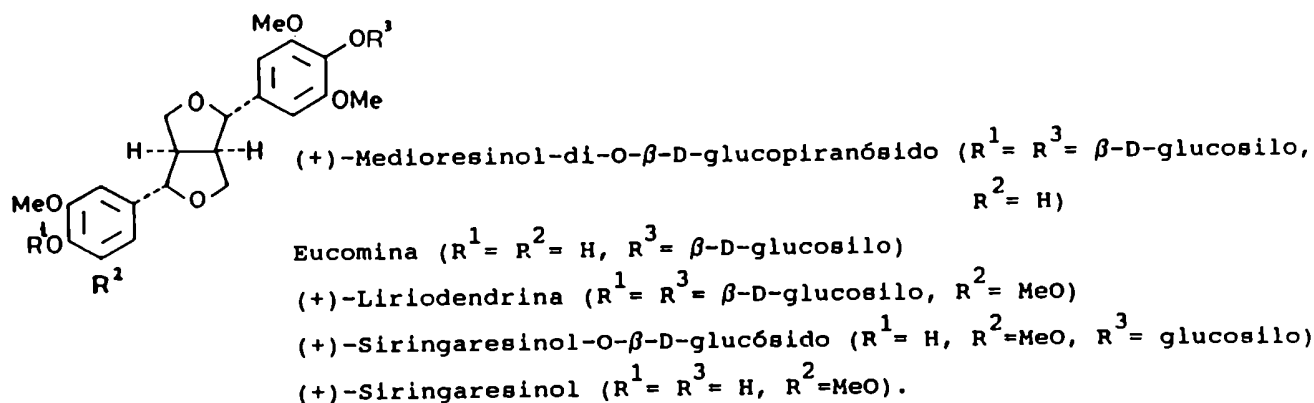
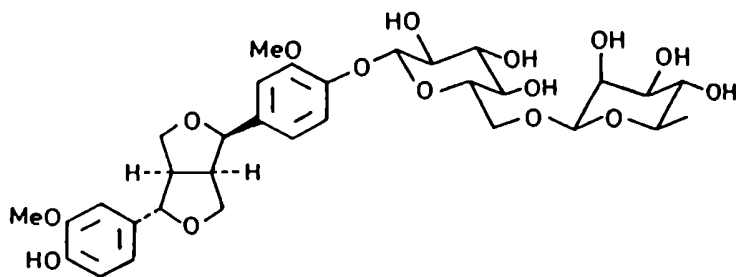
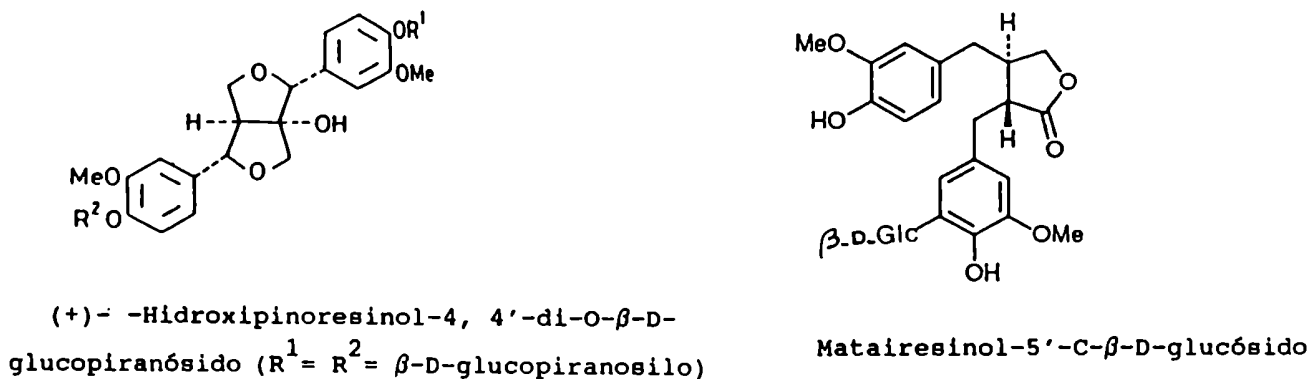


Figura 25

(+)-1'-hidroxipinoresinol-4,4'-di-O-β-D-glucopiranósido [DEYAMA, 1985] (Fig. 26) de *Eucommia ulmoides* Oliv.



(+)-Epipinoresinol-4'- (O-α-L-ramnopiranosil-(1 → 6)-O-β-D-glucopiranósido

Figura 26

No tan distribuidos se hallan los monoglicósidos tales como (+)-siringaresinol-O- β -D-glucopiranosido, pinoresinol-O- β -D-glucopiranosido, eucomina ((+)-medioresinol-4'-O- β -D-glucopiranosido) registrada por primera vez de *Eucommia ulmoides* Oliv [DEYAMA, 1985], y los monoglicosidos con disacáridos como (+)-epipinoresinol-4'-(O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopiranosido [BATHIROV, 1985] (Fig. 26).

Recién en 1986 se identificó por única vez un C-lignano natural de *Trachelospermum asiaticum* como matairesinol-5'-C- β -D-glucósido [ABE, 1986] (Fig. 26).

El primer aislamiento de lignanos glicosidados con tri- y tetrasacáridos lo realizó J. Kinjo y col. [KINJO, 1991], siendo en todos los casos la aglicona el siringaresinol (Fig. 26).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS LIGNANOS

Durante las investigaciones fitoquímicas se encontraron algunas estructuras nuevas de lignanos pero en general sólo con variaciones mínimas de las ya conocidas. En años recientes se dio más énfasis a la actividad biológica de los lignanos, y se han hecho considerables esfuerzos sintéticos, especialmente en el área de la podofilotoxina (Fig. 20) y compuestos relacionados que incluyen sustancias anticancerígenas de uso clínico.

El ácido meso-nordihidroguayarático (Fig. 20) se usó durante muchos años como antioxidante de grasas animales en sustancias alimenticias, pero actualmente está prohibido para este propósito dado que se sospecha que induce quistes renales y además inhibe un gran número de enzimas, entre ellas las lipogenasas y fenoloxidasas.

El pinoresinol (Fig. 23) y el (+)-pinoresinol- β -D-glucósido mostraron actividad inhibitoria contra cAMP-fosfodiasterasa in vitro, y el pinoresinol-di-O- β -D-glucósido actividad antihipertensiva [KITAGAWA, 1984].

También se usan extractos de *Eleutherococcus*, que contienen lignanos y glicósidos de lignanos, en fármacos que inhiben la adicción al alcohol en humanos, administrándolos a través de bebidas alcohólicas [MUDZHIRI, 1988].

Mac Rae y Towers publicaron una actualización sobre las actividades biológicas de lignanos [MAC RAE, 1984]. Estas actividades son muy variadas e incluyen propiedades antitumorales, antimicóticas y antivirales, así como la habilidad de inhibir específicamente ciertas enzimas y ser tóxicos a hongos,

Insectos e invertebrados.

Los lignanos juegan un importante rol biológico a nivel ecológico, mediando en las relaciones planta-hongo, planta-planta y planta-insecto, y también a nivel molecular, interrumpiendo la síntesis de ADN y el transporte de nucleótidos e inhibiendo enzimas. Por ejemplo se demostró que el (+)-siringaresinol (Fig. 26) era el responsable de la actividad citotóxica en *Passerina vulgaris* y que el pinosresinol (Fig. 23) era el piscicida activo presente en *Stellera chamaejasme*.

Por tratamiento con actinomicina D de un cultivo de células en suspensión de *Vigna angularis*, se aisló el ligbalinol (Fig. 23) que se produjo como metabolito de stress [KOBAYASHI, 1983].

BIOSÍNTESIS DE LIGNANOS

Se cree que los lignanos se formarían por un proceso de acoplamiento oxidativo de tipo fenólico análogo al propuesto para la biosíntesis de ligninas, pero siendo esencialmente dímeros del alcohol cinámico. La posterior ciclación y otras modificaciones crean un amplio rango de diferentes tipos de estructuras. Así, *Forsythia intermedia* sintetiza los lignanos tipo dibencilbutirolactona arctigenina y matairesinol, y los lignanos del tipo furofurano filigenina y epipinosresinol, conjuntamente con sus O-glucósidos. Experimentos de marcación con fenilalanina y ácido ferúlico (Fig. 27) usando vástagos de *F. intermedia* mostraron que estos compuestos son buenos precursores de estos lignanos y que el matairesinol y el epipinosresinol se incorporan en los correspondientes metiléteres de arctigenina y filigenina [RAHMAN, 1990a].

Se estudió el grado de oxidación en la cadena lateral de la unidad de acoplamiento del monolignol marcando el alcohol (2'-¹⁴C, 1'-³H)-coniferílico y se corroboró que los lignanos se originarían por un acoplamiento oxidativo de dos unidades de alcohol coniferílico, más que de dos unidades de ácido ferúlico o de aldehído coniferílico (Fig. 27).

Los lignanos naturales son normalmente enantioméricamente puros, y por lo tanto, debería estar actuando un proceso de acoplamiento controlado estereoquímicamente más que un acoplamiento al azar por radicales libres. Se ha registrado una buena evidencia experimental de esta suposición [UMEZAWA, 1990] ya que por incubación de alcohol coniferílico con peroxidasa de rábano

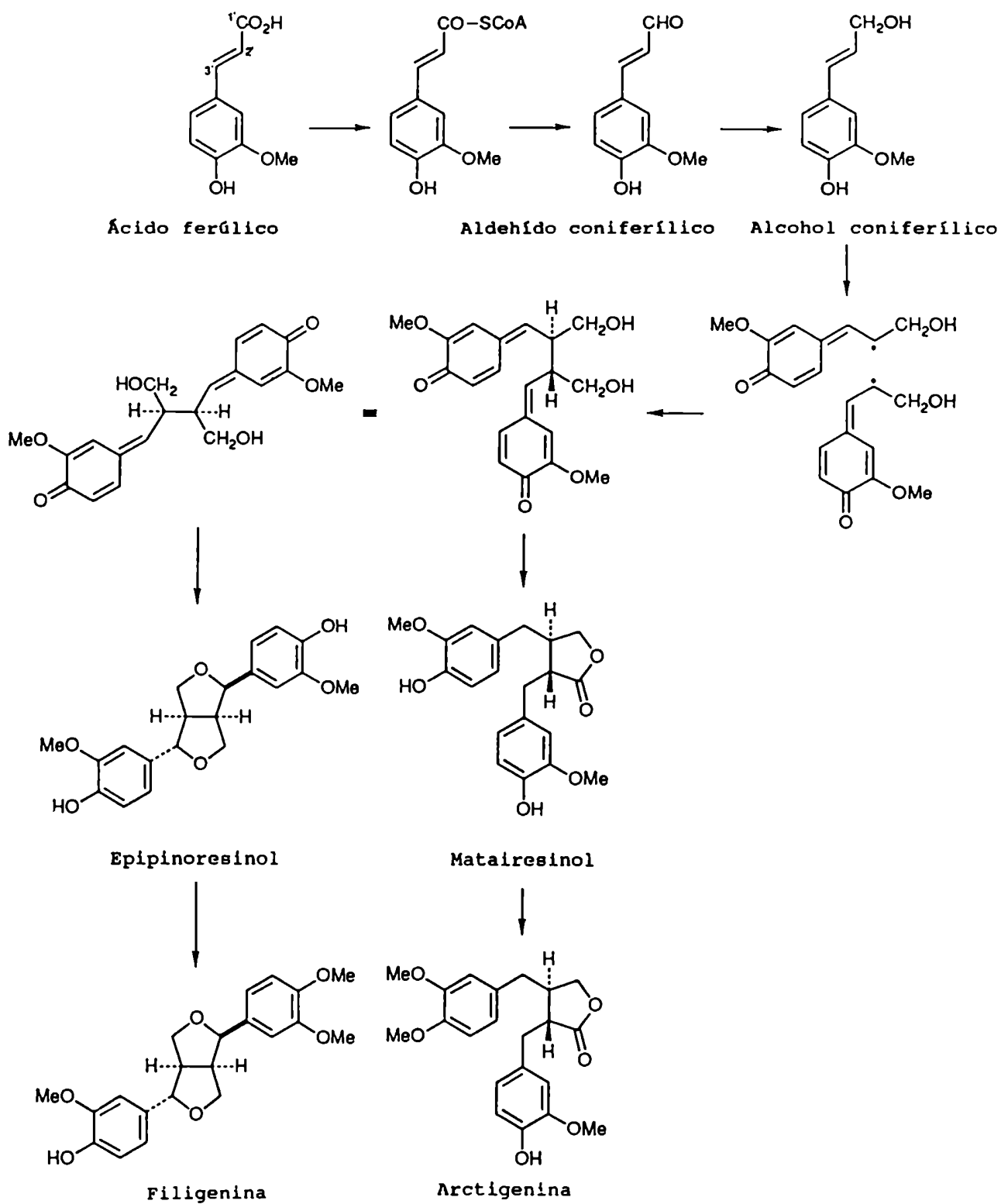


Figura 27

picante en presencia de agua oxigenada se obtuvo (+)- y (-)-pinoresinol en relación 1:1. Una preparación cruda de enzimas, libre de células, de *Forsythia suspensa* también produjo pinoresinol racémico en presencia de agua oxigenada, pero el pinoresinol natural de *F. suspensa* es el isómero dextrorrotatorio. El alcohol coniferílico marcado se convirtió en pinoresinol marcado en retoños de *F. suspensa*, aunque la relación (+)/(-) aumentaba con el tiempo de metabolismo. Esto podría indicar un acoplamiento no específico seguido de pérdida del isómero (-), o conversión del (-)-isómero al (+)-pinoresinol. Sin embargo se mostró que administrando fenilalanina marcada sólo se obtenía (+)-pinoresinol, lo cual implicaría que la biosíntesis del lignano debe estar compartimentalizada e involucrando un mecanismo de acoplamiento estereoespecífico, mientras que el alcohol coniferílico administrado podría acoplarse por peroxidasas no específicas.

DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS LIGNANOS

Espectrometría de masas

Se analizarán las fragmentaciones de lignanos que tienen dos anillos de tetrahidrofuranos fusionados (tetrahidrofurofurano). La estereoquímica de los sustituyentes arílicos en C-7 y 7' causa poca diferencia en el patrón de fragmentación, el cual puede sin embargo ser usado para definir el esqueleto carbonado de las moléculas.

Esto lo corroboró Pelter [PELTER, 1967] cuando analizó y comparó los EM de la eudesmina (serie *normal*) y del isómero correspondiente a la serie *iso*, o sea la epiudesmina, el primer lignano corresponde a la serie *normal* y el otro a la serie *iso*. Si bien se observaron algunas diferencias de intensidades entre ambos espectros, los patrones generales fueron tan similares que no se podría hacer una asignación estereoquímica segura basándose en ellos.

Muchos de los iones que se producen en los EM de estos lignanos son similares a los hallados en los lignanos tetrahidrofuránicos [PELTER, 1966], aunque provendrían de caminos más indirectos. Así, si se aplican las fragmentaciones i y ii se generarían las especies IV a VI (Fig. 28).

Si la molécula se rompe por el camino i a partir del ión molecular I, se produce una fisión con formación de los fragmentos II y IV, junto con el aldehído $ArCHO^+$. Por posterior pérdida de hidrógeno de este último se obtiene

el catión acilio ArCO^+ , el cual genera los fragmentos usuales de estas especies.

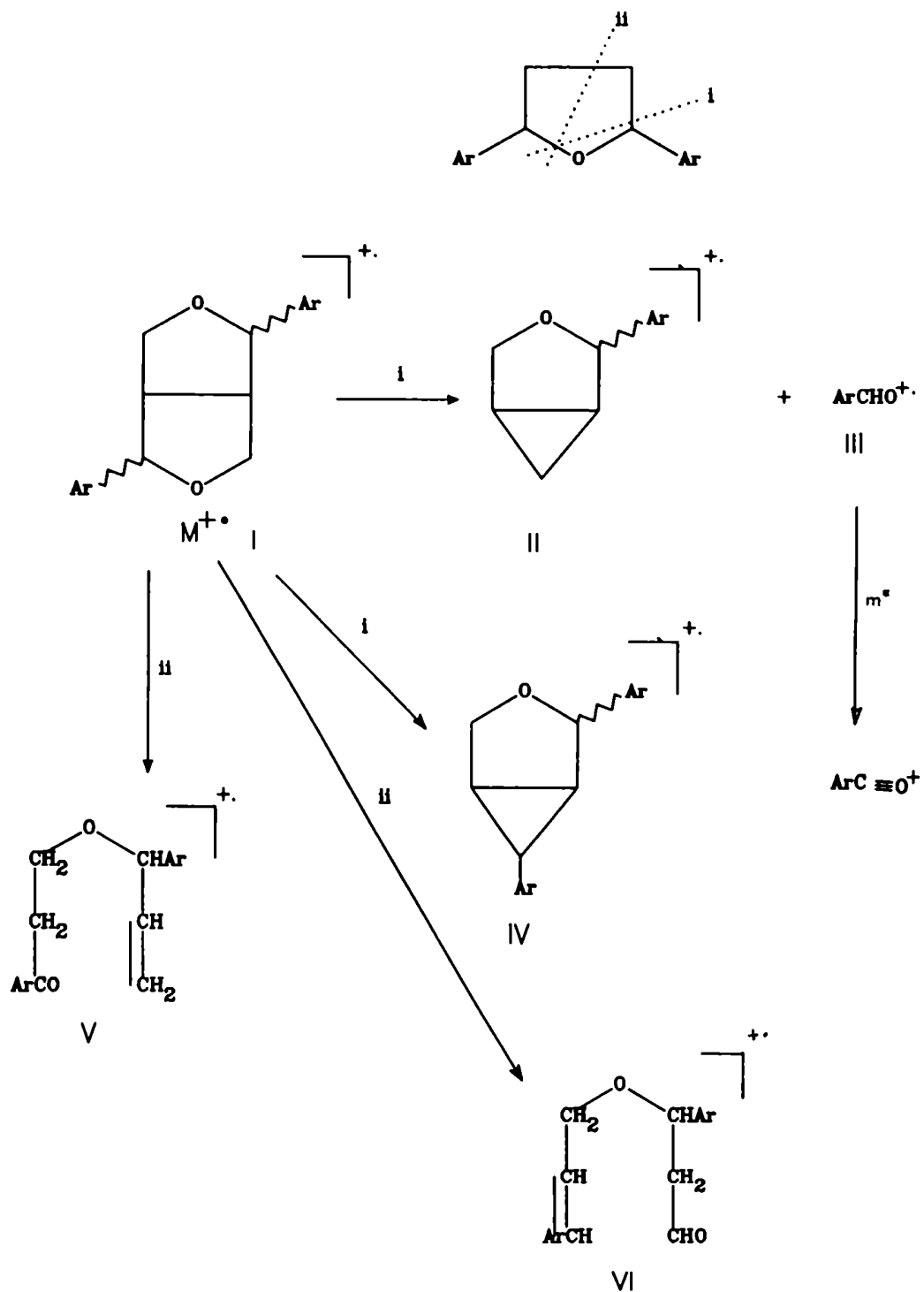


Figura 28

Si se sigue el camino ii, no ocurre fragmentación, pero el ión molecular toma las formas V y VI.

La fragmentación de V por los caminos a, b y c (Fig. 29) conduce en forma directa a los picos prominentes.

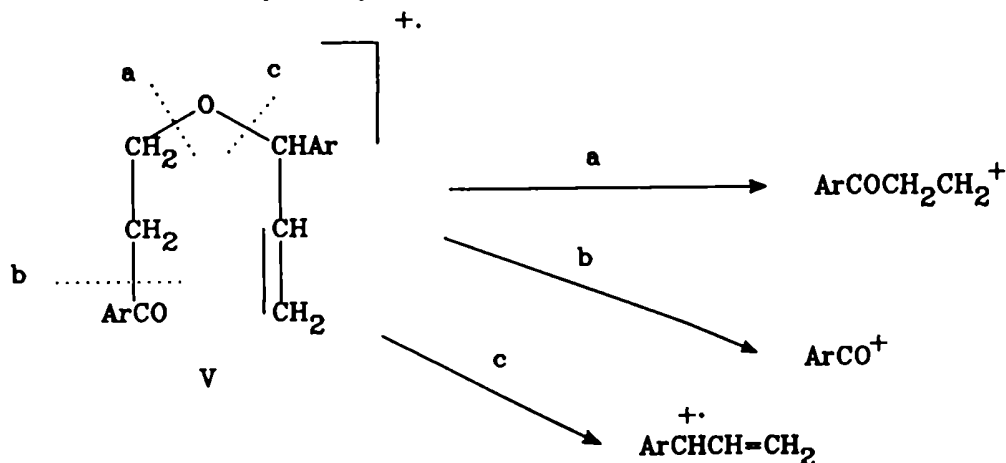


Figura 29

Los picos metaestables indicarían que el ión $\text{ArC}_3\text{H}_4\text{OH}^+$ proviene del ión molecular V, y a su vez se fragmenta perdiendo 17 uma (Fig. 30).

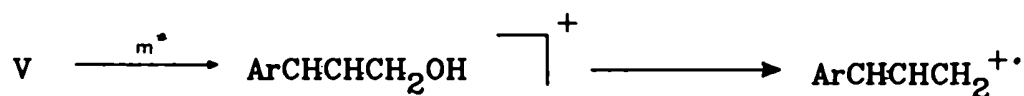


Figura 30

En los espectros también aparece la pérdida de una uma a partir del ión molecular, probablemente con la forma VI.

Una fragmentación de cierta importancia es la que conduce al ión ArCH_2^+ y en base al ión metaestable se estableció que se formaba directamente a partir del M^+ (Fig. 31).

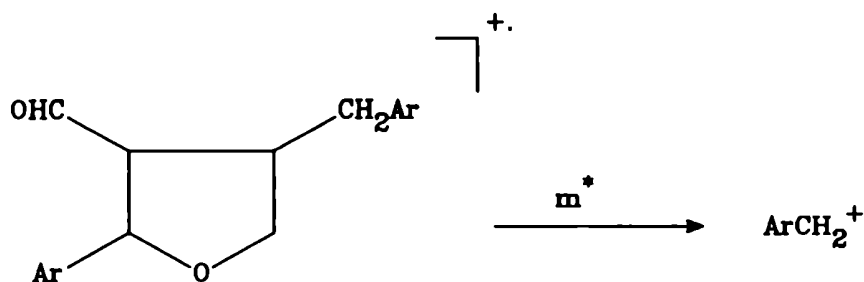


Figura 31

Otros picos significativos son ArH^+ , y en el caso de tener un anillo aromático con función oxigenada en la posición 4, el ión resonante VII que provendría de II por pérdida de un átomo de hidrógeno (Fig. 32).

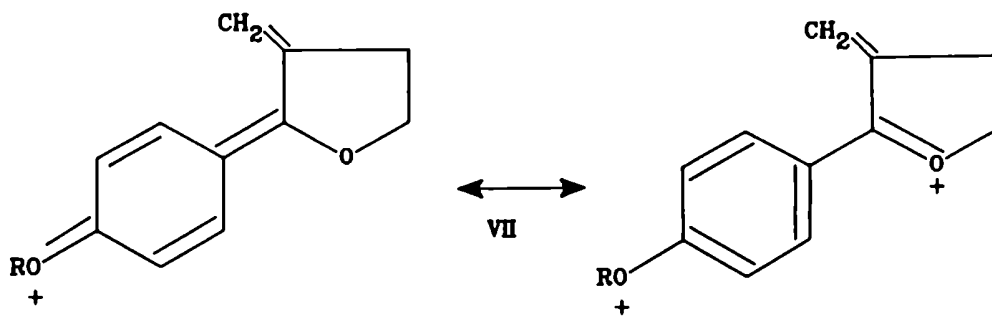


Figura 32

Por otro lado, cuando se analizan directamente los glicósidos de lignanos por EM de impacto electrónico se obtiene en general el espectro de la correspondiente aglicona [CHIBA, 1979].

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica

Pelter y col. [PELTER, 1976] analizaron los métodos que habían sido usados para determinar las estructuras de todos los isómeros *epi* de lignanos conocidos que poseen dos grupos arilo distintos y llegaron a la conclusión que en ningún caso habría una prueba satisfactoria de estructura.

En general, por combinación de métodos ópticos, de espectroscopía de 1H -RMN y EM se puede establecer [ATAL, 1967; PELTER, 1967] la estructura del esqueleto 2,6-diaril-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, aun cuando los dos grupos arilos son distintos.

Sin embargo, cuando los arilos son distintos y el compuesto pertenece a la serie *epi* es difícil decidir cuál de los arilos está en posición *axial* y cuál en posición *ecuatorial*. Esto ocurre debido a que ambos grupos arilos están generalmente sustituidos con grupos alcoxilo y son de naturaleza muy similar. El problema trató de resolverse mediante espectroscopía 1H -RMN y puede dividirse en dos partes:

- i) Decidir qué protón bencílico (H-7 e H-7') es *axial* y cuál es *ecuatorial*.
- ii) Asignar el grupo arilo asociado con cada átomo de hidrógeno bencílico.

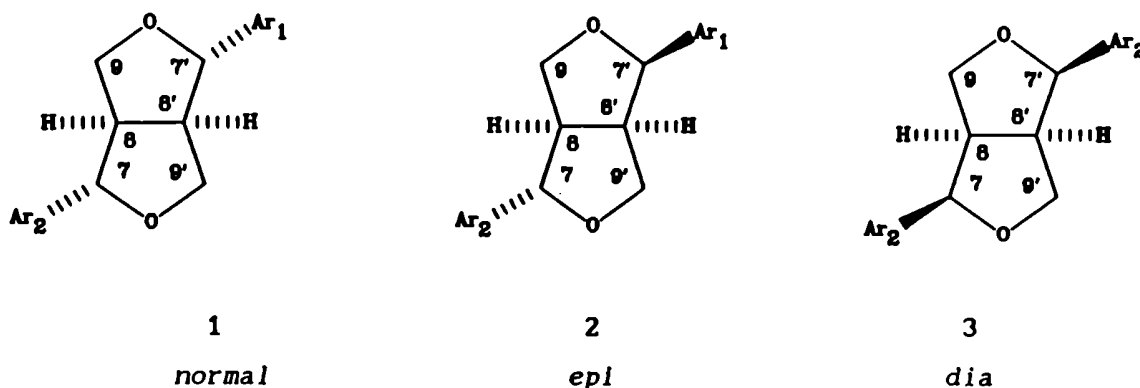
- i) Se usaron dos métodos para asignar la estereoquímica de los hidrógenos

bencílicos. Uno se basó en el trabajo de Ludwing y col. [LUDWING, 1974] quienes compararon los valores de desplazamiento químico (δ) y de constante de acoplamiento (J) de los protones bencílicos (H-7 e H-7') de pinoresinol (δ 4,72, d, J 4,6 Hz) y epipinoresinol (δ 4,86, d, J 5 Hz; δ 4,44, d, J 7 Hz) y argumentaron que el hidrógeno a campos bajos en el epipinoresinol era axial, como el correspondiente hidrógeno en el pinoresinol, aunque no compararon con el diapinoresinol.

También [PELTER, 1976] se compararon los valores de los hidrógenos bencílicos de los tres isómeros de la serie sesamina (a), y de la serie eudesmina (b) [ATAL, 1967].

En la tabla 1 se observa que las series *diecuatorial* y *diaxial* son más semejantes entre ellas que respecto a la serie *epi*. Además la asignación de la estereoquímica a los hidrógenos bencílicos en los compuestos *epi* no puede hacerse por simple comparación [PELTER, 1976]. Por otro lado, las constantes de acoplamiento son tan similares en las series *diecuatorial* y *diaxial* que no permiten diferenciar la estereoquímica.

Tabla 1: Valores de $^1\text{H-RMN}$ de los protones bencílicos de 2,6-diaril-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octanos.

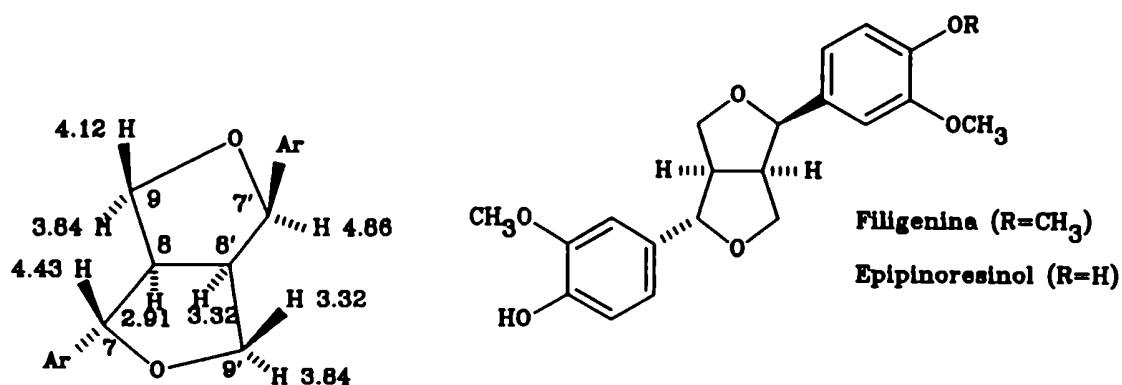


a- Serie sesamina: $\text{Ar}_1 = \text{Ar}_2 = 3,4\text{-dimetoxifenilo}$.

b- Serie eudesmina: $\text{Ar}_1 = \text{Ar}_2 = 3,4\text{-metilendioxfenilo}$.

Lignano	1a	2a	3a	1b	2b	3b
δ	4,75	4,45-4,85	4,90	4,67	4,36-4,76	4,86
J (Hz)	4,0	7,0 5,5	5,0	4,6	6,7 -5,0	5,1

Los compuestos de la serie *epi* son anómalos al mostrar un hidrógeno bencílico a campos altos. Estos autores [PELTER, 1976] sugirieron que esta característica sería diagnóstica de los compuestos *epi* y que sería el resultado de un efecto directo de la anisotropía del campo de un grupo arilo *axial* en la posición 7'. Este análisis se apoya en el hecho que la serie *epi* es la única en la cual el protón bencílico está cerca de un grupo arilo *axial* en el anillo opuesto (Fig. 33). En la serie *diecuatorial* ambos grupos arilo poseen disposición *ecuatorial*, mientras que en la serie *di axial* no hay hidrógeno bencílico *axial* para ser influenciado. En consecuencia, en los compuestos de la serie *epi* el hidrógeno que resuena a campos altos es el *axial*, resolviéndose así el problema de asignar la estereoquímica de C-7 y C-7'.



Ar= 3-metoxi-4-hidroxifenilo

Desplazamientos químicos de los hidrógenos del anillo tetrahidrofurofuránico.

Figura 33

El segundo método para asignar la estereoquímica fue propuesto por Pelter y col. [ATAL, 1967] y está basado en el uso de modelos. Estos muestran que un grupo arilo *axial* está muy cerca del hidrógeno *axial* del grupo metileno del ciclo opuesto, o sea que un grupo arilo *axial* en C-7' afectará al H-9 *axial* y un grupo arilo *axial* de C-7 afectará al H-9 *axial*. El resultado esperado sería un corrimiento del hidrógeno *axial* a mayor campo, lo cual se comprobó en varias series, tales como eudesmina, sesamina y gmelinol. Además en todos los casos el hidrógeno bencílico que resonaba a campos mayores fue el *axial* (H-7), en concordancia con el análisis anterior.

Recién en esta década Rahman y col. [RAHMAN, 1990] demostraron mediante los espectros de resonancia magnética nuclear protónica con diferencia de efecto nuclear de Overhauser (^1H -RMN dif. NOE) de la (+)-filigenina y del (+)-epipinoresinol (Fig. 33), la necesidad de revertir las asignaciones anteriores para los desplazamientos químicos de los hidrógenos *axial* y *ecuatorial* del C-9 de los lignanos furofuránicos que contienen un grupo arilo *ecuatorial* y uno *axial* (serie *epi*).

Así, al hacer el espectro ^1H -RMN con dif. NOE del epipinoresinol (CDCl_3 , 250 MHz) e irradiar el H-7 *axial* se observaron señales con NOE a δ 4,12 (H-9) y 3,32 (H-9') y viceversa, estableciéndose así una relación *ecuatorial* entre estos protones. Análogamente, al irradiar el H-7' *ecuatorial* se observó efecto NOE a δ 2,91 (H-8), 3,84 (H-9 e H-9') lo que los vincula *ecuatorialmente*. De esta manera se puede fijar la geometría de cada hidrógeno (Fig. 33).

ii) Se han usado dos métodos para decidir qué grupo arilo es adyacente a cada hidrógeno bencílico.

Un método confiable se basa en que cuando hay un grupo hidroxilo en posición 4 en un arilo la formación del anión, o su acetilación, produce en el espectro de ^1H -RMN un desplazamiento de la señal debida al hidrógeno bencílico correspondiente. La desventaja de este método es que está limitado a compuestos que posean un grupo fenólico apropiado.

Otro método más general [NISHINO, 1973] utiliza reactivos de desplazamiento de europio; se considera que el anillo en que se producen los corrimientos mayores para los hidrógenos aromáticos y grupos sustituyentes se debe asociar con el hidrógeno bencílico que sufre el corrimiento más grande. Se comprobó que esta premisa no es siempre cierta ya que no tiene en cuenta que la estereoquímica de las posiciones bencílicas también afecta a dichos corrimientos.

Así, no pudo encontrarse una solución general al problema ii) mediante el uso de espectroscopía ^1H -RMN. Por eso, Pelter y col. [PELTER, 1976] utilizaron la espectroscopía de ^{13}C -RMN para tratar de sistematizar las posiciones relativas de los grupos arilo. Al comparar las asignaciones de distintas series de lignanos observaron que los valores de los desplazamientos químicos de las posiciones 1 y 1' de los anillos aromáticos dependían en parte de la naturaleza de los sustituyentes y principalmente de la estereoquímica de la posición bencílica; así en general el C-1 correspondiente a un grupo arilo *axial* resuena a campos mayores que uno *ecuatorial*. Además, los desplazamientos

de los carbonos del ciclo resultaron sensibles a cambios estereoquímicos en C-7 y C-7' pero no a cambios en la naturaleza del grupo arilo.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono trece

La espectroscopía de ^{13}C -RMN ha jugado un rol muy importante en la elucidación estructural y asignación de la estereoquímica de los lignanos, y ha contribuido también a la revisión de algunas estructuras que se postularon a partir de la limitada información obtenida de los datos de EM y ^1H -RMN.

Sin embargo, recién en 1985 Agrawal y Thakur [AGRAWAL, 1985] realizaron una compilación sistemática de datos de desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de lignanos. Esta podría ser una de las razones por las cuales varias publicaciones relacionadas con el aislamiento e identificación de lignanos han ignorado el análisis de los espectros de ^{13}C -RMN a pesar de su importancia diagnóstica.

En particular, la espectroscopía de ^{13}C -RMN ha probado ser muy útil para determinar la estructura y estereoquímica de los lignanos derivados de 3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octanos.

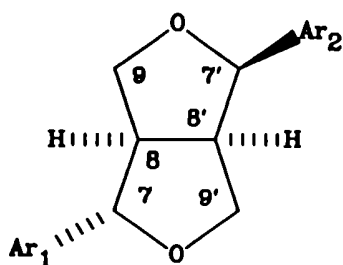
Los desplazamientos químicos de C-1 y C-1' son característicos de la estereoquímica de la unión al esqueleto básico y algo sensibles a cambios en los sustituyentes de los anillos aromáticos [CHIBA, 1980]. Así, los desplazamientos químicos (en CDCl_3) [PELTER, 1976] del C-1 de 3,4-dimetoxifenilo (grupo veratrilo), 3,4-metilendioxifenilo (grupo piperonilo), 3,4,5-trimetoxifenilo y 3-metoxi-4-hidroxifenilo (grupo guayacilo) en posición *ecuatorial* están en el rango de 133,4 - 134,0, 134,9 - 135,6, 136,6 - 136,7 y 132,0 - 133,0 ppm (132,2 - 132,3 ppm en DMSO-d_6) respectivamente, mientras que para los correspondientes sustituyentes *axiales*, éstos aparecen a 130,8 - 131,4, 132,6, 134,1 y 129,5 ppm (en DMSO-d_6) [RAHMAN, 1990b]. De esta manera, se observa un aumento promedio en la protección de 2,3-3,0 ppm en C-1 al pasar de un grupo arilo *ecuatorial* a *axial*; este criterio puede usarse para establecer la estereoquímica de ambos grupos arilo en lignanos de la serie *epi*.

Los desplazamientos químicos del C-7, C-7', C-8, C-8', C-9 y C-9' también dependen de la estereoquímica de la molécula pero no de la naturaleza de los grupos arilo. En los lignanos con ambos grupos arilos orientados *ecuatorialmente*, estos átomos de carbono resuenan en los rangos 85,3-85,9,

53,7-54,4 y 71,3-72,0 ppm respectivamente. Por otro lado, estas señales se observaron a 84,0, 49,5 y 68,7 ppm respectivamente en la diaeudesmina [PELTER, 1976], que posee los dos grupos veratrilo orientados *axialmente*.

Al comparar los valores de desplazamiento químico de los carbonos del biciclo de los compuestos de la serie *epi* se observa (Tabla 2, CDCl_3) que las señales de los C-7 y C-7' toman distintos valores, encontrándose a menor campo el C-7 unido al arilo *ecuatorial* (87,5 - 87,8 ppm) y a mayor campo el C-7' (82,0 - 82,1 ppm) relacionado con el arilo *axial*. También el C-8', cercano al arilo *axial*, se desplaza a campos mayores (50,1 - 50,2 ppm).

Tabla 2: Valores de desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN (CDCl_3) del sistema furofurano de lignanos (serie *epi*).



(+)-Epieudesmina ($\text{Ar}_1 = \text{Ar}_2 = 3,4$ -dimetoxifenilo)

(+)-Filigenina ($\text{Ar}_1 = 3$ -metoxi-4-hidroxifenilo)

($\text{Ar}_2 = 3,4$ -dimetoxifenilo)

(+)-Episesamina ($\text{Ar}_1 = \text{Ar}_2 = 3,4$ -metilendioxfenilo)

COMPUESTO	δ_c (ppm)						CITA
	C-7	C-7'	C-8	C-8'	C-9	C-9'	
(+)-epieudesmina	87,5	82,0	54,4	50,1	70,9	69,6	[PELTER, 1976]
(+)-filigenina	87,8	82,1	54,5	50,2	71,1	69,7	[AGRAWAL, 1985]
(+)-episesamina	87,7	82,1	54,8	50,3	71,0	69,7	[PELTER, 1976]

Efectos inducidos por glicosilación

En los lignanos O-glicosidados se produce un corrimiento de la resonancia del C-1 del azúcar a campos más bajos. Con excepción del pequeño corrimiento en la resonancia del C-2, el espectro remanente del azúcar prácticamente no se ve afectado [AGRAWAL, 1985]. Las asignaciones de las señales de los carbonos del azúcar pueden realizarse por comparación y mayor coincidencia con los datos para monosacáridos y metilglicósidos [BOCK, 1983].

Así, el efecto de glicosilación sobre las señales del núcleo del lignano es más diagnóstico que sobre las señales de los carbonos del azúcar. En

términos generales, el carbono en el sitio de glicosilación se desplaza a campos más altos, mientras que los carbonos en *orto* y *para* se desplazan a campos más bajos. Usualmente, los desplazamientos de los átomos de carbono *ipso* y *orto* están en el rango de sólo 0,7 - 2,0 ppm. Evidentemente, el indicio más confluente de glicosilación sería el corrimiento a campos bajos de la señal del carbono *para*, la cual es invariablemente más grande que los otros corrimientos y en general está en el rango de 1,7-4,0 ppm [AGRAWAL, 1985].

Los azúcares en forma furanósica se distinguen de los correspondientes isómeros piranósicos debido a las diferencias en sus desplazamientos químicos. Las señales de los C-1, C-2 y C-4 se corren a campos menores (4-14 ppm) y la del C-5 a campos mayores (4-7 ppm) en la forma furanósica con respecto a la piranósica [GORIN, 1975]. Además, el desplazamiento químico del átomo de carbono anomérico depende fuertemente de la configuración anomérica y puede usarse para elucidar esta configuración.

Todo lo expuesto anteriormente está relacionado con los glicósidos de lignanos que poseen el azúcar unido a un grupo hidroxilo fenólico. Sin embargo, se conocen varios glicósidos de lignanos en los cuales el azúcar está unido a un hidroxilo alcohólico, en cuyo caso el efecto sobre la parte del azúcar debido a la aglicona es similar a la descrita arriba. No obstante, los cambios en los desplazamientos del núcleo de la aglicona debido a la glicosilación, como ser un corrimiento a campos menores de los átomos de C- α y a campos mayores de los átomos de C- β , son de importancia diagnóstica para reconocer el sitio de glicosilación.

Finalmente se concluye que la comparación de los desplazamientos químicos de los glicósidos de lignanos con el azúcar y el lignano apropiados, junto con las consideraciones sobre los corrimientos inducidos por la glicosidación, proveen un método confiable para la elucidación estructural.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

ESTUDIO DE *FESTUCA ARGENTINA*

ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO

Se sembró en pastilla el extracto de éter de petróleo en una columna de silicagel eluyéndose sucesivamente con éter de petróleo, mezclas de éter de petróleo-cloruro de metileno, cloruro de metileno puro y cloruro de metileno-metanol. Paralelamente se monitorearon las distintas fracciones obtenidas mediante CCD de silicagel y se desarrollaron en varios sistemas de solventes. De acuerdo con su similitud en el comportamiento frente a los reveladores, se reunieron distintos eluidos obteniéndose principalmente las siguientes fracciones:

Fracción N°	Componentes mayoritarios
1	hidrocarburos
2	ceras, aldehídos, triterpenoides.
3	ceras, aldehídos
4	alcoholes lineales
5	esteroides
6	residuo

Posteriormente se purificaron estas fracciones mediante métodos cromatográficos y/o recristalización y se procedió a continuación a la identificación de sus componentes.

Análisis de la fracción N° 1

Su estudio por CGL en condiciones isotérmicas dió una serie de picos que mostraban una variación logarítmica del tiempo de retención al aumentar el número de átomos de carbono de los correspondientes compuestos, según se determinó por sus espectros de masas (CGL-EM). Se representó la recta $\ln t_R$ vs n° átomos de carbono dando por cuadrados mínimos un coeficiente de correlación de 0,9995.

Se encontraron hidrocarburos lineales saturados de diecinueve a treinta y un átomos de carbono 1 a 13. Los componentes más importantes son los de número

de carbono impar, ya que se forman por descarboxilación de ácidos grasos pares [KOLATTUBUDY, 1967]. Además, como al realizar el CGL-EM se usó temperatura programada permitió identificar los hidrocarburos más pequeños (C_{12} a C_{18} , 14 a 20) que en condiciones isotérmicas colapsaban a tiempos menores.

Los espectros de masas de estos hidrocarburos exhibían un aspecto característico, en grupos de picos separados por 14 una correspondientes a las series $C_n H_{2n+1}$, $C_n H_{2n}$ y $C_n H_{2n-1}$. La envolvente de estas especies era una curva gaussiana, con pico base en m/e 43 ó 57, ya que estos hidrocarburos no ramificados muestran una declinación gradual en la abundancia de los fragmentos con el aumento del peso del fragmento [BUDZIKIEWICZ, 1967].

Análisis de la fracción N^o 2

Mediante varias cromatografías en placas preparativas se pudieron separar tres grupos de compuestos (subfracciones 2 a-c) que tenían distinto comportamiento al revelar con óleum/calor.

La subfracción 2b presentaba una mancha marrón de $R_f = 0,28$ (hexano-AcOEt, 98:2) equivalente a la presente en la fracción 3, por lo que se analizará luego.

Análisis de la subfracción 2a

Esta subfracción, de comportamiento cromatográfico similar a las ceras, presentó en su espectro IR las bandas diagnósticas a 1742 cm^{-1} , debida a tensión C=O de éster, tensión C-O a 1180 cm^{-1} , como así también la banda de deformación C-H a 740 cm^{-1} , característica de metilenos en cadena larga, y tensión a 2895 cm^{-1} correspondiente a tensión C-H.

Además fue saponificada, estudiándose a continuación los alcoholes y los componentes ácidos resultantes por separado.

Análisis de los alcoholes provenientes de la saponificación de ceras

Se analizaron por CGL y CGL-EM en columna empacada (OV-17) y se comprobó que a pesar de exhibir varios picos, la resolución no fue total ya que algunos EM presentaban fragmentos y/o intensidades distintas a las esperadas.

Al estudiar posteriormente la mezcla de alcoholes por CGL capilar y CGL capilar-EM, se encontró n-hexacosanol 21 y además en menor porcentaje trazas

de esteroides 22 a 25 y una serie de alcoholes terpénicos 26 a 31. Del primer análisis por CGL-EM (Fig. 34 A) no pudieron obtenerse directamente los EM de los componentes terpénicos ni esteroidales de la muestra por encontrarse en muy baja proporción, siendo por lo tanto necesario analizar detalladamente la zona donde aparecen en el cromatograma, con supresión de la zona del compuesto mayoritario (Fig. 34 B).

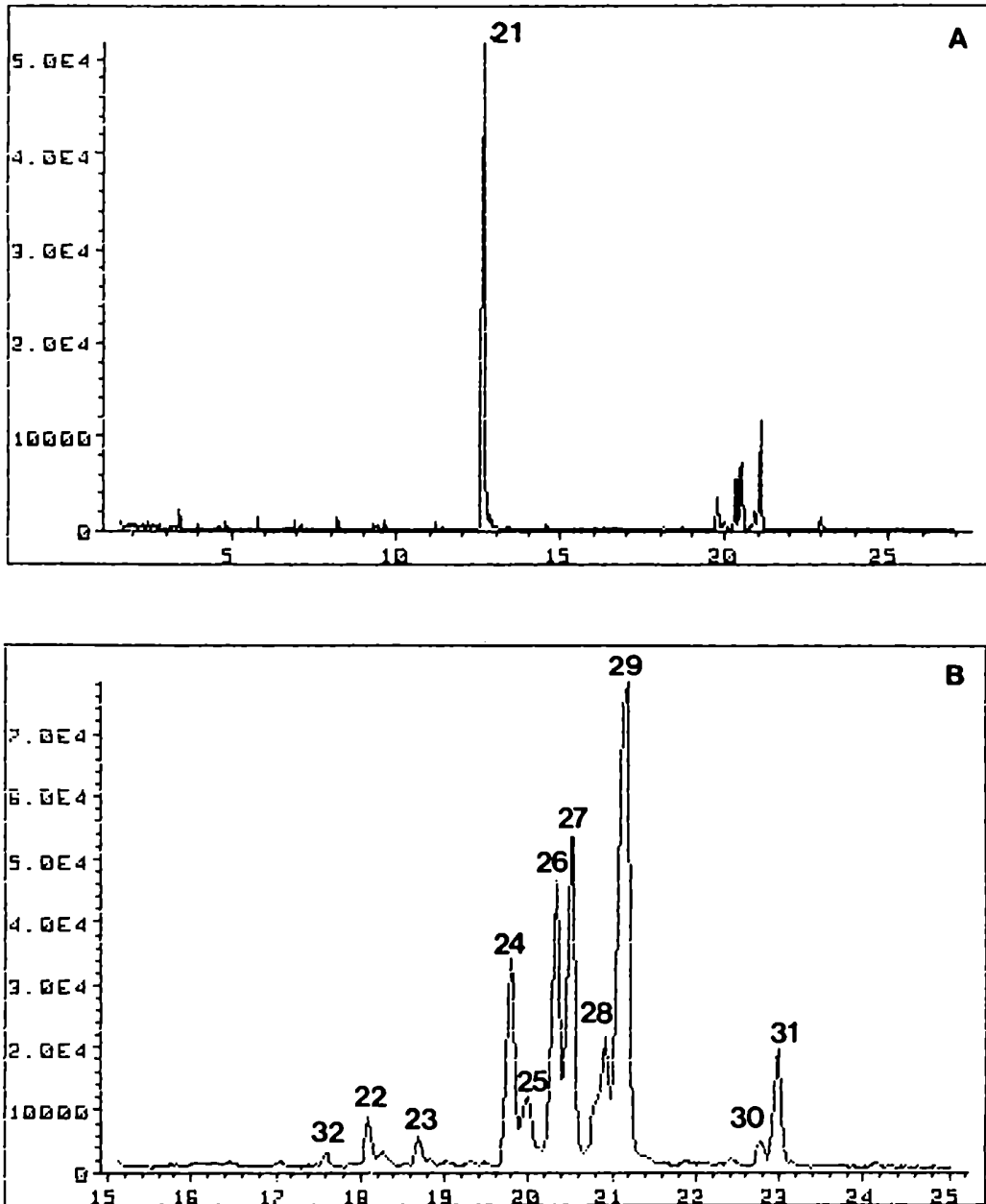


Figura 34: CGL-EM de alcoholes provenientes de hidrólisis de ceras.

A: Cromatograma general.

B: Ampliación del cromatograma en la región entre 15 y 24 minutos.

Los compuestos esteroidales de M^+ : 386, 400, 412, 414 y 416 presentaban un patrón de rupturas característico de Δ^5 -esteroides (ver discusión de la fracción N° 5), siendo identificados como colesterol 32, campesterol 22, estígmasterol 23, sitosterol 24 y dihidrositosterol 25 respectivamente.

Alcoholes terpénicos

Análisis estructural del compuesto 26: La sustancia de t_R 20,34 min (26) presentó en el EM (Fig. 35) un ión molecular a m/e 426, pico base a m/e 218, así como también fragmentos a m/e 207, 203 y 189. Estos datos correspondían a un alcohol triterpénico de tipo Δ^{12} -urseno o Δ^{12} -oleaneno, es decir que el compuesto debería ser una α - o β -amirina. Así, el pb se debería a una reacción de retro-Diels-Alder del anillo C, permaneciendo la carga en la porción del dieno (Fig. 35). El ión m/e 203 se originó por pérdida del sustituyente de C-17 y evidenció que no existía otro sustituyente en los anillos D y E [BUDZIKIEWICZ, 1963].

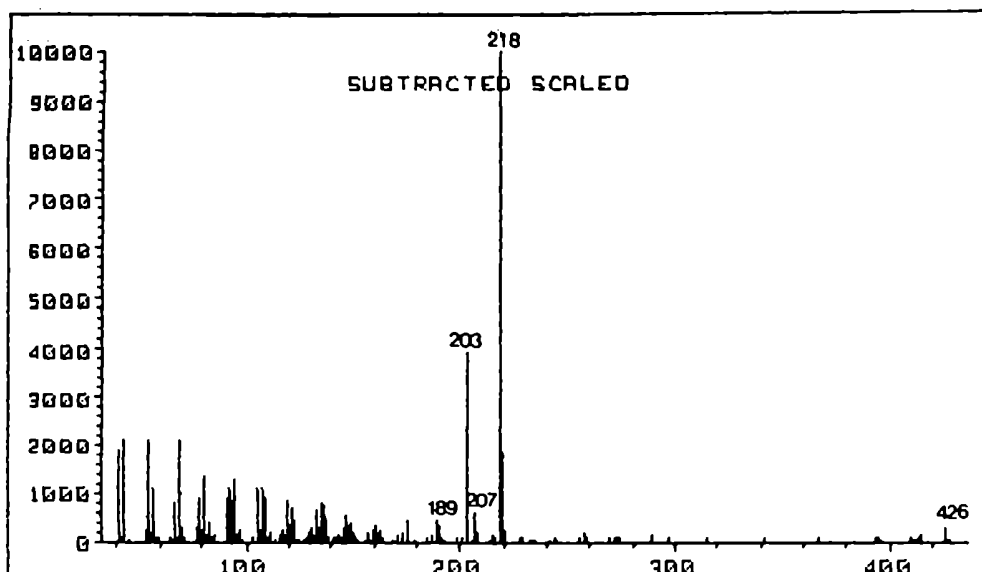
Dado que no se puede diferenciar entre el esqueleto urseno y oleaneno por EM, se comprobó la identidad de esta sustancia por CGL capilar con testigos auténticos de ambos alcoholes. De esta comparación surgió que el compuesto 26 era β -amirina.

Análisis estructural del compuesto 27: El espectro de masas del compuesto de t_R 20,52 min (Fig. 36) presentó un ión molecular a m/e 426 con pérdida de 15 una y otros picos característicos de triterpenos pentacíclicos (Fig. 37) a m/e 218, 205, 204, 203 y 189. Además un fragmento muy intenso a m/e 177 (98,5 %) indicó la presencia de un Δ^{18} -oleaneno o de un friedeleno [BUDZIKIEWICZ, 1963].

En ambos compuestos es esperable la abundancia relativamente alta del ión m/e 411 (M^+ -Me, 26,0 %) ya que exhiben varios metilos activados alilicamente por el doble enlace entre C-18 y C-19.

Alternativamente, el pico base de este espectro a m/e 204 se originó por ruptura de las uniones 11-12 y 8-14 sin transferencia de hidrógeno. La pérdida de un radical Me' condujo al ión m/e 189, que también se formaría a partir del fragmento m/e 207 por pérdida de agua (Fig. 37).

El ión m/e 177 provendría de la ruptura del anillo C con reordenamiento de hidrógeno (m/e 205) y posterior retro-Diels-Alder en el anillo E.



EM de la β -amirina 26

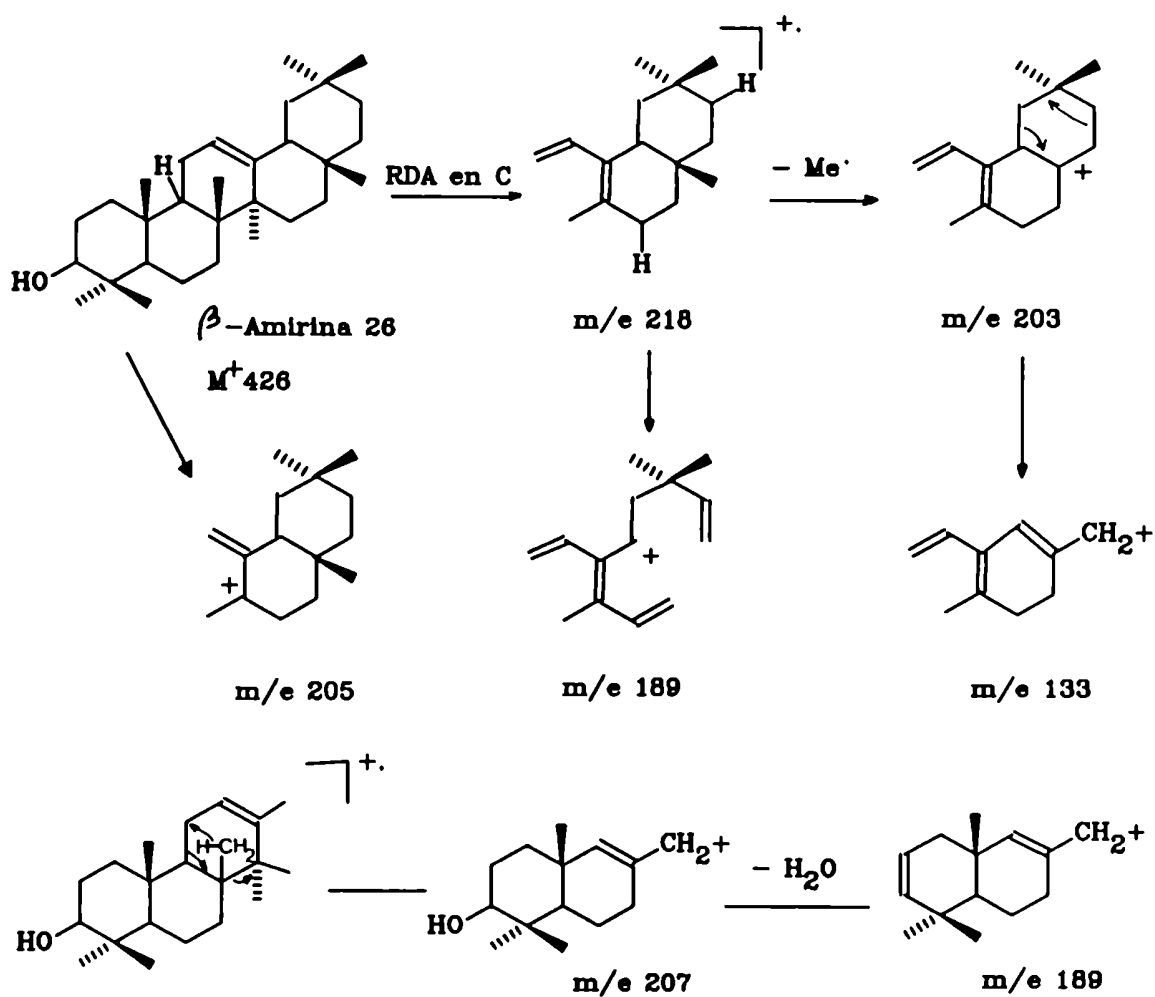


Figura 35

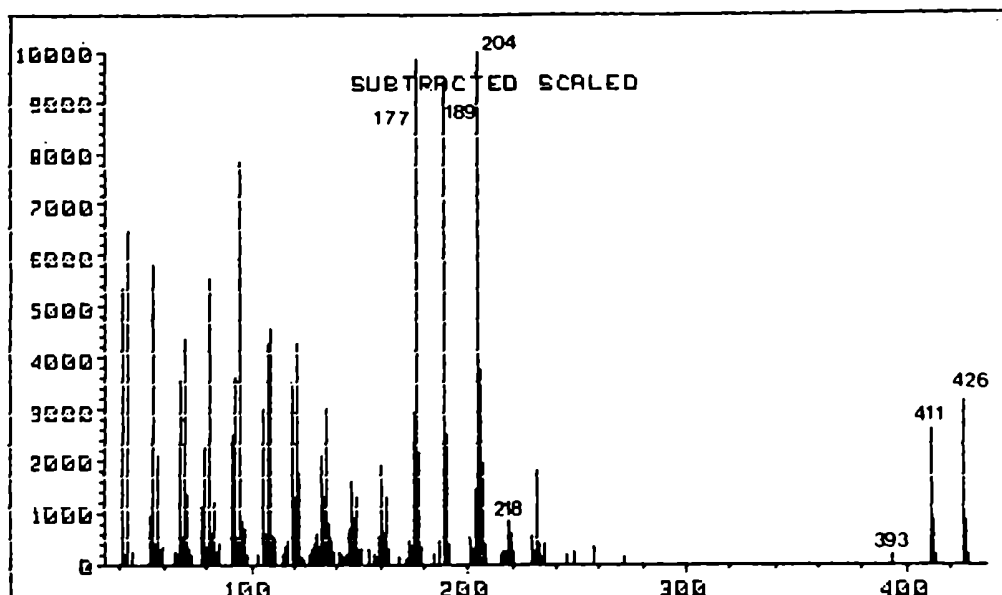


Figura 36: EM del germanicol 27

El ión m/e 203 comprende los anillos D y E y se produjo por ruptura del anillo C sin reordenamiento de H (m/e 218) y posterior pérdida de metilo (Fig. 37).

Si se tomase en cuenta la abundancia relativa del ión a m/e 203 que en general es muy abundante en los Δ^{18} -friedelanos, y baja en el compuesto 27 (14,7 %), habría que descartar esta estructura. Sin embargo, como ambos esqueletos presentan un patrón de rupturas muy similar no se los puede diferenciar fácilmente por EM.

En particular, el EM de 27 es coincidente con el informado para el germanicol por Blanco [Blanco, 1976]; además, para corroborar esta estructura, se analizó la mezcla de alcoholes por CGL capilar coinyectando germanicol testigo, dando un resultado positivo. Así, se deduce que el compuesto 27 es germanicol.

Análisis del compuesto 28: El compuesto 28 de t_R 20,93 min también mostraba un M^+ 416 pero el pico base correspondió a m/e 247 y aparecían otros fragmentos a m/e 411, 259, 229, 205, 135 y 119 (Fig. 38).

Estos iones son característicos [OGUNKOYA, 1981] de triterpenoles con esqueleto oleanano/ursano con migración del metilo de C-14 a C-13 y de metilo de C-8 a C-14 (multifloranos/baueranos) e insaturados en C-7 (multiflorenol/baurenol) o en C-8 (isomultiflorenol/isobaurenol).

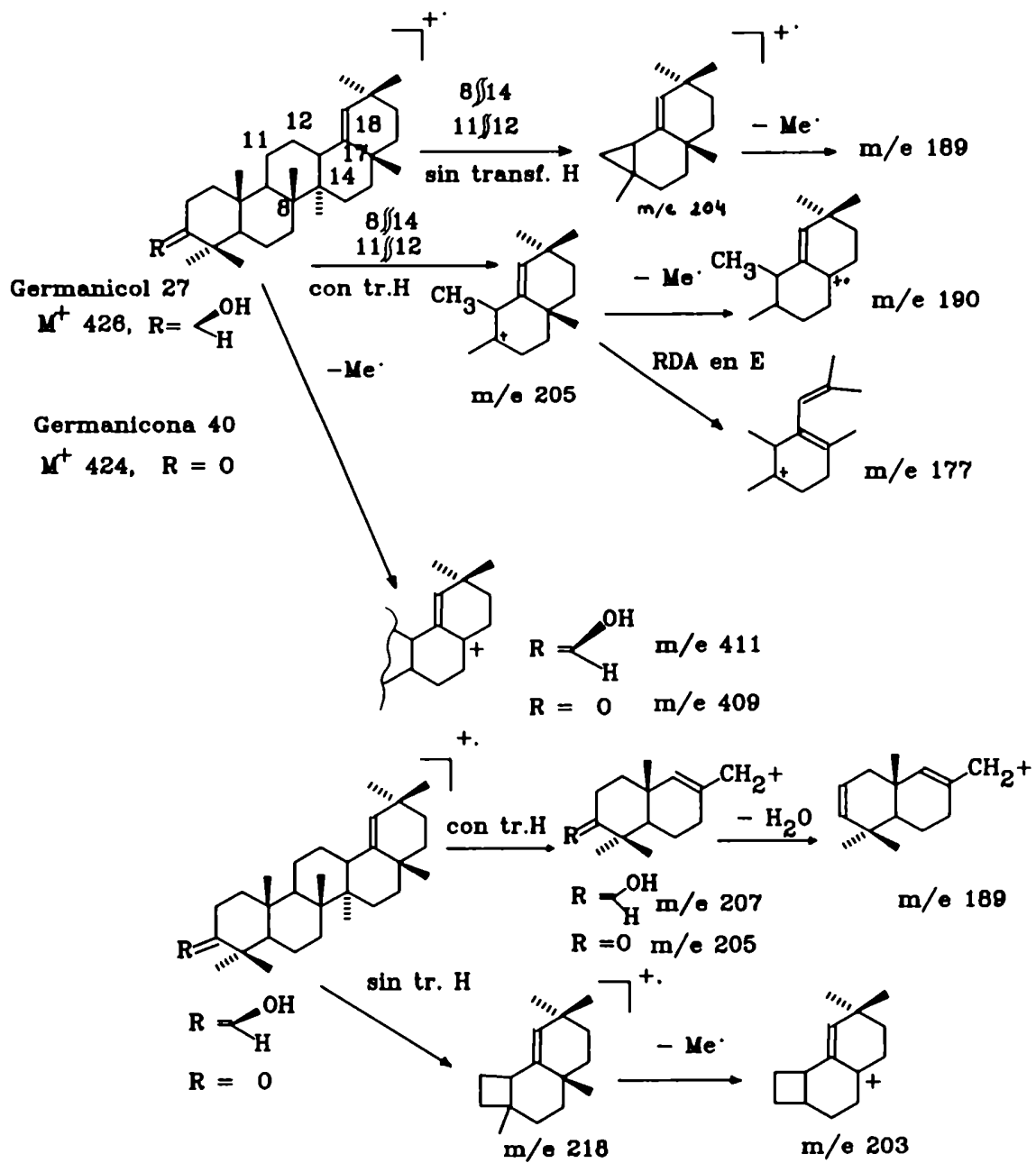


Figura 37

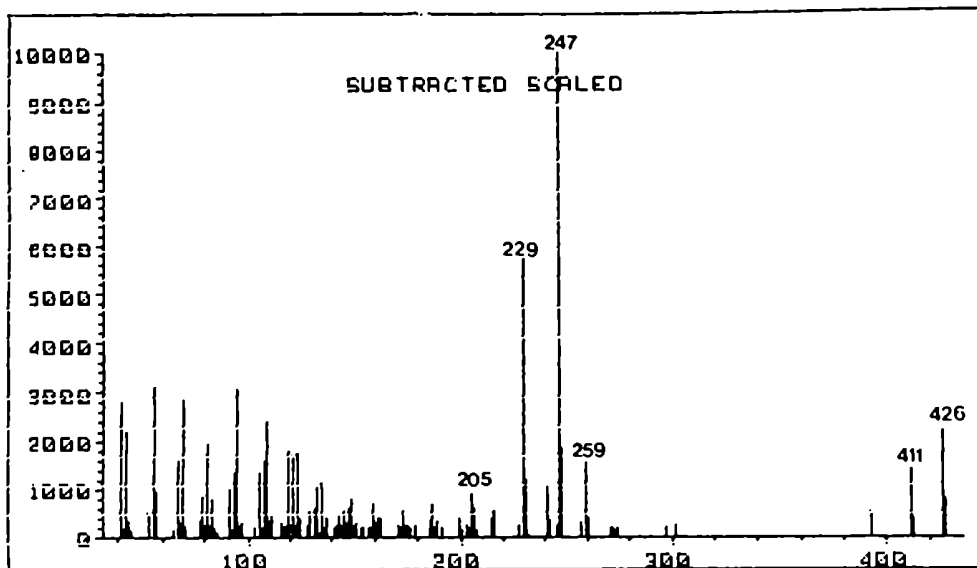


Figura 38: EM del isobaureno 28

Además se demostró [BUDZIKIEWICZ, 1963] que el patrón de fragmentación de estos compuestos se debe principalmente a la presencia de los metilos en C-13 y C-14, mientras que la posición del doble enlace sólo influye sobre las abundancias relativas de ciertos fragmentos. Como era de esperar, debido a la tensión provocada por el grupo metilo de C-13, casi todas las fragmentaciones ocurren en la cercanía de la fusión de los anillos C/D.

Aunque el modo de fragmentación del compuesto 28 (Fig. 39) se asemeja al de los sistemas de los multiflorenos, se trata de un triterpeno de la serie baureno ya que la diferencia más importante reside en que, en el primer caso, el ión a m/e 247 ($M^+ - 179$) es de intensidad relativamente baja, mientras que en la segunda serie es en general el pico base. Este fragmento provendría de una retro-Diels-Alder en el anillo C seguido de ruptura de la unión 15-16 activada alílicamente en los compuestos Δ^8 . En los derivados Δ^7 primero debe producirse la migración del doble enlace o el reordenamiento del H-9 para dar el mismo intermediario.

En contraste, el ión a m/e 205 es de baja abundancia relativa. Es el único fragmento característico que comprende los anillos D y E y se formaría por transferencia de hidrógeno seguido de la ruptura de la unión 12-13 activada alílicamente (Fig. 39). Se supone [BUDZIKIEWICZ, 1963] que la interacción estérica del metilo de C-19 en posición β es responsable de la baja abundancia de este fragmento en la serie baureno (urseno) y muy alta en multiflorenos.

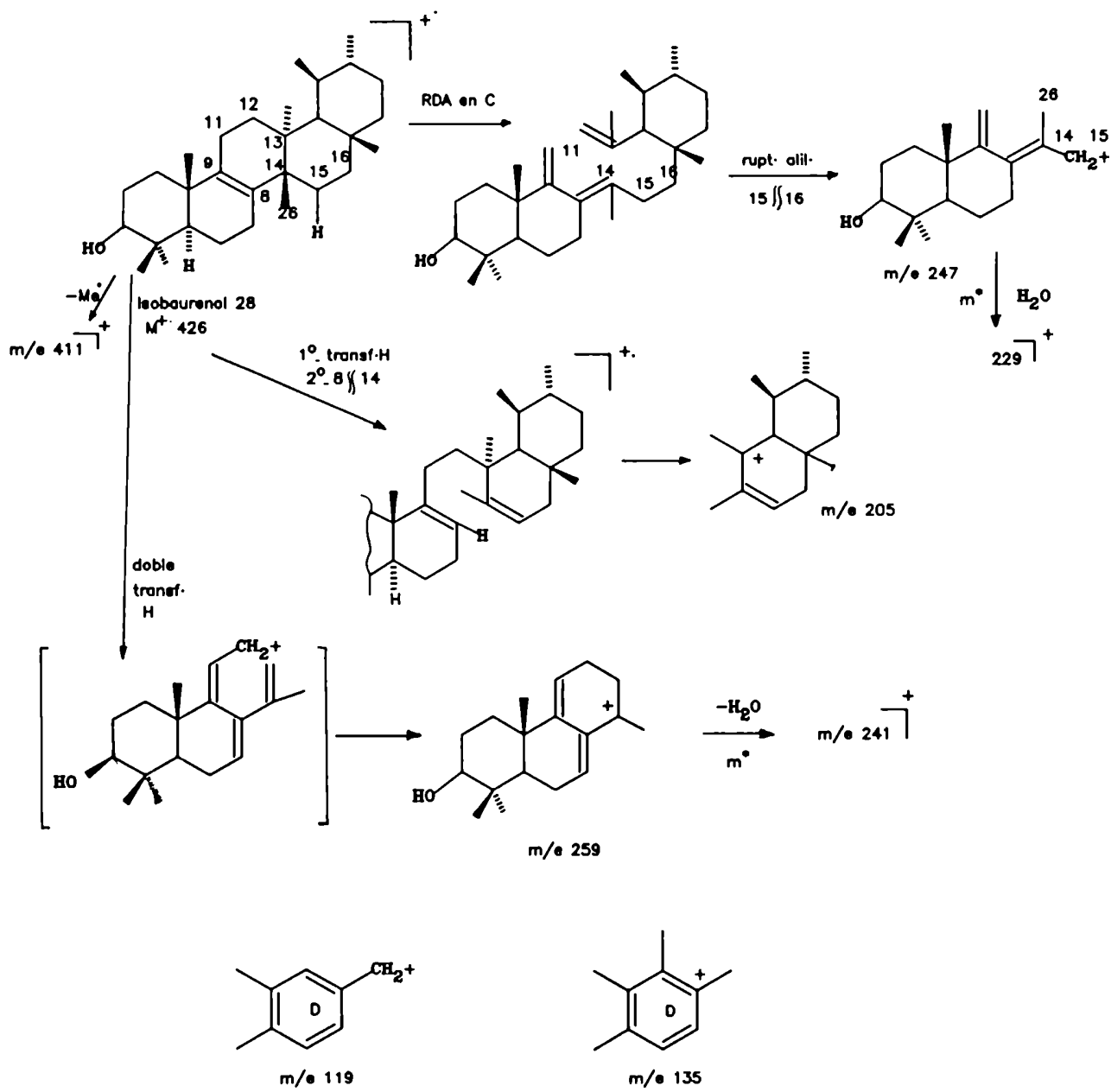


Figura 39

Se descarta la estructura de triterpeno pentacíclico con insaturación en Δ^7 o Δ^8 y el esqueleto de arborano o de fernano porque los picos prominentes serían M^+-167 y M^+-Me , siendo el primero en general el pico base [OGUNKOYA, 1981].

En la Tabla 3 se muestran los fragmentos más importantes de los espectros de masas de muestras auténticas de isobaurenol e isomultiflorenol [TALAPATRA, 1968] con fines comparativos. Los picos a m/e 135 y 119 provendrían del anillo D, probablemente del ión precursor m/e 205 [TALAPATRA, 1968] por rupturas que involucrarían reordenamientos de cuatro centros, transferencia de hidrógeno y rupturas alílicas.

Tabla 3: Comparación de los EM del compuesto 28 con datos de literatura.

Ión m/e (%)	426	411	259	247	205	135	119	241	229
Compuesto 28	22	14	16	100	9	11	18	11	57
Isobaurenol	68	25	24	100	20	22	25	9	35
Isomultiflorenol	89	40	87	39	100	52	52	33	35

De todo lo expuesto, se deduce que el compuesto 28 pertenece a la serie baurenol. Es difícil decidir si el doble enlace se encuentra en Δ^8 (isobaurenol) o en Δ^7 (baurenol), por lo que se compararon las relaciones de abundancias relativas de algunos fragmentos característicos (pb, M^+ y M^+-Me) del isobaurenol y del β -baurenol de literatura, [TALAPATRA, 1968 ; MEKSURIYEN, 1986] respectivamente, con las del compuesto 28 (Tabla 4), llegándose a la conclusión que el compuesto 28 es el isobaurenol (bauer-8-en-3 β -ol). No obstante, podría resultar más sencillo diferenciar baurenol (Δ^7) de isobaurenol (Δ^8) por 1H -RMN, ya que el hidrógeno vinílico aparece como un multiplete a δ 5,42 en el primer caso [MEKSURIYEN, 1986].

Tabla 4: Comparación de las relaciones de AR M^+ / M^+-Me y pb/ M^+ .

Compuesto:	Isobaurenol	28	Baurenol
M^+ / M^+-Me	2,7	1,6	0,1
pb/ M^+	1,5	4,5	33,3

Análisis del compuesto 29: El espectro de masas del compuesto 29 de t_R 21,18 min (Fig. 40), presentaba un M^+ 426 con subsiguiente pérdida de agua (m/e 408). El pico base aparecía a masas bajas (m/e 43) acompañado de otros muy intensos a m/e 55, 69, 81, 95, 107, 109 que no ofrecían mayores indicios sobre la clase de triterpeno de que se trataba. Los picos a m/e 218 y 189 tenían intensidades de 89,3 y 60,8 % respectivamente, mientras que el fragmento a m/e 203 presentaba una abundancia relativamente baja (37,4 %) y estaba acompañado por un ión de abundancia similar a m/e 204.

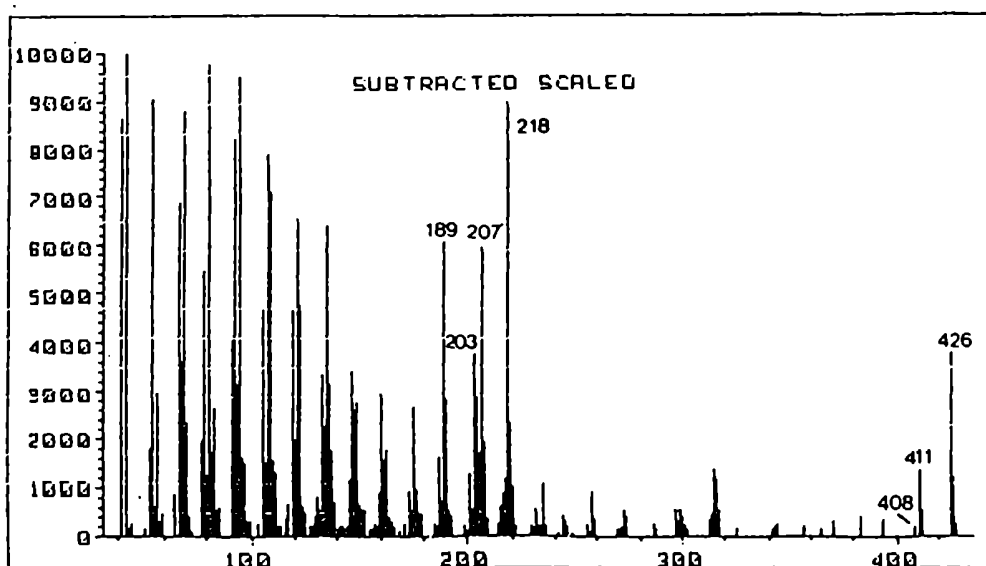


Figura 40: EM del lupeol 29

Esto indicaba que 29 era un triterpeno pentacíclico isómero de la β -amirina. La presencia de un ión a m/e 207 con abundancia relativa del 59,3 % señalaba que el hidroxilo debía encontrarse en los anillos A o B de donde procede este fragmento (Fig. 41), mientras que su elevada intensidad mostraba que esta ruptura estaba favorecida con respecto a la misma en la β -amirina, donde la fragmentación está dirigida por la insaturación de C-12 para dar el pico base a m/e 218. Esto es característico de alcoholes triterpénicos saturados en que hay ausencia de grupos directores.

La pérdida de 43 una respecto del M^+ , con baja abundancia relativa (3,8 %) y la presencia del ión m/e 189, de mayor abundancia relativa que m/e 191, son demostrativos de la presencia de isopropenilo (Fig. 41).

Estos datos presuponen la estructura de un alcohol triterpénico con esqueleto de lupano u hopano.

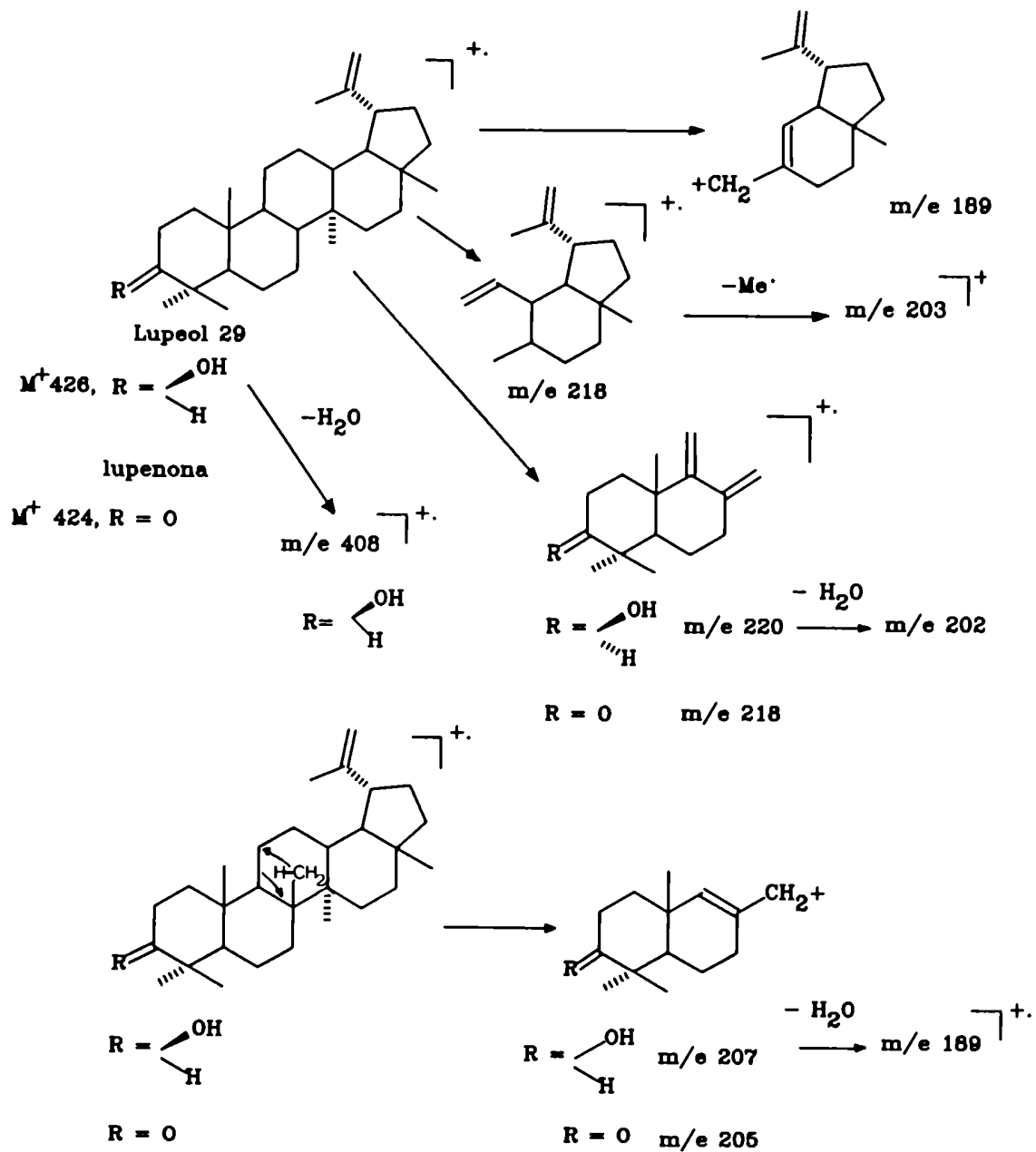


Figura 41

Por este motivo, se comparó mediante CGL capilar con testigo de lupeol y hopeol, encontrándose concordancia entre el primer testigo y el compuesto 29.

Análisis del compuesto 30: El EM del compuesto minoritario 30 (Fig. 42) de t_R mayor que el lupeol y menor que el hopeol también exhibía un M^+ a m/e 426 y un pico base a m/e 189 característico de un esqueleto de lupano u hopano. Además como no aparece el fragmento M^+-43 , se sugiere la presencia de un isopropenilo o un isopropilo con un doble enlace vinílico. Dado que a masas altas los únicos fragmentos que aparecen son a m/e 204 y 207, con ausencia de otras señales diagnósticas hasta el ión molecular, se descarta la estructura de nepehinol u otros lupenoles con fusión de los anillos D/E *cis* porque darían varios fragmentos a masas mayores de m/e 207, en particular el ión a m/e 218 sería importante [AHMAD, 1985].

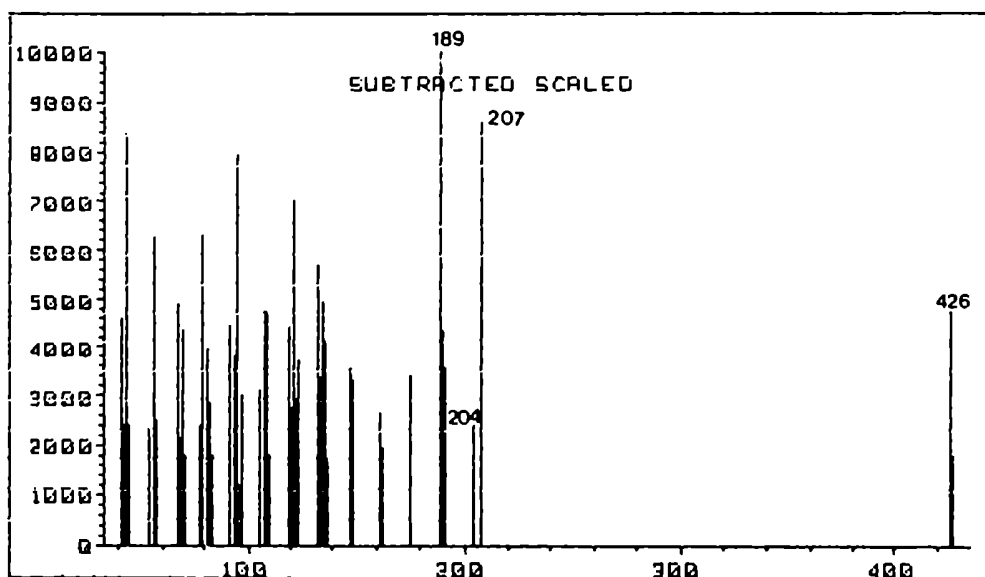


Figura 42: EM del hopenol-a 30

Del análisis de los compuestos relacionados hallados en literatura se sugiere que la estructura del compuesto 30 podría corresponder a hopenol-a (hop-21-en-3- β -ol) o a hopenol I ($\Delta^{17(21)}$ -hopen-3-ol) (Fig.43).

Sin embargo, vale la pena acotar, que el hopenol I es una estructura poco probable porque el fragmento a m/e 247 (Fig. 44) sería muy abundante dado que este compuesto posee una doble unión endocíclica en el anillo E con alta probabilidad de migración en las condiciones experimentales de la espectrometría de masas. Probablemente este ión se originaría vía una ruptura

alílica e involucraría la escisión de tres uniones en conjunción con una doble transferencia de hidrógeno desde la especie cargada [SCHMIDT, 1979].

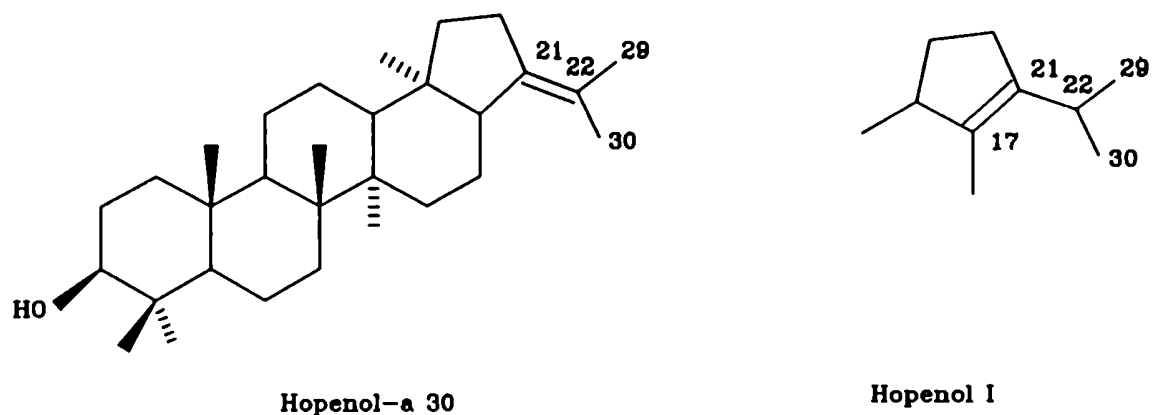


Figura 43

De todo lo expuesto surge que el compuesto 30 correspondería al hopenol-a, estando esta estructura sujeta a confirmaciones posteriores por comparación con testigo. Esto se debe a que, a diferencia de los espectros de masas de triterpenos pentacíclicos derivados de esqueletos ursano u oleanano, los EM de derivados del lupano y hopano son menos característicos y sólo en los casos más simples hay algunos fragmentos lo suficientemente relevantes para ofrecer información útil [BUDZIKIEWICZ, 1963].

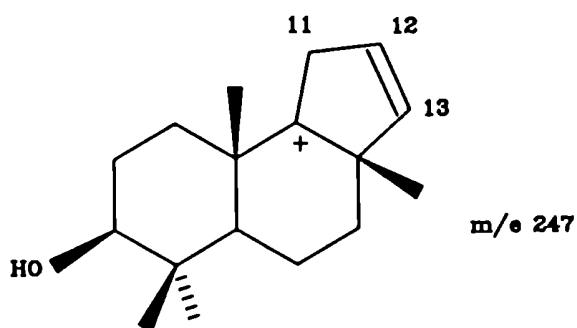
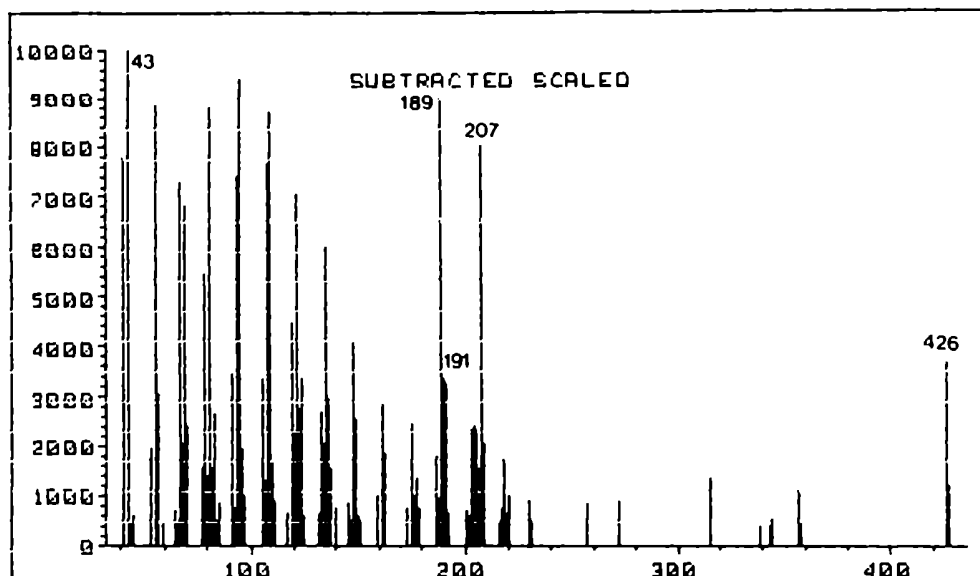


Figura 44

Análisis del compuesto 31: El espectro de masas del compuesto 31 (Fig. 45) de t_R 22,99 min exhibía un M^+ a 426 y un patrón de fragmentaciones análogo al del compuesto 29 (Fig. 41). El pico base a m/e 43 aparecía acompañado de otros fragmentos de alta abundancia relativa a m/e bajos: 41, 55, 67, 93 y 95. El ión a m/e 189 era muy abundante (89,1 %) por lo que el esqueleto básico podría ser el de lupano u hopano [OGUNKOYA, 1981].

Además, como la abundancia relativa del fragmento a m/e 189 era mayor que la del m/e 191 y no había pérdida de isopropilo desde el ión molecular ($M^+ - 43$), la insaturación se ubicaría en este grupo, por lo que el compuesto 31 sería el hopeol (hopenol-b u hop-22,29-en-3- β -ol), isómero de los compuestos 29 y 30.

Ésto se corroboró por CGL capilar con testigo.



EM del hopeol 31

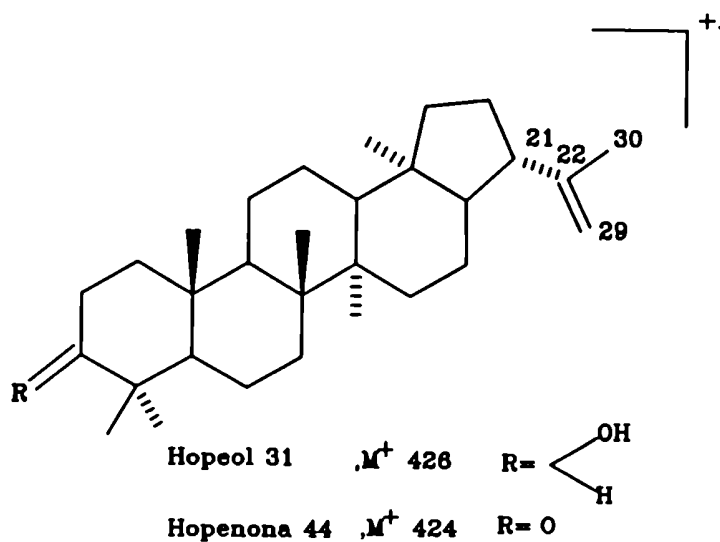


Figura 45

Análisis de los ácidos grasos provenientes de la saponificación de ceras

Para poder analizar por CGL los compuestos ácidos provenientes de la hidrólisis de ceras se los derivatizó a los correspondientes ésteres metílicos. Por CGL-EM, CGL en condiciones isotérmicas y con testigos se determinó que se trataba principalmente de una serie homóloga 33 a 36 y 38; además, la recta $\ln t_R$ vs n° átomos de carbono dio, por cuadrados mínimos, un factor de correlación de 0,9969.

Con excepción del EM del compuesto 37, todos los restantes presentaban un patrón de rupturas en común característico de ésteres metílicos de ácidos grasos saturados. Así, por ruptura α mostraban los iones a m/e 31 ($^+OCH_3$, siempre de baja abundancia relativa pero de valor diagnóstico) y a m/e 59 ($^+O=C-O-CH_3$) y por ruptura α y posterior pérdida de CO, los fragmentos hidrocarbonados principalmente de la serie alquílica.

El ión a m/e 74, pico base de los compuestos 33 a 36 y 38 de cadena saturada y no ramificados en C- α , proviene de un reordenamiento de Mc Lafferty por ruptura β con transferencia de hidrógeno. También se observaron los iones de fórmula general $[(CH_2)_n CO_2 CH_3]^+$ con $n= 2, 6, 10$ ($m/e= 87, 113, 199, 255$ respectivamente) favorecidos en estos ésteres de cadena larga [BUDZIKIEWICZ, 1967].

Por marcación con deuterio y carbono trece se comprobó que el fragmento M-43, abundante en ésteres metílicos de cadena larga se forma por expulsión de C-2, C-3, y C-4 y un átomo de hidrógeno [BUDZIKIEWICZ, 1967].

Dado que los iones moleculares de los compuestos 33 a 36 y 38 aparecieron a m/e 214, 242, 270, 298 y 326 respectivamente se trataría de la serie homóloga de ésteres metílicos correspondientes a los ácidos grasos saturados lineales de número par de átomos de carbono desde $C_{12:0}$ a $C_{20:0}$.

El compuesto 37 con un M^+ 294 (t_R 6,26 min) sería un ácido graso de dieciocho átomos de carbono con dos insaturaciones ($C_{18:2}$), ya que difiere del compuesto 36 (t_R 5,47 min) en 4 uma. Además, el ión m/e 74 no es pico base y los fragmentos hidrocarbonados de serie diinsaturada presentan una mayor abundancia relativa. En particular, el EM tiene un 82% de coincidencia con el del éster metílico del ácido linoleico pero no se puede asegurar la posición de los dobles enlaces ya que como no es un Δ^2 , el espectro de los isómeros de posición de los dobles enlaces se vuelven indistinguibles [RYHAGE, 1959].

Análisis de la subfracción 2c

A pesar de lo trabajoso y dificultoso que resultó aislar esta subfracción de naturaleza terpénica, que revelaba violeta con anisaldehído/ H^+ , surgió el interés de identificarla pues, desde el punto de vista quimiotaxonómico se buscaban los metiléteres de triterpenos pentacíclicos, ampliamente distribuidos en la familia Gramineae [RUSSELL, 1976; HEGNAUER, 1986].

Curiosamente, en *Festuca argentina* se detectaron mediante CGL capilar y CGL capilar-EM cetonas triterpénicas pentacíclicas 39 a 41, 43 y 44 y una cetona triterpénica tetracíclica con anillo ciclopropánico 42, pero ningún metiléter, como se detalla a continuación.

Análisis del compuesto 39: El espectro de masas del compuesto 39 (Fig. 46) exhibía un ión molecular a m/e 424, con pérdida de metilo pero no de agua. Los fragmentos a m/e 205, 203, 189 y 218, este último pico base de esta cetona, serían diagnósticos de un esqueleto oleanano o ursano con un doble enlace entre C-12 y C-13, pero sin sustituyentes en los anillos D y E [OGUNKOYA, 1981]. La reacción de retro-Diels-Alder es la responsable de la prominente fragmentación que conduce al pico base a m/e 218, fragmento diénico que mantiene la carga positiva.

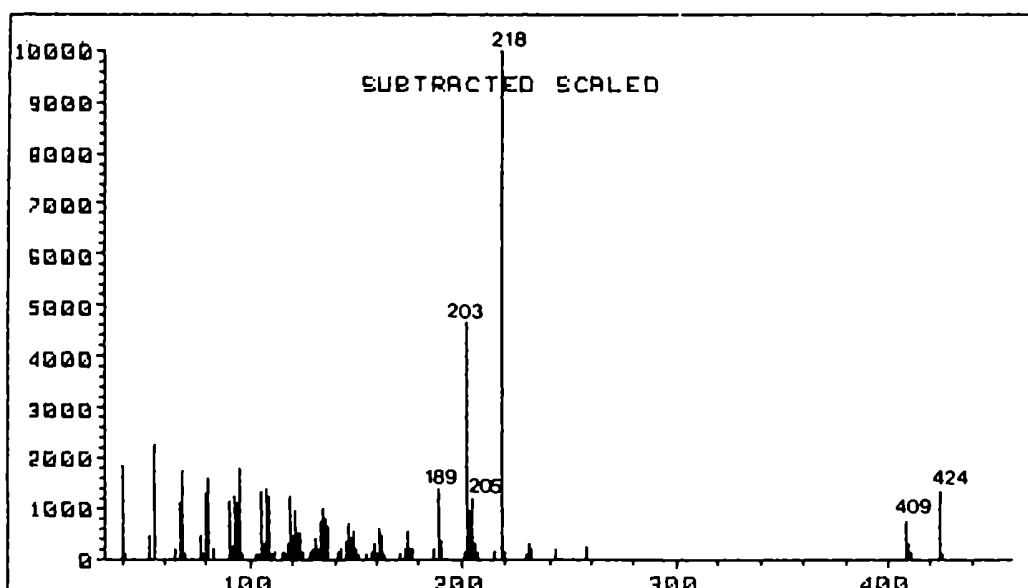


Figura 46: EM de la amirenona 39

El esquema de rupturas es análogo al de la β -amirina (Fig. 35), considerando que el ión a m/e 189 sólo puede provenir de los anillos D y E,

mientras que el ión m/e 205 de las contribuciones de los anillos D y E, así como también de los anillos A y B (m/e 207 en la β -amirina).

En consecuencia, el compuesto 39 podría ser una α - amirenona o una β -amirenona sujeta a confirmación con testigo ya que la ubicación del metilo en C-19 o C-20 respectivamente no afecta al patrón de fragmentación, sino que produce pequeñas diferencias en las abundancias relativas de los iones.

Análisis del compuesto 40: El EM del compuesto 40 (Fig. 47) presenta un ión molecular a m/e 424 con pérdida de metilo, sin observarse en el espectro fragmentos con pérdidas de 18 ó 60 uma características de alcoholes o acetatos respectivamente.

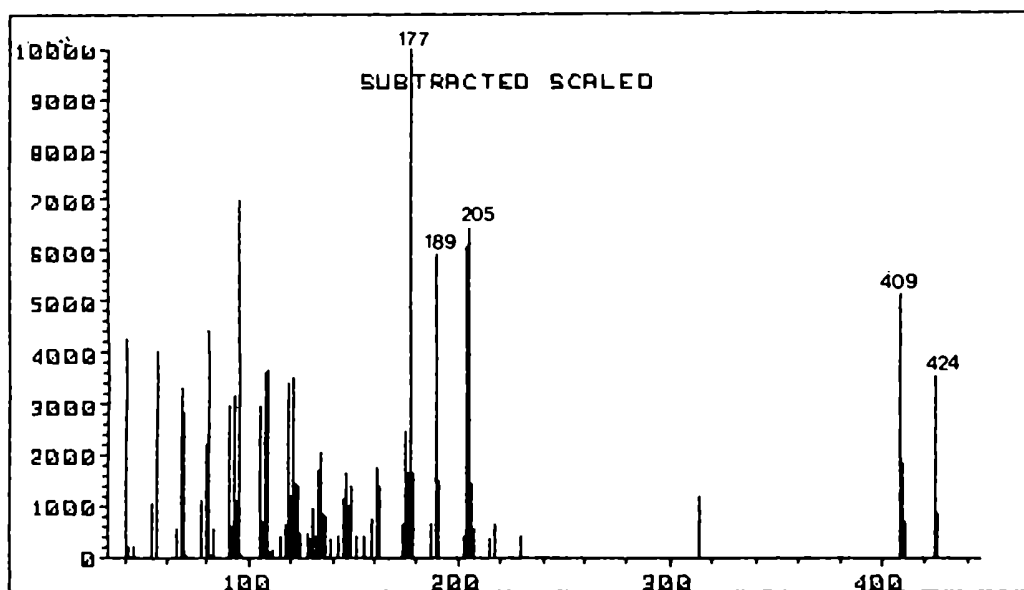


Figura 47: EM de la germanicona 40

El pico base a m/e 177 es típico de Δ^{18} -oleanenos y Δ^{18} -friedelanos [BUDZIKIEWICZ, 1963]. La alta abundancia del fragmento debido a la pérdida de metilo (m/e 409) es coherente con la serie de Δ^{18} -oleanenos. El metilo escindido provendría del C-17 [BUDZIKIEWICZ, 1963], como se esperaría por la activación alílica de la doble unión 18-19. Sin embargo, no podrían excluirse los metilos unidos al C-20.

El esquema de fragmentación y origen de los iones a m/e 177, 189 y 205 es similar al del germanicol (Fig. 37), con la salvedad que el ión a m/e 189, en este caso, sólo se origina a partir del ión m/e 204 por pérdida de metilo, mientras que el ión m/e 205 puede provenir de los anillos D y E, o bien de los anillos A y B.

Como los Δ^{18} -oleanenos y Δ^{18} -friedelenos no se pueden diferenciar por EM, se realizó una coinyección por CGL capilar con Δ^{18} -oleanen-3-ona testigo, dando un resultado positivo. por lo que el compuesto 40 resultó ser germanicona.

Análisis del compuesto 41: El espectro de masas del compuesto 41 (Fig. 48) mostró un ión molecular a m/e 424, pérdida de metilo y de isopropilo, pero no de agua.

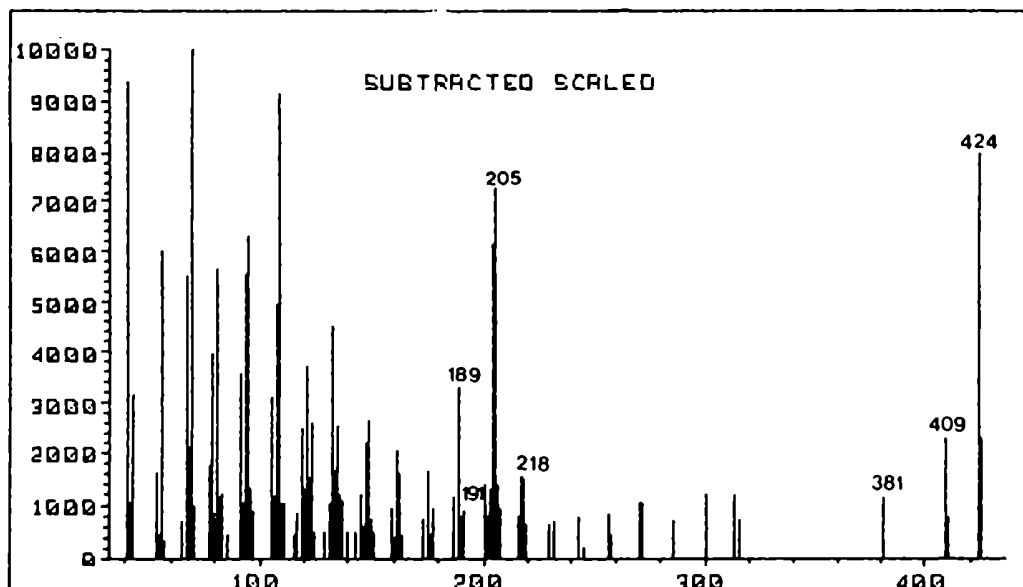


Figura 48: EM de la lupenona 41

Como fragmentos importantes a masas altas figuraron los iones a m/e 189 y m/e 205 mientras que los iones a m/e 191 y 381 (M^+ -isopropilo) resultaron de menor abundancia relativa.

Ésto indicaría la presencia de una cetona con esqueleto hopano o lupano con cadena lateral de isopropenilo (Fig. 41) que en las condiciones de la espectrometría de masas daría lugar a la migración del doble enlace permitiendo así la pérdida de isopropilo [BUDZIKIEWICZ, 1963].

Finalmente, la comparación por CGL capilar con testigo confirmó que el compuesto 41 era lupenona.

Análisis del compuesto 42: Este compuesto mostró en su EM un ión molecular a m/e 426 y al igual que las otras cetonas, dió pérdida de metilo pero no de agua. A diferencia de las cetonas triterpénicas pentacíclicas presentó fragmentos importantes a m/e 313 (pico base), 288, 273 (288-Me) y 175, característicos de triterpenos tetracíclicos con un anillo de ciclopropano en 9:19 [APLIN, 1966].

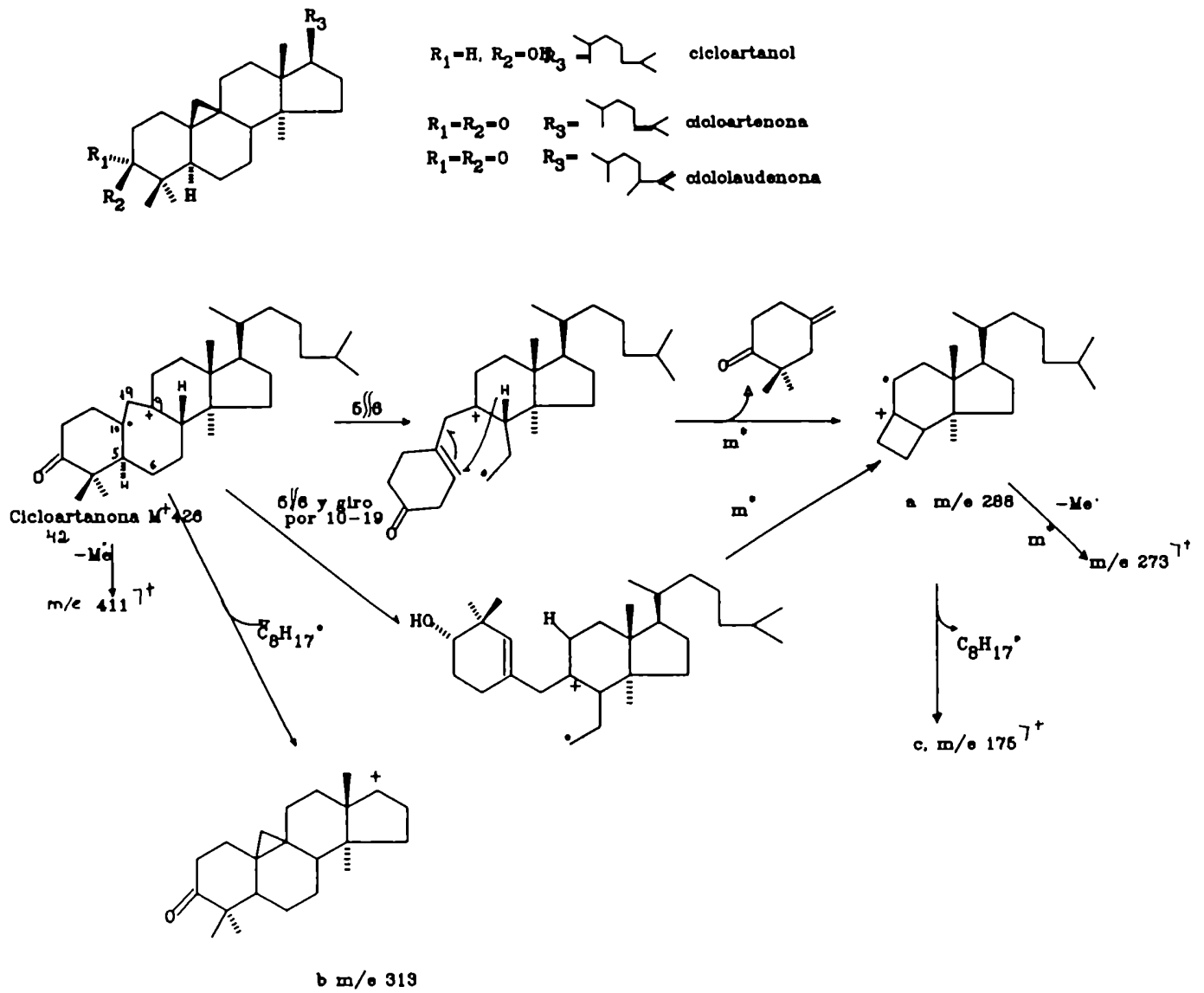


Figura 49

La influencia del anillo ciclopropano en el patrón de fragmentación se manifiesta por la presencia de un ión a par a m/e 288. Éste se originaría [AUDIER, 1966] por ruptura del anillo ciclopropano y pérdida del anillo A y C-6 o C-19 (Fig. 49). Así, la posición de este pico es independiente de la sustitución en el C-4 y de la función oxigenada en C-3 pero se corre de acuerdo con los sustituyentes de la cadena lateral. En el cicloartanol (Fig. 49) el ión a también aparece a m/e 288, por lo que el compuesto 42 podría tener la misma cadena lateral saturada.

La otra fisión diagnóstica corresponde a la ruptura entre C-17 y C-20 y pérdida de la cadena lateral que da el pico b a m/e 313 intenso al igual que en los EM de la cicloartenona y la ciclolaudenona (Fig. 49), mientras que el cicloartanol lo da a m/e 315 con baja abundancia relativa y con subsiguiente pérdida de una molécula de agua para dar m/e 297. Otro fragmento c a m/e 175 resulta común a todos estos espectros y corresponde a la pérdida del anillo A y de la cadena lateral.

Se deduce entonces que el compuesto 42 tendría un anillo A con un carbonilo en C-3 y dos metilos en C-4. Así, la estructura del compuesto 42 coincidiría con la de cicloartanona, cuyo EM concuerda con el de cicloartanona aislada de rizomas de *Polypodium vulgare* L. [ARAI, 1991].

Análisis del compuesto 43: El EM del compuesto 43 (Fig. 50 A) presenta un ión molecular a m/e 424 y fragmentos a m/e 257, 245, 218 correspondientes a $M^+ - 167$, $M^+ - 179$ y $M^+ - 206$ respectivamente, típicos de un esqueleto multiflorano (D:C friedo oleanano) o bauerano (D:C friedo ursano) con insaturación en Δ^7 o Δ^8 ya que la posición del doble enlace sólo afecta a la abundancia relativa de estos fragmentos.

La interacción estérica del grupo 19β -metilo es responsable de la baja abundancia del fragmento m/e 205 en baueranos (Fig. 50 B) por lo que puede descartarse esta posibilidad ya que en el compuesto 43 es pico base.

En cuanto a la ubicación de la insaturación en el esqueleto multiflorano se observa que la isomultiflorenona (Δ^8) (Fig. 50 D) exhibe un pico base a m/e 205, mientras que la multiflorenona (Δ^7) (Fig. 50 C) lo muestra a m/e 218. Ésto se debería a que la ubicación del doble enlace favorecería en el primer caso la transferencia de un hidrógeno, seguido de ruptura de la unión 12-13 activada alílicamente, mientras que en el segundo compuesto favorecería una doble transferencia de hidrógeno y ruptura de los enlaces 8-14 y 12-13 (Fig. 51).

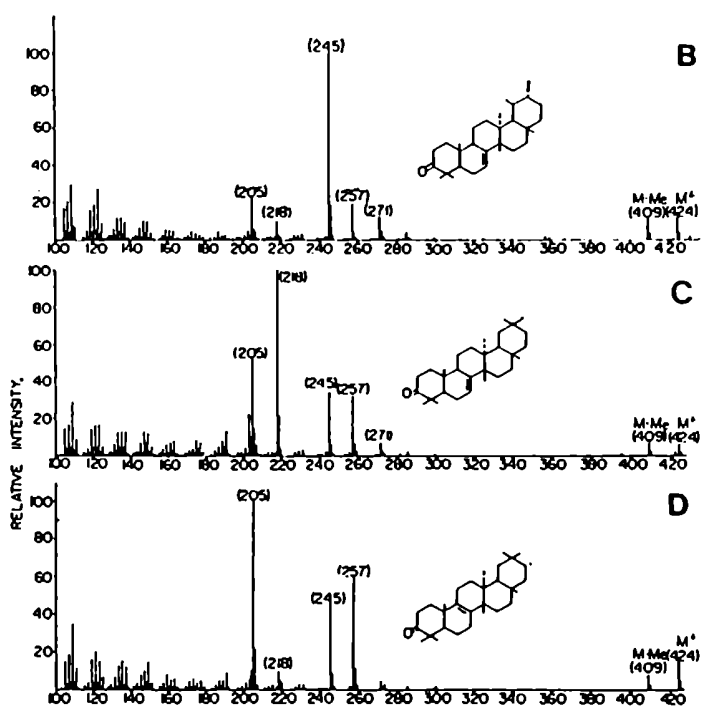
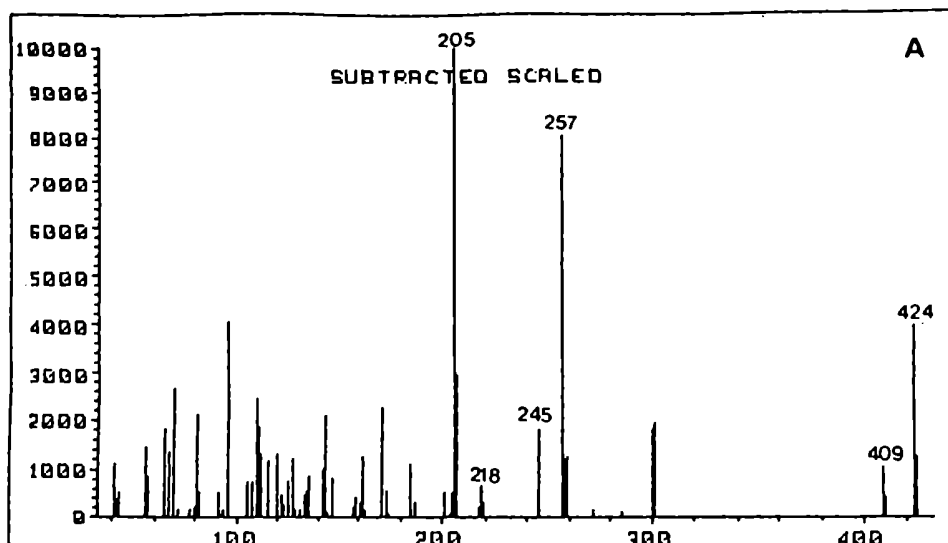


Figura 50: A: EM del compuesto 43.
 B: EM de la baurenona.
 C: EM de la multiflorenona.
 D: EM de la isomultiflorenona.

La formación del ión a m/e 257, de alta abundancia relativa, estaría acompañada de una doble transferencia de hidrógeno hacia el fragmento neutro y de esta forma se explicaría el bajo contenido de hidrógeno de este ión [BUDZIKIEWICZ, 1963]. En la Fig. 51 se sugiere un mecanismo, pero, en ausencia de una marcación adecuada con deuterio, es altamente especulativo.

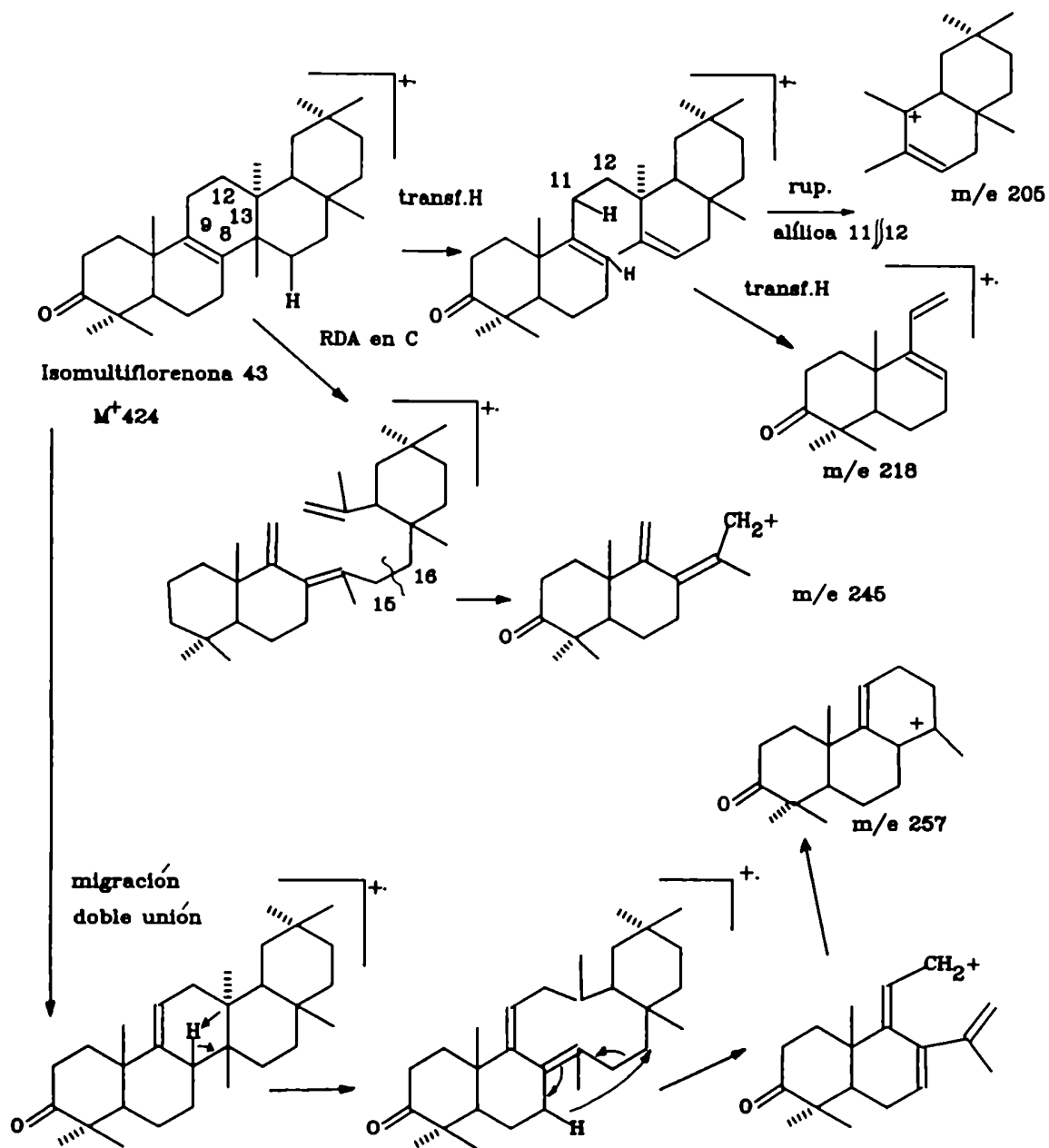


Figura 51

De todo lo expuesto y de la verificación del patrón de fragmentación (Fig. 51) para este compuesto 43, se deduce que se trata de la isomultifloretona.

Análisis del compuesto 44: El espectro de masas del compuesto 44, con ión molecular a m/e 424, exhibió un patrón de fragmentaciones similar al del compuesto 41 (Fig. 48) con fragmentos importantes a m/e 205 y 189 característico de un anillo hopano o lupano [OGUNKOYA, 1981]; además, como no se detectó el ión M^+ -isopropilo debería ser un derivado $\Delta^{22(29)}$.

En particular, el ión a m/e 109 fue muy importante (99,7 %) y sería característico de la hopenona (Fig. 45), aunque este fragmento no haya sido racionalizado [SCHMIDT, 1979].

Por comparación por CGL capilar con testigo, se corroboró la identidad del compuesto 44 como $\Delta^{22(29)}$ -hopen-3-ona (hopenona).

Análisis de la fracción N° 3

Por sucesivas cromatografías en columna de silicagel se aisló una fracción eluida con hexano-AcOEt, 97:3 que presentaba un precipitado blanco y daba una única mancha marrón (óleum) en CCD.

Sin embargo, por CGL capilar en condiciones isotérmicas, aparecieron varias pequeñas señales alrededor de la de mayor intensidad a t_R 4,81 min (compuesto 49, 95,15 %). Graficando el logaritmo del t_R vs número de átomos de carbono se obtuvo una recta con factor de correlación 0,9947, lo que evidenciaría una serie homóloga.

Además se realizó un análisis por CGL-EM. Los espectros de masas de los tres últimos compuestos corroboraron que se trataba de una serie homóloga de aldehídos lineales normales de número par de átomos de carbono, desde dieciocho hasta treinta átomos 45 a 51, siendo el mayoritario el compuesto 49 de veintiseis átomos de carbono.

En el espectro de masas del compuesto 49 se detectó el ión molecular a m/e 380 de baja intensidad (0,8 %) y otros iones significativos a m/e 44 (85,0 %), m/e 362 (M^+ -agua, 9,4 %) y m/e 336 (M^+ -44, 0,6 %) concordantes con un aldehído lineal de veintiseis átomos de carbono [GILPIN, 1957]. El fragmento m/e 44 provendría de la conocida ruptura β con reordenamiento de hidrógeno (reordenamiento de Mc Lafferty).

Otro fragmento diagnóstico resultó ser el M^+ -44 porque indicó la ausencia

de ramificación en el carbono α . Por marcación con O^{18} [GILPIN, 1957] se comprobó que los fragmentos resultantes eran alquenílicos, producidos también por ruptura β con transferencia de hidrógeno pero quedando la carga en el fragmento alquenílico.

El ión resultante de la eliminación de agua (M^+ -agua) es de intensidad significativa, y mayor que la del ión molecular, característico de un aldehído de más de seis átomos de carbono no ramificado [GILPIN, 1957].

También se observaron en el espectro fragmentos alquílicos y fragmentos resultantes de la ruptura de uniones C-C con pérdida de dos hidrógenos, debido al predominio de la porción hidrocarbonada de este aldehído de alto peso molecular.

Los restantes compuestos mostraron espectros de masas similares al del n-hexacosanal 49 con diferencias en veintiocho unidades de masa.

Por posterior recristalización de esta fracción se obtuvo el compuesto 49 cuyo espectro 1H -RMN (benceno- d_6) presentó las señales correspondientes a hidrógeno aldehídico a δ 9,35 (t, J 2 Hz), a los hidrógenos α al grupo aldehído a δ 1,83, a los restantes metilenos a δ 1,34 y al metilo terminal a δ 0,89.

También se realizó el espectro de ^{13}C -RMN de 49 en benceno y en cloroformo deuterados, correlacionándose con los datos de literatura [CLERC, 1973] (Tabla 5). Además se observaron los corrimientos esperados en las señales correspondientes al carbono carbonílico y al carbono α sin ramificación [STOTHERS, 1964], confirmando así la estructura del aldehído 49 como n-hexacosanal.

Tabla 5: Espectros de ^{13}C -RMN del compuesto 49 en distintos solventes.

Solvente	δ_c (ppm)		
	C_6D_6	$CDCl_3$	$CDCl_3$ [CLERC, 1973]
Asignación			
$C=O$	200,2	202,9	202,6
$CH_2C=O$	43,8	44,1	44,0
C-3	22,3	22,3	22,2
$(CH_2)_n$, n= 4 a 23	30,2 a 29,4	29,9 a 28,9	29,2 a 29,4
C-24	32,3	32,1	31,9
C-25	23,1	22,9	22,7
C-26	14,3	14,3	14,1

Análisis de la fracción N° 4

Luego de purificar esta fracción por cromatografía en columna se obtuvo una subfracción que presentó en CCD una única mancha de Rf y color de revelado acordes con alcoholes lineales.

Al analizarla mediante CGL en condiciones isotérmicas y con testigos, y representar el logaritmo del tiempo de retención vs el número de átomos de carbono se obtuvo una recta de factor de correlación 0,9956 y se determinó que se trataba de una serie homóloga de alcoholes lineales de 24, 25, 26 y 28 átomos de carbono 52, 53, 21 y 54.

Al recrystalizar la muestra de acetona se obtuvo el compuesto 21 que era ampliamente mayoritario en la mezcla. Su identidad se corroboró por EM, ^1H -RMN y por comparación del punto de fusión con el de literatura, resultando coherentes con los de n-hexacosanol.

Como era de esperar, el espectro de masas de este alcohol lineal no presentó el ión molecular sino que los iones a mayor masa correspondieron a M^+-18 y M^+-17 debido a una eliminación 1,4 de agua [BUDZIKIEWICZ, 1967] y de radical hidroxilo respectivamente.

La presencia de un fragmento a m/e 336 (M^+-46) descartaría la posibilidad de ramificación en C- α y/o C- β , ya que correspondería a la eliminación de agua acoplada con la expulsión de etileno de C-1=C-2, y ocurriría a través de un estado de transición de seis miembros [BUDZIKIEWICZ, 1967]. Por posteriores expulsiones de etileno a partir del ión m/e 336, se generó un espectro de masas similar al de la correspondiente olefina pero que además presentaba fragmentos de la serie oxigenada ($\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{O}$).

El espectro ^1H -RMN (CDCl_3) de 21 mostró dos tripletes algo deformados a δ 3,55, característico de metileno unido a hidroxilo, y a δ 0,82, típico de metilo terminal de cadena hidrocarbonada, así como una señal intensa a δ 1,20 correspondiente a los metilenos de la cadena hidrocarbonada. También en el espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3), la señal a δ 63,14 (C-1) confirmó la presencia de un alcohol primario y resultó concordante con el informado en literatura [BREITMAIER, 1979].

De estos datos se concluye que el compuesto 21 es el n-hexacosanol.

Análisis de la fracción N° 5

Al purificar esta fracción por cromatografía en columna de silicagel se

obtuvo una muestra que presentaba una mancha violeta (H_2SO_4 10% en etanol) en CCD y que daba positivo el ensayo de Liebermann-Burchard para compuestos esteroidales [LISBOA, 1964].

El análisis mediante CGL en columna OV-17 empacada exhibió varios picos. Sin embargo, fue necesario el uso de CGL capilar para resolver completamente la muestra.

Δ^5 -Esteroles

El cromatograma gaseoso (CGL-EM) (Fig. 52) mostró, entre otras, cuatro señales a t_R 11,24, 12,66, 13,26 y 14,36 min correspondientes a los compuestos 32, 22, 23 y 24 con iones moleculares a m/e 386 (Fig. 54 B), 400, 412 (Fig. 54 A) y 414 respectivamente, que presentaron un patrón de rupturas común.

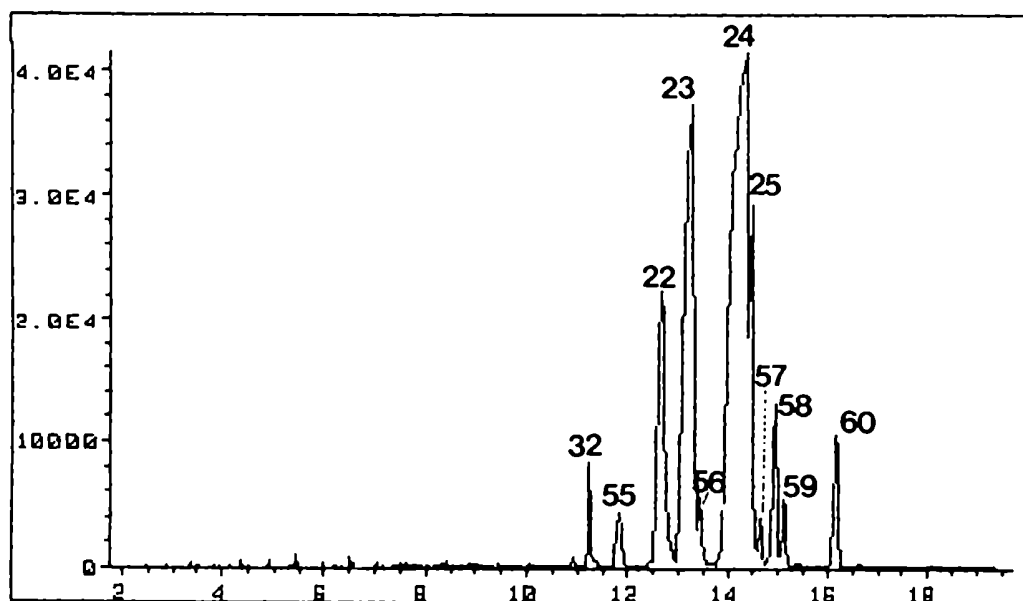


Figura 52: CGL-EM de los compuestos esteroidales

Se observaron señales originadas por pérdidas de metilo, agua, metilo + agua, de cadena lateral unida al C-17 del núcleo esteroidal a m/e 273, de cadena lateral + 42, así como pérdidas de 85, 111 y 139 una a partir del ión molecular correspondientes a los iones j, k y l respectivamente. También aparecieron los fragmentos característicos de Δ^5 -esteroles a m/e 145, 95 y algunos relacionados con todos los anteriores como m/e 163, 135, 109 y 81 (Fig. 53).

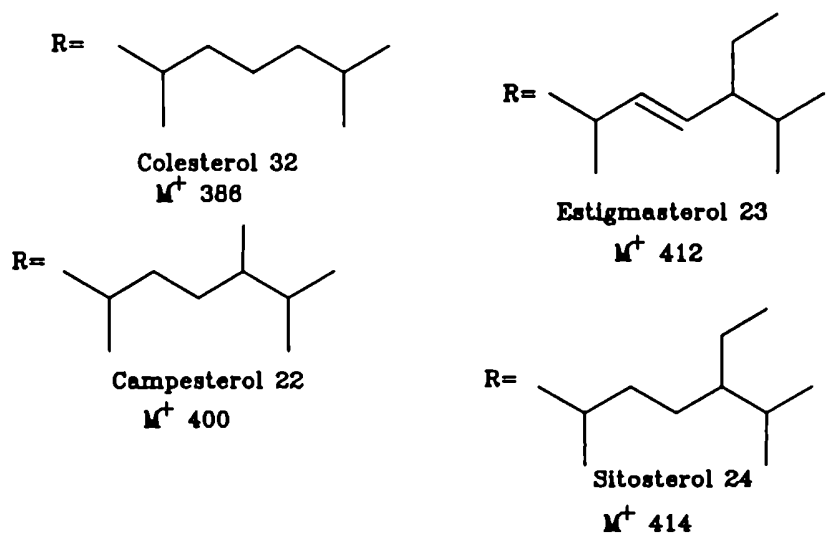
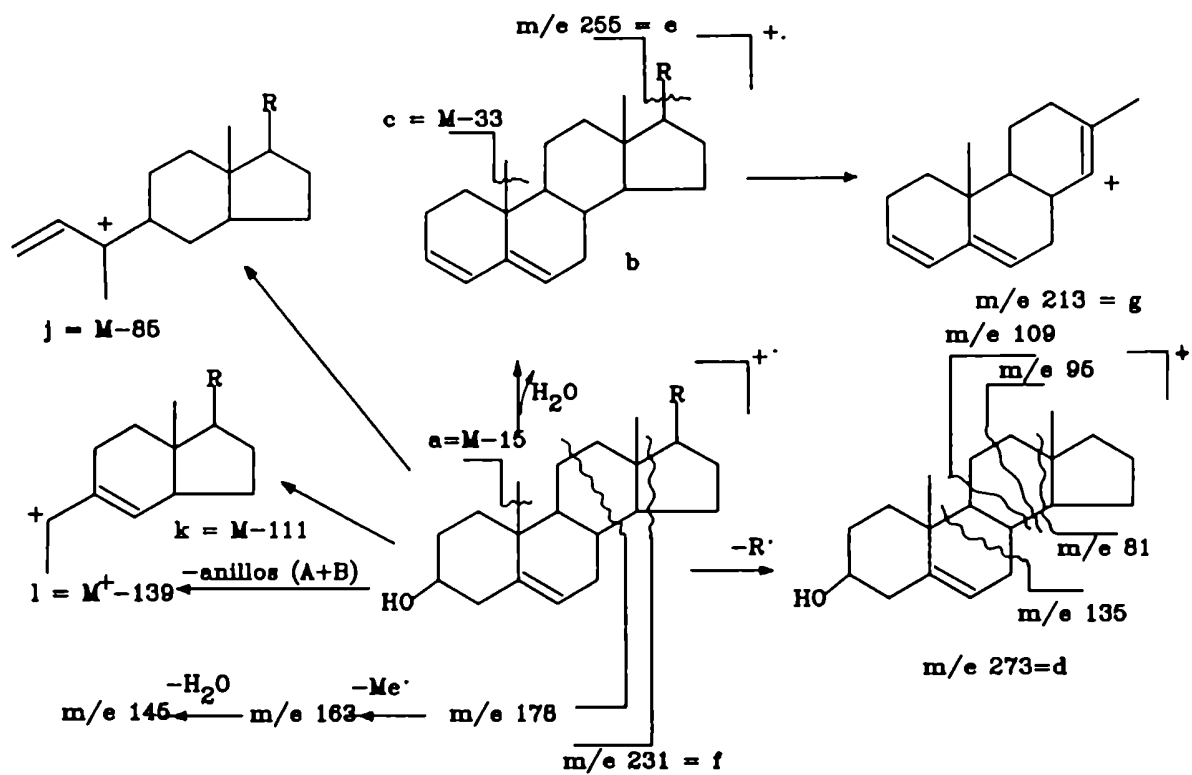


Figura 53

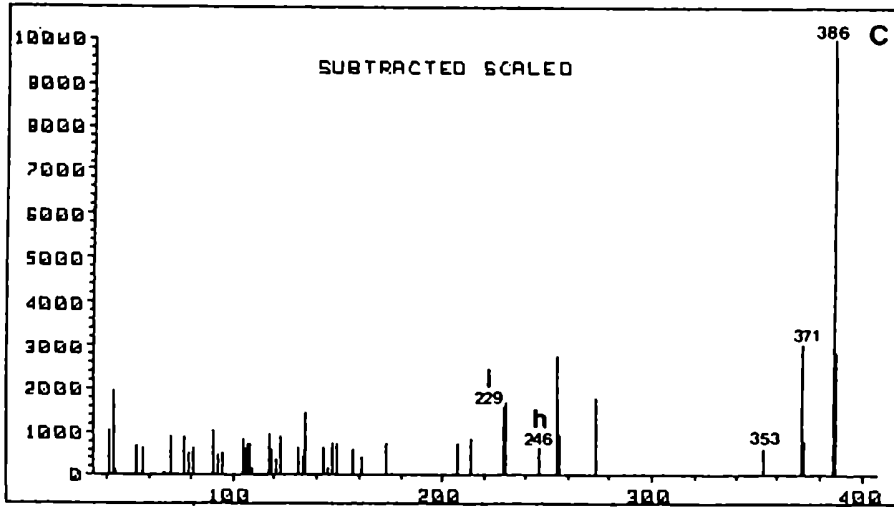
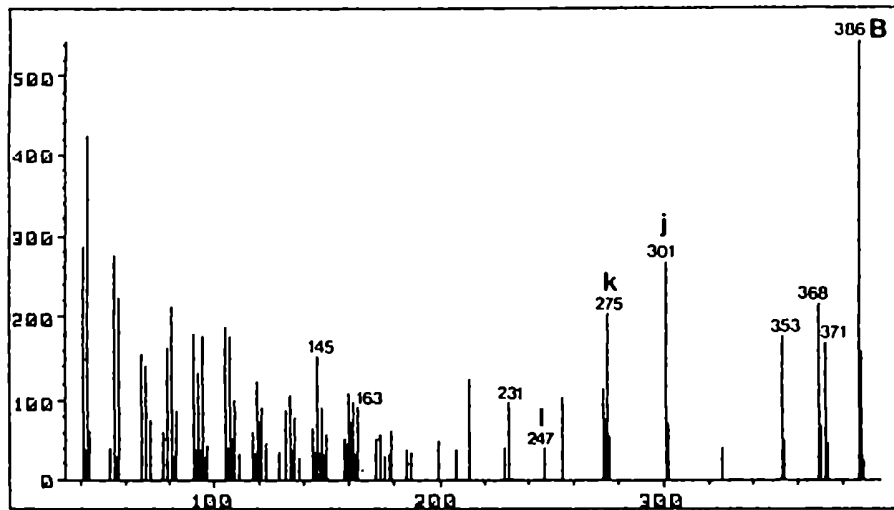
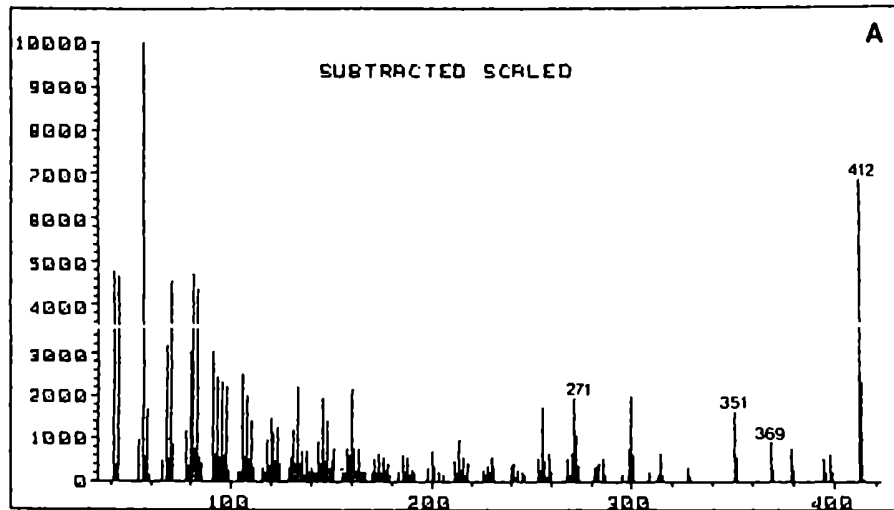


Figura 54: A- EM del estigmasterol 23.
 B- EM del colesterol 32.
 C- EM del Δ^7 -colesterol 55.

Además, el EM del compuesto 23 (Fig. 54 A) presentaba un fragmento a m/e 369 correspondiente a $M^+ - 43$ (y a m/e 351, $M^+ - 43 - \text{agua}$) que se debería a la pérdida de isopropilo terminal típico de Δ^{22} -esteroles [KNIGHTS, 1967] y un ión a m/e 271, correspondiente a la pérdida de cadena lateral y de dos hidrógenos característico de esteroides con cadena lateral insaturada [WYLLIE, 1968].

De todo lo expuesto se deduce que el compuesto 23 es el estigmasterol, mientras que los compuestos 32, 22 y 24 corresponden a colesterol, campesterol y sitosterol respectivamente (Fig. 53). Finalmente, se analizó esta mezcla mediante CGL capilar con testigos corroborándose la identidad de estos Δ^5 -esteroides.

Δ^7 -Esteroides

Al efectuar el análisis de CGL-EM (Fig. 52) se observó la presencia de otros compuestos, 55, 56 y 58 con t_R 12,84, 13,41 y 14,91 min, que presentaban los mismos iones moleculares que el colesterol, campesterol y sitosterol pero que aparecieron respectivamente a tiempos de retención mayores y con una abundancia relativa del 100%. Además estos espectros prácticamente no exhibían los iones j, k y l, muy intensos para los Δ^5 -esteroides (Fig. 53). Estas características permitirían caracterizarlos como Δ^7 -esteroides [KNIGHTS, 1967]. En la Fig. 54 se pueden apreciar las diferencias en los perfiles de los EM de Δ^5 -colesterol (Fig. 54 B) y Δ^7 -colesterol (Fig. 54 C).

Las señales correspondientes a $M^+ - \text{Me}$, $M^+ - \text{H}_2\text{O}$ y $M^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{Me}$ fueron, en general, comparativamente más débiles en los Δ^7 -esteroides que en los Δ^5 -esteroides, lo que corroboraría la asignación.

También aparecieron los iones h e i a m/e 246 y 229 respectivamente, relacionados con la pérdida de la cadena lateral. Como era de esperar, estos iones fueron más abundantes para los correspondientes Δ^7 -esteroides. El ión h se produciría por pérdida de cadena lateral y 27 una que involucraría a los C-16 y C-17; i provendría de la pérdida de hidroxilo a partir de h. Dado que no se ha esclarecido la génesis de ambos iones, h e i, se sugiere [KNIGHTS, 1967] que ocurriría la migración de la doble unión para dar especies cargadas que contendrían a los anillos A, B y C (Fig. 55).

Finalmente, del análisis realizado se determinó la identidad de los compuestos 55, 56 y 58 como Δ^7 -colesterol, Δ^7 -campesterol y Δ^7 -sitosterol respectivamente. En el caso del compuesto 55 se pudo realizar CGL capilar con un testigo de Δ^7 -colesterol y confirmar la asignación.

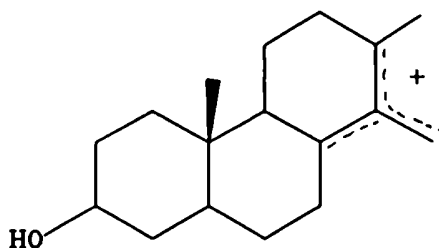


Figura 55

Dihidroesterol

El compuesto 25 presentaba en CGL-EM un tiempo de retención (14,45 min) algo mayor al del sitosterol 24 (14,36 min) mientras que su ión molecular a m/e 416 difería en dos una (Fig. 56). Como se observaba pérdida de agua a partir del M^+ , se confirmó la presencia de un alcohol.

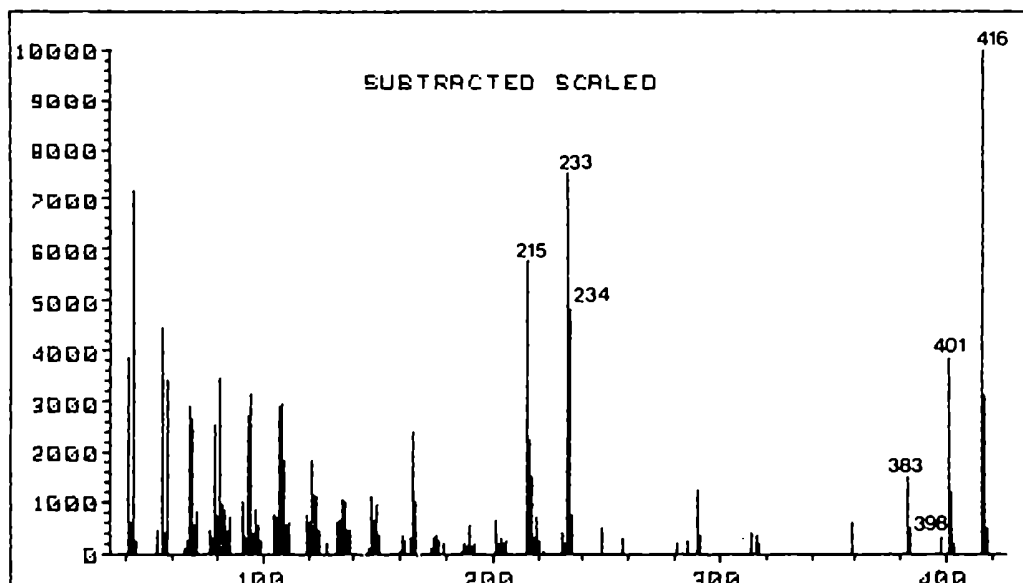


Figura 56: EM del dihidrositosterol 25.

También los fragmentos a m/e 233 y a m/e 215, tenían un valor de 2 una mayor con respecto a los iones análogos del sitosterol (Fig. 53); además mostró un ión a m/e 234 característico de esteroides saturados. Concordantemente, no se detectaron los iones j (416-85), k (416-111) y l (416-139) a m/e 331, 305 y 277 respectivamente, diagnósticos de esteroides con una insaturación en C-5.

La génesis de los fragmentos a m/e 233 y m/e 234 serán analizadas al

tratar los dihidroesteroides 92 y 94 de *F. hieronymi*.

Todo lo expuesto concordaría con una estructura de dihidrositosterol para el compuesto 25.

Δ^4 -Cetoesteroides

Continuando con el análisis por EM de otros picos del CGL-EM (Fig. 52) se observó que los compuestos 57 y 60 poseían un patrón de rupturas semejantes y con iones moleculares de m/e 398 y m/e 412 respectivamente.

En ambos espectros aparecían los iones m/e 124 (pico base) y m/e 271 (M^+ - cad. lateral) que señalaría la existencia en el ciclo esteroidal de un oxígeno y dos insaturaciones. Ésto también se correspondería con una cadena lateral saturada de nueve átomos de carbono para el compuesto 57. Además el EM del compuesto 60 (Fig. 57) exhibía una señal a m/e 229, que corresponde a M^+ - 141 - 42 que indicaría la presencia de una cadena lateral saturada de diez átomos de carbono.

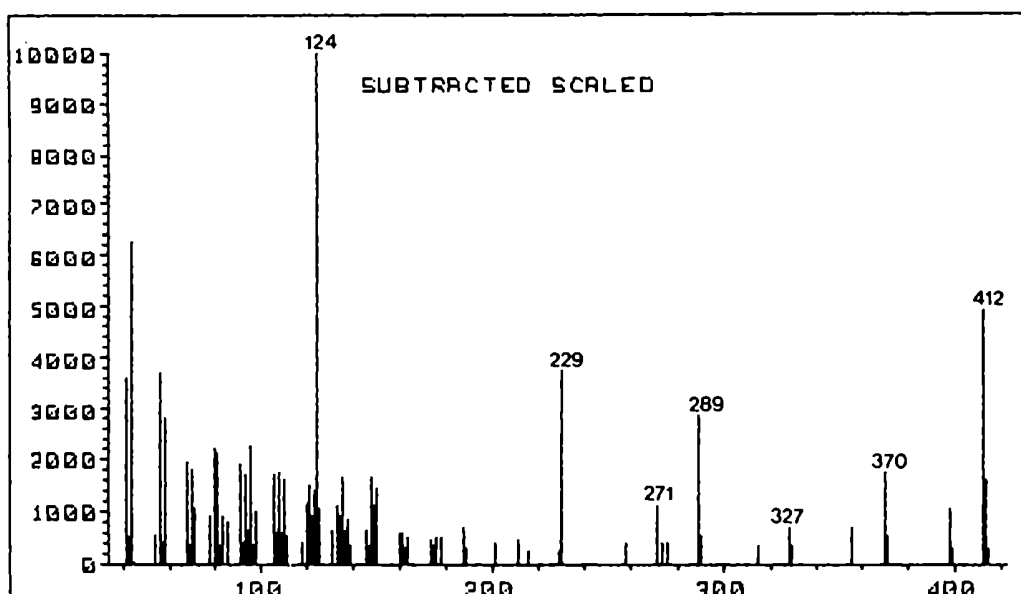
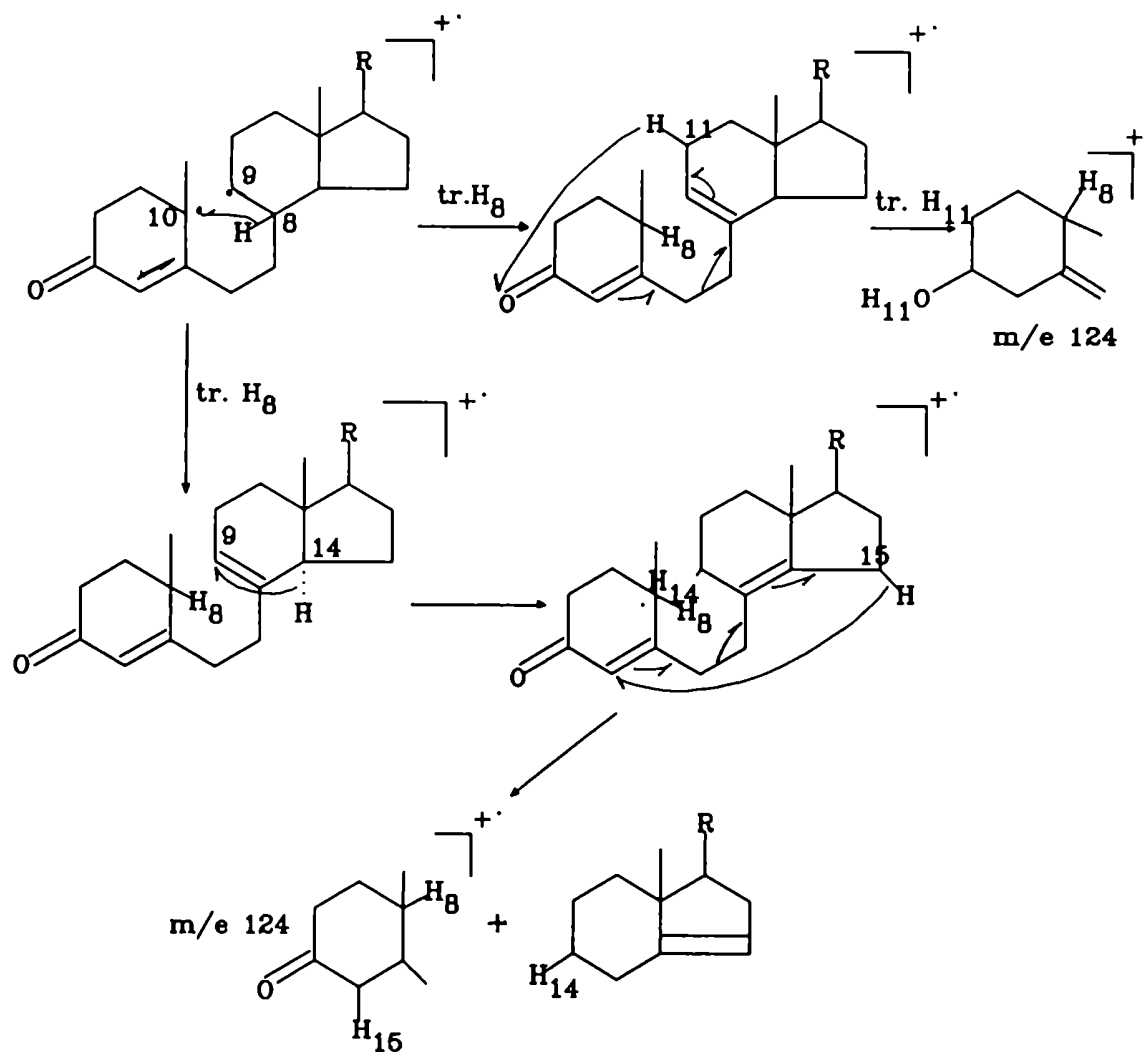


Figura 57: EM de la sitosterona 60.

Debido a la ausencia del fragmento correspondiente a M^+ - H_2O y presencia del M^+ - 42, o sea pérdida de cetena, cabía esperar que se tratara de cetonas insaturadas. Además, el pico base a m/e 124 resulta característico de Δ^4 -3-cetoesteroides [VON UNRUH, 1970].

Shapiro y Djerassi [SHAPIRO, 1964] establecieron que el fragmento de m/e 124, que comprendía al anillo A y a los C-6, C-19 y a dos hidrógenos adicionales, se generaba por fisión del enlace 9-10, activado alílicamente,

que estaría favorecida también por disminuir la compresión estérica del sistema fusionado de los anillos A y B, y por posterior migración de hidrógenos, principalmente de C-8 y C-11 (Fig. 58). Ésta podría producirse por varios mecanismos ya que en estos procesos están involucrados los hidrógenos 8, 11, 15 y 14.



Posibles orígenes del ión m/e 124 en Δ^4 -cetoesteroides

Figura 58

Si los hidrógenos itinerantes son los 8 y 11 no está establecido cuál migra primero. Debido al rol migratorio crucial desarrollado por el H-8 en la ruptura del anillo B para dar el fragmento M^+-123 , Brown y Djerassi propusieron que primero se transfiere este H-8. Además determinaron por estudios con marcación [BROWN, 1980] que el H-11 sólo contribuye como segundo hidrógeno itinerante, en menos del 50% de los iones de m/e 124 formados. Como

el H-15 se incorpora junto con el H-8 en un porcentaje comparable al del H-11 en este ión, se postula un desplazamiento sigmatrópico 1,3 de un H-14 hacia el C-9, generándose así un dieno ionizado que es termodinámicamente más estable. La posterior migración del H-15, alílico, al C-4 induce la ruptura del enlace entre C-6 y C-7 produciéndose así el ión m/e 124 y un dieno neutro (Fig. 58).

Otro ión de abundancia considerable es M^+-123 , que se origina, como en el caso del m/e 124 por ruptura de los enlaces 6-7 y 9-10, pero con retención de la carga en la porción que contiene los anillos C y D. Los hidrógenos itinerantes serían H-8, 9, 14 y 15 (Fig. 59).

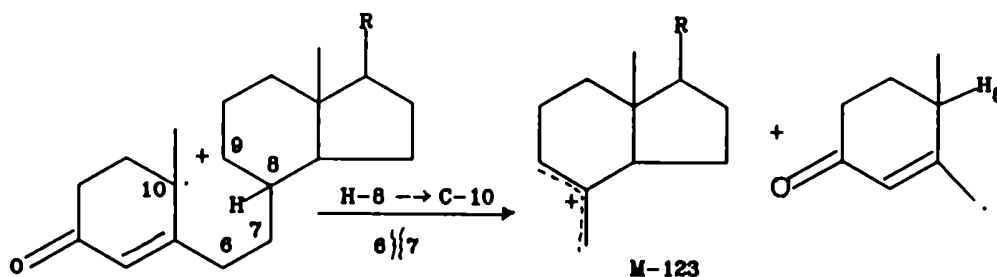
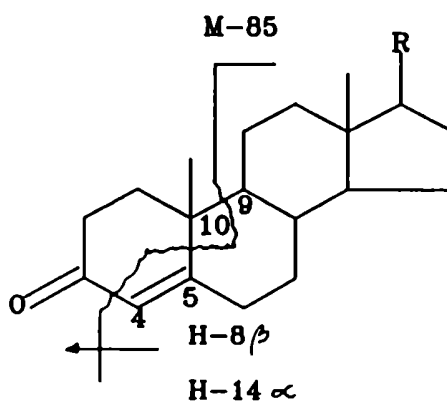


Figura 59

Otra señal que da información acerca de la ubicación del grupo carbonilo y del doble enlace, es la que aparece a M^+-85 , característica de los Δ^4 -3-cetoesteroides. Este fragmento provendría [BROWN, 1980] del ión M^+-42 , correspondiente a la pérdida de cetena, por ruptura de las uniones 9-10, 5-10 y 3-4 y la migración de dos hidrógenos desde este fragmento cargado (Fig. 60).



Possible origen del fragmento M-85

Figura 60

Todas las rupturas analizadas para los compuestos 57 y 60 coinciden con

las esperadas para 24-metilcolest-4-en-3-ona (campesterona) y 24-etilcolest-4-en-3-ona (sitosterona) respectivamente (Fig. 61).

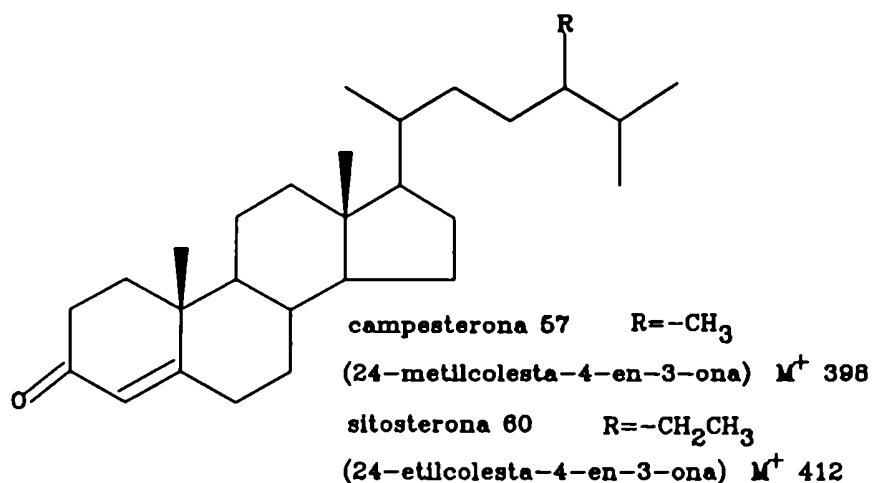


Figura 61

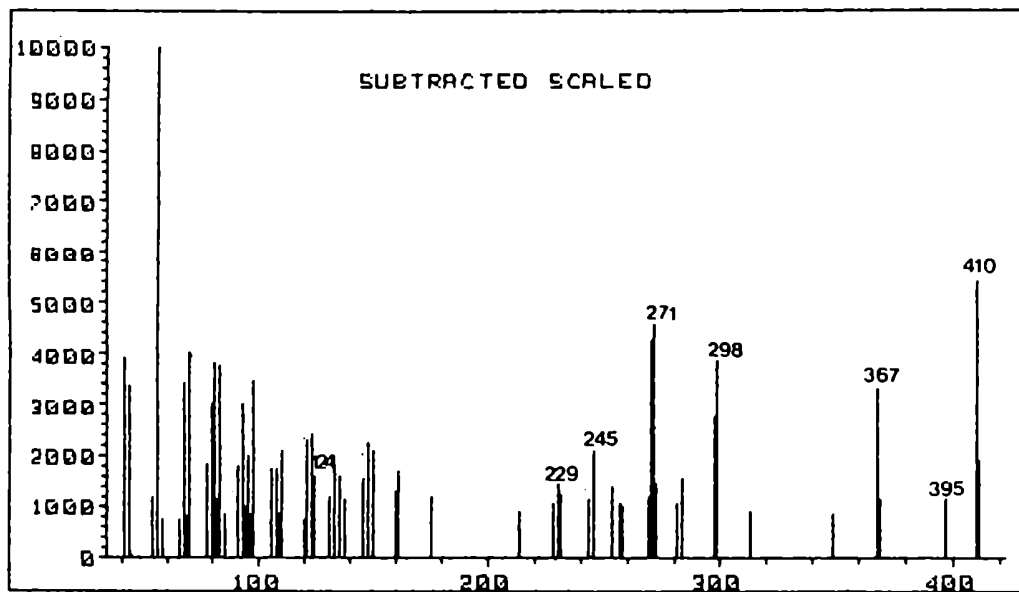
Δ^7 -Cetoesteroide

El compuesto 59 con t_R 15,10 min (Fig. 52) presentó en su EM un ión molecular a m/e 410, con pérdida de metilo y cetena, pero no de agua. Al igual que los cetoesteroides anteriormente analizados exhibió un fragmento a m/e 271, lo que indicaría un ciclo esteroidal oxigenado diinsaturado, aunque no aparecieron los fragmentos característicos de Δ^4 -3-cetoesteroides [BROWN, 1980] a M⁺ - 57 (pérdida de cetena y metilo, m/e 353), M⁺ - 85 (pérdida de C-1, 2, 3, 10 y 19, m/e 325), M⁺ - 123 (m/e 287) y el ión a m/e 124 (16,1 %) resultó poco importante (Fig. 62).

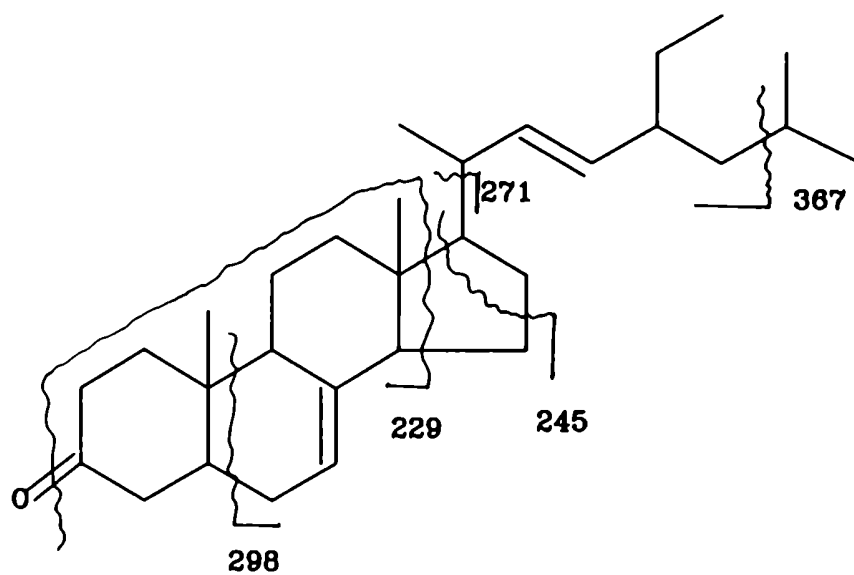
Así, el compuesto 59 sería un 3-cetoesteroide con una insaturación en el núcleo distinta a Δ^4 . Por otro lado, la cadena lateral de 139 una sería de 10 átomos de carbono con una insaturación. Dada la presencia del ión m/e 367 (33,1 %) de alta abundancia, correspondiente a la pérdida de isopropilo, la cadena lateral podría ser análoga a la del estigmasterol ya que habría una activación alílica debido al doble enlace Δ^{22} .

Como además aparecen fragmentos relativamente importantes a m/e 229, 243 y 245, relacionados el primero con la pérdida de cadena lateral y anillo D con transferencia de hidrógeno, y los otros dos con el análogo del ión h (ver Δ^7 -esteroides), o sea M⁺ - cadena lateral - CO y M⁺ - cadena lateral - 27 con transferencia de hidrógeno, que son diagnósticos de Δ^7 -esteroides [PARTRIDGE,

1977], y a m/e 298 y 299 correspondientes a la ruptura alílica del anillo B con y sin transferencia de hidrógeno, el compuesto 59 sería la Δ^7 -estigmasterona (espinasterona). Las rupturas características se esquematizan en la figura 62.



EM de la Δ^7 -estigmasterona 59.



Δ^7 -estigmasterona M^+ 410

Figura 62

ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO

A una solución del extracto metanólico se le agregó poliamida para columna y se evaporaron los solventes. La pastilla resultante se sometió a sucesivas percolaciones con cloruro de metileno, agua y metanol. Luego de evaporar los respectivos solventes se obtuvieron: un percolado de cloruro de metileno, un percolado acuoso y un percolado metanólico, procediéndose a continuación a estudiarlos separadamente, excepto el percolado acuoso que no se analizó.

Asimismo, se tomó una porción del extracto metanólico original para proceder a analizar los alcaloides.

MARCHA DE ALCALOIDES

Por CCD de alúmina del extracto metanólico y posterior revelado con el reactivo de Dragendorff, se observaron varias manchas de color anaranjado, lo que evidenciaría la probable presencia de alcaloides, ya que el ensayo puede dar falsos positivos [FARNSWORTH, 1962].

El estudio de los supuestos alcaloides se encaró con una marcha separativa en una primera etapa con fines analíticos, para hallar los pH adecuados de extracción (pH= 8 y 11) y de precipitación de las bases solubles en agua como reineckatos (pH= 11) [GHOSAL, 1970].

Alcaloides extraídos a pH= 8

Luego de purificarlos por cromatografía en columna de alúmina, se los analizó por CGL capilar. Dada la diversidad de compuestos presentes en pequeña cantidad, se procedió a realizar CGL-EM para poder elucidar así las estructuras de los compuestos mayoritarios 61 y 62.

Alcaloides extraídos a pH= 11

Se los sometió a una cromatografía en columna de alúmina y posteriormente se identificó los compuestos 63, 64 y 65 por CGL capilar-EM.

Análisis estructural de los compuestos 61 a 65

En todos los casos, el análisis por CGL-EM brindó espectros con un patrón de rupturas común. Así, se observaron picos a m/e 55, 82 y 111 característicos de un anillo pirrolizidínico sustituido [NEUNER-JEHLER, 1965]. Pero los iones moleculares resultaron ser pares, indicando así un número par de átomos de nitrógeno en la molécula. Además, se evidenciaron rupturas con pérdida de fragmentos nitrogenados con y sin pérdida de H, como así también se detectó la pérdida de 29 uma y 28 uma a partir del M^+ o de otros fragmentos, correspondientes a la eliminación de formilo y monóxido de carbono característica de los compuestos pirrolizidínicos con puente etéreo de la familia de alcaloides del *Lolium*.

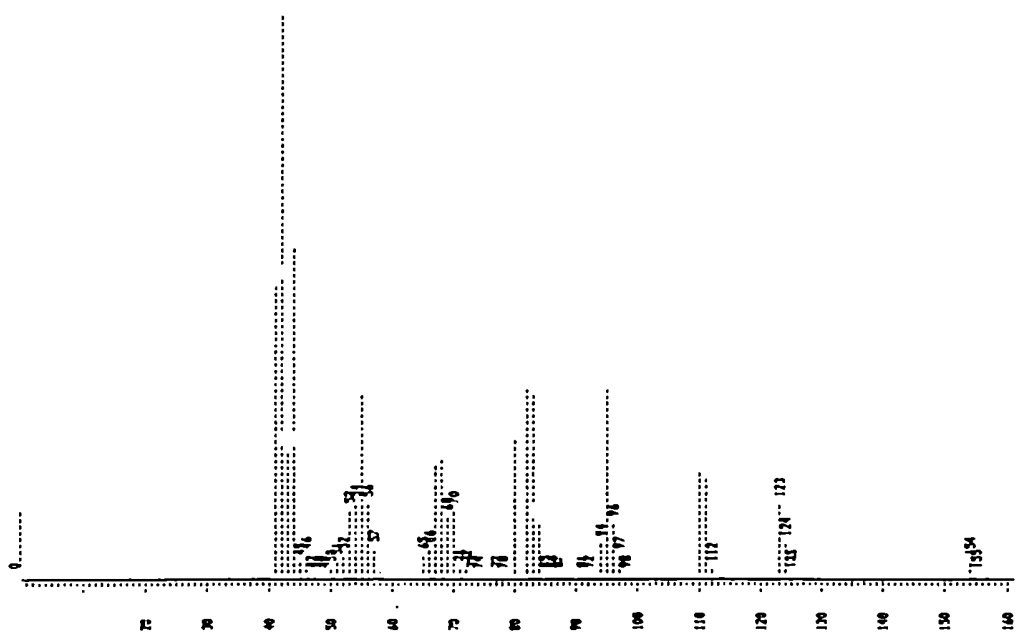
La diferencia en los EM de los compuestos 61 a 64 se manifiesta en la aparición de algunos fragmentos específicos que se forman como consecuencia de los distintos grupos que sustituyen al nitrógeno unido al C-1 del núcleo pirrolizidínico.

El espectro de masas del compuesto 63, de M^+ 154, presentó iones característicos a m/e 124, 111, 110, 95, 83 y 82 (Fig. 63). El fragmento a a m/e 124 se forma directamente a partir del M^+ por pérdida del grupo lateral, lo que indicaría que la posición 1 estaría sustituida con un grupo N-metilamino (-NHMe). A su vez, el ión a m/e 95 surge del ión m/e 124 por pérdida del radical formilo debido a la ruptura de los enlaces C-1-C-8, C-1-C-2 y C-7-O (puente etéreo), lo cual se demostró por iones metaestables [AKRAMOV, 1968].

También se comprobó [AKRAMOV, 1968] que el ión f a m/e 83 proviene del fragmento c, a m/e 111, por eliminación de monóxido de carbono. Además, los iones c y d (a m/e 110) se originan del M^+ , por pérdida del C-1 con su correspondiente sustituyente como molécula neutra o radical respectivamente (Fig. 63).

El pico base de este espectro es el ión g a m/e 82, que surgiría de m/e 110 por pérdida de CO, aunque aún no se comprobó por iones metaestables.

Finalmente, se llega a la conclusión que el compuesto 63 corresponde a la lolina, siendo el EM hallado concordante con el de literatura [AKRAMOV, 1968].



EM de la lolina 63

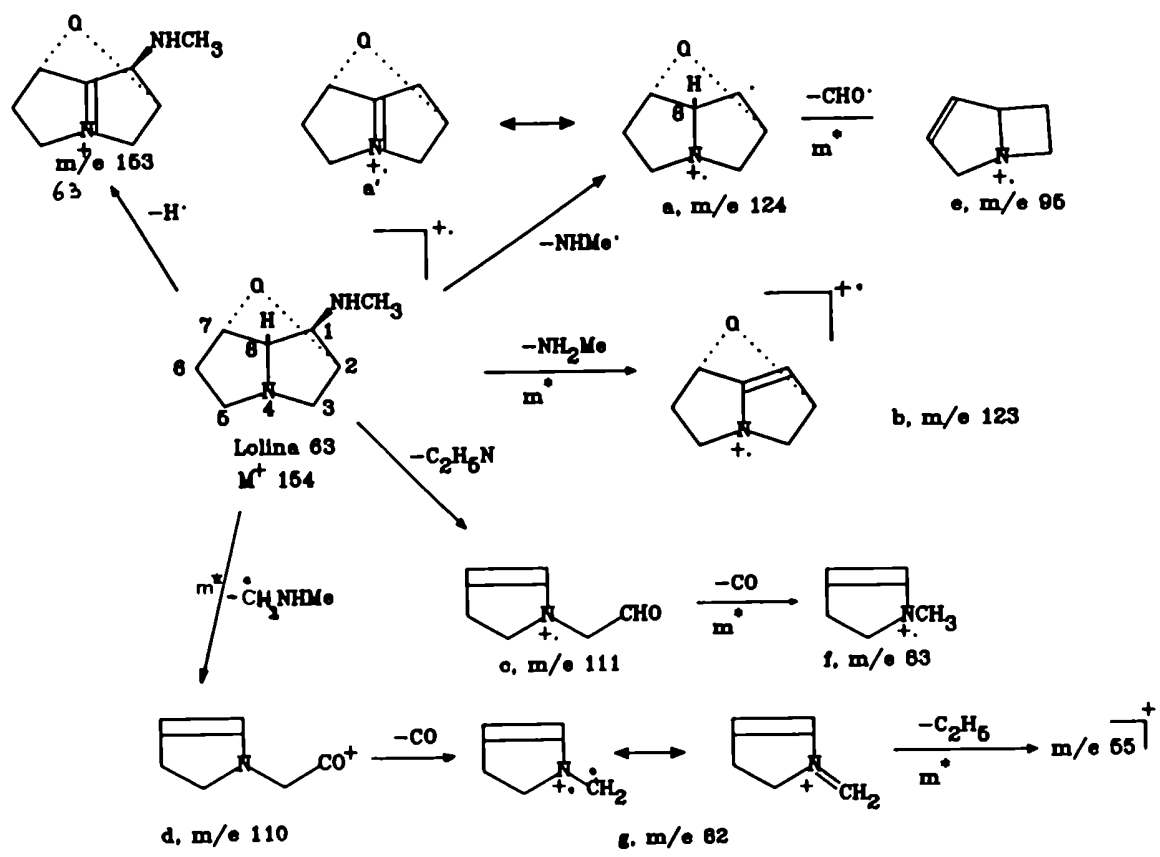


Figura 63

El EM del compuesto 64 mostró un M^+ a 14 una mayor que el anterior 63, mientras que los iones a a h tenían los mismos valores de m/e (Fig. 63). Además, había un fragmento diagnóstico a m/e 153 correspondiente a la pérdida de metilo, por lo que se deduce que la única diferencia estaría en la sustitución del nitrógeno de C-1. Así, el compuesto 64 sería la N-metillolina.

Cabe aclarar que para este compuesto se comprobó por iones metaestables [AKRAMOV, 1968] que la génesis del ión e sería distinta de la del compuesto 63, ya que se originaría a partir del b, por pérdida de CO, y éste a su vez del M^+ ($M^+ m^* > b m^* > e$) (Fig. 64).

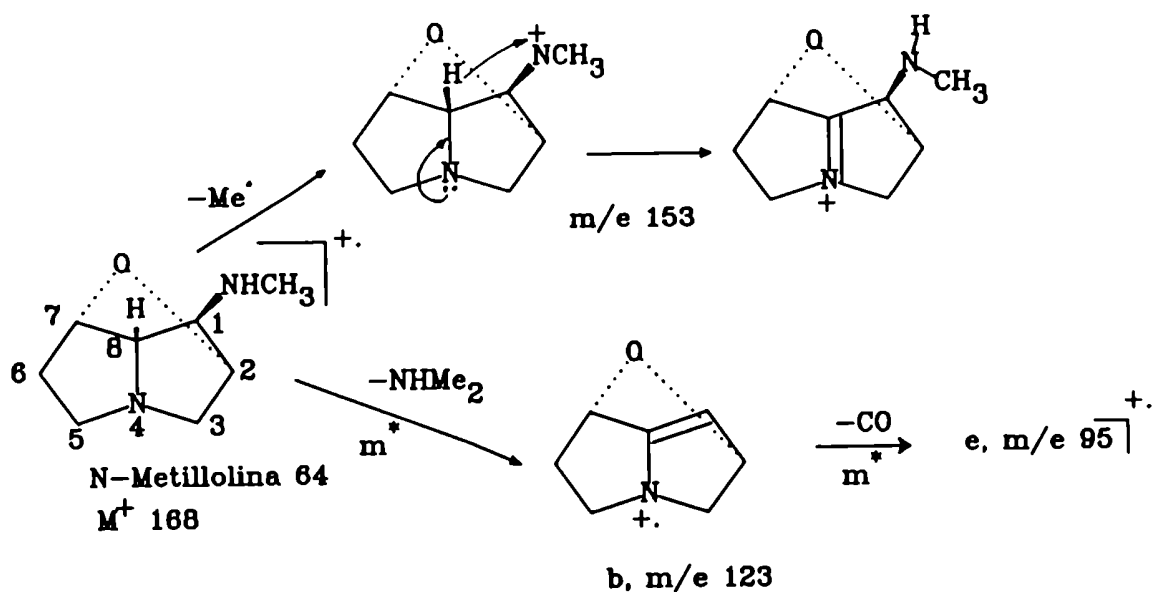
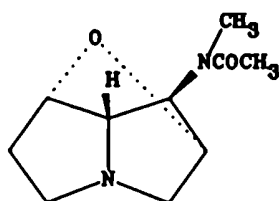


Figura 64

Para el compuesto 61 se obtuvo un EM con M^+ a m/e 196 y también los iones a m/e 124 a, 123 b, 111 c, 110 d, 95 e y 82 g, característico de los alcaloides de la lolina (Fig. 63), y fragmentos característicos a m/e 43, correspondiente a acetilo, y a M^+-43 , el cual se formaría a partir del ión molecular por pérdida de acetilo y migración de un hidrógeno radical de C-8 al grupo nitrogenado lateral.

Así, el compuesto 61 correspondería a la N-acetillolina (lolinina) (Fig. 65).



N-Acetylloolina 61

$M^+ 196$

Figura 66

Análogamente, el EM del compuesto 62 (Fig. 66) muestra los fragmentos a a h (Fig. 63) correspondientes a un núcleo pirrolizidínico con puente etéreo C-2-O-C-7. Dado que el M^+ era m/e 182, el sustituyente del C-1 podría ser -NMeCHO (N-formillolina) ó -NHCOMe (N-acetilnorlolina).

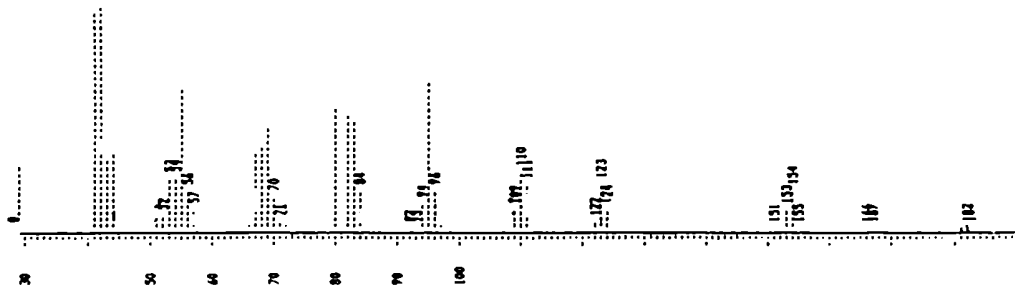
Como a partir del M^+ se observa la pérdida de hidrógeno, CO y formilo (a m/e 181, 154 y 153 respectivamente) (Fig. 66), que no se detectaron en el espectro de masas de la N-acetilnorlolina [ROBBINS, 1972], y la ausencia de señales a m/e 139 ($M^+ - \text{AcO}^\cdot$) y a m/e 125, ambas presentes en el EM de la N-acetilnorlolina [ROBBINS, 1972], se deduce que el compuesto 62 sería la N-formillolina.

Se comprobó la coincidencia con el EM de N-formillolina hallada en festuca alta Kentucky 31 [ROBBINS, 1972].

El EM del compuesto 65 (Fig. 67), cuyo M^+ es 194, muestra un fragmento importante a m/e 109 (70,9) y otros diagnósticos a m/e 165 ($M^+ - 29$), 150 (165-Me), 122, 94 (122-CO) y 81 (109-CO). Si comparamos con los valores de los fragmentos obtenidos en el compuesto 63 (Fig. 63) se podría correlacionar el ión a m/e 122 con a, m/e 94 con a-CO, 109 con c, 82 con g y 81 con f (Fig. 67). La alta abundancia relativa del ión a m/e 109 se justificaría por la formación de un catión radical dialílico y a su vez con la conjugación de las dobles uniones.

Así, se llega a la conclusión que el compuesto 65 tendría una insaturación en el anillo A del núcleo pirrolizidínico con puente etéreo C-1-C-8, y que además en el C-1 habría un N,N-acetilmetilo (-NMeCOMe). La posición de la insaturación en Δ^6 o Δ^7 sería poco probable ya que generaría mucha rigidez en el C-7, que es cabeza de puente.

De lo expuesto se propone para el compuesto 65 la estructura de Δ^5 -N-acetylloolina, sujeta a posteriores confirmaciones, ya que no ha sido descrita en literatura hasta la fecha.



EM de la N-formillolina 62

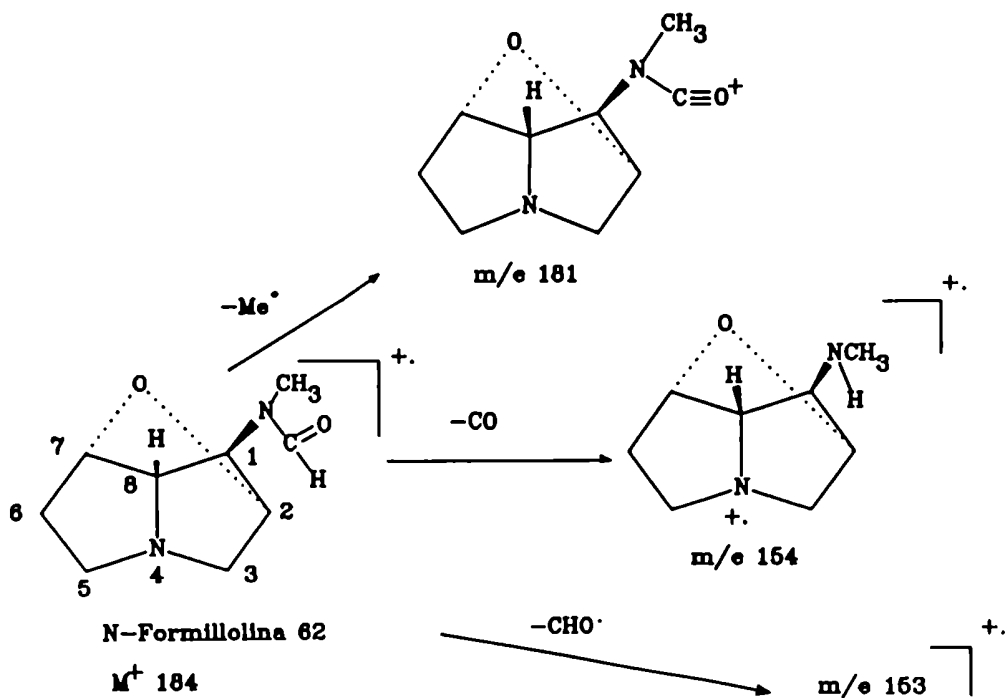
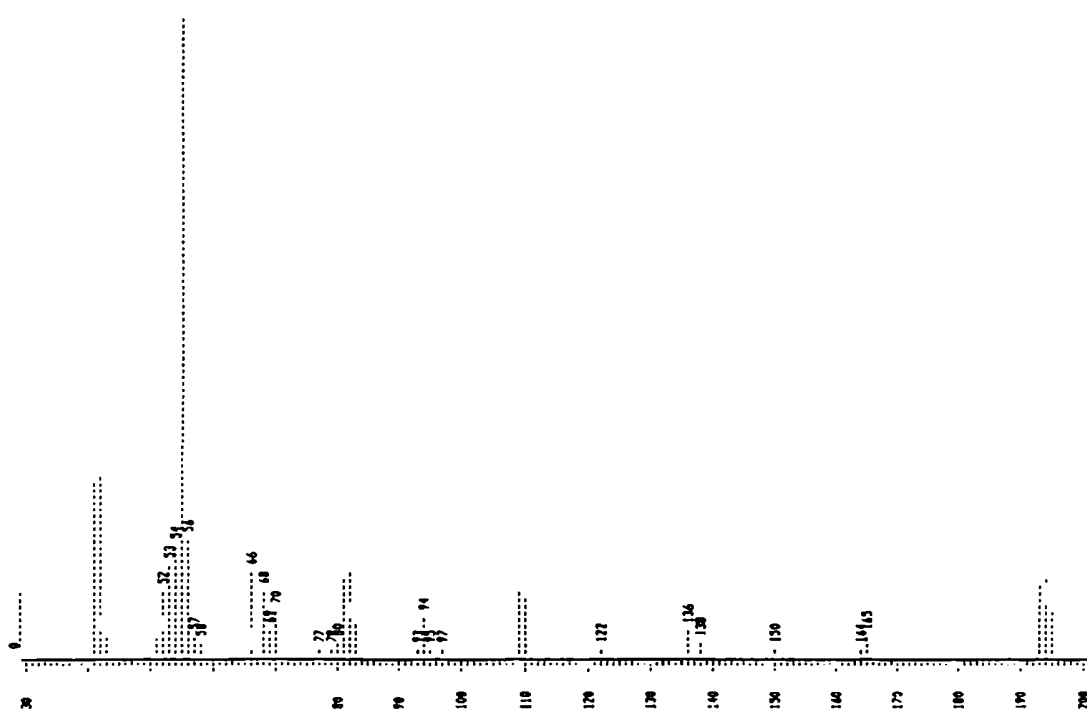


Figura 66



EM de la Δ^5 -N-acetilololina.

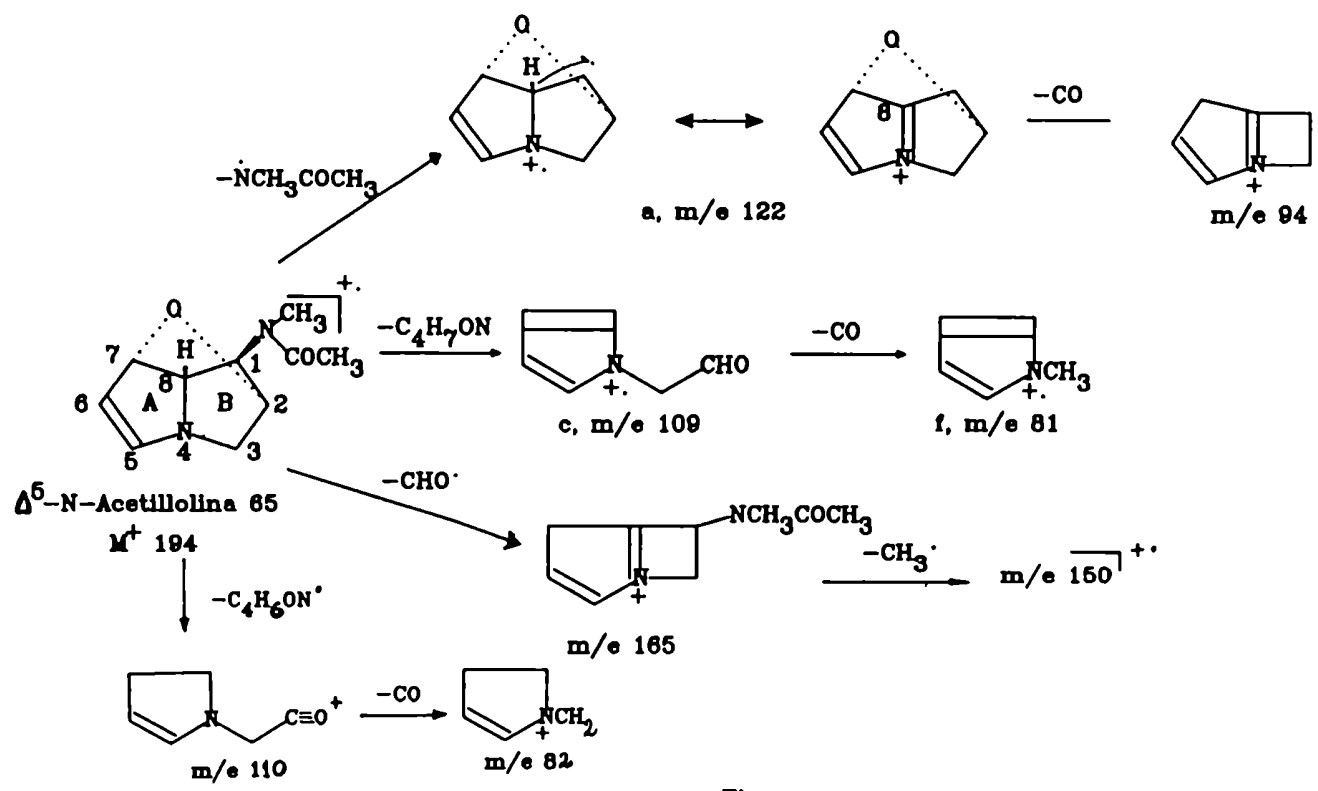


Figura 67

Esta familia de alcaloides parece ser característica sólo de algunas especies de *Lolium* y de *Festuca*; esta distribución restringida es quizás la causa de la poca información disponible en lo referente a las fragmentaciones que sufren por EM y análisis estructural de este grupo de alcaloides. De hecho, no se conocen estudios con marcación con deuterio para determinar la génesis de algunos fragmentos que, en cambio, sólo han sido en parte analizados por la presencia de iones metaestables [AKRAMOV, 1968].

La lolina se aisló por primera vez en 1955 [YUNUSOV, 1955], pero recién una década más tarde se logró por métodos degradativos asignarle la estructura correcta, con el puente etéreo uniendo el C-2 y el C-7 (Fig. 63) [AKRAMOV, 1965].

Por estudios por difracción de rayos X del clorhidrato de lolina [WILSON, 1981] se confirmó su estructura espacial (Fig. 63), y por dispersión anómala se estableció la configuración absoluta de los alcaloides del grupo lolina [BATES, 1972].

Análisis de los reineckatos

Como resultado de la marcha separativa para el estudio de compuestos alcaloidales en el extracto metanólico, se obtuvo un precipitado a pH= 11 con el agregado de una solución saturada de la sal de reinecke. Luego se liberó la base por cromatografía de intercambio aniónico y se purificó por cromatografía en columna de alúmina, obteniéndose así el compuesto 66 en forma de acetato.

El espectro $^1\text{H-RMN}$ (D_2O) de este protoalcaloide 66 (Fig. 68) evidenció la presencia de dos singuletes, uno a δ 2,07 que integraba para tres hidrógenos y otro a δ 3,25 que integraba para nueve hidrógenos. El primero puede asignarse al metilo del acetato, mientras que el último a tres metilos unidos a un nitrógeno cuaternario.

Se observan además, dos multipletes a δ 3,56 y 4,10 integrando ambas señales para dos hidrógenos, correspondientes a un metileno unido al nitrógeno cuaternario y a un metileno con un sustituyente oxigenado respectivamente. Así, pudo determinarse la identidad de este compuesto 66 como colina (forma acetato) $((\text{Me}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}) \text{AcO}^-$, siendo el espectro obtenido concordante con el informado en literatura [SADTLER, 1976].

Para verificar este resultado se lo derivatizó como picrato; el punto de fusión de éste resultó coincidente con el de un testigo, además el punto de fusión mezcla no mostró depresión.

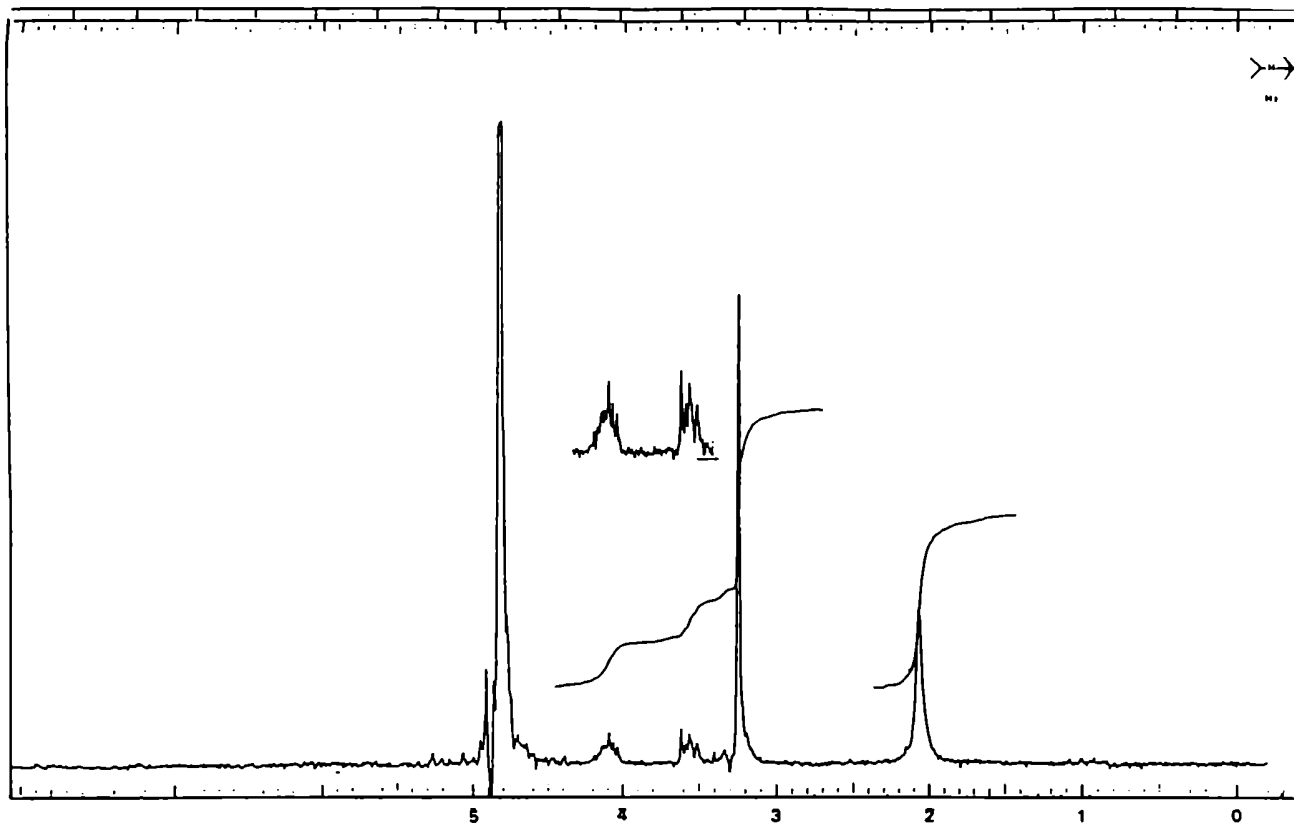


Figura 68: Espectro de ^1H -RMN (D_2O) de colina 66 (forma acetato).

ESTUDIO QUÍMICO DEL PERCOLADO DE CLORURO DE METILENO

Un análisis preliminar del percolado de cloruro de metileno mediante CCD de silicagel en distintos solventes de desarrollo reveló en parte un comportamiento similar a las fracciones relativamente más polares del extracto de éter de petróleo.

Se sometieron 6 g de este percolado a una cromatografía rápida en columna seca de silicagel utilizando gradientes de CH_2Cl_2 -AcOEt y AcOEt-MeOH. El análisis mediante CCD de los eluidos así obtenidos permitió reagruparlos en cinco fracciones. Es de destacar que todas las fracciones contenían gran cantidad de clorofilas y otros pigmentos, lo que dificultaría el aislamiento de las otras sustancias.

Las fracciones 1, 2 y 3 contenían principalmente clorofilas, alcoholes lineales y esteroides.

La fracción 4 por CCD de silicagel reveló con óleum/calor una mancha marrón de alcoholes lineales y dos manchas moradas de $R_f = 0,60$ (esteroides) y $0,45$ (lignanos) (CH_2Cl_2 -AcOEt, 8:2). Por posterior purificación por cromatografía en columna de silicagel se aislaron principalmente dos subfracciones que revelaron manchas moradas (óleum/calor) por CCD. La primera subfracción 4a revelaba una única mancha morada de $R_f = 0,45$ (CH_2Cl_2 -AcOEt, 8:2) y dió positivo el ensayo de FeCl_3 2% en etanol (coloración verde) para compuestos fenólicos. Su grado de pureza se analizó por CGL (OV-17 3%) y CGL capilar (DB-1) y CLAR, dando un único pico correspondiente al compuesto 67.

La segunda subfracción 4b presentó trazas del compuesto 67 y otra mancha morada de menor R_f correspondiente a otro lignano 68 (HPTLC de silicagel, CH_2Cl_2 -metanol, 25:1, $R_f_{67} = 0,64$; $R_f_{68} = 0,40$), que también dió positivo el ensayo con cloruro férrico y que fue purificado por CLAR de fase reversa.

Con el propósito de eliminar la gran cantidad de clorofilas presentes en la fracción 5, se la recrystalizó de acetato de etilo, y por CCD de silicagel (AcOEt-MeOH, 9:1) se corroboró la presencia de impurezas ($R_f = 0,6-1$) principalmente en las aguas madres. El precipitado (126 mg) se purificó mediante cromatografía en columna y se obtuvieron tres subfracciones (5 a-c); la subfracción 5a contenía pigmentos, la subfracción 5b (3 mg) glicósidos esteroidales que revelaron una mancha alargada lila de $R_f = 0,8$ y la subfracción 5c (26 mg) exhibió una mancha morada de $R_f = 0,5$ por CCD de silicagel (AcOEt-MeOH, 9:1) revelando con H_2SO_4 10% en metanol/calor.

Por su comportamiento cromatográfico, la subfracción 5c podría contener glicósidos de esteroides urónicos. Sin embargo, dieron negativa la metilación (CH_2N_2 /éter) en placa delgada, descartándose así la presencia de ácidos carboxílicos. Así, la subfracción 5c se sometió a una cromatografía en columna de silicagel y se obtuvo una fracción (4 mg) que revelaba dos manchas de color morado (óleum/calor) de $R_f = 0,49$ y $0,45$ por HPTLC (CH_2Cl_2 -MeOH, 17:3). Posteriormente se los separó por CLAR semipreparativo (RP-18) obteniéndose los compuestos 69 y 70.

Análisis del compuesto 67

Esta sustancia dió un resultado positivo (coloración verde) frente al ensayo con cloruro férrico para compuestos fenólicos. El espectro de ^{13}C -RMN de 67 mostraba pocas señales en relación al moderado ión molecular a m/e 358 de su espectro de masas, por lo que se sospechó una estructura con cierto grado de simetría.

El espectro de masas (Fig. 69 A) de 67 tenía también fragmentos característicos de un lignano tetrahidrofurofuránico [PELTER, 1967; Cap. 4] sustituido en posición 7 y 7' con el mismo grupo arilo correspondiente al ión de m/e 123 ($\text{Ar}_1^+ = 3\text{-metoxi-4-hidroxifenilo}$). Así, el arilo contendría un grupo metoxilo y un hidroxilo, coherente con el pico base a m/e 151 (Ar_1CO^+) que confirmó al grupo guayacilo como sustituyente.

El espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) de 67 también mostró la presencia de dos anillos aromáticos trisustituídos a δ 6,79-6,91 (6 H), un singulete correspondiente a dos metoxilos aromáticos a δ 3,91 y otra señal debida a dos hidroxilos a δ 5,66 (Fig. 69 B). Además exhibió señales acordes con un anillo tetrahidrofurofurano 2,6-disustituído en forma diecuatorial, ya que los hidrógenos bencílicos (H-7 y 7') dieron una única señal a δ 4,74 y los metilenos de C-9 y 9' resonaron en los rangos de δ 3,87 y 4,25 [PELTER, 1976; Cap.4]. El valor de la rotación específica, en módulo, relativamente bajo ($[\alpha]_D^{-30,7}$) corroboró la disposición *diecuatorial* para los grupos guayacilo [FREUDENBERG, 1960], mientras que su signo negativo indicó que se trataba del isómero levorrotatorio.

El espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3) totalmente desacoplado (Fig. 70 A) y el de SPDD (Fig. 70 B) de 67 corroboran esta estructura. En particular, los valores de los desplazamientos químicos de los C-1 y C-1' de los grupos guayacilo a 132,9 ppm, y de los C-7,7', C-8,8' y C-9,9' a 85,9, 54,1 y 71,7 ppm respectivamente, fueron los esperables para una orientación *diecuatorial* [PELTER, 1976; Cap. 4]; los valores de 108,6 (C-2 y 2'), 114,3 (C-5 y 5'), 118,9 (C-6 y 6'), 145,2 (C-4 y 4') y 146,7 ppm (C-3 y 3') fueron coherentes con el grupo aromático sustituido en posición 3 con un metoxilo (OMe 55,9 ppm) y en C-4 con un hidroxilo.

Así, el compuesto 67 sería el (-)-pinoresinol (Fig. 71) que, a diferencia de su enantiómero, se encuentra poco distribuido en la naturaleza [LIN-GEN, 1982; MARCOS, 1990] y hasta ahora no se lo había detectado en la familia de las Gramíneas.

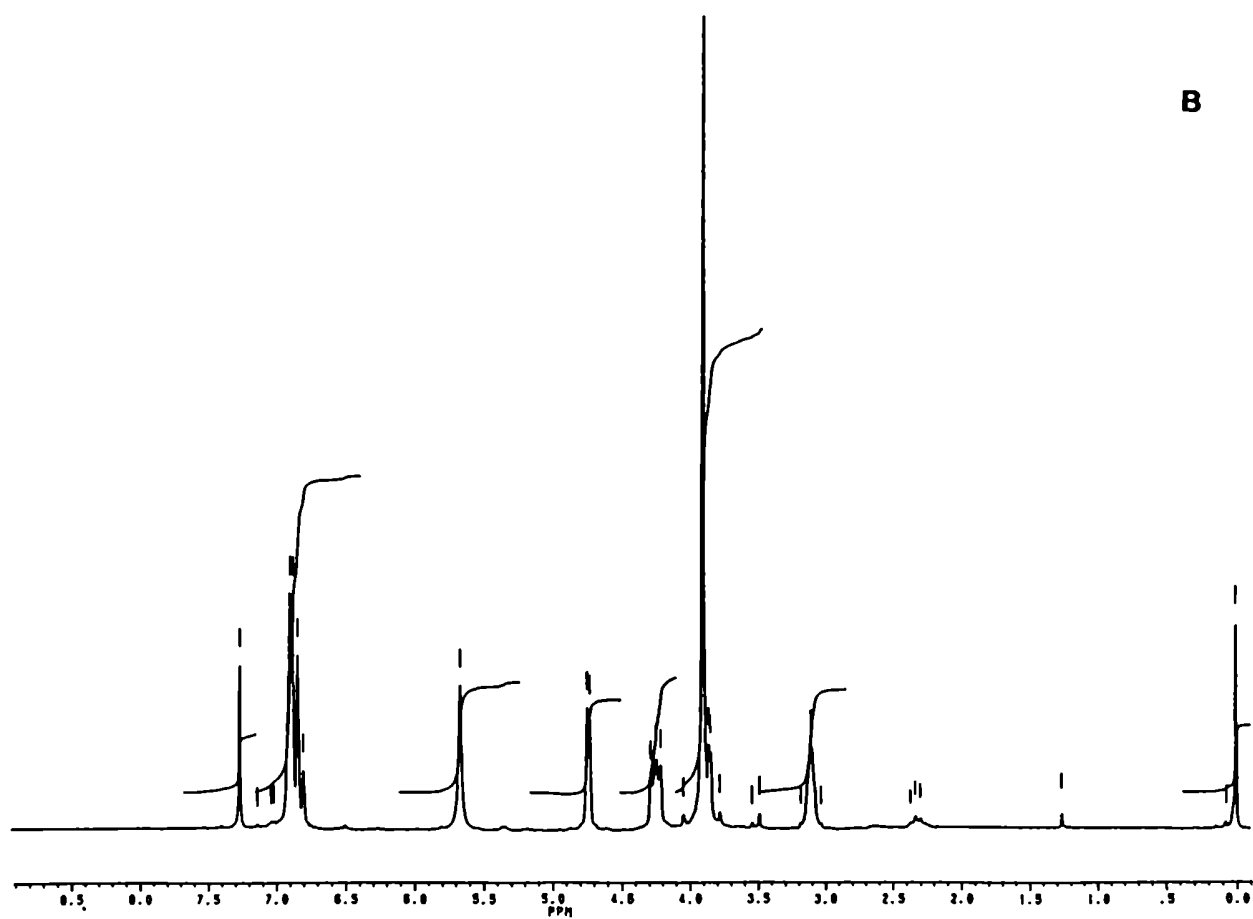
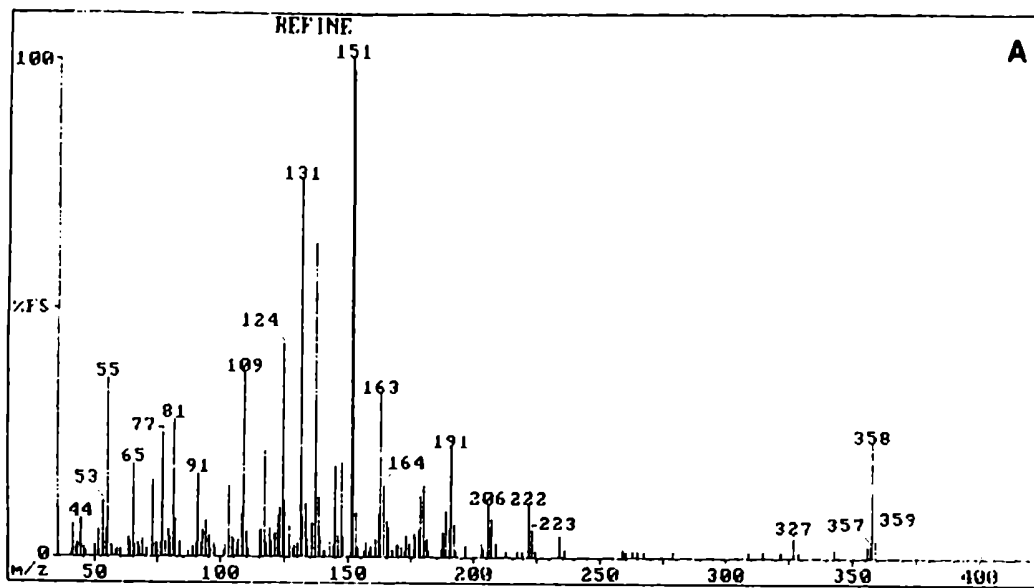


Figura 69: A- EM del (-)-pinoresinol 67.

B- Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) del (-)-pinoresinol 67.

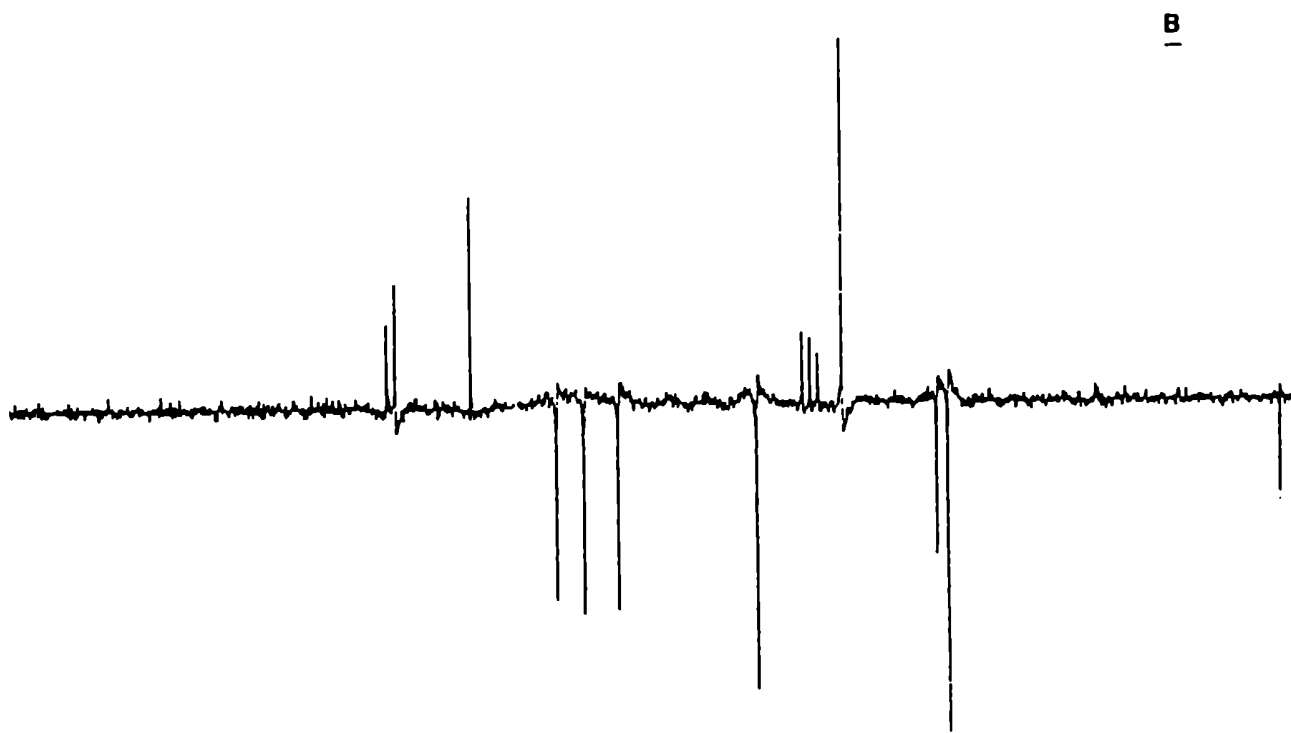
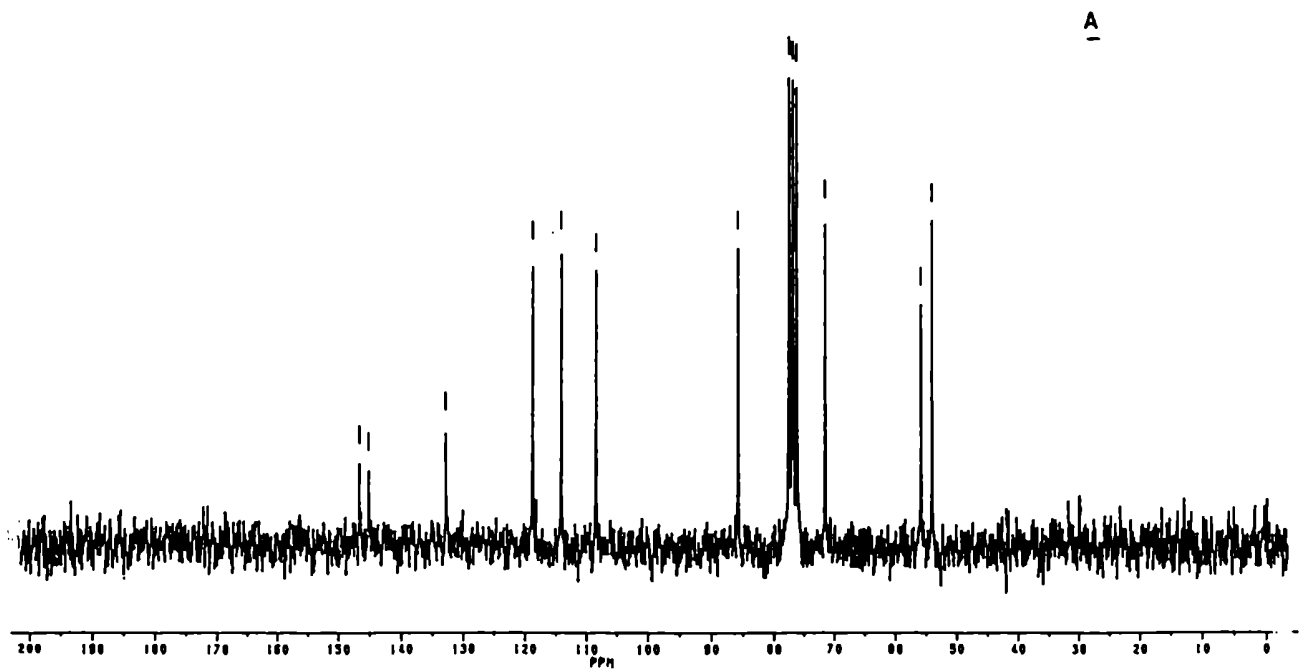
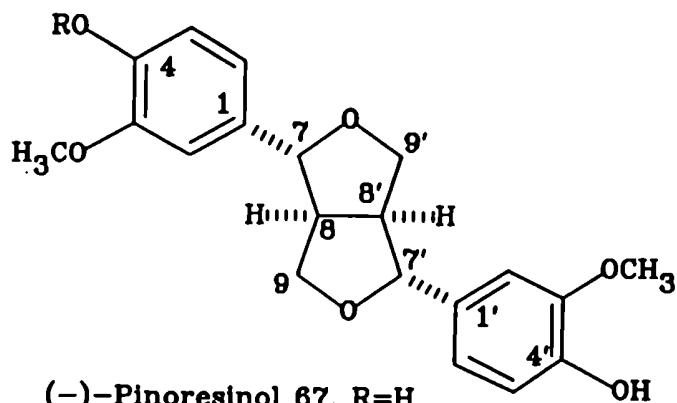


Figura 70: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3) del (-)-pinoresinol.

A- Totalmente desacoplado.

B- SPDD.



(-)-Pinoresinol 67, R=H

(-)-Pinoresinol-4-O- β -D-glucopiranosido 69, R=glc.

Figura 71

Análisis del compuesto 68

El compuesto 68, de Rf menor al del (-)-pinoresinol pero en un rango esperable para un lignano sin glicosidar [RAHMAN, 1990b] presentó un comportamiento también fenólico frente al ensayo con cloruro férrico.

El espectro de masas (Fig. 72) mostró un M^+ a m/e 328 y picos atribuibles a fragmentos que contienen grupos hidroxifenilo y guayacilo, a m/e 121 y 151 respectivamente, a partir de un lignano perteneciente al sistema 2,6-diariltetrahidrofurofurano [Cap. 4] (Fig. 73).

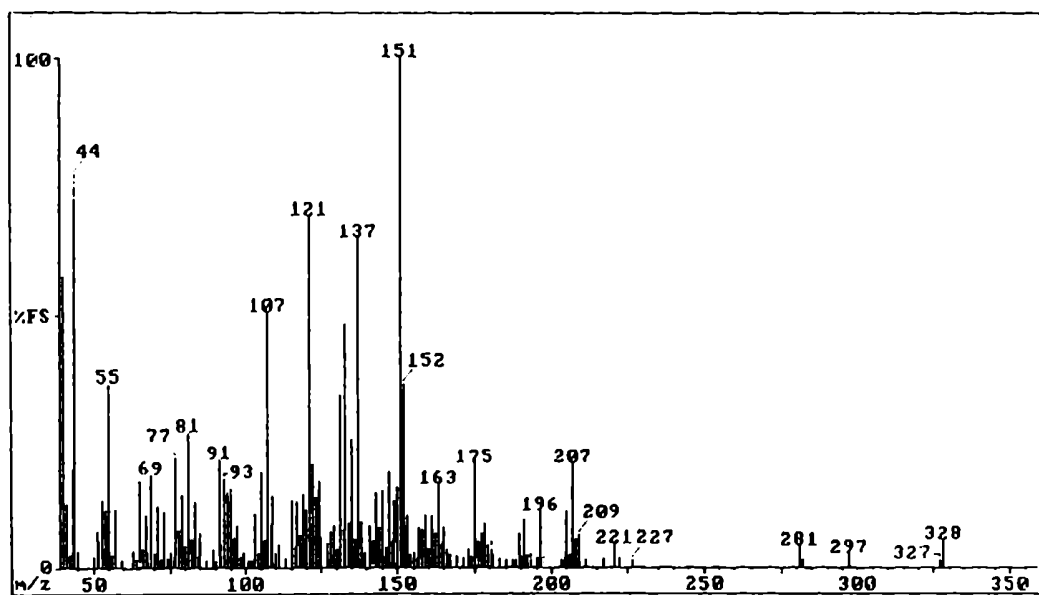


Figura 72: EM del compuesto 68.

El espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) de **68** era también consistente con el sistema de ciclos y la estereoquímica de los anillos aromáticos era claramente *axial-ecuatorial*, más que *diecuatorial* o *di axial*, mostrando pertenecer a la serie "*epi*". Así, además de las señales de un metoxilo aromático, dos hidroxilos y siete protones aromáticos, el espectro mostraba ocho protones adicionales en más de cuatro entornos magnéticos. En particular, las señales de los hidrógenos bencílicos H-7 y 7' no fueron idénticas y aparecieron como dobletes a δ 4,28 (J 7,0 Hz) y 4,73 (J 4,1 Hz) respectivamente. Se postuló que el protón *axial* H-7 estaba muy cerca del grupo arilo *axial* de C-7' y estaba en su cono de protección [PELTER, 1976; Cap. 4]. Así, el protón *axial* H-7 se corrió a campos más altos mientras que el H-7' adyacente al anillo aromático *axial* resonaba a campos más bajos.

Para la asignación de las restantes señales se procedió a la comparación con las del epipinoresinol y la filigenina, que a su vez se asignaron por espectros bidimensionales ^1H - ^1H -COSY. Rahman y col. [RAHMAN, 1990b] lograron a través de espectros de diferencia en el efecto nuclear de Overhauser asignar correctamente al H-9 *axial* e H-9 *ecuatorial* en estos lignanos furofuranos, revirtiendo las asignaciones anteriormente publicadas. Análogamente para el compuesto **68**, el H-9 *axial* resonó a campos más bajos, a δ 4,22 mientras que el H-9 *ecuatorial* se desplazó a campos mayores, a δ 3,31; además apareció un doblete a δ 3,68 asignable a H-9 *ecuatorial* e H-9' *ecuatorial*.

El espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3) del compuesto **68** (Fig. 74) fue concordante con estos resultados y fue de mucha utilidad para establecer la estereoquímica de los grupos arilos. Es decir, cuál de los grupos arilo estaba en posición *axial* y cuál en *ecuatorial*. Desafortunadamente, no hay en literatura datos adecuados de ^{13}C -RMN de lignanos tetrahidrofurofuránicos con arilos monooxygenados, ya que son raros en la Naturaleza y sólo se informaron el ligbalinol (2,6-di-(4-hidroxifenil)-3,7-dioxabicyclo-[3.3.0]-octano) y el isómero *diecuatorial* del compuesto **68** [CUENCA, 1991] pero sin datos de ^{13}C -RMN.

Por eso se usaron como compuestos modelo la (+)-filigenina, el (-)-pinoresinol y el (+)-epipinoresinol (Fig. 75). Como era de esperar, los desplazamientos químicos de los C-1 y C-1' dependieron de la naturaleza de los grupos arilos y de su estereoquímica. En cambio, los desplazamientos químicos de C-7, 8, 9 y 7', 8', 9' estaban afectados sólo por la estereoquímica del esqueleto [RAHMAN, 1990b; PELTER, 1976]. Al comparar en los compuestos modelo

Los C-1 y C-1' de los grupos guayacilo se obtuvo un valor de 132,8 a 133,0 ppm para el caso *ecuatorial*, mientras que el guayacilo *axial* apareció a 130,6 ppm en CDCl_3 , considerando el efecto de solvente. Así, el valor de 132,9 ppm en el compuesto 68 se asignaría al C-1 del grupo guayacilo *ecuatorial* y, en consecuencia, el grupo 4-hidroxifenilo sería *axial*.

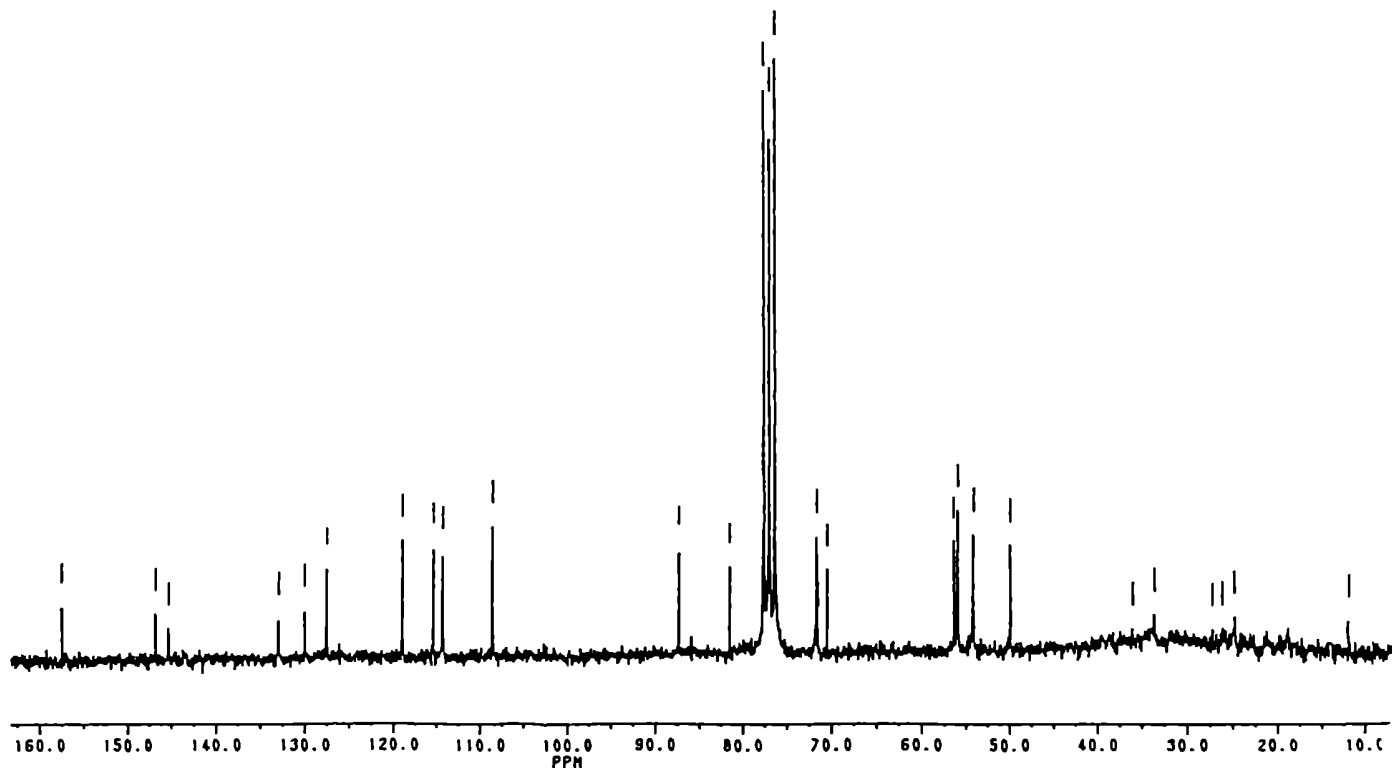


Figura 74: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3) del compuesto 68.

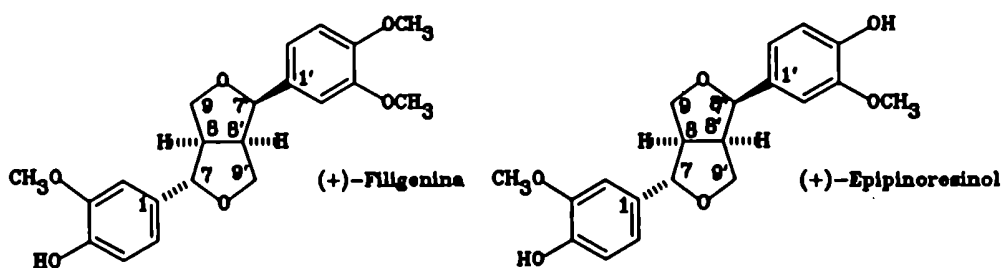


Figura 76

De esta manera, y teniendo en cuenta su rotación específica ($[\alpha]_D -110^\circ$), se identifica al compuesto 68 como (-)-(1S, 2S, 5S, 6R)-2-(4-hidroxifenil)-6-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octano, siendo un lignano natural de estructura no descrita anteriormente en la literatura.

Análisis del compuesto 69

El compuesto 69 presentaba un valor de $R_f = 0,45$ por CCD de silicagel (CH_2Cl_2 -MeOH, 17:3), por lo que podría tratarse de un compuesto más polar que 67 y 68, como por ejemplo de un lignano monoglicosidado [RAHMAN, 1990b]. Luego se corroboró la naturaleza del azúcar mediante el espectro de ^{13}C -RMN (DMSO-d_6), ya que mostró, entre otras, seis señales entre 61,2 y 100,3 ppm atribuibles a una hexosa sustituida en C-1, en particular a un β -D-glucopiranosido [BOCK, 1979]. Además, por hidrólisis del compuesto 69 con β -glucosidasa se obtuvo glucosa y (-)-pinoresinol.

El espectro de ^1H -RMN (CD_3OD) de 69 (Fig. 76) señaló la presencia de dos metoxilos aromáticos en entornos ligeramente distintos a δ 3,85 y 3,86, seis hidrógenos aromáticos a δ 6,76-7,15; los hidrógenos bencílicos H-7 e H-7' resonaron a $\delta = 4,75$, siendo coherente con una estereoquímica *diecuatorial* ya que en las series *diaxiales* aparecerían a δ 4,0 [ATAL, 1967].

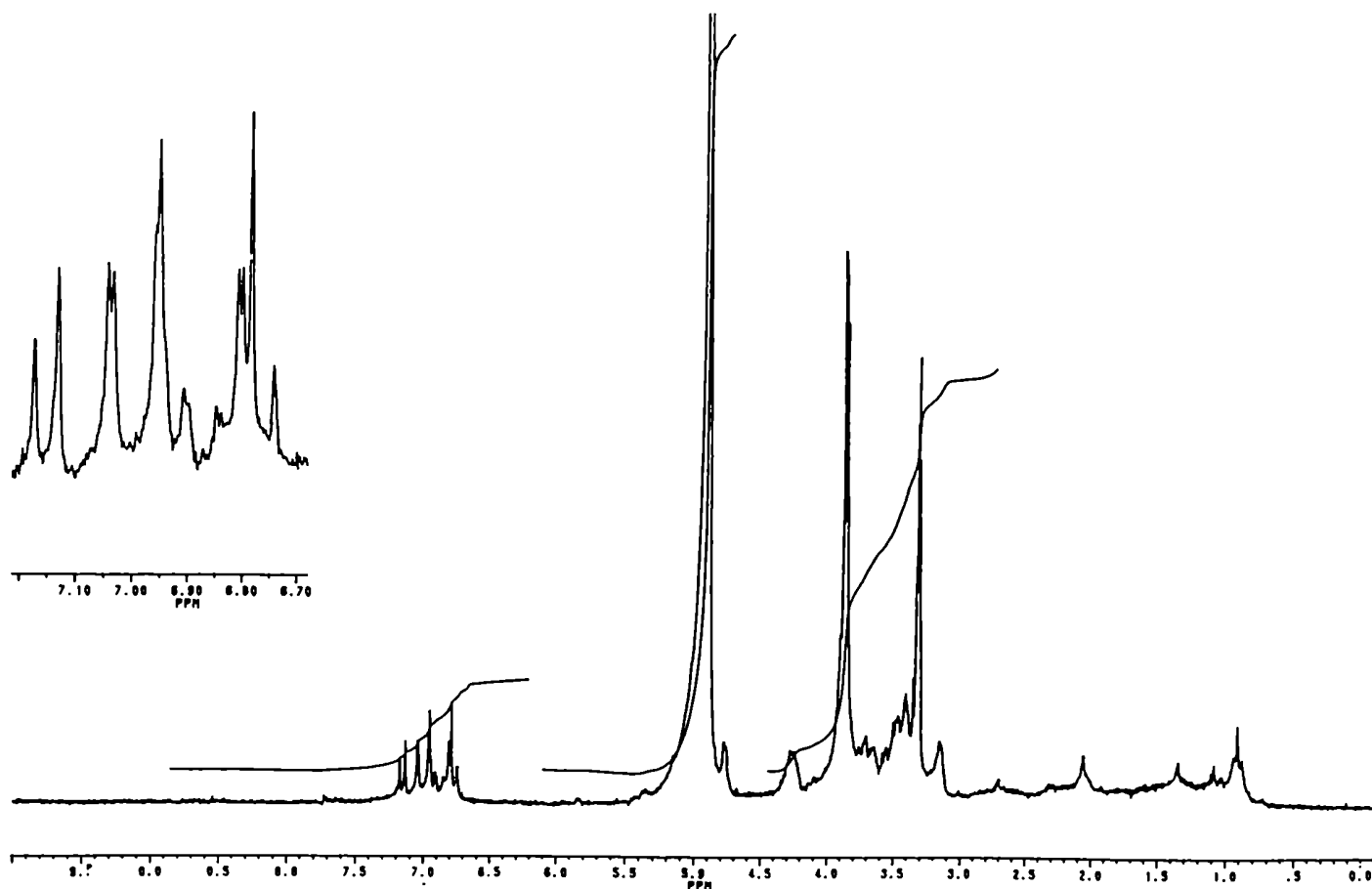


Figura 76: Espectro de ^1H -RMN (CD_3OD) del (-)-pinoresinol-4-O- β -D-glucopiranosido 69.

Esta disposición espacial *diecuatorial* de los grupos arilos se corrobora con el espectro de ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) teniendo en cuenta que los valores de los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del anillo tetrahidrofurofurano fueron similares a los del (-)-pinoresinol 67, puesto que serían sólo sensibles a la estereoquímica [CHIBA, 1980].

De ésto se deduce que la diferencia en los valores de los desplazamientos químicos de los C-1 y C-1' de los grupos guayacilo se debe a que, aunque ambos tienen una disposición *ecuatorial*, sólo uno de ellos estaría glicosidado (Tabla 6).

Tabla 6: Comparación de valores de desplazamientos químicos (^{13}C -RMN, DMSO- d_6) de los grupos guayacilo en lignanos glicosidados y libres.

lignano ppm	δ_c (ppm)			δ_c (ppm)			$\Delta\delta_{lit}$
	69	67	$\Delta\delta_{69,67}$	70	71	$\Delta\delta_{70,71}$	
C-1	135,3	132,3	3,0	135,3	132,3	3,0	3,1
C-1'	132,3			131,5	131,6		3,1
C-2	110,7	110,4	0,3	110,7	110,6	0,1	0,3
C-2'	110,3			103,8	104,0		0,4
C-3	149,1	147,6	1,5	149,1	147,5	1,6	1,5
C-3'	147,7			148,0	148,0		1,6
C-4	146,0	146,1	-0,1	146,0	146,0	0,0	0,0
C-4'	146,1			135,3	135,1		0,0
C-5	115,4	115,0	0,4	115,4	115,2	0,2	0,5
C-5'	115,2			148,0	148,0		0,5
C-6	118,3	118,9	-0,6	118,3	118,6	-0,3	-0,5
C-6'	118,8			103,8	104,0		-0,4

69: (-)-Pinoresinol-4-O- β -D-glucopiranósido.

67: (-)-Pinoresinol.

$\Delta\delta_{69,67}$: $\delta_{\text{guayacilo glicosidado 69}} - \delta_{\text{guayacilo 67}}$

70: (+)-Medioresinol-4-O- β -D-glucopiranósido.

71: (+)-Medioresinol [DEYAMA, 1985].

$\Delta\delta_{70,71}$: $\delta_{\text{guayacilo glicosidado 70}} - \delta_{\text{guayacilo 71}}$

lit.: 1'-hidroxipinoresinol-4,4'-di-O- β -D-glucopiranósido.

$\Delta\delta_{lit.}$: $\delta_{\text{guayacilo glicosidado lit.}} - \delta_{\text{guayacilo pinoresinol}}$ [DEYAMA, 1985].

Como era de esperar [DEYAMA, 1986], el efecto de glicosidación sobre los átomos de carbono aromáticos del compuesto 69, en comparación con la aglicona, o sea el compuesto 67, produce (Tabla 6) un corrimiento a campos bajos del C-1 (+3,0 ppm) y del C-3 (+1,5 ppm), un pequeño corrimiento a campos bajos del C-2 (+0,3 ppm) y del C-5 (+0,4 ppm), un pequeño desplazamiento a campos altos del C-4 (-0,1 ppm) y del C-6 (-0,6 ppm). Además los rangos de variaciones de estos corrimientos ($\Delta\delta$) fueron coherentes con los informados para un grupo guayacilo glicosidado con respecto a uno libre, ya que dependen de los sustituyentes en el anillo aromático. Es por eso que en la tabla 6 se comparan con los valores de $\Delta\delta$ obtenidos para el 8'-hidroxipinoresinol-4,4'-di-O- β -D-glucopiranosido respecto del pinoresinol [DEYAMA, 1985].

De este análisis se deduce que el monoglucósido 69 es el (-)-pinoresinol-4-O- β -D-glucopiranosido (Fig. 71), que de esta manera se informa por primera vez en la familia de las Gramíneas.

Análisis del compuesto 70

El compuesto 70 mostró características cromatográficas similares al (-)-pinoresinol-O- β -D-glucósido 69, por lo que se sospechó la presencia de otro monoglucósido. Esto se avaló por las seis señales en el ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) de 70 (Fig. 77) en el rango 100,3 (C-1") a 60,8 (C-6") ppm.

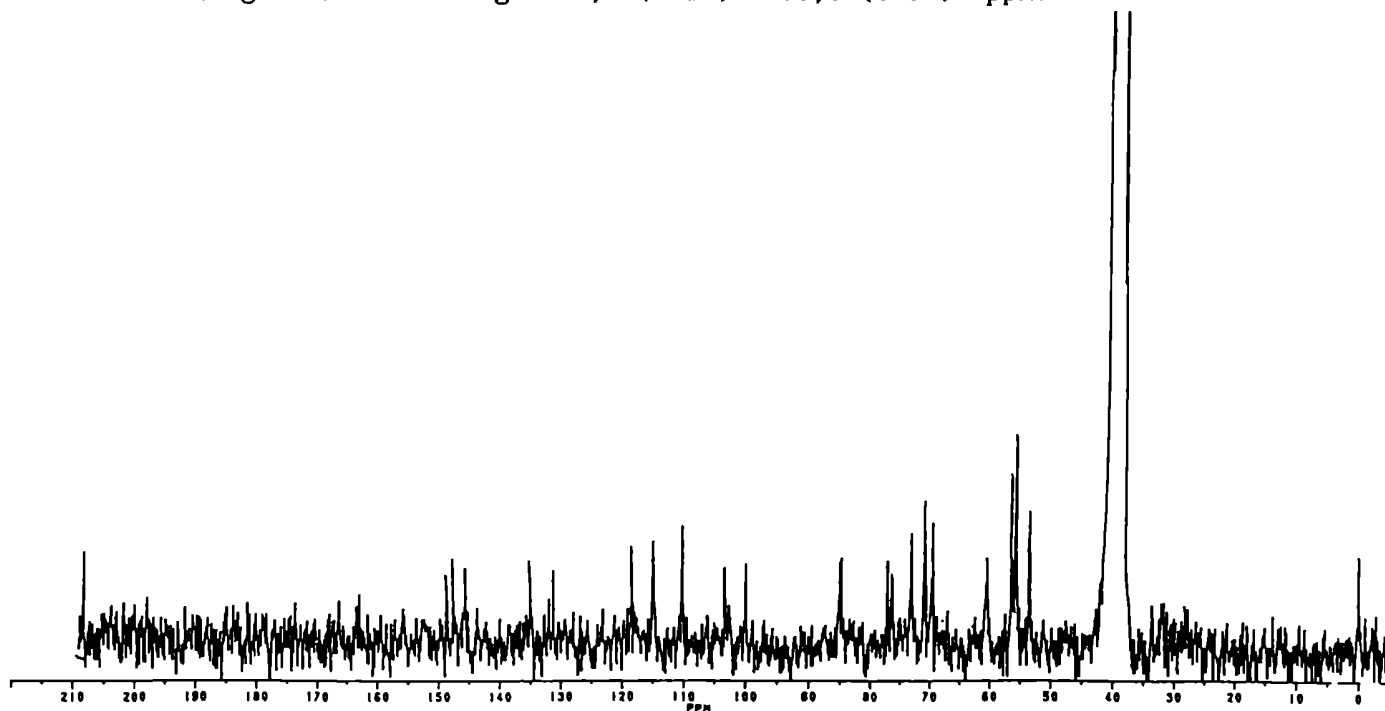


Figura 77: Espectro de ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) del compuesto 70.

Además, el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) mostró la señal del hidrógeno anomérico a δ 4,90 (d, J 7,5 Hz, H-1'') características de un β -D-glucopiranosido, como así también las señales de tres grupos metoxilos a δ 3,75 (6H, s) y 3,76 (3H, s), cinco hidrógenos aromáticos a δ 6,60 (2H, s) y 6,62-7,06 (3H, m) y un hidroxilo fenólico a δ 8,29 (1H, s).

Además, por hidrólisis del compuesto 70 con β -glucosidasa se obtuvo como azúcar glucosa, identificada por CLAR. La aglicona, de rotación específica positiva presentó un EM con ión molecular a m/e 388 y pico importante a m/e 151, característico de un grupo guayacilo y además fragmentos diagnósticos a m/e 137 (36,9 %), 181 (36,9 %) y 167 (28,2 %), estos dos últimos iones diagnósticos de un grupo siringilo (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenilo), por lo que se deduce que la aglicona sería (+)-medioresinol, cuyo esquema de rupturas se muestran en la figura 78.

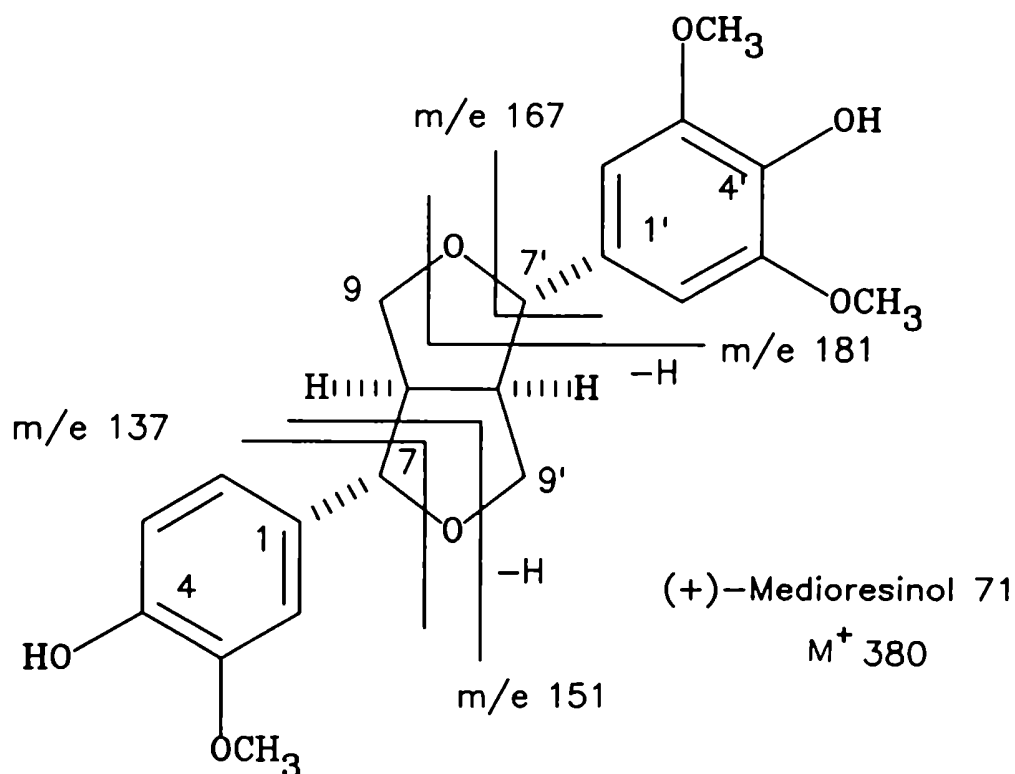


Figura 78

Los resultados enumerados sugieren que el compuesto 70 es (+)-medioresinol-monoglucopiranosido y que el grupo glucosilo está unido a un hidroxilo fenólico en la posición 4 ó 4'.

La posición de la unión glucosídica se dedujo comparando el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 70 con los del medioresinol [DEYAMA, 1985], compuesto 67 (pinoresinol) y compuesto 69 (pinoresinol-monoglucósido), en particular los desplazamientos químicos de los carbonos de los anillos aromáticos (Tabla 6). Se observó que los valores de desplazamiento de los carbonos del anillo siringilo en el compuesto 70 eran similares a los correspondientes del medioresinol. En cambio, las resonancias del anillo guayacilo eran similares a las del grupo guayacilo glucosidado del pinoresinol-monoglucósido 69. En particular, las señales están desplazadas respecto al grupo guayacilo del medioresinol en un valor ($\Delta\delta$) similar al obtenido para el par 1'-hidroxipinoresinol-4-4'-O-glucósido - pinoresinol [DEYAMA, 1985] y pinoresinolglucósido-pinoresinol, lo cual era esperable. Por consiguiente, el grupo glucosilo estaría unido al hidroxilo de C-4 del grupo guayacilo del medioresinol.

El compuesto 70 correspondería al (+)-medioresinol-4-O- β -D-glucopiranosido, informado recientemente por primera vez en la naturaleza, en la familia Oleaceae, con el nombre de isoeucomina A [SUGIYAMA, 1991] con datos espectroscópicos no totalmente asignados.

Análisis de los glicósidos esteroidales

Por purificación de la subfracción 5b por cromatografía en columna se obtuvo una muestra que en HPTLC de silicagel apareció como una mancha elongada, de R_f concordante con los de monoglicósidos, de color lila al revelar con H_2SO_4 10% en etanol/calor y que daba positiva la reacción de Liebermann-Burchard característica de compuestos esteroidales.

Debido a la poca masa de esta fracción (3 mg), se procedió a estudiarla mediante una hidrólisis ácida. Los azúcares se analizaron por CGL y CGL capilar en distintas condiciones con testigos, previa derivatización a los correspondientes alditoles acetilados, encontrándose los correspondientes a glucosa, xilosa y arabinosa.

Las agliconas, extraídas con cloruro de metileno de la fase acuosa se

analizaron mediante CGL capilar-EM y por CGL capilar con testigos, revelando la presencia de colesterol 32, Δ^7 -colesterol 55, campesterol 22, estigmasterol 23, sitosterol 24, dihidrositosterol 25 y Δ^7 -sitosterol 58. Cualitativamente estos esteroides también se encontraron en forma libre en la planta pero en distinta proporción relativa y en mayor cantidad. Así, el porcentaje de colesterol, Δ^7 -colesterol y Δ^7 -sitosterol fue mayor en los correspondientes glicósidos mientras que disminuyó comparativamente el porcentaje de sitosterol y dihidrositosterol respecto de los esteroides libres.

Estos resultados son coherentes con los hallados por Adler en *Calendula officinalis* [ADLER, 1975]. Al analizar los glicósidos esteroidales y los esteroides comprobaron que las agliconas de estos compuestos estaban estructuralmente relacionadas con los fitoesteroides que se encontraban en la misma planta en forma libre o esterificados, no existiendo vinculación cuantitativa entre los glicósidos de esteroides y los esteroides libres.

Con respecto a la naturaleza de estos monoglicósidos esteroidales presentes en *F. argentina*, convendría acotar que a pesar de no poder establecer fehacientemente la combinación azúcar-aglicona, resulta interesante haber encontrado arabinósidos de Δ^5 - y/o Δ^7 -esteroides y/o de dihidrositosterol pues no han sido informados anteriormente de una fuente natural. Además, el único Δ^5 -esterol que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza es el sitosterol-3-O-glucopiranosido [IRIBARREN, 1983]; en cambio, el estigmasterol-3-O- β -D-glucopiranosido [YEH, 1982], el sitosterol-3-O- β -D-xilopiranosido [IRIBARREN, 1984], el sitosterol-3-O- α -D-riburonopiranosido [IRIBARREN, 1985] y el sitosterol-3-O-glucuronopiranosido [JARES, 1990] se caracterizaron como compuestos poco frecuentes.

En cuanto a las funciones fisiológicas de estos glicósidos, existen sólo observaciones individuales de sus posibles roles como hormonas o precursores, como almacenadores de hidratos de carbono, como transportadores de esteroides y como constituyentes de membranas. Se sospecha que el proceso reversible de glicosidación y deglicosidación de esteroides que ocurre en las membranas de células vegetales podría tener un efecto regulatorio sobre la función y organización de la membrana debido a los cambios en las interacciones lípido-lípido y/o lípido-proteína [FORSEE, 1974].

ESTUDIO QUIMICO DEL PERCOLADO METANOLICO

Sobre este percolado, que dió positivo el ensayo de Shinoda para flavonoides, se realizaron algunas CCD de silicagel desarrollando con distintos gradientes de cloruro de metileno-metanol (9:1, 8:2, 7:3) detectándose, entre otras, manchas de Rf intermedios en las distintas condiciones. Éstas eran de color amarillo tenue con luz visible, revelaban con luz UV e intensificaban su color al ser expuestas a vapores de amoníaco (con luz visible y UV a $\lambda = 366$ nm).

El comportamiento de estas sustancias frente a los distintos reveladores y los valores de Rf obtenidos fueron típicos de los flavonoides libres y glicosidados.

Para poder separar las agliconas de los flavonoides glicosidados se sometió este extracto a una cromatografía de permeación en geles. Se obtuvieron seis fracciones (1-6); por tratamiento de las mismas por sucesivas cromatografías de adsorción y/o permeación en geles y CLAR de fase reversa (ver parte experimental) se identificaron de la fracción 4 los compuestos 72 a 75; de la fracción 5 los compuestos 76 a 79 y de la fracción 6 el estilbena 80.

Las fracciones 1-3 revelaban por CCD compuestos esteroidales y lignanos similares a los hallados en el percolado clorofórmico pero en mucha menor proporción, por lo que no se trataron.

El compuesto 79 fue analizado por CCD de silicagel y CLAR (RP-18) habiendo coincidencia con los t_R de la apigenina (Fig. 79).

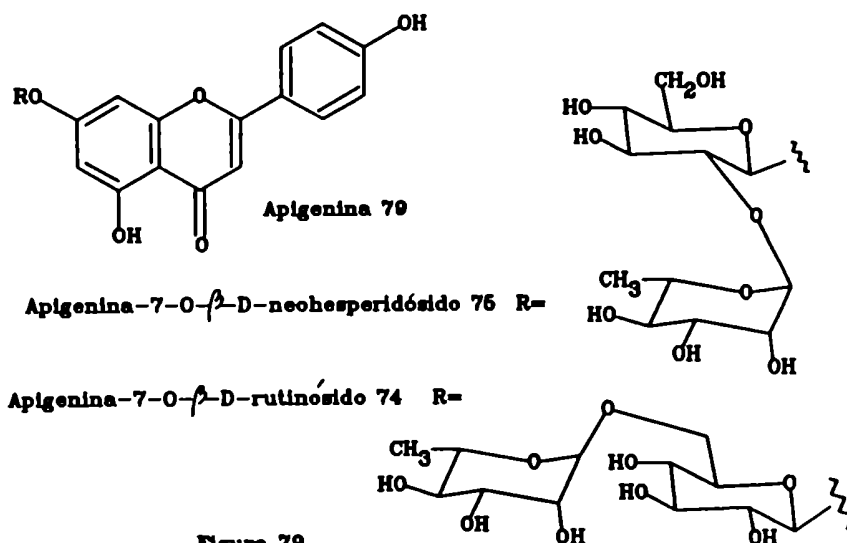


Figura 79

Análisis del compuesto 72

El espectro UV de este compuesto en metanol (Fig. 80 A) mostró dos máximos de absorción importantes, típicos de flavonoide, a λ 350 y 266 nm denominadas respectivamente Banda I (B I, asociada con la absorción debida al anillo B del sistema cinamoilo) y la Banda II (B II, relacionada con la absorción que involucra al sistema benzoilo del anillo A (Fig. 81).

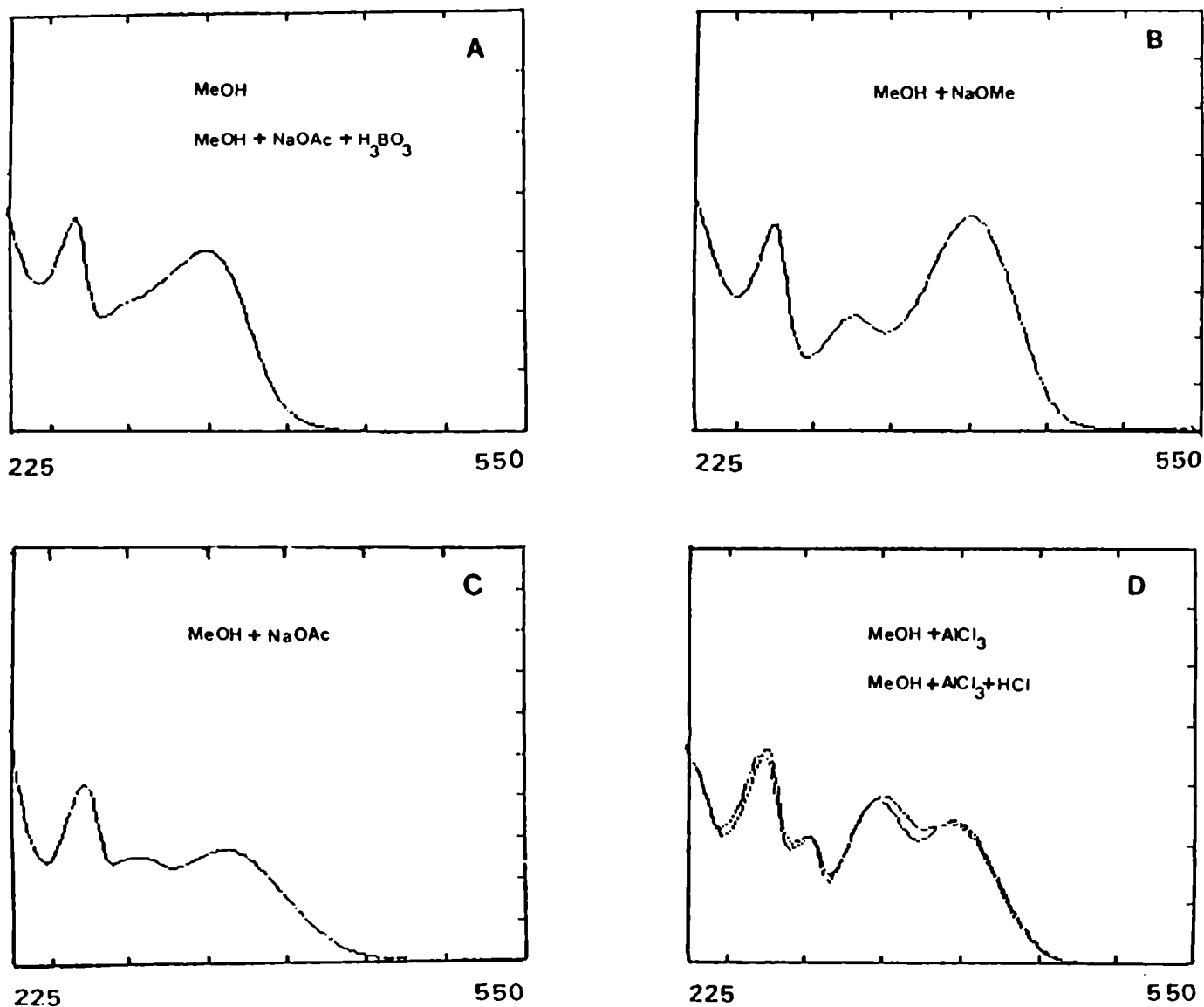


Figura 80: Espectros UV del canferol-3-O- β -D-glucopiranosido 72 en metanol y con reactivos de desplazamiento.

En presencia de NaOMe (Fig. 80 B) se observó un gran desplazamiento

batocrómico de la B I (50 nm) sin disminución de la intensidad, lo que sería una señal diagnóstica de grupo 4'-OH libre y ausencia de 3-OH libre.

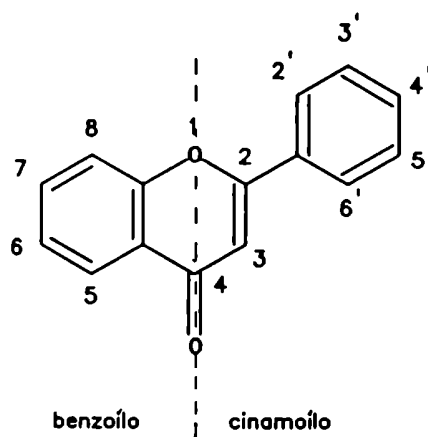


Figura 81

El espectro UV en presencia de NaOAc (Fig. 80 C) mostró un desplazamiento batocrómico de la B II de +6 nm (respecto al espectro en MeOH) que diagnosticaría un grupo hidroxilo en C-7. Al agregar H_3BO_3 (Fig. 80 A) el espectro no varió respecto al de metanol por lo que se descartó la presencia de grupos *orto*-dihidroxilo en el flavonoide.

El espectro UV con agregado de $AlCl_3$ (Fig. 80 D) dió cuatro máximos (Ia, Ib, IIa, IIb) que no se modificaron por agregado de HCl (Fig. 80 D), corroborando la ausencia de un grupo *orto*-dihidroxilo en el anillo B. El desplazamiento batocrómico de la banda Ia de 46 nm con respecto al espectro en metanol, sería consecuencia de un grupo OH en posición 5 (5-hidroxi flavona) o de un 5-hidroxi flavonol sustituido en posición 3 (Tabla 7).

Tabla 7: Desplazamiento batocrómico de la B I de flavonoides en el UV (MeOH) por agregado de $AlCl_3 + HCl$.

Flavonoide	$\Delta\lambda$ (nm)
	B I (MeOH) --> B I ($AlCl_3/HCl$)
5-Hidroxi flavonas y flavonoles-3-sustituídos	35 - 55
3-Hidroxi flavonas	60
3,5-Dihidroxi flavonas	50 - 60

Por espectroscopía de ^{13}C -RMN, se corroboró [AGRAWAL, 1981] que en los 5,7-dihidroxi flavonoides, los valores de desplazamiento químico del carbono carbonílico (anillo C) directamente refleja el nivel de oxidación del anillo central de pirona y tendría valor diagnóstico (Tabla 8).

Tabla 8: Desplazamientos químicos del C-4 de distintos flavonoides.

Flavonoide	C-4 (ppm)
Flavanona y flavanonol	197 ± 1
Flavonas e isoflavonas	181 ± 1
Flavonoles	175 ± 1

Dado que el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 72 (Fig. 82) presentaba la resonancia del C-4 a $\delta_c = 176,6$ se confirmó que era un flavonol 3-O-sustituido.

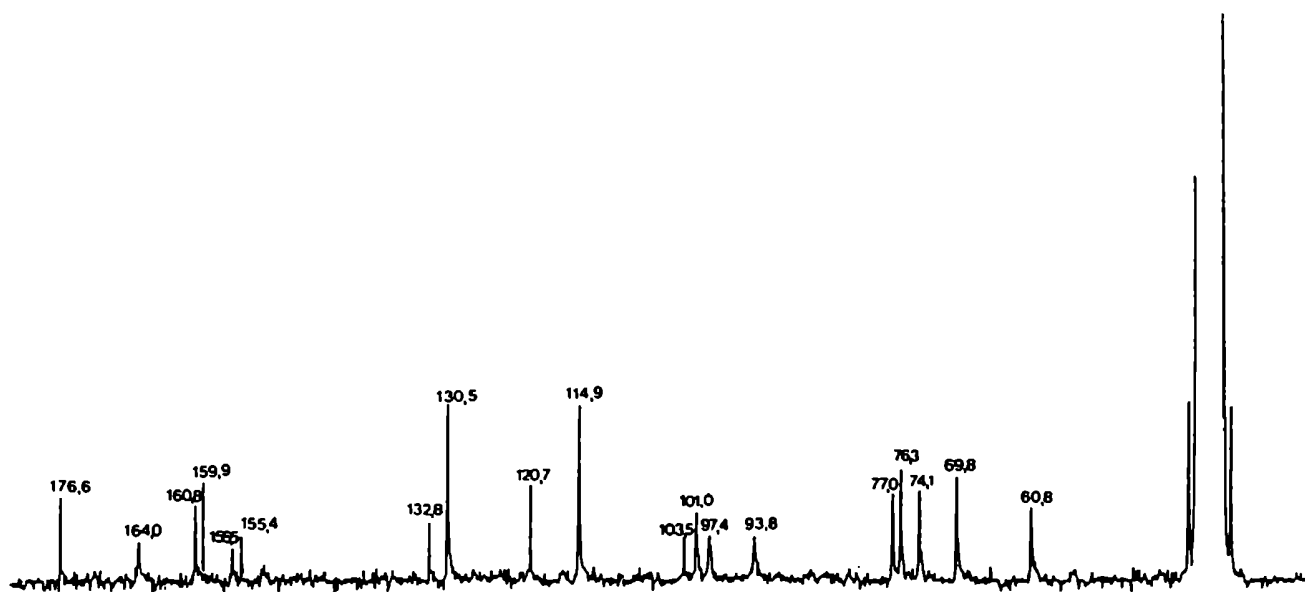


Figura 82: Espectro de ^{13}C -RMN (DMSO-d_6) del canferol-3-O- β -D-glucopiranosido 72.

El espectro de ^1H -RMN de 72 (Fig. 83) mostró un par de dobletes a δ 8,05 (2 H) y 6,90 (2 H) con acoplamiento orto (J 8 Hz) correspondientes al anillo B

para-sustituído, y otro par de dobletes que integraban para un hidrógeno cada uno a δ 6,30 y 6,10 con acoplamiento *meta* (J 2 Hz) asignables a los H-6 e H-8 respectivamente, presentes en un anillo A 5,7-di-O-sustituído.

La presencia de señales a δ 5,45 (m) característica de un H anomérico y a δ 3,85-3,30 confirmó que el flavonol estaba 3-O-glucosidado. En cuanto al tamaño del anillo y configuración del C-1 del azúcar, se había determinado anteriormente que los metilglicofuranósidos y los metilglicopiranosidos del mismo azúcar eran fácilmente distinguibles por medio de sus espectros de ^{13}C -RMN [GORIN, 1975; RITCHIE, 1975].

Además, generalmente las señales de los β -D-glicósidos aparecen a campos bastante menores que los correspondientes anómeros α . La comparación con datos de literatura [BOCK, 1979] permitió establecer que el azúcar era un β -D-glucopiranosido.

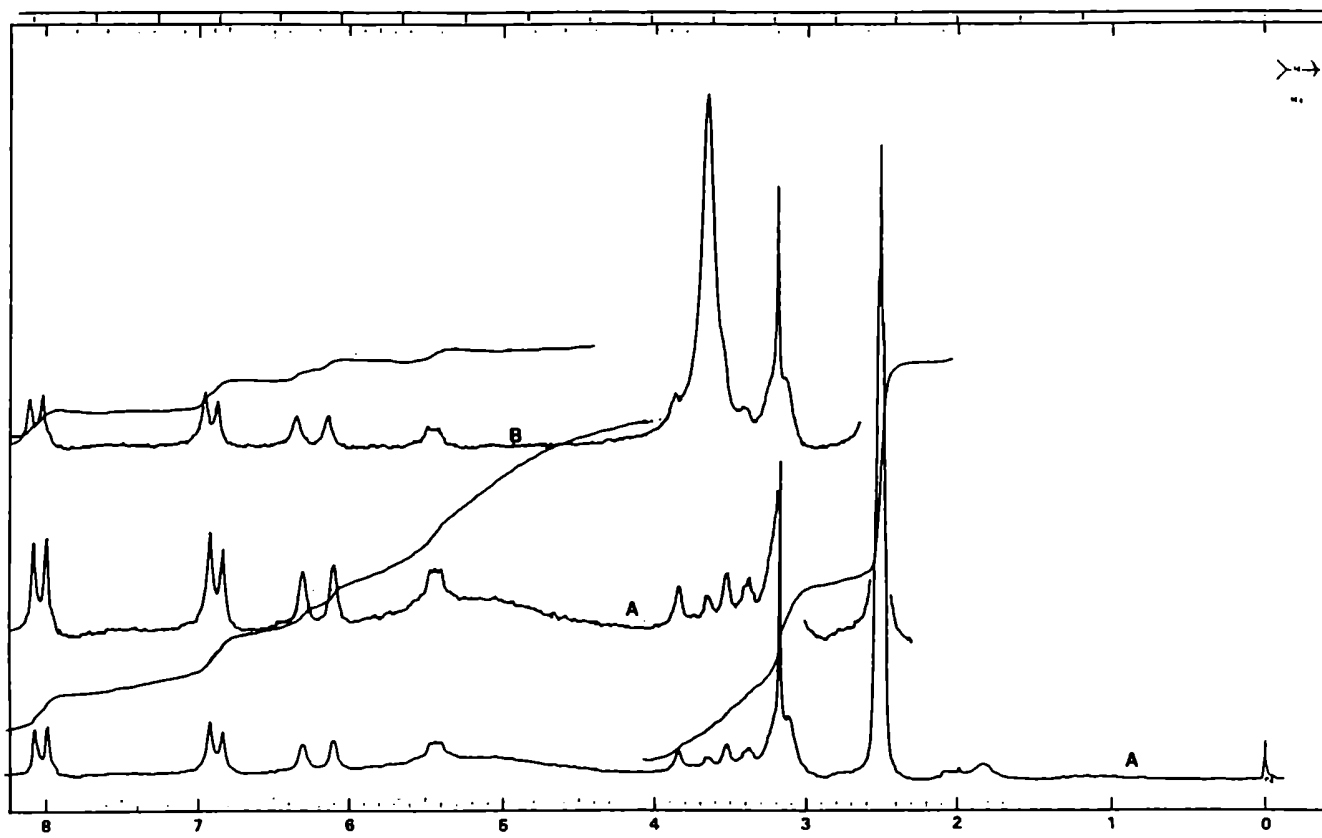


Figura 83: Espectro de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del compuesto 72.

A- en DMSO-d_6 ; B- en $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$.

De todo lo expuesto se deduce que el compuesto 72 es el

canferol-3-O- β -D-glucopiranosido (astragalina) (Fig. 84).

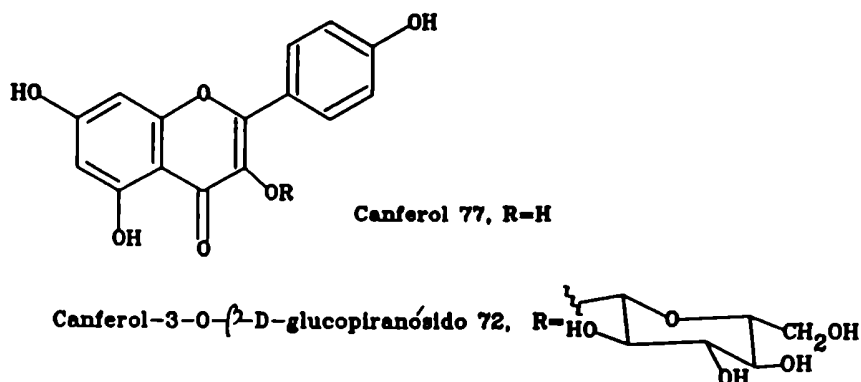


Figura 84

Análisis del compuesto 73

El compuesto 73 exhibió en el espectro UV en metanol dos máximos a 268 nm (B II) y 332 nm (B I). Por el valor de la B I podría tratarse de una flavona o de un flavonol sustituido en C-3.

Al agregar NaOMe el resultado fue ambiguo ya que se produjo un corrimiento batocrómico de la B I de 62 nm pero con disminución de la intensidad, lo que descartaría un 4'-OH, aunque tampoco podría ser un 3-OH por el valor de la B I.

Al no observarse un desplazamiento batocrómico adecuado de la B II en presencia de NaOAc se descartaría la presencia del grupo 7-OH libre. También se comprobó la ausencia del grupo *orto*-dihidroxilo por agregado de H_3BO_3 .

El compuesto formó un complejo con $AlCl_3$ que fue estable en medio ácido por lo que debió formarse entre el grupo carbonilo de C-4 y un hidroxilo cercano (5-OH). Por el valor del desplazamiento batocrómico de B Ia ($AlCl_3/HCl$) respecto a B I (MeOH) de 54 nm podría tratarse de una 5-hidroxiflavona o de un 5-hidroxiflavonol sustituido en 3.

En el espectro de ^{13}C -RMN apareció, entre otras, una señal a δ 181,7 ppm, característica del C-4 carbonílico de una 5,7-dihidroxiflavona (Tabla 8).

El espectro de 1H -RMN ($DMSO-d_6$) (Fig. 85) mostró una señal a δ 6,95 (s) debida al H-3, lo que confirmaría la estructura de una 5-hidroxiflavona. La presencia a campos bajos, δ 8,10 (2H) y 7,15 (2H) de dos dobletes con

partición *orto* (J 8 Hz) y a campos altos, δ 3,80, de un singlete correspondiente a un metoxilo aromático sería coherente con un anillo B *para*-sustituído con metoxilo. Los dobletes a δ 6,80 y 6,47 con partición *meta* (J 2 Hz) corresponderían al anillo A, 5,7-disustituído. Por lo analizado con los espectros UV estaría 5-hidroxilado y 7-sustituído, siendo el compuesto 73 un 7-O-glicósido de acetina.

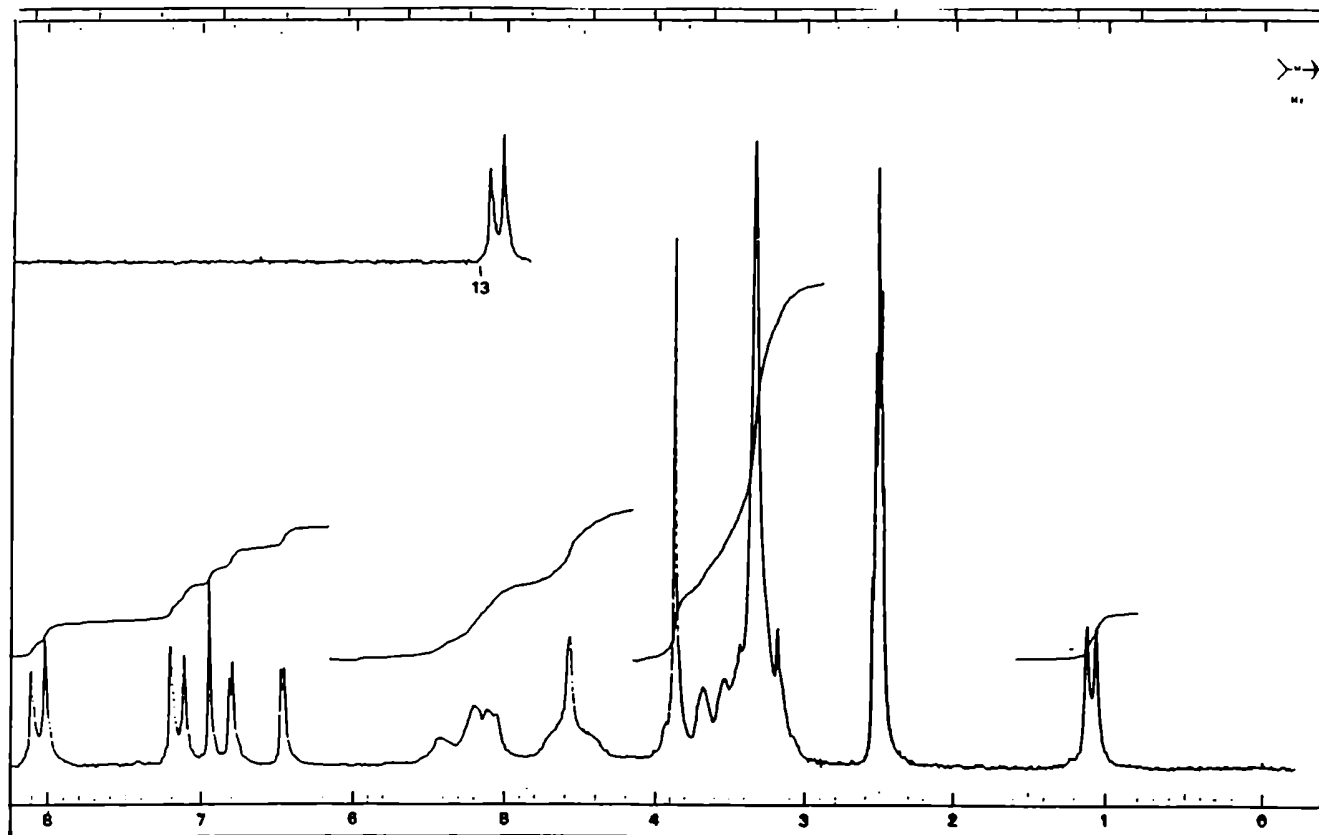


Figura 85: Espectro de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de la acetina-7-O- β -D-rutinósido 73.

Con respecto a la parte glicosídica del flavonoide 73, presentó un multiplete a δ 1,10 y un singlete ancho a δ 4,57, correspondientes al metilo (H-6^{R}) y al protón anomérico de ramnosa (H-1^{R}) respectivamente, así como una señal ancha a δ 5,25-5,00 debido al hidrógeno anomérico de la glucosa (H-1^{G}).

Los ramnoglucósidos de flavonoides más distribuidos contienen un grupo rutinósido (α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido) ó neohesperidósido (α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido). Estos dos sustituyentes, que difieren sólo en la unión de la ramnosa a la glucosa, se distinguen de los demás disacáridos de flavonoides porque en el ^1H -RMN aparece una señal diagnóstica a campos menores debido al H-6^{R}

La presencia del rutinósido se confirmó por ^{13}C -RMN. Es conocido que la glicosidación de los hidroxilos de un azúcar produce un desplazamiento a campos menores en la resonancia del carbono portador del hidroxilo [YAMOAKA, 1971]. En los rutinósidos se encontró que la señal correspondiente al C-6^G aparecía a campos más bajos en 4,5-6,0 ppm con respecto al de la glucosa libre y que el C-5 sufría un desplazamiento a campos altos en aproximadamente 1,4 ppm, mientras que en los neohesperidósidos la señal del C-2^G se desplazaba en 2,6-3,6 ppm a campos menores y, en general, el C-1^G se corría a campos mayores en 2,9 ppm [AGRAWAL, 1981] (Tabla 9).

Tabla 9: Comparación de los desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos de la glucosa en glicósidos de flavonoides.

Glicósido	ppm					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Canferol-3-O- β -D-glucopiranosido 72	101,0	74,1	76,3	69,8	77,0	60,8
Acacetina-7-O- β -D-rutinósido 73	99,8	73,1	76,1	69,5	75,5	66,0
Apigenina-7-O- β -D-neohesperidósido 75	98,2	76,6	77,6	70,8	77,1	60,8

Así, si comparamos los valores de los desplazamientos químicos de los carbonos del residuo glucosilo del compuesto 73 con respecto al 72 (canferol-3-O- β -D-glucopiranosido) (Tabla 9), vemos que efectivamente la señal del C-6^G se desplazó en 5,2 ppm a campos menores mientras que el C-5^G se corrió 1,5 ppm a campos mayores, esperable para un rutinósido.

Se llega así a la conclusión que el compuesto 73 es la acacetina-7-O- β -D-rutinósido (linarina) (Fig. 86).

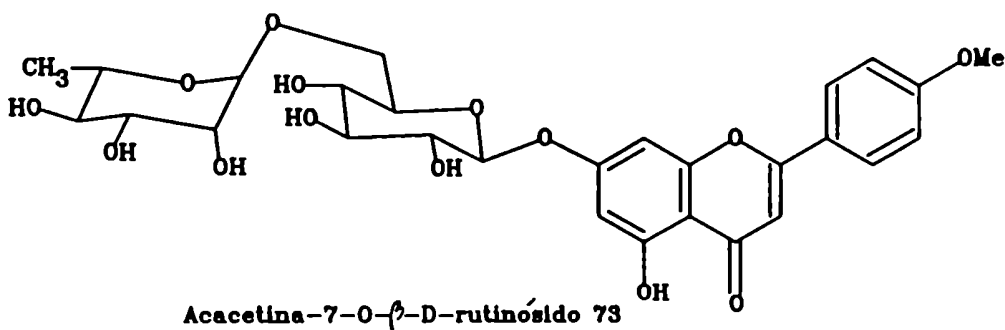


Figura 86

Análisis del compuesto 74 y del compuesto 75

El compuesto 74 exhibió en su espectro UV en metanol (Fig. 87 A) dos máximos a 268 y 336 nm y el compuesto 75 a 266 y 350 nm por lo que podrían tratarse de flavonas o flavonoles sustituidos en posición 3.

El comportamiento espectroscópico de ambas sustancias frente a los distintos reactivos de desplazamiento fue similar. En presencia de NaOMe (Fig. 87 A) hubo un corrimiento batocrómico sin disminución de la intensidad en la B I de 58 nm y 54 nm para los compuestos 74 y 75 respectivamente, indicando un hidroxilo libre en 4'. En ambos compuestos se comprobó la ausencia de 7-OH libre, ya que por agregado de AcONa no hubo corrimiento batocrómico de la B II; también se descartaron los grupos orto-dihidroxisilos en los núcleos de los flavonoides por agregado de H_3BO_3 .

Los espectros en presencia de $AlCl_3$ exhibieron cuatro máximos a mayores longitudes de onda respecto a los espectros en metanol, que no se modificaron por agregado de HCl. En ambos compuestos el desplazamiento de B Ia ($AlCl_3/HCl$) (Fig. 87 B) respecto a B I (MeOH) (Fig. 87 A) fue de 46 nm, coherentes con una 5-hidroxisflavona o flavonol 3-sustituído.

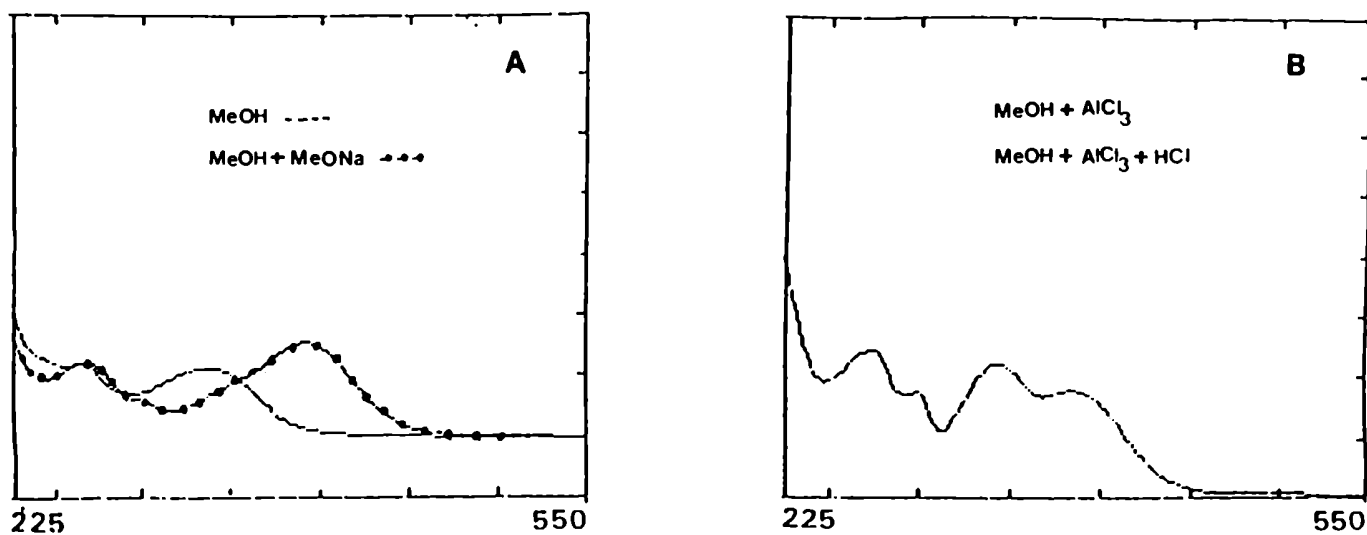


Figura 87: Espectros UV de la apigenina-7-O- β -D-rutinósido 74 en metanol y con reactivos de desplazamiento.

En los espectros de 1H -RMN de los compuestos 74/75 las señales debidas al

núcleo del flavonoide fueron similares: a δ 6,45/6,25 la señal del H-3 de flavona, un par de dobletes a δ 7,90/7,95 y 6,92/6,85 con J orto (8-9 Hz) debido al anillo B *para*-sustituído con un hidroxilo, y otro par de dobletes a campos mayores correspondiente al anillo A 5,7-disustituído. Además, en la región anomérica aparecen señales características de un grupo O- β -D-glucopiranosilo a δ 5,05/5,20 (H-1^G) y de un grupo O- α -L-ramnopiranosilo a δ 4,57/4,40 (H-1^R).

De lo expuesto anteriormente se deduce que ambos flavonoides son 7-O-ramnoglucósidos de apigenina (5,7,4'-trihidroxi-flavona). En particular en el espectro de ¹H-RMN del compuesto 74 el metilo de la ramosa (H-6^R) apareció como un multiplete a δ = 1,14 ppm que sería característico de un rutinósido.

En cambio, para el compuesto 75 esta señal apareció a campos un poco menores como un doblete a δ 1,18. Además si se comparan los datos del espectro de ¹³C-RMN de la parte del glucosilo de este compuesto con respecto a la del compuesto 72 (canferol-3-O- β -D-glucopiranosido) (Tabla 9) se observa que la señal del C-2^G se desplazó ($\Delta\delta$ = 76,6 - 74,1 ppm) en 2,5 ppm a campos menores, mientras que el C-1^G se corrió a campos mayores en 2,8 ppm ($\Delta\delta$ = 98,2 - 101,0 ppm). Ésto confirmaría la presencia de un grupo neohesperidósido en el compuesto 75.

Así, el compuesto 74 sería la apigenina-7-O- α -L-ramnopiranosil-(1->6)- β -D-glucopiranosido o apigenina-7-O- β -D-rutinósido (isoroifolina) (Fig. 79), mientras que el compuesto 75 sería la apigenina-7-O- α -L-ramnopiranosil-(1->2)- β -D-glucopiranosido) o apigenina-7-O- β -D-neohesperidósido (roifolina) (Fig. 79).

Análisis del compuesto 76

El compuesto 76 presentó en el espectro UV máximos a 243 (h), 270, 304 (h) y 346 nm, características de una flavona o de un flavonol 3-sustituído. Se observó un gran corrimiento batocrómico (65 nm) en B I al usar NaOMe como reactivo de desplazamiento, indicando la presencia de un hidroxilo en C-4'; un desplazamiento batocrómico de 6 nm en B II en presencia de NaOAc que diagnosticaría un hidroxilo en C-7 y un corrimiento batocrómico de 46 nm de B Ia en presencia de AlCl₃ que se mantuvo al agregarle HCl. Así, por el valor de BI (MeOH) y del corrimiento en presencia de AlCl₃ podría tratarse de una 5-hidroxi-flavona o de un flavonol 3-O-sustituído.

El espectro ¹H-RMN (DMSO-d₆) del compuesto 76 (Fig. 88) permitió confirmar la presencia de la flavona ya que a δ 6,97 apareció un singulete

correspondiente al H-3. Además un singulete a δ 3,90 (6 H) indicó la presencia de dos metoxilos aromáticos, a δ 7,34 un singulete (2 H) fue asignado a los hidrógenos equivalentes H-2' e H-6' y a δ 6,24 y 6,59 se observaron dos dobletes con una constante de acoplamiento correspondiente a dos hidrógenos con una partición *meta* (J 2 Hz) entre sí (H-6 e H-8 respectivamente).

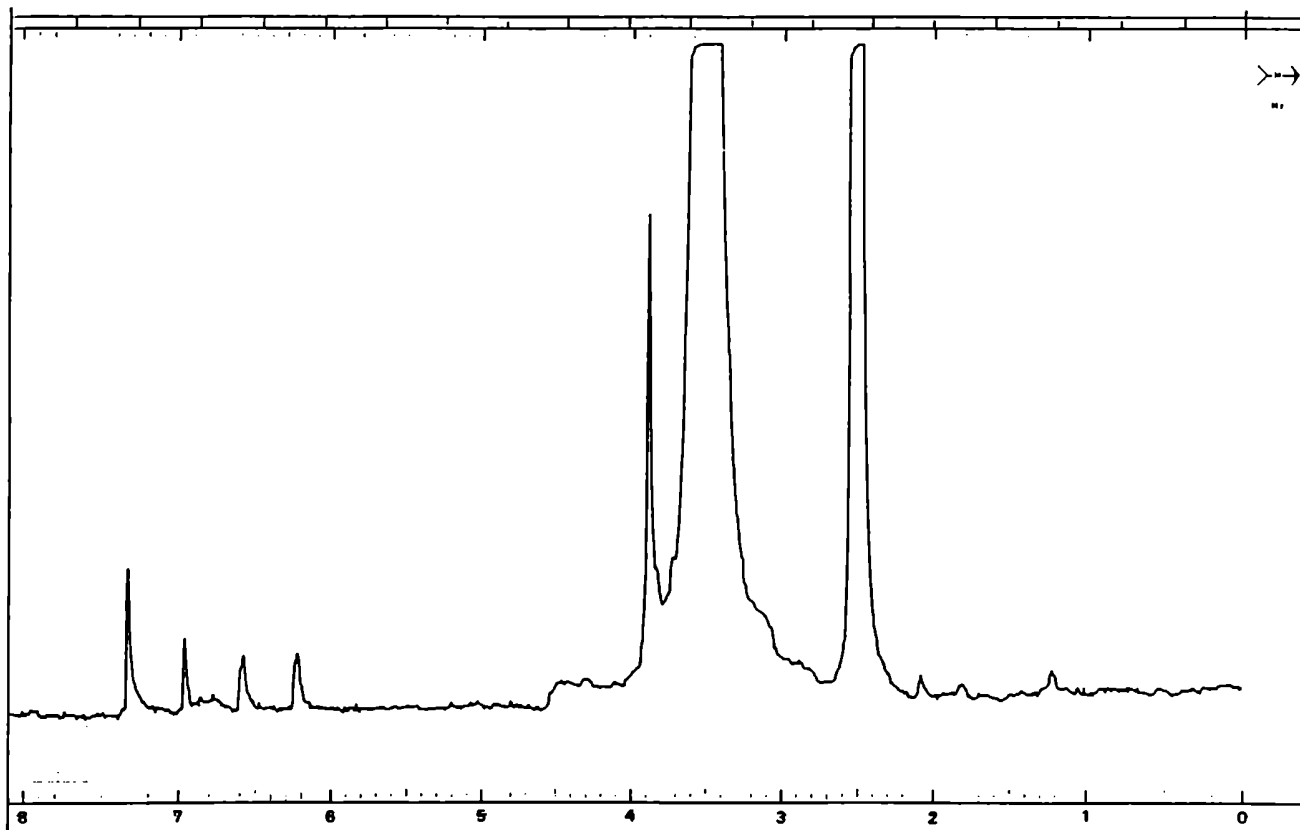


Figura 88: Espectro de ^1H -RMN (DMSO-d_6) de la tricina 76.

En el espectro de ^{13}C -RMN (DMSO-d_6) apareció un grupo de señales a campos menores de 140 ppm debidas a carbonos aromáticos sin sustituir y otro a campos mayores correspondientes a carbonos aromático unidos a alguna función oxigenada. El carbono carbonílico C-4 apareció a 181,3 ppm, característico de una flavona (Tabla 8).

Estos datos indicarían la ausencia de sustitución en C-3 y la presencia de un hidroxilo en C-5 y en C-7. Además el anillo B tendría en 4' un hidroxilo libre y en 3' y 5' estaría sustituido con metoxilos.

El compuesto 76 sería la 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (Fig. 89), llamada tricina, cuya identidad fue corroborada por CLAR con testigo. Esta flavona está ampliamente distribuida en las Gramíneas [Hegnauer, 1986].

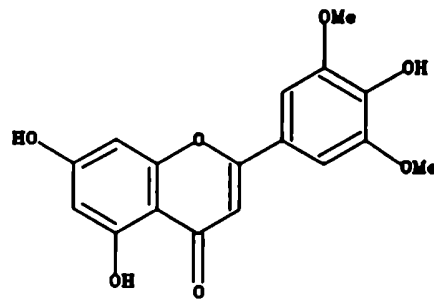


Figura 89

Tricina 76

Análisis del compuesto 77

El valor de B I del espectro UV (MeOH) del compuesto 77 a 365 nm diagnosticó un flavonol con el hidroxilo en posición 3 libre.

Además, se observaron corrimientos batocrómicos de 49 nm en B I en presencia de NaOMe y posterior degeneración del espectro (hidroxilo en C-4'), de 9 nm en B II al agregar NaOAc (hidroxilo en C-7) y de 58 nm (B I \rightarrow B Ia) en presencia de AlCl_3 que se mantuvo al agregar HCl (hidroxilo en C-3 y C-5).

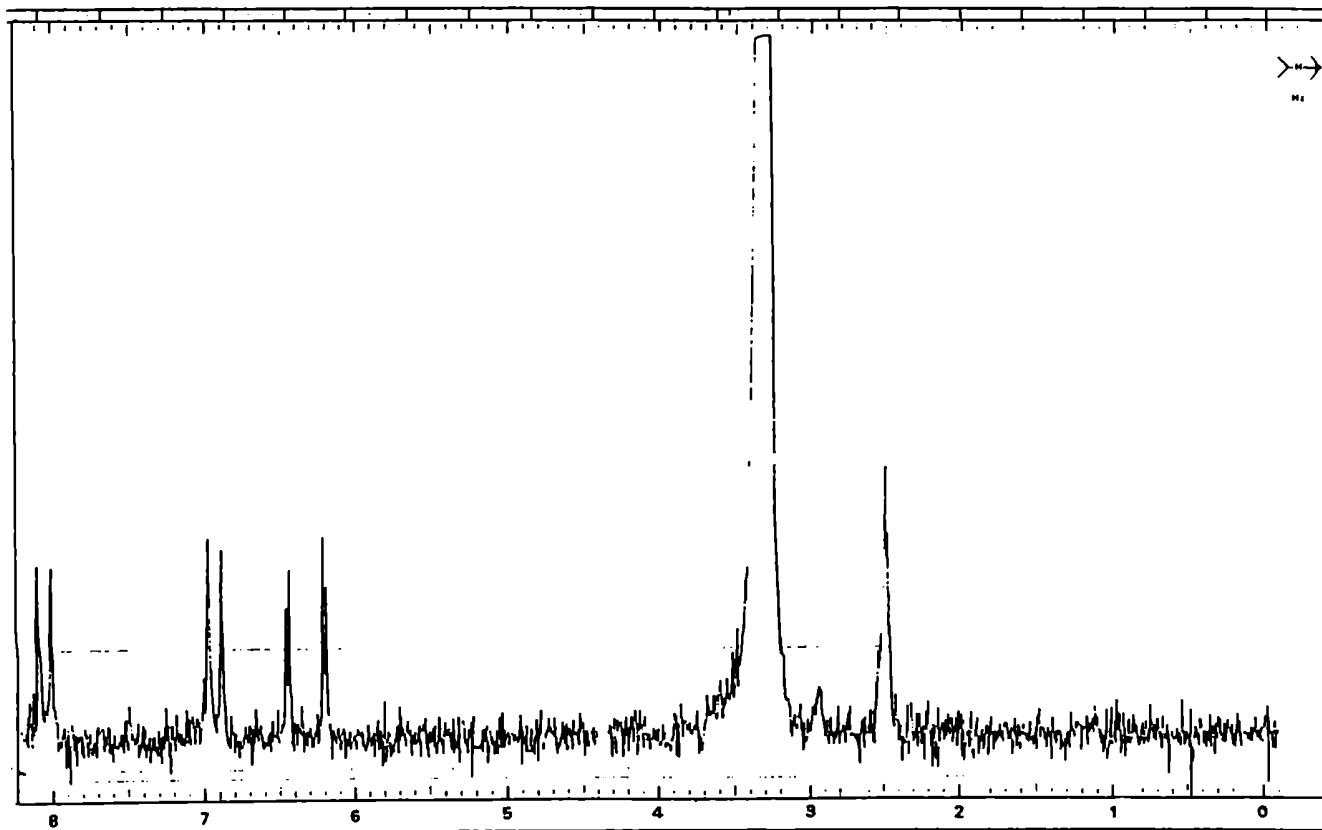


Figura 90: Espectro de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del canferol 77.

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) (Fig. 90) aparecieron dos dobletes a δ 6,20 y 6,45 con una constante de acoplamiento *meta* (2 Hz) correspondientes a H-6 e H-8 respectivamente, lo que indicaría una sustitución en C-5 y C-7. El anillo B, hidroxilado en C-4' mostró dos dobletes con *J* orto (8 Hz) a δ 6,95 (H-3' e H-5') y a δ 8,05 (H-2' y 6').

En base a los datos anteriores, el compuesto 77 fue identificado como 5,7,3'-trihidroxi flavonol (canferol) (Fig. 84), cuyo t_R por CLAR resultó coincidente con el de un testigo.

Análisis del compuesto 78

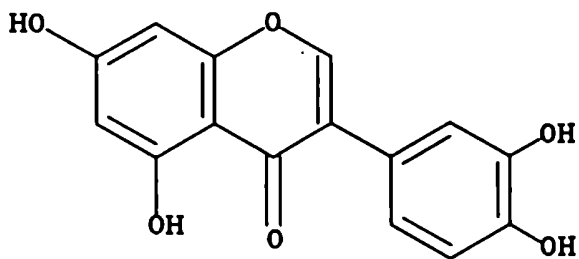
El espectro UV (MeOH) fue distinto al de los flavonoides anteriores ya que exhibió una banda II intensa a 262 nm con un hombro como B I debido a que no habría conjugación entre los anillos A y B. Si se compara con los valores de B II tabulados por Mabry [MABRY, 1970] (B II isoflavonas: 245-270 nm; B II flavanonas, dihidroflavonoles: 270, 295 nm) el compuesto 78 sería una isoflavona.

Los espectros UV de isoflavonas, flavanonas y dihidroflavonoles en presencia de reactivos de desplazamiento tienen un comportamiento distinto al de las flavonas y flavonoles [MABRY, 1970]. Así, en presencia de NaOMe se observó un corrimiento batocrómico de las bandas y una rápida disminución de la intensidad, todo ello diagnóstico de 3', 4'-dihidroxilación. Además hubo un corrimiento batocrómico de B II de 8 nm debido a la ionización específica del hidroxilo de C-7 [JURD, 1961]. Al no haber modificaciones en el espectro UV en presencia de NaOAc/ H_3BO_3 , y de AlCl_3 respecto a AlCl_3/HCl se descartaría un grupo *orto*-dihidroxilo en el anillo A. El corrimiento batocrómico de B II de 11 nm en presencia de AlCl_3/HCl respecto al espectro en MeOH, diagnosticaría una 5-hidroxiisoflavona.

Por otro lado, la señal que apareció en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) a campos menores (δ 8,52) como un singulete correspondiente al H-2 confirmó que el compuesto 78 era una isoflavona. También en la zona aromática, en forma análoga al anillo A del canferol (Fig. 90), mostró dos dobletes a δ 6,11 y 6,43 con *J meta* (2 Hz) asignables a los H-6 e H-8, además un doblete a δ 6,95 (*J* 8 Hz) debido al H-5' y un sistema no bien resuelto a δ 7,50

correspondientes a los H-2' e H-6'.

De esta manera, se deduce que el compuesto 78 sería la 5,7,3',4'-tetrahidroxilisoflavona llamada orobol (Fig. 91).



Orobol 78

Figura 91

Análisis del compuesto 80

A pesar que el valor de Rf de esta sustancia resultó similar al de las agliconas de flavonoides, se descartó la posibilidad de que este compuesto perteneciese a esta familia debido a la respuesta cromogénica que exhibía frente a los distintos reveladores. Más aún, ésto fue corroborado en base a la ausencia tanto de una señal de carbono carbonílico en su espectro de ^{13}C -RMN como de la banda de tensión C=O correspondiente en el espectro IR.

Por otro lado, este compuesto dió positivo el ensayo con FeCl_3 2% en etanol para compuestos fenólicos. Además, la ausencia de señales a campos altos en los espectros de ^{13}C y ^1H -RMN y las señales acopladas a campos bajos indicaron que el compuesto debía ser aromático y estar sustituido únicamente por grupos hidroxilo.

El espectro de ^1H -RMN (metanol- d_4) de 80 (Fig. 92) presentaba señales centradas en δ 7,40 y 6,83, ambas dobletes (J 8,6 Hz) consistentes en un sistema AA'XX' de un anillo para-sustituido (anillo B). Además había un doblete a δ 6,52 debido a los protones H-2 e H-6 del otro anillo bencénico simétricamente sustituido (anillo A), acoplados ($J_m = 2$ Hz) con el H-4, el cual apareció como triplete a δ 6,24, determinándose así una trisustitución 1,3,5 para el anillo A. Los protones olefinicos se observaban como dos dobletes a 7,05 y 6,82 ppm, cuya constante de acoplamiento de 16 Hz resultó

consistente con un E-estilbeno y no con un Z-estilbeno (J_{cis} 12- 12,5 Hz). Además los valores de los desplazamientos químicos de los protones aromáticos y olefínicos son los esperables para un *trans*-estilbeno, ya que aparecen a campos más bajos que el isómero *cis* [GUSTEN, 1967], debido a que los *trans*-estilbenos son totalmente planos (salvo si tiene sustituyentes en posición 2 en un anillo) mientras que los *cis*-estilbenos pierden coplanaridad.

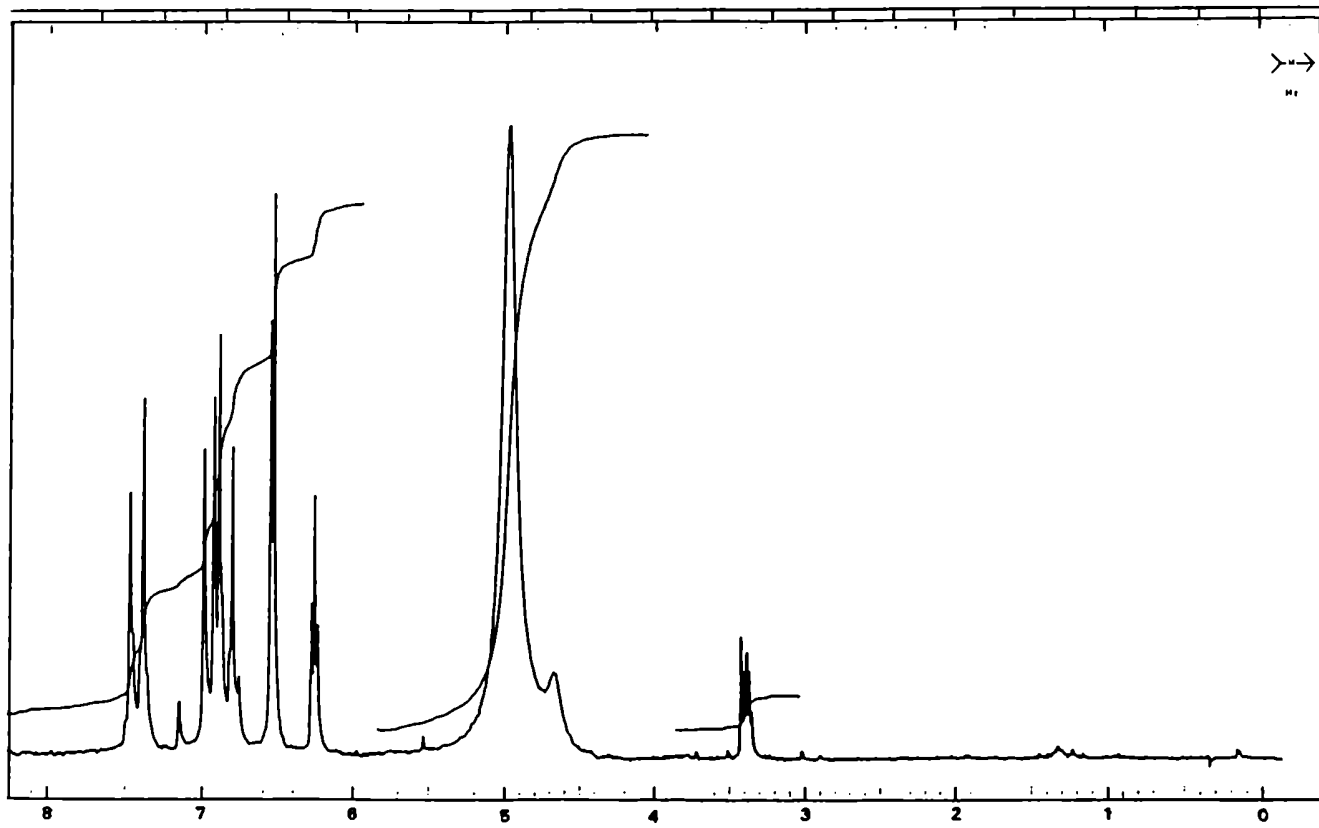


Figura 92: Espectro de ^1H -RMN (metanol- d_4) del *trans*-resveratrol **80**.

También el análisis de los espectros IR y UV permitió corroborar la configuración geométrica del estilbeno. En el espectro IR (KBr) se observó entre otras, las absorciones debidas a deformación fuera del plano de $\text{RCH}=\text{CHR}'$ *trans* en 965 cm^{-1} (para *cis*-estilbenos aparece entre $900\text{-}850\text{ cm}^{-1}$) [THOMPSON, 1950], dos vibraciones $\text{C}=\text{C}$ de los núcleos aromáticos a 1520 y 1595 cm^{-1} y deformaciones fuera del plano $\text{C}-\text{H}$ de los anillos aromáticos sustituidos en $675\text{-}830\text{ cm}^{-1}$. El espectro UV (MeOH) presentó la banda más intensa a $\lambda = 306\text{ nm}$, con un hombro a 336 nm , característica de un *trans*-estilbeno, ya que éstos dan una absorción en UV a longitudes de onda mayores que el correspondiente isómero *cis* ($\lambda \sim 270\text{ nm}$).

El espectro de ^{13}C -RMN (metanol- d_4) de 80 (Fig. 93) mostró sólo diez señales, dada la simetría de los anillos aromáticos. Los desplazamientos químicos de los C-1 y C-1' a 141,2 y 130,3 ppm respectivamente, fueron característicos de la 3,5-disustitución con grupos oxigenados en el anillo A [TALVITIE, 1987] y de la sustitución en la posición 4' del anillo B. Las asignaciones estuvieron de acuerdo con la multiplicidad determinada con el espectro de APT.

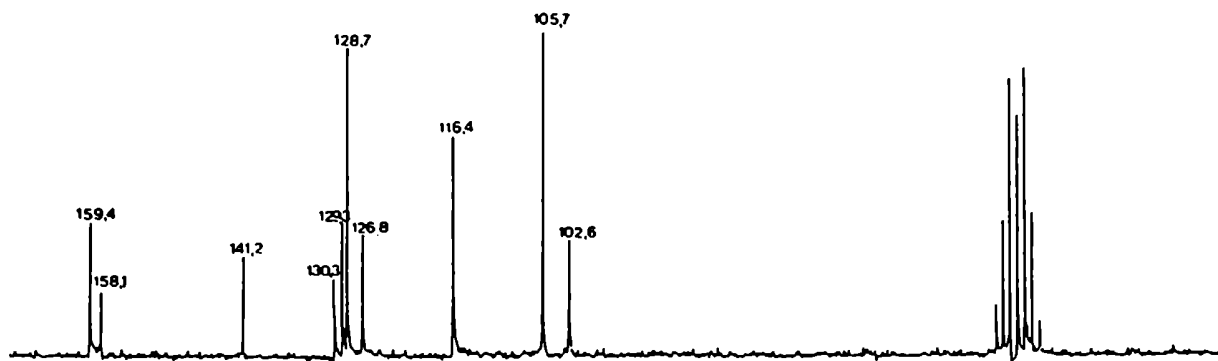
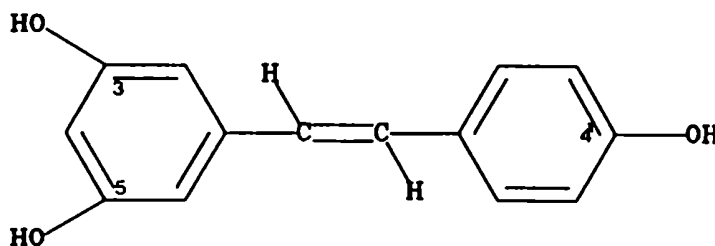


Figura 93: Espectro de ^{13}C -RMN (metanol- d_4) del *trans*-resveratrol 80.

Así, la espectroscopía de ^{13}C -RMN permitió corroborar la identidad del compuesto 80 como el *trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno (*trans*-resveratrol) (Fig. 94).



trans-resveratrol 80

Figura 94

Esta es la primera detección de un estilbeno en la familia de las Gramíneas. Si bien se han encontrado en una especie (*Veratrum grandiflorum*) de la familia *Liliaceae* que pertenece a las monocotiledóneas, su distribución más

común es en las gimnospermas dicotiledóneas como las *Pinaceae* y en las angiospermas dicotiledóneas (*Saxifragaceae*, *Papilionaceae*, *Fabaceae*, *Myrtaceae*, *Polygonaceae* y *Fagaceae*) y en ciertos casos, los estilbenos resultaron de valor quimiotaxonómico.

Por ejemplo, el *trans-resveratrol* y su 3-O- β -D-giucósido (piceído) han sido utilizados eficazmente como trazadores taxonómicos en el género *Eucalyptus* (*Myrtaceae*) [HATHWAY, 1962]; la presencia o ausencia de estos derivados del estilbeno resultó típico de ciertas "series" dentro de la subsección *Longoires* del género *Eucalyptus*, con lo cual se confirmaron investigaciones taxonómicas basadas exclusivamente en aspectos morfológicos.

Aunque se conocen registros de la actividad biológica de los estilbenos, fundamentalmente como inhibidores enzimáticos, por ejemplo de la glucosidasa [KUBO, 1991] y de la celulasa [HATHWAY, 1962], su función más importante en el vegetal pareciera estar relacionada con aspectos alelopáticos.

Así, Taylor y Shaw [TAYLOR, 1983] comprobaron que los extractos de la corteza del abeto de Engelmann (*Picea engelmannii*) constituidos principalmente por taninos y los hidroxiestilbenos isorapontina (*trans*-3'-O- β -D-glucopiranosil-4,5'-dihidroxi-3-metoxiestilbeno) y astringina (3-O- β -D-glucopiranosil-3',4',5-trihidroxiestilbeno) tenían efectos alelopáticos sobre la germinación de las semillas y el desarrollo de las siembras de varias coníferas frecuentemente asociadas con esta especie.

También se estableció que los estilbenos exhibían alta toxicidad hacia hongos, peces e insectos y que el ácido lunulárico (2'-carboxi-4,3'-dihidroxidihidroestilbeno) actuaba como inhibidor del crecimiento en la hepática *Lunularia cruciata* [PRYCE, 1972].

En el caso de la planta en estudio, *Festuca argentina*, la presencia del *resveratrol* como sustancia constitutiva es poco probable; sería más lógico pensar que su presencia esté relacionada con un comportamiento de fitoalexina puesto de manifiesto por la infección de la planta con el hongo endofito. Detalles de las interacciones planta-microorganismo se encuentran en el capítulo 3.

Se han descrito casos de estilbenos con acción de fitoalexina; Ingham [INGHAM, 1976] estudió e identificó las fitoalexinas del maní (*Arachis hypogaea*) y encontró que en los hipocótilos del maní africano se acumulaba una mezcla de *cis*- y *trans*-*resveratrol* cuando estaba infectado con el hongo no patogénico *Helminthosporium carbonum*.

Por otro lado, en el maní americano se aislaron las fitoalexinas [AGUAMAH, 1981] *trans*-3,5,4'-trihidroxi-4-isopentenilestilbeno, 4-(3-metil-but-1-enil)-3,5,3',4'-tetrahidroxiestilbeno y 4-(3-metil-but-1-enil)-3,5,4'-trihidroxiestilbeno. La isoprenilación aumentaría la fungotoxicidad de los correspondientes compuestos no prenilados debido a un aumento en la lipofilicidad y una mayor afinidad por las membranas del hongo, el sitio usual de acción de las fitoalexinas.

ESTUDIO DE *FESTUCA HIERONYNI*

Se procedió a la comparación de *Festuca argentina* con otra especie del mismo género, siendo con este fin elegida la especie *Festuca hieronymi* debido a que es también una gramínea tóxica para el ganado, pertenece al mismo fenotipo y no se conocen estudios químicos ni toxicológicos sistemáticos de esta especie en la literatura. En particular, se decidió investigar los componentes del extracto de éter de petróleo de *F. hieronymi* y compararlos con los de *F. argentina*. Asimismo, se efectuaron ensayos con animales de laboratorio conducentes a ubicar la/s fracción/es tóxica/s y analizar la sintomatología y los daños macro y microscópicos de una manera comparativa con lo observado al administrar *F. argentina*.

ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO

Mediante técnicas cromatográficas se fraccionó este extracto y se aislaron hidrocarburos (fracción 1), ceras (subfracción 3a), aldehídos lineales (subfracción 3b.1), cetonas (subfracción 3b.2), alcoholes lineales (subfracción 3c) y esteroides (fracción 5) que fueron analizados e identificados por CGL, CGL-EM, CGL con testigos y métodos espectroscópicos según el caso.

Análisis de los hidrocarburos

La fracción menos polar (fracción 1) proveniente de la separación mencionada en la parte experimental se analizó por CGL isotérmico y CGL-EM, observándose la presencia de hidrocarburos lineales de C_{19} a C_{31} 1, 2, 4 a 13, excepto C_{21} ; el gráfico $\ln t_R$ vs el n° de átomos de carbono brindó una recta con factor de correlación de 0,9996.

Los patrones de fragmentaciones por EM fueron equivalentes a los observados para los hidrocarburos de *F. argentina*. Al comparar los porcentajes de los hidrocarburos presentes en ambas especies (Tabla 10) se observó que en ambas series homólogas había un paralelismo en cuanto a la relación de porcentajes, siendo para los compuestos de número par de átomos de carbono mayor que para los impares hasta 26 átomos de carbono, invirtiéndose la relación de porcentajes para los de mayor peso molecular. Las dos diferencias más ostensibles entre ambas series fue la ausencia de $n-C_{21}$ en *F. hieronymi*,

aunque en *F. argentina* era minoritario, y la presencia de dos hidrocarburos en porcentajes similares ($n\text{-C}_{29}\text{H}_{60}$ 11 y $n\text{-C}_{31}\text{H}_{64}$ 13) en *F. hieronymi* sin gran predominio de C_{29} .

Tabla 10: Porcentajes de los hidrocarburos lineales de *Festucas*.

$n\text{-C}_n\text{H}_{2n+2}$, n=	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
<i>F. argentina</i>	0,36	2,79	0,09	2,32	0,17	1,95	3,89	1,50	8,03	1,69	52,56	1,38	20,11
<i>F. hieronymi</i>	0,26	8,66	---	7,77	0,32	6,39	1,48	4,83	4,29	3,82	29,98	3,17	20,80

Análisis de las cetonas

Dada la escasa masa de la subfracción 3b.2 y, debido a que presentaba más de una mancha por CCD se la analizó directamente por CGL capilar y CGL-EM.

Las señales en el cromatograma (Fig. 95) aparecieron agrupadas en dos sectores; el grupo de menores t_R 7,73, 10,30, 12,37 y 13,90 min estaba formado por cuatro picos 81 a 84 cuyos iones moleculares diferían entre sí en 28 uma, lo que haría sospechar la presencia de una serie homóloga con variación en dos metilenos.

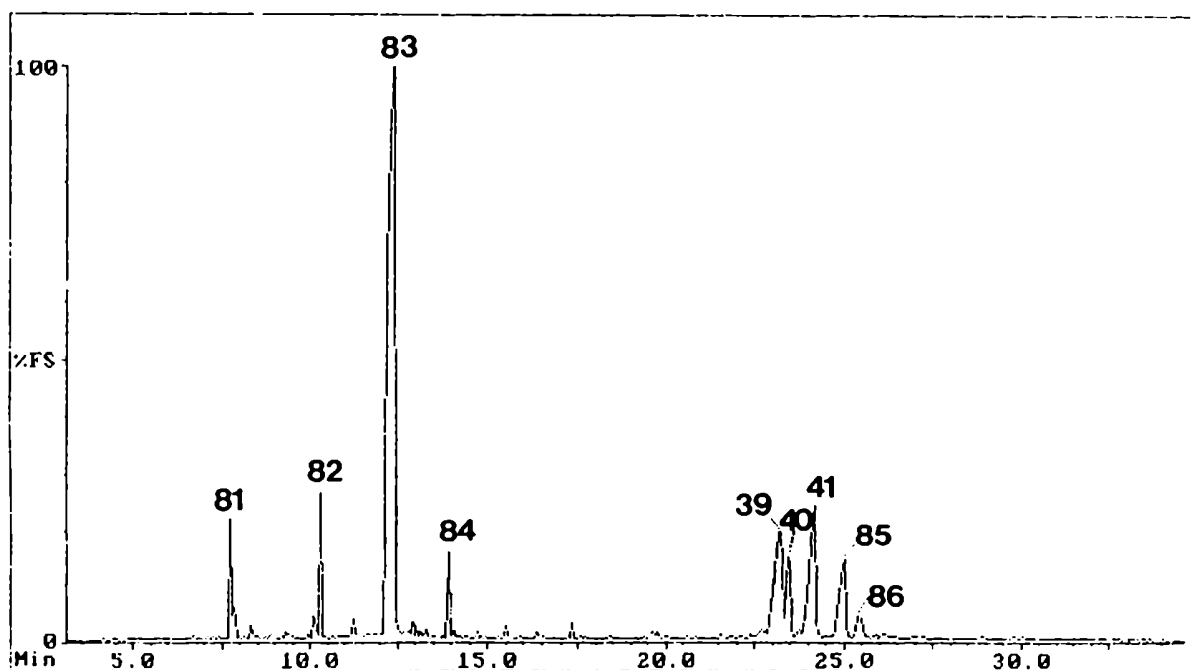


Figura 95: CGL-EM de las cetonas.

El espectro de masas del compuesto mayoritario 83 de este grupo, de t_R 12,37 min mostró un ión molecular a m/e 310 y un $M^+ + 1$ a 311 pero ausencia de $M^+ - 1$. El único fragmento a masas altas fue a m/e 295 o sea pérdida de metilo a partir del M^+ . Además, el espectro de barras presentaba una envolvente gaussiana con máximo a m/e 58 y con fragmentos de la serie alquílica o carbonílica. A masas bajas, el ión a m/e 43 también era importante y podría generarse en parte por ruptura α al carbonilo ($CH_3C=O^+$). El ión a m/e 58, pico base del espectro, provendría de una ruptura β con reordenamiento de Mc Lafferty de una metilcetona de cadena recta, no ramificada en C-3. Se descartó una estructura de dialquilcetona con dos grupos alquilo de tres o más átomos de carbono, porque daría tres picos de reordenamiento de masa par.

Así, se propondría una estructura de metilcetona de 21 átomos de carbono para el compuesto 83 que se correspondería con la abundancia relativa del ión a m/e 71 (55,79%), que se generó por ruptura γ , mayor que la del ión a m/e 57 (23,84%), proveniente de ruptura β , y que la del ión a m/e 85 (13,43%), formado por ruptura δ como era esperable [BUDZIKIEWICZ, 1967], ya que la fuerza impulsora para esta fragmentación podría corresponder a la ruptura de la unión alílica en una forma enólica, o a la formación de un ión oxonio cíclico.

Los compuestos 81, 82 y 84 mostraron un EM similar al anterior por lo que se dedujo que este grupo de compuestos sería una serie homóloga de metilcetonas lineales de número impar de átomos de carbono de C_{17} a C_{23} , 2-heptadecanona 81, 2-nonadecanona 82, 2-heneicosanona 83 y 2-tricosanona 84, no detectadas en *F. argentina*.

El otro grupo de cinco señales que apareció en el cromatograma a mayores t_R poseían todas un ión molecular a m/e 424, ausencia del ión a m/e 406 correspondiente a pérdida de agua y fragmentos característicos de triterpenos pentacíclicos.

Se identificaron los compuestos 40 (t_R 23,47 min) y 41 (t_R 24,19 min) como germanicona y lupenona respectivamente (halladas también en *F. argentina*) y otras tres cetonas 39, 85 y 86.

El compuesto 39 (t_R 23,25 min)(Fig. 95) exhibía en su EM pérdida de metilo y pico base a m/e 218 (Fig. 96), pero no presentaba iones importantes a m/e 245 ni 257. Otros fragmentos diagnósticos [BUDZIKIEWICZ, 1963] aparecieron a m/e 205, 203 y 189 que, junto con el pb permitieron caracterizar a una

Δ^{12} -oleanen-3-ona o Δ^{12} -ursen-3-ona (β -amirenona y α -amirenona respectivamente). Así, el patrón de fragmentación de 39 sería análogo al de amirina (Fig. 35)

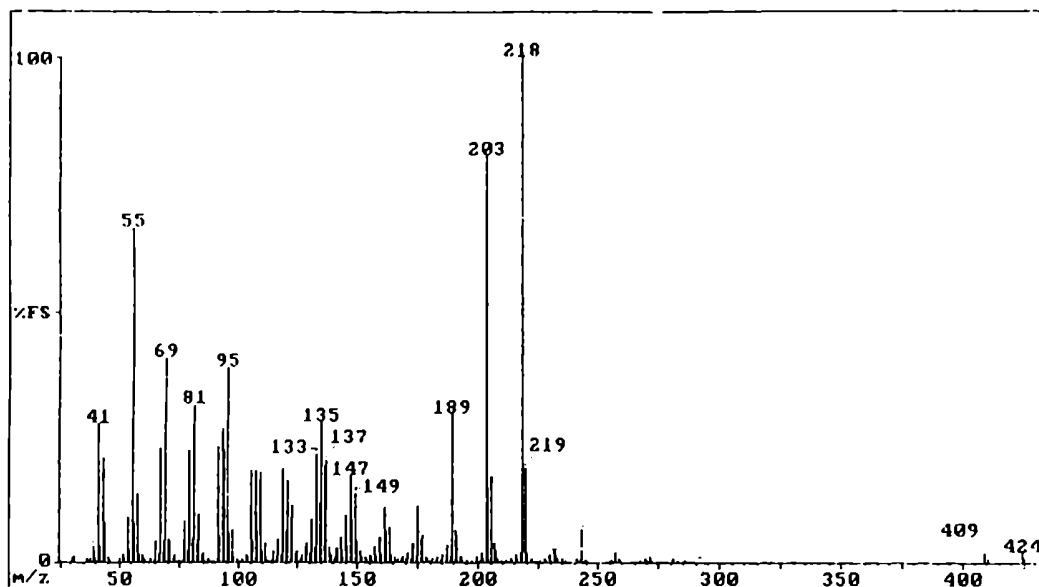


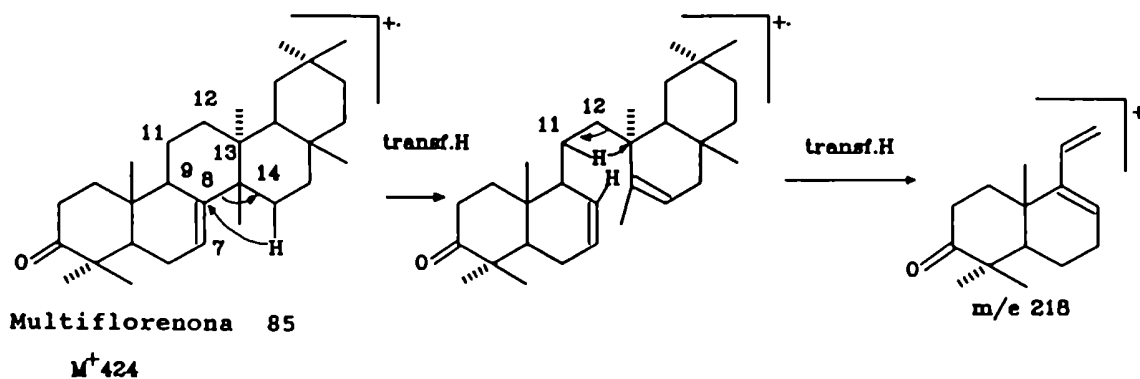
Figura 96: EM de la amirenona 39.

Cabe señalar que el EM de esta cetona triterpénica (Fig. 96) fue similar al del compuesto 39 de *F. argentina* (Fig. 46), lo único destacable fue el cambio en la relación de abundancias relativas de los iones m/e 203 y 205, lo que podría deberse a que en un caso el esqueleto sería urseno y en el otro, oleaneno.

El EM del compuesto 85 ($t_R = 25,00$ min) presentaba un patrón de rupturas semejante al de la isomultiflorenona (compuesto 43 de *F. argentina*), los iones sólo variaban en sus abundancias relativas (Fig. 50) lo que indicaría que la diferencia entre ellos sería la ubicación del doble enlace. La presencia de fragmentos a m/e 271, 257 ($M^+ - 167$), 245 ($M^+ - 179$), 218 y 205 indicaba que se trataba de un D:C friedo oleaneno o friedo-urseno (multifloreno y bauereno respectivamente), con metilos en C-13 y C-14 en la unión de los anillos C y D. El incremento del impedimento estérico en el caso en que el grupo metilo se encuentre en el C-20 (multifloreno) y no en el C-19 estaría indicando la influencia de este grupo en el patrón general de fragmentación (Fig. 51).

En particular, el pico base a m/e 218 sería característico de la cetona de esqueleto multiflorano con insaturación en Δ^7 llamada multiflorenona (Fig.

97). La formación de este ión correspondería formalmente a la ruptura de las uniones 8-14 y 12-13, pero parece más razonable (Fig. 97) invocar una doble transferencia de hidrógeno para evitar la ruptura desfavorable de una unión vinílica.



En principio, sería la ubicación de la doble unión la que favorecería en la isomultiflorenona 43 la formación del ión m/e 205 (Fig. 51) y en el compuesto 85 la del ión m/e 218 [BUDZIKIEWICZ, 1963].

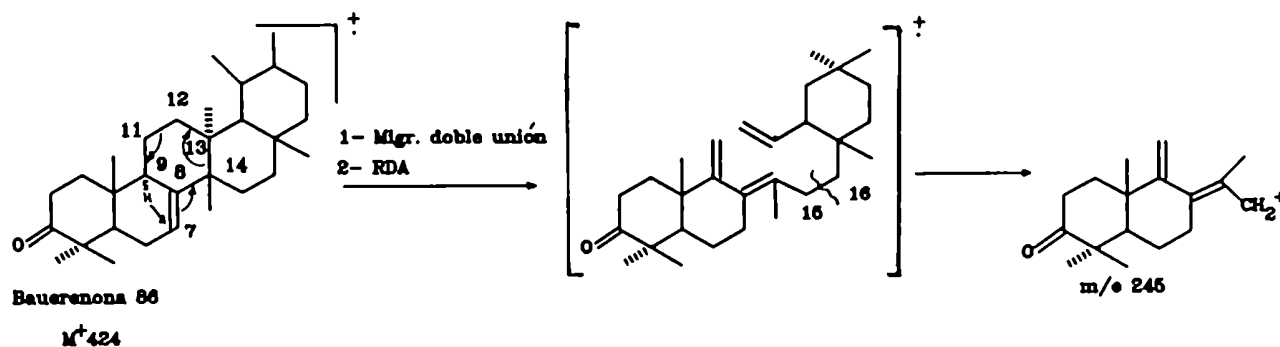
De esta manera se deduce que el compuesto 85 sería la multiflorenona (Fig. 97), cetona triterpénica que no se detectó en *F. argentina*.

El compuesto 86 (t_R 25,47 min) exhibía iones característicos a m/e 409 ($M^+ - Me$), 271, 257, 245, 218 y 205, similares a los encontrados en el compuesto 85, pero con diferencias en las abundancias relativas. En consecuencia se trataría de otra cetona triterpénica perteneciente a la familia de los baueranos.

La menor abundancia relativa del ión a m/e 205 (33,3 %) en 86 con respecto al compuesto 4, que comprende los anillos D y E, por ruptura del anillo C, sugeriría la presencia de un metilo en C-19 responsable de una interacción estérica. Se ha encontrado un ejemplo [BUDZIKIEWICZ, 1963] en que la posición del grupo metilo en el anillo E (en C-19 o C-20) generaba una influencia considerable en el comportamiento general de fragmentación en el par baurenio-multiflorenio.

Por otro lado, el ión a m/e 245 como pico base sería diagnóstico de la baurenona y provendría de una migración de la doble unión a la posición Δ^8 y retro-Diels Alder en el anillo C con posterior ruptura de la unión activada

15-16, ó un reordenamiento del átomo de hidrógeno de C-9 para dar el mismo intermediario (Fig. 98).



La génesis de los demás fragmentos sería similar a la descrita para la isomultiflorenona 43 (*F. argentina*) y para la multiflorenona 85 (*F. hieronymi*). En base a todo lo analizado se propuso la estructura de bauerenona para el compuesto 86.

Análisis de los aldehídos

La subfracción 3b.1 reveló por CCD de silicagel una única mancha marrón (óleo) de $R_f = 0,56$ (hexano-AcOEt, 98:2). Sin embargo, al analizarlo por CGL capilar en condiciones isotérmicas mostró varios picos debido a una serie homóloga de aldehídos lineales de $n-C_{14}H_{28}O$ a $n-C_{30}H_{60}O$ 87, 88, 45 a 51 respectivamente, con número par de átomos de carbono. Por cálculos de cuadrados mínimos de la recta resultante del logaritmo del t_R vs el número de átomos de carbono se obtuvo un factor de correlación de 0,9982.

En la Tabla 11 se analizan comparativamente los porcentajes de aldehídos lineales en ambas especies del género *Festuca*.

Tabla 11: Porcentajes de los aldehídos lineales presentes en *Festucas*.

$n-C_nH_{2n}O$, n=	14	16	18	20	22	24	26	28	30
<i>F. hieronymi</i>	5,07	1,35	0,93	1,50	0,68	0,57	89,32	0,14	0,43
<i>F. argentina</i>	-	-	0,25	1,78	0,57	0,35	95,15	0,30	1,60

Se corroboró por comparación por CGL capilar con testigos la identidad del aldehído mayoritario, $n\text{-C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}$ 49, que resultó ser el mismo que en *F. argentina* aunque en un porcentaje menor (Tabla 11). Por otro lado los compuestos más pequeños de esta serie ($\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}$ y $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}$, 87 y 88) no se detectaron en *F. argentina*.

Análisis de los alcoholes

La subfracción 3c se analizó mediante CGL isotérmica y con testigos resultando ser una serie homóloga de alcoholes lineales de veinticuatro a treinta átomos de carbono 52, 53, 21, 89, 54, 90 y 91, cuya naturaleza fue verificada por CGL-EM.

De los valores del logaritmo de t_R , en condiciones isotérmicas, en función del número de átomos de carbono se obtuvo un factor de correlación de 0,9995.

Al comparar los porcentajes de los distintos alcoholes con los de *F. argentina* (Tabla 12) se observó que en *F. argentina* el n-hexacosanol 21 es prácticamente el único alcohol lineal, mientras que en *F. hieronymi* es también mayoritario pero existe cierta distribución hacia los de mayor peso molecular, siendo en particular significativo el n-octacosanol 54.

Tabla 12: Porcentajes de los alcoholes lineales presentes en *Festucas*.

$n\text{-C}_n\text{H}_{2n+2}\text{O}$, n=	24	25	26	27	28	29	30
<i>F. hieronymi</i>	1,05	0,28	90,06	0,55	5,06	0,68	1,77
<i>F. argentina</i>	1,11	0,33	98,30	-	0,27	-	-

Análisis de los esteroides

La fracción 5 dió una única mancha rosada (óleum) de $R_f = 0,37$ por CCD de silicagel (hexano-AcOEt, 9:1) indicativo de esteroides. El análisis de la misma se encaró por CGL capilar (Fig. 99), CGL capilar-EM y CGL capilar con testigos.

Así se dedujeron las estructuras de los compuestos 32, 55, 22, 23, 56, 24, 25, 58 y 59 como colesterol, Δ^7 -colesterol, campesterol, estigmasterol,

Δ^7 -campesterol, sitosterol, dihidrositosterol, Δ^7 -sitosterol y Δ^7 -estigmasterona respectivamente.

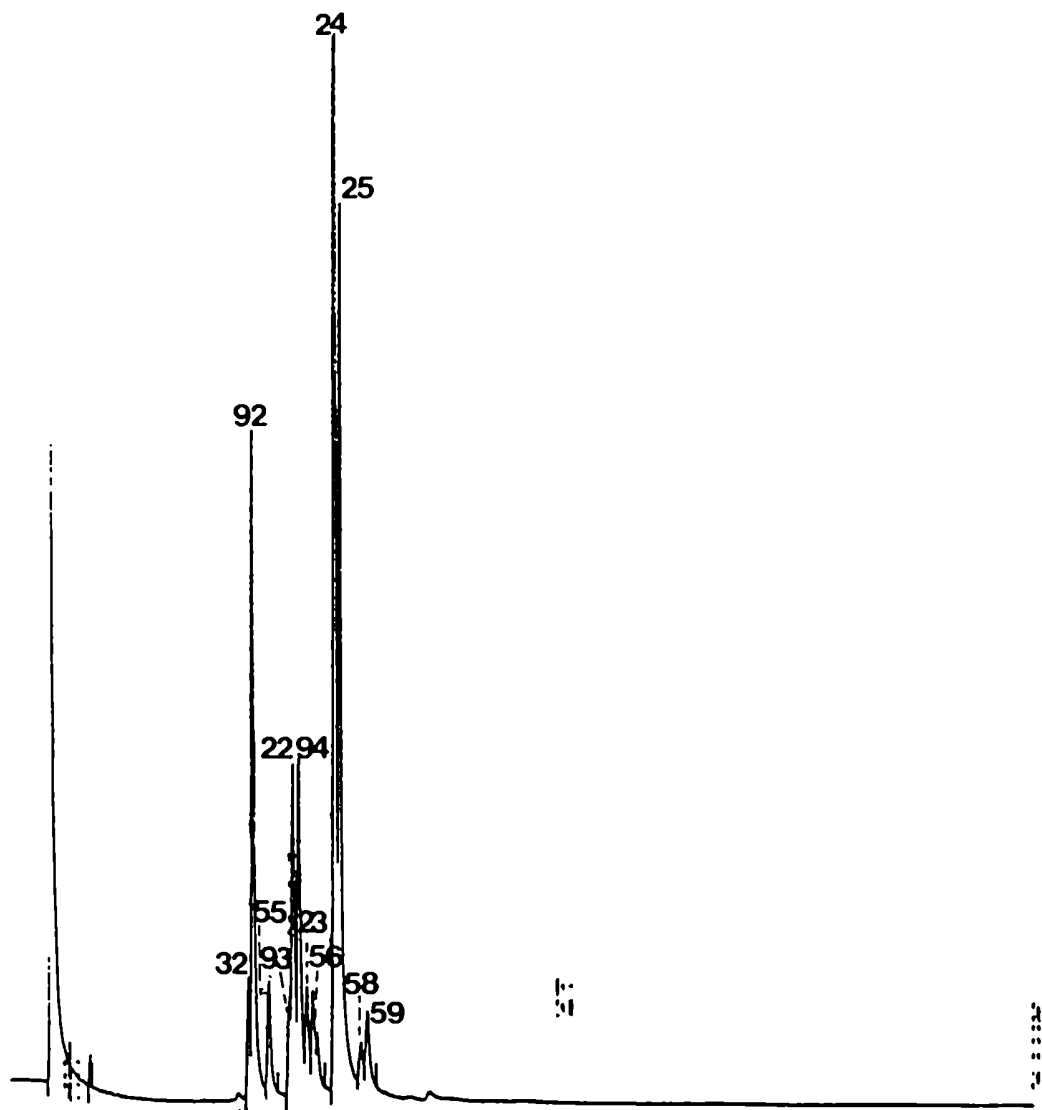


Figura 99: CGL-EM de los esteroides de *F. hieronymi*.

Los compuestos 92 y 94 con t_R 7,64 y 8,88 min respectivamente, aparecían entre las señales del colesterol 32 y Δ^7 -colesterol 55 en un caso, y las del campesterol 22 y Δ^7 -campesterol 56 en el otro. Sus iones moleculares a m/e 388 y 402 respectivamente, eran 2 una mayores que estos compuestos por lo que se sospechó la presencia de los correspondientes esteroides saturados dihidrocolesterol y dihidrocampesterol (Fig. 100 A y 100 B, respectivamente).

Ésto se confirmó por la presencia del ión a m/e 233 (Fig. 100) equivalente al fragmento f de Δ^5 -esteroides de *F. argentina* (Fig. 53) muy

abundante (97,7 y 89,5 % respectivamente) característico de esteroides saturados sustituidos en C-17 [PARTRIDGE, 1977] y que provendría de la pérdida de C-15, 16 y 17 en un fragmento que incluye la cadena lateral y un átomo de hidrógeno adicional. Esta fragmentación es de importancia considerable como herramienta diagnóstica para determinar la naturaleza del sustituyente de C-17 en esteroides saturados ya que no sufren una fácil pérdida de la cadena lateral de C-17 (fragmento d de Δ^5 -esteroides de *F. argentina*, Fig. 53).

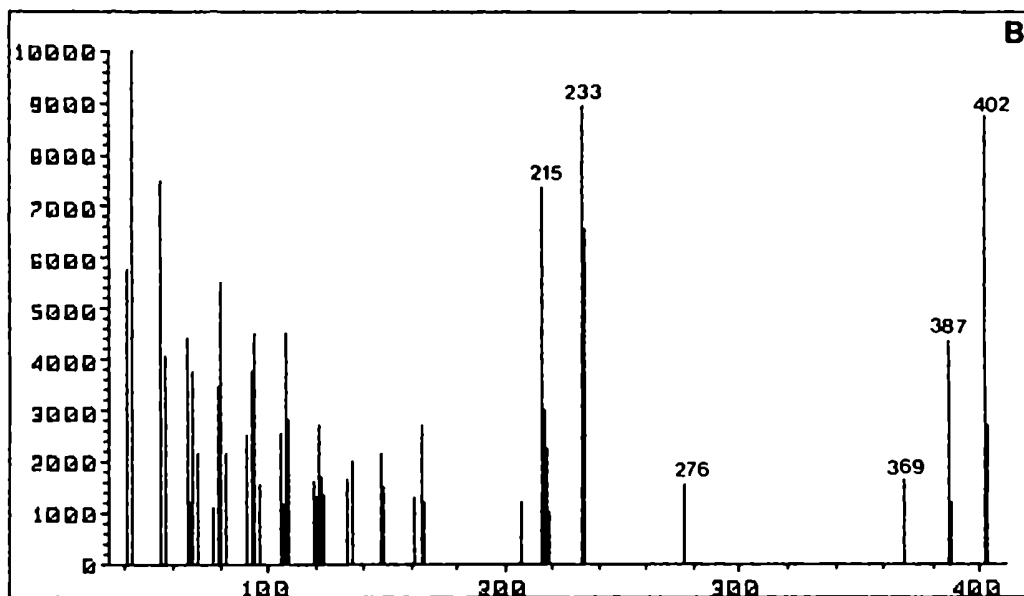
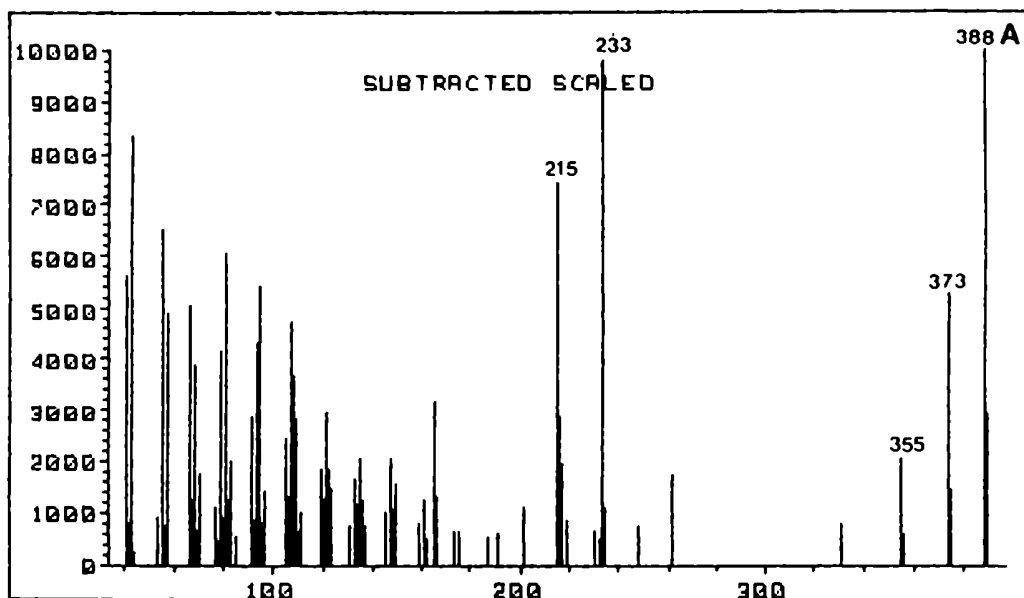


Figura 100: A- EM del dihidrocolesterol 92.

B- EM del dihidrocampesterol 94.

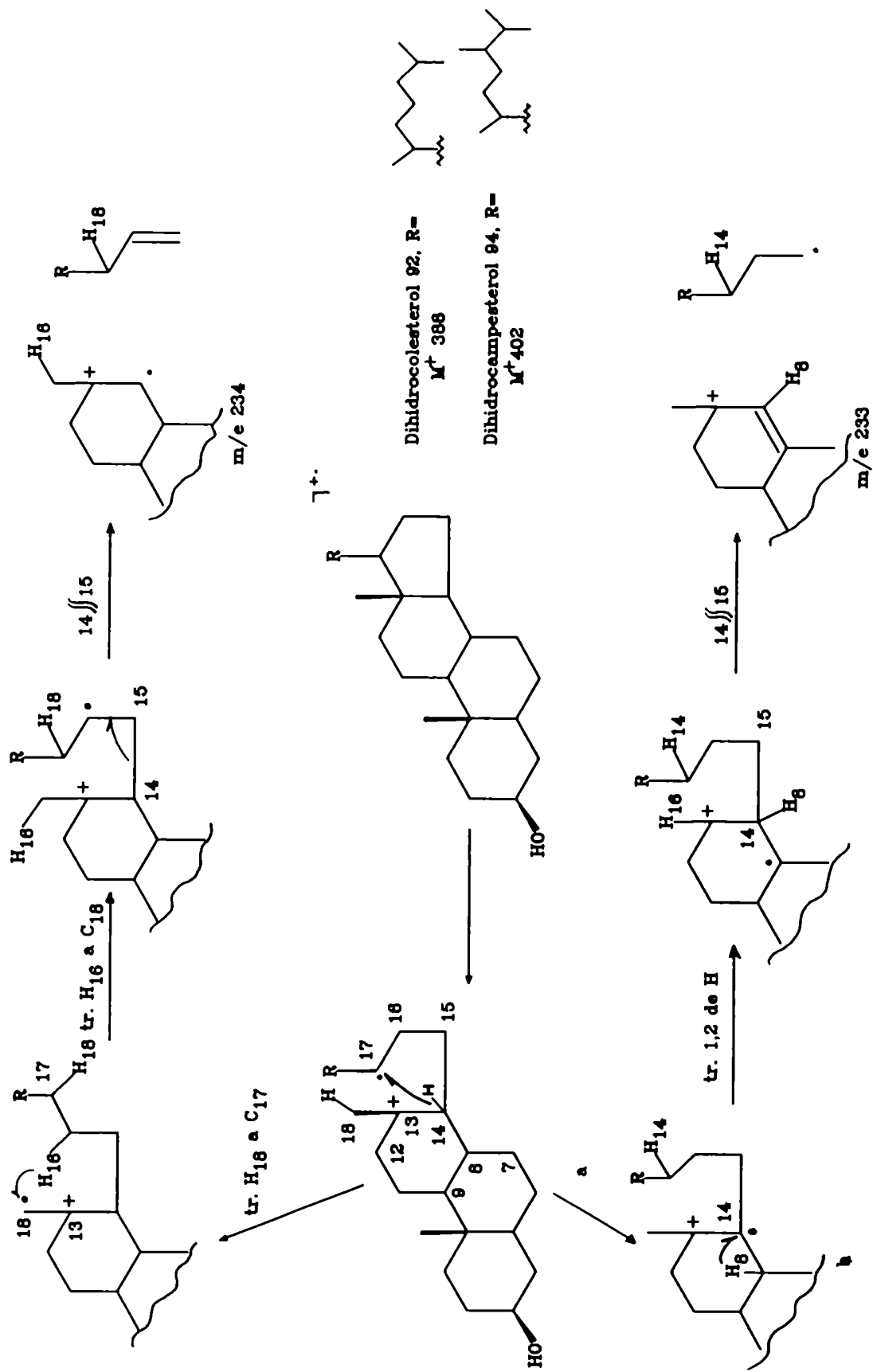


Figure 101

Los EM de 92 y 94 (Fig. 100) también mostraron otro ión diagnóstico a m/e 234 (70,9 y 65,5 % respectivamente) correspondiente a la expulsión del anillo D, pero sin transferencia de hidrógeno, que estaba ausente en los espectros de Δ^5 - y Δ^7 -esteroles.

Se demostró [TÖKÉS, 1968] que en los esteroides saturados la fuente más importante del hidrógeno que se transfiere (aproximadamente en un 70%) y se pierde con la cadena lateral para generar el ión m/e 233, proviene de la posición 14. En cambio, la pérdida del fragmento del anillo D sin transferencia de hidrógeno, que da lugar al ión m/e 234, sería el resultado de la transferencia recíproca de hidrógenos entre C-16 y C-18.

Así, ambas fragmentaciones se podrían racionalizar a través de un intermediario común (a, Fig. 101). La ionización de la unión 13-17 liberaría la tensión del anillo D y produciría un ión carbonio terciario muy estable y un radical secundario a. La geometría de a sería tal que el sitio radical podría aproximarse al H-14 α , la transferencia del cual daría una olefina ionizada b. Postulando una transferencia 1,2 de hidrógeno y la pérdida del fragmento del anillo D se generaría un ión carbonio alílico terciario a m/e 233. La génesis del ión m/e 234 se podría racionalizar [PARTRIDGE, 1977] a partir de a (Fig. 101), por una transferencia recíproca de hidrógenos entre los C-16 y C-18 seguida de la pérdida del fragmento que contiene al anillo D, sin ningún hidrógeno adicional.

También la ausencia de los iones h e i y j, k y l (Fig. 53 *F. argentina*) corroboró estas estructuras saturadas ya que las rupturas enumeradas estarían relacionadas con la insaturación en Δ^7 y Δ^5 respectivamente.

Estos resultados fueron concordantes con una estructura de dihidrocolesterol para el compuesto 92 y de dihidrocampesterol para el compuesto 94.

Como el compuesto 93 estaba en muy baja proporción respecto a los otros esteroides, su EM (Fig. 102) exhibía pocas señales, en particular no se registraron fragmentos entre el M^+ y el ión a m/e 273. Presentó un ión molecular a m/e 398, correspondiente a un esteroide con 28 átomos de carbono y un pico base a m/e 271, ambos consistentes con la presencia de dos dobles enlaces, uno en el núcleo y otro en la cadena lateral [WYLLIE, 1968].

La ausencia de los iones j, k y l de las fragmentaciones de fitoesteroides, $M^+ - Me$, $M^+ - H_2O$ y $M^+ - H_2O - Me$ sugeriría una estructura de Δ^7 -esteroide.

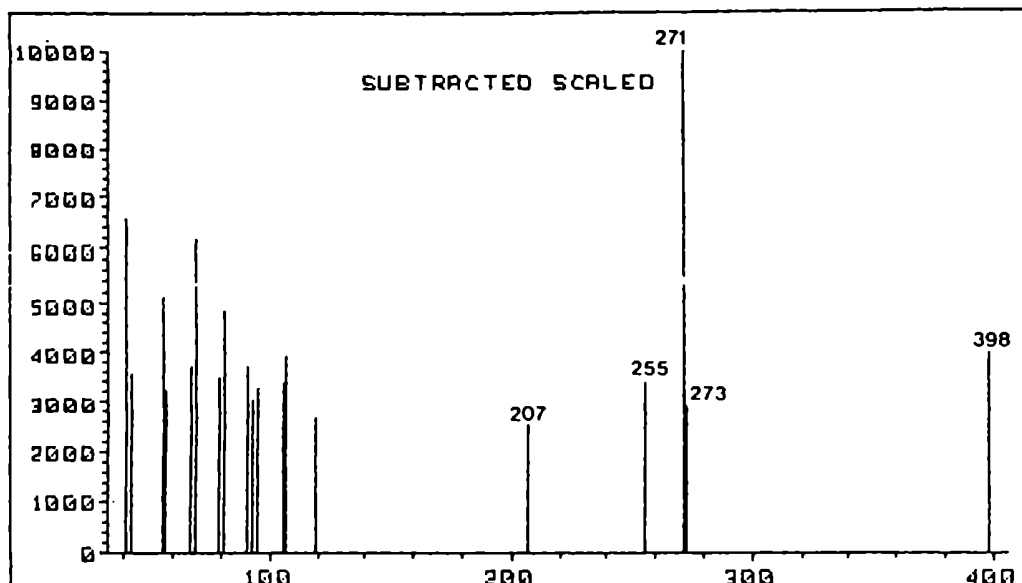


Figura 102: EM del $\Delta^{7,22}$ -24-metilcolesterol 93.

Los fragmentos a m/e 271 y 273 corresponden a la pérdida de una cadena lateral monoinsaturada de nueve átomos de carbono con y sin pérdida de dos hidrógenos del núcleo esteroidal respectivamente; esta cadena sería análoga a la del 24-metilcolesterol. La insaturación no podría estar en Δ^{24} ó $\Delta^{24(28)}$ porque aparecería un pico de alta abundancia relativa a m/e 314 proveniente de un reordenamiento tipo Mc Lafferty con ruptura de la unión 22-23 y transferencia de un hidrógeno al fragmento cargado. Así, las estructuras probables corresponderían a $\Delta^{7,22}$ ó $\Delta^{7,25(27)}$ -24-metilcolesterol (Fig. 103).

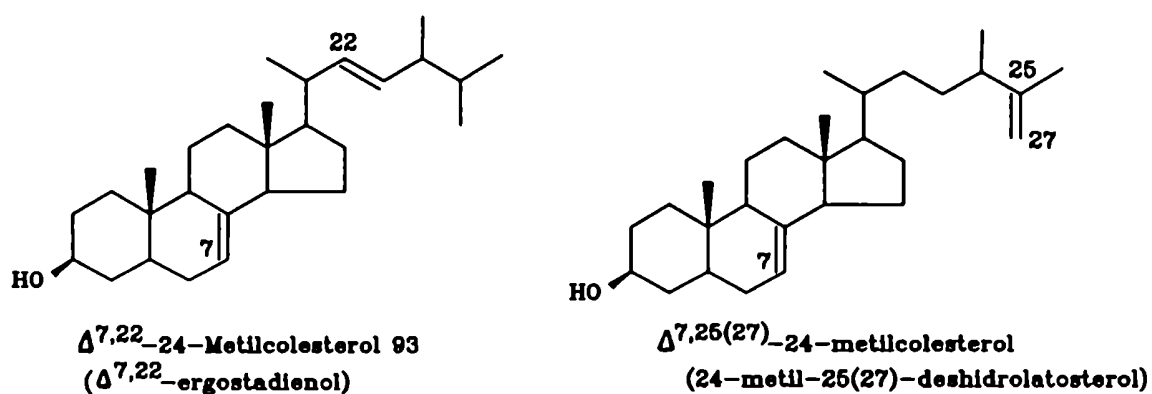


Figura 103

El derivado $\Delta^{7,25(27)}$ se encontró por primera vez en plantas superiores en *Cucurbita maxima* [GARG, 1984], como no se conocían 24- α -alquil- $\Delta^{25(27)}$ -esteroides en plantas vasculares, la configuración del C-24 de este esteroide sería probablemente β , o sea que sería el 25(27)-deshidrofungisterol, lamentablemente no se pudo aislar ya que se encontraba como traza.

Previamente se detectó una mezcla de epimeros de C-24 de $\Delta^{7,25(27)}$ -24-metilesteroides en la esponja *Verongia cauliformis* [KOKKE, 1979]; se informó [KOKKE, 1979] un EM parcial en el cual había, entre otros, fragmentos a m/e 246, 314 y 328, estos dos últimos de baja intensidad, que no aparecieron en el compuesto 93.

En particular, el compuesto 93 presentó una relación de abundancias relativas en los iones m/e 273, 271 y 255 semejante al descrito para el $\Delta^{7,22}$ -24-etilcolesterol (24 α -etil-22-deshidrolatosterol, espinasterol) [NES, 1977].

Además, mostró un tiempo de retención menor que el del campesterol por CGL (columnas QF-1 y SE-30) en concordancia con el informado para el $\Delta^{7,22}$ -24-metilcolesterol ($\Delta^{7,22}$ -ergostadienol) [PATTERSON, 1971].

De lo expuesto se deduce que el compuesto 93 resultaría ser el $\Delta^{7,22}$ -24-metilcolesterol; sin embargo sería necesario una comparación con testigo auténtico para confirmar la estructura en las mismas condiciones experimentales.

Los demás compuestos esteroidales de *F. hieronymi* presentaban un espectro de masas y t_R concordantes con los hallados en *F. argentina*, aunque con distinto porcentaje relativo de cada uno (Tabla 13).

Así, del análisis de la tabla surge que, en comparación con *F. argentina*, *F. hieronymi* sería más rica en esteroides saturados, no presentaría cetonas esteroidales α,β -insaturadas (Δ^4) pero sí insaturadas en Δ^7 que serían relativamente más abundantes.

Tabla 13: Porcentajes de compuestos esteroidales de *Festucas*

Esteroides	<i>F. hieronymi</i>	<i>F. argentina</i>
Colesterol 32	1,8	1,3
Dihidrocolesterol 92	13,2	-
Δ^7 -Colesterol 55	2,6	1,3
$\Delta^{7,22}$ -Campesterol 93	1,6	-
Campesterol 22	7,0	8,5
Dihidrocampesterol 94	7,9	-
Estigmasterol 23	2,5	24,2
Δ^7 -Campesterol 56	2,4	1,0
Sitosterol 24	9,9	49,4
Dihidrositosterol 25	24,8	6,9
Campesterona 57	-	0,6
Δ^7 -Sitosterol 58	1,2	2,6
Δ^7 -Estigmasterona 59	2,2	0,9
Sitosterona 60	-	2,0

Finalmente, al analizar esta fracción por CGL capilar-EM en otras condiciones ya que se usó una columna capilar DB-5, con temperatura programada, se pudo detectar una señal pequeña a t_R menor con respecto a los compuestos mencionados anteriormente.

El EM de este compuesto 95 presentó a masas altas una señal a m/e 394. También se observó la pérdida de 15 una a partir de 394, correspondiente a un metilo angular, $M^+ - 15$ (m/e 379), así como también la pérdida de la cadena lateral (M-141) a m/e 253, lo cual indicaría que esta cadena era saturada y poseía 10 átomos de carbono. Apareció además el fragmento correspondiente a M^+ -cad. lat.-42 a m/e 211, debido a la pérdida de la cadena lateral y el anillo D a partir del ión molecular [PARTRIDGE, 1977].

Resultan importantes los fragmentos a m/e 119 y 275 desde el punto de vista estructural, pues indicarían la presencia de tres dobles enlaces en los anillos A y B. Se postula que estas señales se obtendrían por retención de la carga de los dos fragmentos generados por la ruptura de los enlaces 7-8 y 9-10 con migración de hidrógeno desde la porción que contiene los anillos C y D a la que contiene el anillo A.

El pico base a m/e 135 correspondía a la pérdida de cadena lateral a

partir del ión m/e 275, mientras que el ión m/z 93 correspondería a la pérdida de la cadena lateral y del anillo D (C-15, C-16 y C-17) también a partir del ión m/e 275, con la respectiva transferencia de un hidrógeno.

El fragmento a m/e 158 también confirmó la presencia de tres dobles enlaces en los anillos A y B, pues correspondería a la ruptura de las dos uniones 11-12 y 8-14 con retención de la carga en el fragmento que contiene los anillos A y B. La subsiguiente pérdida de 15 una a partir de m/e 158 justificaría la señal importante a m/e 143.

En la figura 104 se esquematizan las rupturas del compuesto 95, con una de las distribuciones posibles de tres dobles enlaces conjugados en los anillos A y B, que correspondería a lo observado en el EM de este compuesto.

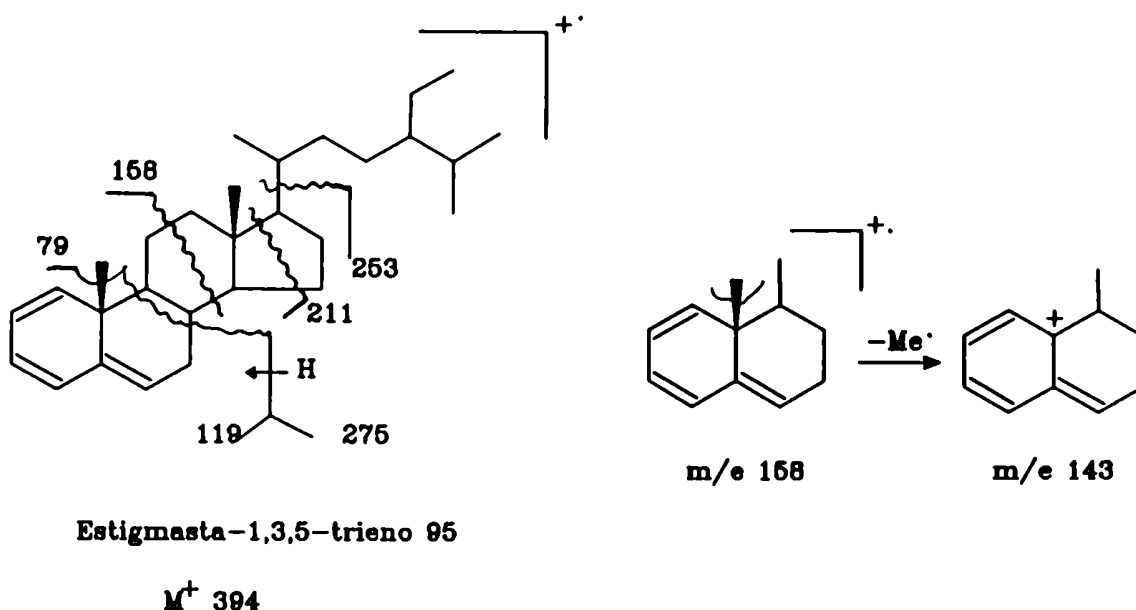


Figura 104

Con respecto a la sustancia presente en la planta, se plantea la problemática de la existencia de este tipo de compuestos como naturales o si en realidad se trata de compuestos que artificialmente se han formado por la temperatura a la que son sometidos en la fuente iónica al hacer CGL-EM.

En este último caso, si ésto ocurriera, indudablemente el compuesto natural sería el 3-hidroxiderivado correspondiente (estigmasta-4,6-dien-3-ol), que por deshidratación en las condiciones de la CGL-EM, daría el compuesto indicado en la Fig. 104, estando además favorecido por la formación de tres dobles enlaces conjugados. Esta disyuntiva no ha sido esclarecida aún en la literatura.

ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS PRELIMINARES DE LAS DOS ESPECIES DE FESTUCA

Se realizaron estudios comparativos de toxicidad en las dos especies pertenecientes al género *Festuca*: *Festuca argentina* y *Festuca hieronymi*. Para ello se efectuaron inoculaciones de los distintos extractos y fracciones en ratones, observando la sintomatología, analizando las necropsias en los casos de administrar dosis letales. Además se efectuaron los estudios histopatológicos de los órganos afectados y las correspondientes microfotografías.

FESTUCA ARGENTINA (SPEG.) PAR.

Se probó la toxicidad de los distintos extractos de éter de petróleo, metanólico y acuoso, de las fracciones obtenidas de la marcha de alcaloides (extractos a pH = 8 y pH = 11) y de los correspondientes percolados clorofórmico, metanólico y acuoso provenientes del subfraccionamiento del extracto metanólico, inoculándolos como suspensiones de concentraciones conocidas por vía intraperitoneal en ratones.

Resultaron letales el extracto metanólico (en una concentración de 100 mg/ml, inyectando 1 ml produjo muerte en 4,5 hs), y el percolado acuoso que inoculándolo en una concentración de 138 mg/ml en distintas dosis en ratones, causó parálisis generalizada y posteriormente la muerte entre 4 y 46 hs.

El extracto acuoso resultó ser el más activo ya que en una concentración de 85 mg/ml, inferior a las anteriores, ocasionó en ratones ojos dilatados, parálisis general, marcada en el tren posterior y luego la muerte entre 2,5 hs y 9 hs. En las necropsias se observó un aumento de hígado y congestión pulmonar y de riñón.

Lesiones microscópicas de los órganos afectados al inocular los ratones con:

Extracto metanólico

Los órganos más afectados fueron el hígado y el riñón. En hígado se observó hiperemia (aumento de la circulación sanguínea) y edema celular (hepatosis). El riñón presentó hiperemia glomerular; edema celular y degeneración hialina en los túbulos renales (nefrosis).

Percolado acuoso

El hígado presentó leve edema celular (hepatosis). En el riñón se observó hiperemia y aumento de la celularidad glomerular; edema celular y degeneración grasa en túbulos contorneados proximales. En el bazo se detectó hiperplasia de pulpa blanca (aumento del número de linfocitos); y en el cerebro hiperemia.

Extracto acuoso

En el hígado se observó congestión venosa central y portal, dilatación y congestión sinusoidal, áreas de hemorragia y edema celular (hepatosis). El riñón mostró hemorragia y degeneración tubular (nefrosis); y el cerebro una marcada hiperemia.

Estudio toxicológico del extracto acuoso

Debido a los resultados biológicos obtenidos se realizó el fraccionamiento de este extracto eligiendo los métodos separativos más adecuados con fines toxicológicos en forma empírica, analizando la actividad de cada subfracción en ratones.

En primer lugar se probó la precipitación con etanol, la cual fue adecuada ya que dio precipitados con dos concentraciones de etanol: 70% (Ppdo 70%) y 90% (Ppdo 90%); al inocular en ratones suspensiones del Ppdo 70% (24 mg/ml), del Ppdo 90% (19 mg/ml) y de la solución remanente, resultó letal sólo el Ppdo 70%. Los animales inoculados con ella presentaron como síntomas la parálisis general (marcada en el tren posterior) o bien ataxia (incoordinación) de tren posterior y ojos dilatados. Al realizar las necropsias se encontró aumento de hígado y congestión de pulmón y de riñón.

Dado lo útil que resultó este método separativo, por ser reproducible y permitir trabajar con grandes cantidades, se realizó nuevamente la precipitación con etanol partiendo de una mayor masa del extracto acuoso.

Posteriormente se subfraccionó el Ppdo 70% mediante diálisis con una membrana de celulosa (corte PM 12000) contra agua destilada. Se efectuaron los ensayos toxicológicos correspondientes resultando letal la subfracción de peso molecular promedio mayor a 12000; así, la suspensión interna de la bolsa del Ppdo 70% (Ppdo 70% int.) en una concentración de 24,9 mg/ml, produjo la muerte de los ratones en 2,3 hs. y 9 hs en dosis de 1 ml y 0,5 ml respectivamente.

Por otro lado resultó inocua la solución externa de la bolsa del Ppdo 70% (Ppdo 90% ext.).

En la necropsia de los ratones inoculados se observó una marcada congestión pulmonar, aumento del tamaño de hígado y reblandecimiento cerebral.

Lesiones microscópicas de los órganos afectados al inocular los ratones con:

Ppdo 70%:

Se observó hiperemia en pulmón, hígado y riñón. Además el hígado mostró dilatación y congestión sinusoidal; y el pulmón zonas de hemorragia y presencia de hemosiderina.

El riñón presentó degeneración hialina en los túbulos contorneados proximales y presencia de hemosiderina (nefrosis).

Suspensión interior de la bolsa del Ppdo 70%:

En el riñón había hiperemia y zonas de hemorragia, edema celular en las células epiteliales de los túbulos y el cambio graso evidenciado por las vacuolas de distintos tamaños que deforman el citoplasma celular (Fig. 105). En otros cortes, la lesión más llamativa fue la degeneración hialina en túbulos contorneados proximales que le dio al citoplasma un aspecto homogéneo (Fig. 106) (nefrosis).

El hígado (Fig. 107) presentó congestión venosa y sinusoidal, desorden trabecular y hepatocitos aumentados de tamaño con bordes redondeados y con núcleos grandes, denominados megahepatocitos, y con finas granulaciones en sus citoplasmas con el aspecto característico de edema celular (hepatosis).

El pulmón mostró hiperemia, zonas de hemorragia y áreas de enfisema. El bazo exhibió hiperemia; presencia de hemosiderina y amiloide en pulpa roja.

En cerebro (Fig. 108) se observó hiperemia; degeneración y desintegración de las neuronas (necrosis de cuerpos neuronales) que perdieron sus núcleos y alteraron sus características citoplasmáticas convirtiéndose en masas homogéneas que fueron reduciendo su tamaño hasta desaparecer. Estas neuronas se rodearon de células de la glía, algunas de las cuales tendrían acción fagocítica (satelitosis).

Microfotografías de los cortes histopatológicos de los órganos afectados al
inocular en ratones la suspensión interior de la bolsa del Ppdo 70%

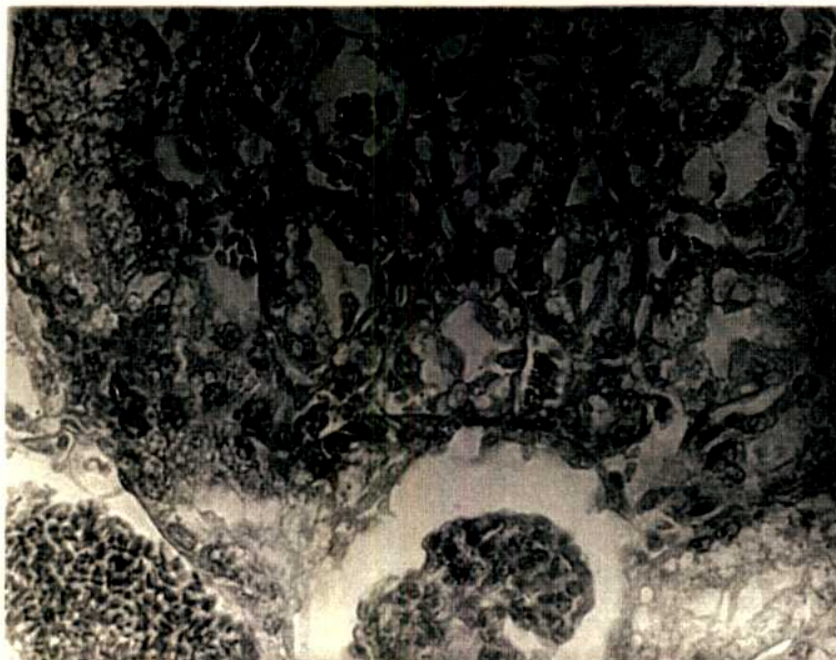


Figura 105. Riñón (X 20):
Edema celular en epitelio tubular y cambio graso. Hiperemia.

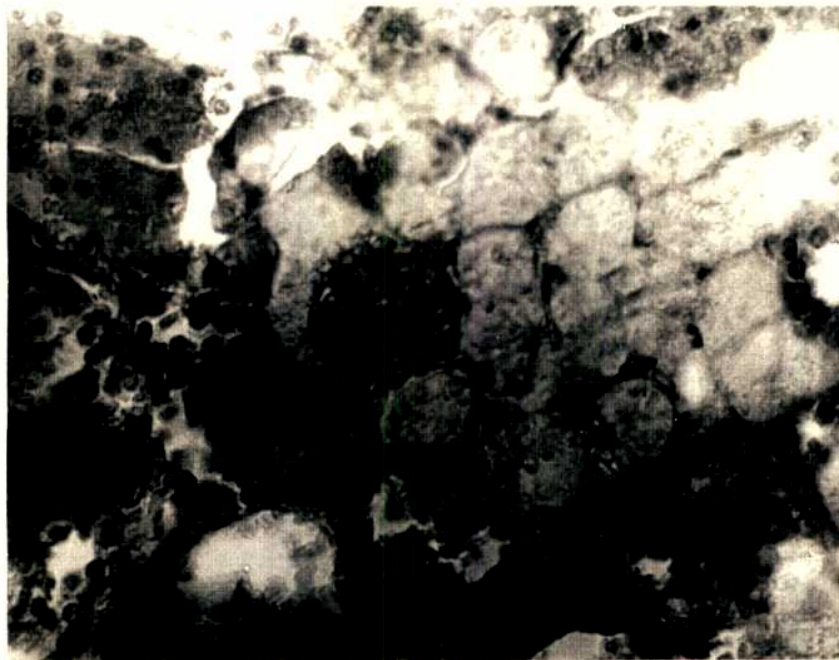


Figura 106. Riñón (X 20):
Degeneración hialina en epitelio tubular rodeando un glomérulo con hiperemia.

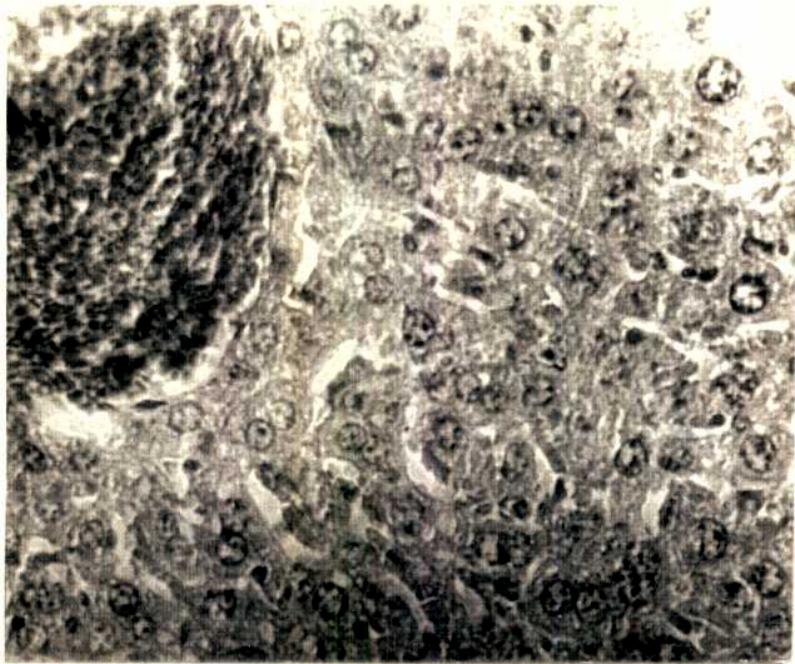


Figura 107. Hígado (X 20):
Congestión venosa y sinusoidal. Edema celular.



Figura 108. Cerebro (X 20):
Necrosis neuronal. Satelitosis.

Determinación de la naturaleza química de los componentes de la fracción tóxica de *Festuca argentina*

Dado que resultó tóxica la fracción interior de la bolsa de diálisis del precipitado 70 % (Ppdo.70% int.) de *F. argentina*, se trató de caracterizar los componentes de la misma.

Se sospechó la naturaleza proteica de ésta ya que por agregado de etanol a la correspondiente fracción acuosa se formaba precipitado a una concentración de 70 %, además, el peso molecular sería mayor de 12000, al no atravesar la membrana de diálisis.

Así, muchas proteínas pueden ser precipitadas por agregado de solventes orgánicos miscibles con agua, como acetona y etanol. Al agregar el solvente orgánico disminuye la constante dieléctrica de la solución y por lo tanto su poder de solvatación, con lo cual disminuye la solubilidad de una proteína y puede ocurrir agregación en base a la atracción electrostática. La precipitación ocurre en seguida cuando el pH está cercano al pI de la proteína. El tamaño de la proteína también influye en el comportamiento de la precipitación; así, una proteína más grande precipitará con concentraciones más bajas del solvente orgánico que una proteína más chica con propiedades similares.

Posteriormente se realizaron una secuencia de ensayos para confirmar la naturaleza química de esta fracción. Se evaluó el contenido de proteínas por lectura a 280 nm y por reacción de Lowry, y se analizó el comportamiento electroforético así como la detección con azul brillante de Coomassie que permitieron establecer la naturaleza peptídica del o de los componentes tóxicos. Además, como luego de la electroforesis dio coloración con el reactivo de Schiff, tendría aparentemente naturaleza glicopeptídica.

La absorción en el UV de esta fracción se debería a que la mayoría de las proteínas exhiben un máximo de absorción a 280 nm atribuida al grupo fenólico de tirosina y al indólico del triptofano. La real ventaja de este método espectroscópico es que es rápido y no-destructivo.

El procedimiento de Folin-Lowry es el método más comúnmente usado para la determinación de proteínas y se basa en el trabajo de Lowry y col. [LOWRY, 1951]. Consiste en la reacción de Biuret de proteínas con Cu bajo condiciones

alcalinas y la reducción de Folin-Ciocalteu del ácido fosfomolibdicofosfotúngstico a heteropolimolibdeno azul por la oxidación catalizada por Cu de los aminoácidos aromáticos. El ensayo resulta en un fuerte color azul y es más sensible (rango 0,10-1 mg proteína/ml) que la reacción de Biuret.

La reacción presenta una moderada variación de respuesta a la composición de aminoácidos proteicos, además se han registrado detalladamente las interferencias químicas [PETERSON, 1979].

Luego de realizar las electroforesis (SDS-PAGE; IEF) del Ppdo.70% int., se realizó la tinción de las mismas con Azul Brillante de Coomassie R-250 ("Coomassie Brilliant Blue", CBB R-250). Esta técnica la desarrolló Bradford [BRADFORD, 1976] y se fundamenta en que la unión del colorante, una trifenilamina sulfatada, a la proteína causa un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante de 465 nm (forma roja) a 595 nm (forma azul). El procedimiento es capaz de detectar aproximadamente 0,5 μ l de proteína/cm² de gel; además, presenta una dependencia marcada con la composición de aminoácidos proteicos debido a que el colorante se uniría a los residuos básicos (especialmente arginina) y aromáticos de los aminoácidos [COMPTON, 1985].

También las electroforesis SDS-PAGE del Ppdo.70% int. revelaron con el reactivo ácido periódico-Schiff ("Periodic acid-Schiff", PAS) usando fucsina [ZACCHARIAS, 1969], una banda con movilidad similar a la coloreada con Azul de Coomasie, por lo que tendría una naturaleza glicopeptídica.

Metodos electroforéticos

Se utilizó la electroforesis con gel de poliacrilamida ("polyacrylamide gel electrophoresis", PAGE) debido a su capacidad de alta resolución. Además, se conoce una variedad de técnicas electroforéticas que permiten separar proteínas en base a una o a la combinación de sus tres propiedades mayores: tamaño, carga neta e hidrofobicidad relativa. Al trabajar con PAGE en presencia de un detergente aniónico, dodecilsulfato de sodio ("sodium dodecyl sulfate", SDS) las proteínas pueden ser caracterizadas en términos del tamaño molecular de sus constituyentes polipeptídicos.

Así, al realizar la electroforesis SDS-PAGE con testigos [LAEMMLI, 1970] se pudo caracterizar en el Ppdo.70% int., una banda con movilidad algo menor a

la de la albúmina bovina (PM 68.000).

Esto fue coherente con el hecho que la concentración total de monómero en el gel de poliacrilamida usado fuera de 10 % T (masa de acrilamida y bis en 100 ml de gel), ya que determina un rango efectivo de separación de proteínas [HARRIS, 1989] de PM 15.000 a 200.000 (Tabla 14).

Tabla 14. Rangos de separación de geles de acrilamida de distinta concentración (%T)

%T	Rango óptimo de PM
3-5	> 100.000
5-12	20.000-150.000
10-15	10.000-80.000
15+	< 15.000

Otro procedimiento complementario que se eligió para el análisis de esta fracción fue el isoelectroenfoque ("isoelectric focusing", IEF) que permite caracterizar proteínas en términos de su pI. En este método de alta resolución las proteínas son separadas en presencia de un gradiente continuo de pH. Bajo estas condiciones las proteínas migran según sus cargas hasta alcanzar los valores de pH a los cuales no tienen carga (sus pI). Las proteínas alcanzarán, entonces, un estado estable de migración cero y estarán concentradas o enfocadas en zonas angostas. Además, como IEF separa proteínas en base a sus cargas, se minimizan los efectos de tamizado molecular usando geles de baja concentración de acrilamida (3-5 %T).

Para generar el gradiente de pH se incorporaron anfolitos carrier comerciales Pharmalyte de bajo PM en la matriz del gel de poliacrilamida que cubren el rango de pH 3-9,5.

Finalmente al realizar IEF en condiciones nativas, donde los geles sólo contienen los anfolitos carrier, usando como testigo una mezcla de marcadores de pI se observó una única banda en la fracción del Ppdo 70 % int., en la zona de pH próxima a 6,5.

Los estudios electroforéticos y de isoelectroenfoque se realizaron en colaboración con la Prof. Dra. Alcira B. Nesse y la Lic. María Cristina Romero (Laboratorio de Análisis Biológicos, Dpto. de Química Biológica, FCEyN, UBA).

FESTUCA HIERONYMI HACKEL

Se realizaron ensayos en ratones inyectando suspensiones acuosas de los tres extractos y de los percolados del extracto metanólico, para localizar aquellos responsables de la letalidad observada.

El extracto de éter de petróleo y el percolado metanólico no resultaron letales; sin embargo inoculando este percolado en una concentración de 200,2 mg/ml (volumen inyectado 0,4 ml) se observó una marcada disminución de la motilidad.

El extracto metanólico causó letalidad recién con una concentración de 94 mg/ml e inyectando 1 ml (muerte en 30 min). Inyectando 0,5 ml de una suspensión del percolado de cloruro de metileno de concentración 81,1 mg/ml los ratones presentaron dificultades motoras en el tren posterior y murieron a las 72 horas. Al administrar en ratones una suspensión muy concentrada del percolado acuoso (300,7 mg/ml), se produjeron convulsiones violentas seguidas de muerte (5-10 minutos).

El extracto acuoso produjo dificultades motoras y temblores en animales de experimentación en una concentración de 100 mg/ml; resultó letal cuando se inoculaba (0,2 ml, 0,4 ml) una suspensión de mayor concentración (250 mg/ml), mostrando los ratones ojos lacrimosos, ataxia en el tren posterior, caída de la cabeza hacia un costado, incoordinación motora y finalmente la muerte en 5 a 72 horas.

Lesiones microscópicas de los órganos afectados al inocular los ratones con:

Percolado de cloruro de metileno:

El corazón presentó degeneración de algunas fibras musculares; el útero, ligera hiperplasia epitelial e hiperemia. En riñón se observó hiperemia, descamación del epitelio de los túbulos contorneados proximales y edema celular. El hígado mostró una marcada congestión venosa, edema celular y presencia de megahepatocitos. En cerebro hubo degeneración de escasa cantidad de neuronas, hiperemia y congestión meníngea.

Percolado acuoso:

El riñón mostró una marcada congestión en corteza y médula; edema celular y descamación en el epitelio de los túbulos contorneados. El hígado presentó congestión portal y sinusoidal, edema celular y cambio graso panlobulillar (en todo el lobulillo).

Extracto acuoso:

En riñón se observó una ligera congestión y áreas de hemorragias; edema celular. El hígado presentó una marcada congestión portal, sinusoidal y de venas centrales; escaso edema celular y marcado cambio graso.

Los análisis histopatológicos y las inoculaciones de los ratones se realizaron en colaboración con el Dr. Carlos Mazzini y la médica-veterinaria Elvira Falzoni (PROPLAME-CONICET).

COMPARACIÓN DE LAS LESIONES MACRO Y MICROSCÓPICAS PROVOCADAS POR AMBAS ESPECIES

En este trabajo sobre los efectos tóxicos de las especies de festucas estudiadas, se puso de manifiesto que, a pesar de producir ambas plantas una sintomatología similar (ojos afectados, ataxia de tren posterior, parálisis), las fracciones que las causan y los órganos afectados y/o lesiones microscópicas no son análogas en ambas especies.

La diferencia más importante se encuentra en la letalidad del percolado de cloruro de metileno de *Festuca hieronymi* que dio sintomatología y que además produjo lesiones en corazón, útero, riñón, hígado y cerebro en los animales inoculados, mientras que resultó inactivo el de *Festuca argentina*.

En los animales inyectados con el extracto de cloruro de metileno de *F. hieronymi* se hallaron: marcada congestión renal, edema y descamación celular en el epitelio de los túbulos contorneados proximales; y a nivel hepático marcada congestión venosa con zonas de edema celular y extensas áreas de evidente cambio graso en hepatocitos, congestión en meninges y degeneración de neuronas.

Por otro lado, las fracciones más polares de ambas especies (percolado acuoso y extracto acuoso) produjeron sintomatología y letalidad comparables,

pero sólo en el caso de *F. argentina* se observó, entre otras, lesiones a nivel cerebral, y en bazo y en pulmón con la suspensión interior de la bolsa del Ppdo 70 %.

También vale la pena destacar en ambas especies la congestión y hemorragias de diversa intensidad y el edema celular que se observan a nivel renal y hepático como producto de un estado de shock tóxico evidentemente manifestado en ratones inyectados con dosis letales.

De esta manera, los resultados obtenidos permitieron localizar tanto en los extractos como en el fraccionamiento subsiguiente, cuáles producen sintomatología y alteran el comportamiento animal sin producir letalidad, y cuáles provocan mortandad animal.

CONCLUSIONES SOBRE LA TOXICIDAD DE AMBAS ESPECIES

Lo presentado en esta Tesis ha sido un aporte para el esclarecimiento de la intoxicación con ambas *Festucas* (*F. argentina* y *F. hieronymi*), ya que no se conocía ningún estudio toxicológico de estas dos especies en animales de laboratorio, para verificar la letalidad de las mismas, ni sobre la etiología y patología de la intoxicación; hasta el momento sólo existían antiguos registros de observaciones de campo [PARODI, 1950] (ver Capítulo 1).

Además, resultó interesante la similitud en cuanto al comportamiento químico y físico de las fracciones tóxicas de *F. argentina* con *Poa huecu* [POMILIO, 1989], que es otra especie perteneciente a la misma tribu, aunque distinto género, y en la cual el principio activo resultó ser también de naturaleza glicopeptídica. Estos resultados fueron novedosos, ya que históricamente se vinculaba la toxicidad de festucas con alcaloides o compuestos cianogénicos (ver Capítulo 2).

A la luz de los conceptos introducidos por la Química Ecológica, actualmente podemos plantear el análisis de la toxicidad de esta tribu como un proceso complejo ya que no involucraría simplemente una interacción de tipo planta-animal. La presencia de endofitos en las festucas sudamericanas reconocidas como tóxicas y su ausencia en las especies reconocidas como forrajeras [BERTONI, 1993], apoyaría en parte la hipótesis de que los endofitos fúngicos estarían relacionados de alguna manera con la toxicidad de estas plantas. Dado que el material empleado de ambas festucas presentaba endofito [CABRAL, PRHIDEB-CONICET, comunicación oral; BERTONI, 1993] se generan varias interacciones y respuestas posibles a las mismas, como las referidas a

si el endofito es el causante inmediato de la toxicidad, o sea si éste genera metabolitos letales para el ganado (micotoxinas), o si provienen de la simbiosis mutualista.

Es de destacar que no se detectaron en *F. argentina* alcaloides de la familia del Ergot que son los característicos de un origen fúngico, y que se hallaron en *Festuca arundinacea* [LYONS, 1986; BACON, 1986] y serían los responsables del pie de festuca, sino los de la familia del *Lolium*. En esta especie, los alcaloides de la familia de la lolina no producen sintomatología [JACOBSON, 1963], y sólo resultan letales al ser inyectados en altas concentraciones en animales de experimentación pero no al administrarlo por vía oral [YATES, 1965].

Sin embargo, la concentración de alcaloides derivados de la lolina en la planta (LDA: "loline derivative alkaloid concentration") se correlaciona con el grado de infestación (% de endofito) en la planta tóxica durante una estación determinada [BELESKY, 1987; BUSH, 1982], aunque no se pudo establecer una simple relación entre la LDA y la EIF ("endophyte infection frequency") en condiciones de pastoreo a largo término ya que podrían estar involucrados factores asociados con la influencia del animal en pastoreo sobre la respuesta de la planta, crecimiento del endofito, y metabolismo en adición a, o en lugar de, factores ambientales [BELESKY, 1987].

Además, los alcaloides de la lolina, independientemente de su función en la toxicosis de *F. arundinacea* se originan de las rutas metabólicas secundarias de los aminoácidos. Por consiguiente, la presencia de un hongo endofítico en la festuca y el concomitante aumento en la concentración de alcaloides puede resultar en una alteración de la composición de aminoácidos de la planta huésped, afectando los tipos y cantidades de productos nitrogenados disponibles para exportar a la semilla en desarrollo [BELESKY, 1985].

Durante mucho tiempo la perlolina, presente en *Lolium perenne*, se asoció con la tembladera ("staggers") [AASEN, 1969b]. Sin embargo este síndrome no se reprodujo experimentalmente por administración del alcaloide perlolina y se supuso que estos síntomas estaban asociados con la infección por endofito.

Así, otra posibilidad sería que, a través de la asociación planta-microorganismo (*Festuca*-endofito) se genere una respuesta de la planta de tipo fitoalexina (ver Capítulo 3) que resulte tóxica al ganado, pudiéndose producir en este caso sustancias de estructura química muy diversa; como por ejemplo un derivado complejo de un indol isoprénico, detectado e identificado

como lolitrema B en *Lolium perenne* (ver Cap. 3, referido a Química. Ecológica en Gramíneas) o de naturaleza glicopeptídica como en *Poa huecu* [POMILIO, 1989].

Aun no ha sido en realidad resuelta la toxicidad de *F. arundinacea*, que fue detectada por primera vez en Australia en 1949 [CUNNINGHAM, 1949] y luego en EEUU [YATES, 1962], y que se presenta cuando existe una asociación mutualista [BACON, 1988] con el hongo endofítico *Acremonium coenophialum* [HOVELAND, 1980]. Vale la pena destacar que la intoxicación por este pasto, llamado vulgarmente Festuca alta, consiste en los siguientes tres síndromes [DE BUENO, 1985]:

i) "Síndrome gangrenoso", "festucosis" o "pie de festuca" que se asemeja a un envenenamiento tipo ergot y se presenta fundamentalmente en otoño -invierno.

La lesión básica radica en los miembros, comienza con invalidez en una o ambas patas traseras y progresa hasta gangrena y necrosis de la parte distal del pie y puede desprenderse la pezuña afectada. En algunos animales se evidencia depilación y descamación costrosa en los flancos, cola y orejas. Se detectó masivamente en vacas y, en menor proporción en ovejas; los animales con gangrena manifiesta no se recuperan.

ii) "Síndrome hipertérmico" o "animal asoleado" que se presenta en primavera-verano y se manifestaría con temperaturas ambientales superiores a los 25-28°C.

Se observa hipertermia, aumento del ritmo respiratorio y cardíaco (pudiendo llevar a infarto), larga permanencia de los animales en lugares frescos o echados en el barro, y reducción casi total del consumo voluntario de alimentos con pérdida de peso. Tienen un cuadro hematológico caracterizado por anemia e hipoglucemia, que podría deberse a los alcaloides como la perlolina presentes en el pasto ya que reducen la digestibilidad de la celulosa por una acción tóxica sobre los microorganismos ruminales.

Este síndrome se detectó en ganado vacuno pero no en caballar; en general los animales se hacen asintomáticos cuando refresca.

iii) Efectos negativos sobre rendimientos productivos, como ser pobre producción de leche y pérdida de peso en animales de engorde, sobre todo en verano.

Ninguna de estas características se observan en las festucas aquí estudiadas, *F. argentina* y *F. hieronymi*, que como hemos descripto en detalle en el Capítulo 1, guardan estrecha relación en cambio, con el cuadro

clínico-patológico observado en la intoxicación por *Poa huecu* [POMILIO, 1989], como así también con la naturaleza glicopeptídica del tóxico.

Es por ello que en base a todo lo realizado y analizado en esta Tesis resulta importante encarar las investigaciones en el futuro hacia las interacciones planta-endofito-animal superior y los metabolitos relacionados desde un aspecto multidisciplinario bioquímico-micológico-biológico y químico para poder así clarificar esta toxicosis.

CAPÍTULO 6

PARTE EXPERIMENTAL

MÉTODOS EMPLEADOS

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

Los poderes rotatorios (α_D) fueron medidos en un polarímetro digital Perkin-Elmer, modelo 141, a temperatura ambiente, con los solventes y concentraciones que se indican en cada caso.

Los espectros de absorción ultravioleta (UV) fueron determinados en un espectrofotómetro con arreglo de diodos Hewlett Packard 8451 A (teclado H.P. 98155 A, disquetera H.P. 9121 A). En los espectros UV de flavonoides se utilizaron como reactivos de desplazamiento metóxido de sodio (NaOMe), cloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 5% en metanol, ácido clorhídrico acuoso (HCl) 1:1, acetato de sodio (NaOAc) sólido y ácido bórico (H_3BO_3) sólido y se siguió el procedimiento expuesto por Mabry [MABRY, 1970].

Los espectros de absorción infrarroja (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 710-B.

Los espectros de masas (EM) por introducción directa se realizaron en los espectrómetros de masas Varian-Mat CH7-A y Trio VG Masslab, ionizando por impacto electrónico a 70 eV.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (1H -RMN) y los de carbono trece (^{13}C -RMN) se efectuaron a 100,1 MHz y 25,2 MHz respectivamente en un espectrómetro Varian XL-100 y los de alta resolución a 200,1 MHz y 50,3 MHz respectivamente, en un espectrómetro Bruker ACE-200. Para algunos compuestos se utilizaron las siguientes secuencias de pulsos de ^{13}C -RMN: ecos de spin con desacople alternado (APT) y desacople retardado de pulso único (SPDD).

El solvente en que fueron hechos los espectros de RMN se indica en cada caso utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se indican en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en hertz (Hz). Las abreviaturas usadas en la descripción de los espectros son: s, singulete; d, doblete; t, triplete; c, cuarteto; m, multiplete; dd, doble doblete.

Para eliminar el solvente de extractos y otras muestras acuosas se utilizó un liofilizador F.I.C. modelo L 0,5.

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

a) Cromatografía en capa delgada (CCD):

Para las cromatografías analíticas en capa delgada se utilizaron placas preparadas con silicagel G (Merck) de un espesor de 250 micrones, activadas una hora a 105°C; cromatoplasmas de silicagel G-60 F₂₅₄ (Merck), de fase reversa RP-18 (Merck), de alúmina F₂₅₄ de 100 micrones de espesor y de celulosa F₂₅₄ (Merck). También se usaron cromatoplasmas de alta resolución (HPTLC) de silicagel 60 F₂₅₄. En todos los casos se utilizó la técnica ascendente.

Para las CCD preparativas, se armó cada placa suspendiendo 30 g de silicagel G en 60 ml de agua destilada y luego se extendió sobre una placa metálica (20 cm x 20 cm). Se la dejó reposar por 24 hs a temperatura ambiente y posteriormente se la activó en estufa a 110-120°C durante una hora.

Como revelador universal se empleó una mezcla de ácido sulfúrico-ácido acético en relación 1:1 (oleum) o iodo. También se reveló con luz ultravioleta de longitud de onda de 254 nm. Como reveladores específicos se utilizaron:

Para alcaloides, el reactivo de Dragendorff según Thies, Reuther, modificación de Vágujfalvi [VÁGUJFALVI, 1960].

Para terpenos, anisaldehído 1%/ H⁺ [STAHL, 1961].

Para compuestos fenólicos, FeCl₃ al 2% en etanol.

Para compuestos esteroideos, el reactivo de Liebermann-Burchard [LISBOA, 1964].

En todos los casos, luego de rociar la placa con el revelador correspondiente, se la calentó a 105-110°C durante dos a cinco minutos.

b) Cromatografía en columna

Los rellenos utilizados fueron: silicagel H (Merck), Sephadex LH-20 (Sigma), alúmina neutra (Woelm), resina de intercambio Amberlite IRA-400 (OH⁻) (Sigma).

Las columnas de silicagel y las de alúmina fueron eluidas a mediana presión con aire comprimido (o con nitrógeno para muestras susceptibles de oxidación) o mediante una bomba impulsora de solventes Prominent-Electronic

1001 SCJ provista de un amortiguador de pulsos.

Para las cromatografías rápidas en "columna seca" se emplearon embudos con placa filtrante de vidrio sinterizado, haciendo vacío al agregar el solvente [HARWOOD, 1985].

Todos los solventes utilizados en las extracciones y en las cromatografías fueron previamente purificados. Todas las mezclas de solventes usadas en cromatografía están expresadas en relaciones de volumen (v/v).

c) Cromatografías gas-líquido (CGL)

Se realizaron en cromatógrafos Hewlett-Packard 5830A, 5840A y 5890 A con detector de ionización de llama (FID) y nitrógeno como gas portador.

Los CGL capilares acoplados a espectrometría de masas (EM) se efectuaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890A acoplado a un detector selectivo de masas 5970B ó en un VG TRIO-2 VG Mass Lab (U.K.). Los datos fueron procesados mediante el Lab Base GC-MS data system. El scanning de masas se realizó en el rango de 40 a 800 para cada pico de las muestras.

Los CGL (columna empacada)-EM se realizaron en un cromatógrafo Varian Aerograph serie 1400 acoplado a un espectrómetro de masas Varian Mat CH7A con procesador de datos (computadora Varian Mat Spectra System 166 con teletipo Tektronix 4010-1 e impresor Tektronix 4631).

Las fases de las columnas tenían como soporte Chromosorb W-AW-DMCS, malla 60-80, excepto la fase ECNSS-M, cuyo soporte era Chromosorb Q.

La columna DB-1 (capilar) era de 30 m de longitud, d. i. 0,245 mm y espesor del film 0,25 μm .

La columna Ultra-1 (capilar) tenía 25 m de longitud, d. i. 0,2 mm y espesor del film 0,33 μm .

La columna Ultra-2 (capilar) era de 25 m de longitud, d. i. 0,2 mm y espesor del film de 0,33 μm .

Las condiciones y columnas empleadas se indican en cada caso.

d) Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR; HPLC)

Se llevaron a cabo en un equipo Waters 6000A o en un equipo KONIK 500B con detección por espectrofotometría ultravioleta de longitud de onda variable Waters 481. La señal de salida del detector se registró con un

graficador Sargent modelo SR o con un procesador de datos Waters 745. Se usó también un equipo LKB 2249 con detector de índice de refracción LKB 2142 e integrador LKB 2221.

Las columnas de fase reversa utilizadas fueron:

analítica: μ Bondapack C-18, 4 x 300 mm, dp= 10 μ m (Waters).

semipreparativas: μ Bondapack RP-18, 8 x 300 mm, dp= 10 μ m (Waters).

Ultrasphere-ODS, 10 x 250 mm, dp= 5 μ m (Beckman).

En todos los casos, las muestras fueron filtradas a través de cartuchos de fase reversa (SepPak-C₁₈) previamente a su inyección.

Como solventes de elución se emplearon distintos gradientes de metanol-agua. El metanol se purificó reflujándolo sobre hidróxido de sodio y luego bidestilándolo, mientras que el agua se purificó por resina de intercambio y tridestilación. Luego fueron filtrados a través de los correspondientes filtros para CLAR (orgánicos y acuosos, Millipore) y las mezclas desgasificadas (agitación-vacío).

REACCIONES GENERALES

a) Acetilación

Todas las acetilaciones se efectuaron con anhídrido acético-piridina, 1:0.8 a temperatura ambiente durante 15-18 horas. Los respectivos derivados acetilados se aislaron por evaporación a presión reducida de la mezcla de reacción o volcando la mezcla acetilante sobre hielo-ácido clorhídrico y filtrando el derivado o extrayéndolo con cloroformo.

b) Metilaciones

Las metilaciones de ácidos carboxílicos se llevaron a cabo mediante el agregado de diazometano en éter a las muestras disueltas en solventes adecuados. Al cabo de catorce horas de reacción a temperatura ambiente, se aislaron los derivados metilados por evaporación de la mezcla de reacción.

También se realizaron metilaciones en capa delgada, colocando cuidadosamente gotas del reactivo sobre la muestra sembrada y luego desarrollando la cromatoplaca.

c) Preparación de alditoles acetilados

La identificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis de los distintos glicósidos aislados se realizó mediante el análisis por CGL de sus alditoles acetilados [BJORNDAL, 1970].

La muestra se disolvió en agua y se redujo con NaBH_4 a temperatura ambiente durante 14 horas. Se eliminó el exceso de borohidruro agregando acetona, evaporando y luego mediante sucesivas evaporaciones con metanol anhidro. Los alditoles así obtenidos fueron acetilados como se describió en a).

ESTUDIO QUÍMICO DE *FESTUCA ARGENTINA*

Material vegetal

Se utilizó la planta entera recolectada por el Ingeniero A. Soriano en la Estación Experimental del INTA de Río Mayo, Chubut, e identificada en el Instituto de Botánica Darwinion por la Dra. Elisa Nicora. Ejemplar de herbario N° SI 28004 depositado en dicho Instituto.

Extracción del material vegetal

La planta entera fue secada a 30°C en estufa con circulación de aire y molida posteriormente en un molino Wiley modelo ED-5.

El material molido fue extraído en Soxhlet con éter de petróleo (fracción $60-80^{\circ}\text{C}$) y posteriormente con metanol obteniéndose así un extracto de éter de petróleo (1,6 % del peso seco) y un extracto metanólico (6,7 % del peso seco).

El remanente vegetal se extrajo con agua en batch y agitación; posteriormente se filtró y centrifugó. La solución sobrenadante se llevó a sequedad por liofilización, obteniéndose un extracto acuoso (1,5 % del peso del remanente vegetal seco).

ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO

Se sembraron en pastilla 8 gramos del extracto de éter de petróleo en una columna de silicagel (250 g) eluyéndose sucesivamente con éter de petróleo, mezclas de éter de petróleo-cloruro de metileno, 9:1 y 1:1; cloruro de metileno puro y cloruro de metileno-metanol, 99:1 - 98:2 - 9:1 - 8:2 y 7:3. Paralelamente se sembraron en placas analíticas de silicagel las distintas fracciones obtenidas y se desarrollaron con mezclas de éter de petróleo y cloruro de metileno, cloruro de metileno puro y mezclas de cloruro de metileno-metanol para las fracciones más polares. De acuerdo con su similitud en el comportamiento frente a los reveladores, se reunieron distintos eluidos obteniéndose principalmente las siguientes fracciones:

Fracción N°	Componentes mayoritarios
1	hidrocarburos
2	ceras, aldehídos, triterpenos.
3	ceras, aldehídos
4	alcoholes lineales
5	esteroides
6	residuo

Análisis de los hidrocarburos

De la fracción N° 1 se obtuvieron los hidrocarburos lineales 1 a 20 luego de purificarlos en columna de silicagel utilizando como solventes de elución éter de petróleo y mezclas éter de petróleo-cloruro de metileno, 8:2 y 1:1.

Se caracterizaron por CGL-EM, corroborándose posteriormente con testigos.

CGL (OV-17 3%, 1,8 m. de long. a temp. 220°C, isotérmica):

t_R minutos (fórmula, %): 1,27 (n-C₁₉H₄₀ 1, 0,36), 1,75 (n-C₂₀H₄₂ 2, 2,79), 2,25 (n-C₂₁H₄₄ 3, 0,09), 3,21 (n-C₂₂H₄₆ 4, 2,32), 4,24 (n-C₂₃H₄₈ 5, 0,17), 6,04 (n-C₂₄H₅₀ 6, 1,95), 8,12 (n-C₂₅H₅₂ 7, 3,89), 11,48 (n-C₂₆H₅₄ 8, 1,50), 15,59 (n-C₂₇H₅₆ 9, 8,03), 21,90 (n-C₂₈H₅₈ 10, 1,69), 31,70 (n-C₂₉H₆₀ 11, 52,56), 41,70 (n-C₃₀H₆₂ 12, 1,38), 58,84 (n-C₃₁H₆₄ 13, 20,11).

Los espectros de masas de estos compuestos se determinaron por CGL-EM, utilizando una columna OV-17, 3%, 1,2 m. de long., temp. 50 --> 290 °C, 10 °C/min., obteniéndose para el compuesto mayoritario el siguiente espectro: $n\text{-C}_{29}\text{H}_{60}$ 11 m/e (%): 408 (M^+ , 0,8), 365 (0,7), 337 (0,6), 309 (0,8), 295 (0,7), 281 (0,9), 267 (0,8), 253 (1,0), 239 (1,2), 225 (1,2), 211 (1,7), 197 (2,0), 183 (2,2), 169 (3,5), 155 (3,8), 141 (5,3), 127 (7,5), 113 (10,4), 99 (17,1), 98 (4,9), 97 (13,0), 85 (43,7), 84 (8,5), 83 (12,0), 71 (69,8), 70 (12,5), 57 (100), 56 (9,5), 55 (4,1), 43 (27,7), 42 (1,8), 41 (4,1).

Además de los EM de los compuestos arriba mencionados, se obtuvieron también los correspondientes a los hidrocarburos $n\text{-C}_{12}\text{H}_{26}$ a $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ (14 a 20).

Análisis de las ceras y de las terpenonas

En la fracción N° 2 se detectaron, por CCD de silicagel (hexano-AcOEt, 98:2) revelando con óleum/calor, una mancha importante de $R_f = 0,60$ rosada característica de ceras, una mancha marrón de $R_f = 0,53$ correspondiente a aldehídos (ver fracción N° 3) y otra mancha anaranjada muy tenue de $R_f = 0,38$ presumiblemente de terpenoides. Debido a la gran cantidad de ceras, y a su característica de difundir y de obstruir parcialmente las columnas cromatográficas, por este método no se pudieron aislar los terpenos, compuestos minoritarios, libres de ceras. Por ello se probó una separación mediante cromatografía en placa preparativa, a pesar de que la masa total no era pequeña.

Se sembró una placa preparativa de silicagel G, previamente extendida y activada, y se desarrolló con hexano:acetato de etilo, 97:3. Las distintas bandas se eluyeron con cloroformo y se verificó una separación aceptable al analizar cada banda por CCD analítica. Por ello se eligió este método para purificar esta fracción. En consecuencia, se debieron sembrar varias placas preparativas para separar la masa total.

Se compararon por CCD analítica de silicagel las subfracciones obtenidas en las distintas placas y se reagruparon en tres subfracciones; subf. 2a: ceras, subf. 2b: aldehídos lineales (se analizarán en la fracción N° 3) y subf. 2c terpenos.

Análisis de la subfracción 2a (ceras)

Esta subfracción exhibió una única mancha por CCD de Rf y color acorde con un testigo de ceras de relativamente alto peso molecular, y su espectro IR mostró las bandas características a:

IR (KBr) ν cm^{-1} : 2895 (tensión C-H), 1742 (tensión C=O), 1475 (deformación C-H), 1180 (tensión C-O), 740 (def. C-H).

Luego se procedió a saponificarla y analizar de esta forma los componentes ácidos y alcohólicos por separado.

Las ceras se saponificaron mediante calentamiento a reflujo de 0,13 g de muestra con hidróxido de potasio 20% en metanol durante 4 horas con agitación (se siguió la reacción por CCD). Se llevó a sequedad, se agregó agua y se extrajo varias veces con cloroformo. Se juntaron las fases orgánicas y previo secado con Na_2SO_4 anh. se eliminó el solvente en evaporador rotatorio obteniéndose los alcoholes.

La fase acuosa se llevó a pH ácido y se extrajeron los compuestos ácidos con cloroformo, esta fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anh. y luego se llevó a sequedad.

Alcoholes provenientes de la hidrólisis de ceras

Los alcoholes se analizaron en primer lugar por CGL en columna empacada (OV-17 3% , 1,8 m de long., temp. 200°C --> 290°C , $10^\circ\text{C}/\text{min}$) pero la resolución no fue adecuada.

Por CGL capilar se pudo resolver mejor la muestra de alcoholes:

CGL capilar (DB-1, temp. 1 min a 180°C , 180 --> 300°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$):

t_R min (compuesto, %): 22,09 (n-hexacosanol 21, 61,00), 24,75 (campesterol 22 + estigmasterol 23, 1,14), 27,98 (sitosterol 24 + dihidrositosterol 25, 6,46), 28,59 (β -amirina 26, 6,04), 28,77 (germanicol 27, 8,01), 29,19 (isobaurenol 28, 2,18), 29,34 (lupeol 29, 12,80), 31,27 (hopenol-a 30 + hopeol 31, 2,18).

Se corroboró la identidad de n-hexacosanol 21, β -amirina 26, germanicol 27, lupeol 29 y hopeol 31 por CGL capilar mediante coinyección de testigos.

Por CGL capilar-EM se detectaron además, otros esteroides; observándose en estas condiciones una completa resolución de los picos.

CGL capilar-EM (Ultra-1, temp. 240 --> 300°C, 3°C/min):

t_R min (compuesto): 12,52 (n-hexacosanol 21), 17,59 (colesterol 32), 18,10 (campesterol 22), 18,68 (estigmasterol 23), 19,79 (sitosterol 24), 19,99 (dihidrositosterol 25), 20,34 (β -amirina 26), 20,52 (germanicol 27), 20,93 (isobaurenol 28), 21,18 (lupeol 29), 22,76 (hopenol-a 30), 22,99 (hopeol 31).

EM del colesterol 32, campesterol 22, stigmasterol 23, sitosterol 24 y dihidrositosterol 25: coincidentes con los obtenidos para esteroides libres.

EM del n-hexacosanol: coincidente con el de alcoholes libres.

β -Amirina 26 EM m/e (%): 427 ($M^+ + 1$, 0,6), 426 (M^+ , 2,7), 411 ($M^+ - Me$, 0,5), 393 ($M^+ - Me - H_2O$, 0,9), 219 (18,7), 218 (RDA, anillos D y E, 100), 207 (anillos A y B, 6,0), 205 (anillos D y E, 0,5), 203 (218-Me, 39,3), 189 (207- H_2O y/o anillos D y E -29, 4,5), 175 (4,6), 147 (5,5), 135 (8,1), 133 (218-15-70, 6,3), 121 (6,8), 119 (8,5), 109 (8,9), 107 (11,1), 105 (10,9).

Germanicol 27 EM m/e (%): 427 ($M^+ + 1$, 8,5), 426 (M^+ , 31,7), 411 ($M^+ - Me$ de C-17, 26,0), 393 ($M^+ - Me - H_2O$, 1,9), 231 (18,1), 219 (6,2), 218 (anillos D y E + C-11 + C-12), 207 (anillos A y B, 19,7), 206 (15,3), 205 (anillos D y E + C-12, 37,6), 204 (anillos D y E + C-12, 100), 203 (218-Me, 14,7), 191 (18,1), 190 (205-Me, 24,9), 189 (207- H_2O y 204-Me, 93,8), 178 (21,4), 177 (RDA en anillo D + anillo C, 98,5), 176 (29,0), 175 (4,6), 149 (12,8), 148 (8,9), 147 (16,0), 135 (30,1), 133 (20,8), 123 (17,7), 122 (12,6), 121 (42,5), 120 (12,9), 119 (35,1), 109 (45,6), 108 (12,2), 107 (42,4), 105 (30,1).

Isobaurenol 28 EM m/e (%): 427 ($M^+ + 1$, 7,8), 426 (M^+ , 21,9), 411 ($M^+ - Me$, 14,1), 393 ($M^+ - Me - H_2O$, 5,1), 259 (anillos A + B + C + Me-26, 15,5), 248 (18,3), 247 (RDA en anillo C y rupt. C-15-C-16, 100), 241 (259- H_2O , 10,5), 230 (11,9), 229 (247- H_2O , 57,3), 6,2), 206 (6,1), 205 (anillos D y E, 8,8), 187 (7,1), 173 (5,3), 159 (7,1), 149 (7,7), 147 (5,8), 145 (5,5), 135 (anillo D, $C_{10}H_{15}$, 11,3), 133 (10,6), 131 (5,8), 129 (5,3), 123 (17,3), 121 (17,0), 119 (anillo D, C_9H_{11} , 18,1), 109 (23,9), 107 (15,9), 105 (13,2).

Lupeol 29 EM m/e (%): 427 ($M^+ + 1$, 12,0), 426 (M^+ , 38,0), 411 ($M^+ - Me$, 13,4), 408 ($M^+ - H_2O$, 1,7), 393 ($M^+ - H_2O - Me$, 3,2), 316 (11,6), 315 (13,7), 299 (5,5), 272 (5,5), 257 (9,1), 234 (10,5), 221 (5,5), 220 anillos A y B, 9,9), 219 (23,0), 218 (anillos D y E, 89,3), 217 (11,5), 216 (8,3), 215 (6,1), 208 (18,9), 207 (anillos A y B, 59,3), 206 (16,6), 205 (16,7), 204 (28,7), 203 (37,4), 201 (12,3), 191 (26,8), 190 (27,9), 189 (207- H_2O y/o anillos D y E, 60,8), 188 (6,8), 187 (16,0), 177 (9,6), 176 (8,6), 175 (26,4), 137 (17,5), 136 (31,7), 135 (64,1), 134 (22,3), 133 (33,7), 131 (8,1), 124 (5,7), 123 (47,5), 122 (32,8), 121 (65,3), 120 (19,5), 119 (46,8), 117 (6,3), 111 (13,1), 110 (15,3), 109 (70,9), 108 (47,9), 107 (78,8), 106 (14,9), 105 (46,5).

Hopenol-a 30 EM m/e (%): 427 ($M^+ + 1$, 18,0), 426 (M^+ , 47,8), 207 (anillos A y B, 85,7), 204 (24,2), 191 (35,4), 190 (43,5), 189 (207- H_2O y/o anillos D y E, 100), 175 (34,2), 163 (19,3), 161 (26,7), 149 (32,9), 148 (21,7), 147 (35,4), 137 (16,8), 136 (41,0), 135 (49,7), 134 (33,5), 133 (57,1), 123 (37,3), 122 (29,2), 121 (70,2), 120 (27,3), 119 (44,1), 110 (18,0), 109 (47,2), 108 (36,6), 107 (47,8), 105 (31,1).

Hopeol 31 EM m/e (%): 427 ($M^+ + 1$, 11,9), 426 (M^+ , 36,6), 357 (10,7), 344 (5,4), 316 (6,3), 315 (13,5), 272 (9,1), 257 (8,2), 229 (9,1), 220 (10,0), 219 (6,3), 218 (16,9), 217 (anillos D y E + C-11 + C-12, 7,2), 208 (RDA, anillos A y B, 20,6), 207 (anillos A y B - H, 79,6), 206 (15,3), 205 (22,8), 204 (24,3), 203 (22,9), 201 (6,8), 192 (6,3), 191 (32,5), 190 (33,4), 189 (RDA, anillos D y E -H, 89,1), 188 (9,3), 187 (17,8), 179 (7,4), 177 (13,4), 176 (10,1), 175 (24,7), 173 (7,5), 163 (18,4), 162 (14,0), 161 (28,7), 159 (9,9), 151 (5,0), 150 (6,2), 149 (25,4), 148 (21,6), 147 (40,7), 145 (8,2), 139 (7,2), 137 (15,4), 136 (29,7), 135 (60,0), 134 (20,7), 133 (26,9), 131 (6,3), 124 (5,9), 123 (33,7), 122 (27,5), 121 (70,3), 120 (22,5), 119 (44,9), 117 (6,3), 111 (8,8), 110 (16,5), 109 (86,6), 108 (45,3), 107 (76,5), 106 (12,8), 105 (33,4).

Se indicaron los datos de EM de estos triterpenoles desde m/e 105, aunque se registraron desde m/e 40, ya que son en general los que tienen valor diagnóstico.

Ácidos grasos provenientes de la hidrólisis de ceras

Se los analizó por CGL y CGL-EM, previa derivatización como ésteres metílicos ($\text{CH}_2\text{N}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) a temp. amb., según lo descrito en técnicas generales.

CGL (NPGS 8%, 1,8 m de long., temp. 190°C isotérmica):

t_R min (fórmula, %): 0,95 ($\text{C}_{12:0}$ 33, 1,87), 1,57 ($\text{C}_{14:0}$ 34, 4,03), 2,82 ($\text{C}_{16:0}$ 35, 38,75), 5,47 ($\text{C}_{18:0}$ 36, 25,66), 6,26 ($\text{C}_{18:2}$ 37, 19,81), 10,52 ($\text{C}_{20:0}$ 38, 5,72).

CGL-EM (SP-2340, 1,2 m de long., temp. 60 --> 270°C, 8°C/min):

Se identificaron los ésteres metílicos de los ácidos grasos anteriormente mencionados. En particular para el ácido graso saturado $\text{C}_{18:0}$ 36 y para el diinsaturado $\text{C}_{18:2}$ 37 se obtuvieron los siguientes espectros:

$\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{CO}_2\text{Me}$ 36 EM m/e (%) 299 ($\text{M}^+ + 1$, 6,1), 298 (M^+ , 29,7), 267 (M-MeO, 6,4), 265 (7,7), 264 (15,8), 255 ($\text{M}^+ - 43$ o $(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{Me}^+$, 13,6), 222 (7,3), 199 ($(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{Me}^+$, 12,1), 185 (5,8), 180 (5,6), 157 (5,6), 143 ($(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{Me}^+$, 37,9), 129 (14,5), 125 (7,1), 124 (5,3), 123 (7,4), 115 (8,1), 112 (5,5), 111 (13,7), 98 (24,9), 97 (28,9), 96 (18,2), 95 (14,0), 88 (14,2), 87 ($(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{Me}^+$, 99,2), 85 (10,9), 84 (28,3), 83 (41,9), 82 (13,4), 81 (19,0), 75 (67,8), 74 (Mc Lafferty, 100), 73 (5,3), 71 (21,4), 70 (13,3), 69 (60,2), 68 (13,4), 67 (14,6), 59 ($^+\text{O}=\text{COMe}$, 8,1), 57 (56,8), 56 (18,3), 55 (62,6), 54 (8,1), 43 (68,2), 42 (7,1), 41 (28,3), 31 (^+OMe , 4,6).

$\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{CO}_2\text{Me}$ 37 EM m/e (%) 295 ($\text{M}^+ + 1$, 2,9), 294 (M^+ , 13,8), 263 ($\text{M}^+ - \text{MeO}$, 6,7), 262 (5,2), 255 ($(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{Me}^+$, 0,4), 164 (8,6), 151 (5,2), 150 (11,4), 149 (7,2), 138 (7,9), 137 (8,7), 136 (9,9), 135 (9,1), 124 (13,8), 123 (14,0), 122 (8,7), 121 (10,2), 111 (6,9), 110 (28,2), 109 (32,4), 108 (10,9), 107 (10,2), 97 (15228,9), 96 (54,2), 95 (73,2), 91 (5,2), 87 ($(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{Me}^+$, 13,6), 83 (25,3), 82 (73,0), 81 (95,6), 80 (26,9), 79 (26,6), 74 (21,2), 69 (44,0), 68 (71,0), 67 (100), 59 ($^+\text{O}=\text{COMe}$, 5,8), 57 (11,8), 55 (70,3), 54 (59,7), 43 (20,6), 41 (35,0), 32 (5,6), 31 (^+OMe , 0,5).

Se corroboraron las identidades de los ácidos grasos saturados lineales mediante comparación con patrones de una mezcla de $\text{C}_{12:0}$ a $\text{C}_{20:0}$.

Análisis de las terpenonas

Se corroboró la naturaleza terpenoidal de la subfracción 2c ya que reveló de color violeta con anisaldehído/H⁺.

Debido a su escasísima masa se la analizó por CGL y CGL-EM (OV-17 3%, 1,2 m de long., temp. 150 --> 290°C, 10°C/min) pero mostró baja resolución.

Luego se trató por CGL capilar y CGL capilar-EM y se resolvieron varias bandas correspondientes a cetonas triterpénicas.

CGL capilar-EM (Ultra-1, temp. 180 --> 300°C, 10°C/min):

t_R min: 26,10 (α- ó β-amirenona 39), 26,23 (germanicona 40), 26,42 (lupenona 41), 26,54 (cicloartanona 42), 26,60 (isomultiflorenona 43), 28,60 (hopenona 44).

α- ó β-Amirenona 39 EM m/e (%): 425 (M⁺+1, 4,9), 424 (M⁺, 13,4), 409 (M⁺-Me, 7,5), 219 (16,3), 218 (RDA, anillos D y E, 100), 205 (anillos D y E o anillos A y B, 12,0), 204 (9,3), 203 (218-Me de C-17, 46,5), 189 (anillos D y E -29, 14,1), 161 (5,7), 149 (5,7), 147 (7,1), 137 (6,6), 136 (7,8), 135 (9,8), 133 (218-15-70, 7,3), 121 (9,5), 119 (12,4), 109 (12,4), 108 (5,2), 107 (13,7), 105 (13,3).

Germanicona 40 EM m/e (%): 425 (M⁺+1, 16,6), 424 (M⁺, 35,2), 411 (6,8), 410 (18,5), 409 (M⁺-Me, 51,3), 217 (6,5), 207 (5,3), 206 (14,5), 205 (anillos D y E con transf. de H y anillos A y B, 64,2), 204 (anillos D y E, 60,8), 203 (218-Me, 4,1), 191 (7,8), 190 (205-Me, 15,0), 189 (204-Me, 59,4), 187 (6,5), 178 (16,7), 177 (RDA en anillo D + anillo C, 100), 176 (16,4), 175 (24,6), 173 (6,6), 163 (14,0), 162 (6,5), 161 (17,7), 159 (7,5), 149 (14,1), 148 (10,1), 147 (16,4), 145 (11,3), 137 (8,2), 136 (8,4), 134 (16,7), 133 (17,2), 131 (9,6), 123 (14,2), 122 (14,5), 121 (35,2), 120 (11,7), 119 (33,9), 117 (6,6), 109 (36,5), 108 (10,2), 107 (35,9), 106 (7,0), 105 (29,4).

Lupenona 41 EM m/e (%): 425 (M⁺+1, 23,1), 424 (M⁺, 80,0), 409 (M⁺-Me, 23,1), 381 (M⁺-isopropilo, 11,2), 315 (7,4), 313 (12,0), 301 (13,4), 286 (7,6), 272 (10,4), 271 (10,2), 257 (8,5), 245 (2,1), 243 (7,8), 232 (5,2), 231 (7,1), 229 (6,4), 219 (6,4), 218 (anillos D y E, 15,1), 217 (15,4), 216, 215 (7,7), 207 (9,5), 206 (13,7), 205 (anillos A y B, 72,5), 204 (61,9), 203 (13,0),

202 (8,0), 201 (13,9), 191 (9,1), 190 (7,8), 189 (anillos D y E, 32,9), 187 (11,5), 177 (9,6), 175 (16,7), 173 (7,3), 163 (15,8), 162 (9,4), 161 (20,6), 159 (9,7), 151 (5,0), 150 (7,3), 149 (26,5), 148 (12,2), 147 (22,1), 146 (6,0), 145 (12,0), 137 (10,9), 136 (11,9), 135 (25,8), 134 (16,7), 133 (45,2), 132 (5,0), 131 (10,4), 124 (5,0), 123 (26,1), 122 (14,8), 121 (37,1), 120 (13,2), 119 (24,9), 117 (8,7), 111 (10,2), 110 (10,4), 109 (91,5), 108 (43,6), 107 (49,3), 106 (11,3), 105 (31,0).

Cicloartanona 42 EM m/e (%): 427 ($M^+ + 1$, 25,0), 426 (M^+ , 65,3), 411 ($M^+ - \text{Me}$, 45,9), 314 (27,0), 313 ($M^+ - \text{cad. lateral}$, 100), 288 ($M^+ - \text{anillo A} - \text{C-6} - \text{C-19}$, 44,4), 273 (288-Me, 17,9), 271 (16,3), 218 (17,9), 217 (17,3), 206 (16,3), 205 (34,7), 204 (26,5), 203 (27,5), 201 (14,3), 191 (21,9), 189 (45,9), 177 (55,6), 175 (288-cad. lateral, 43,4), 173 (20,9), 163 (36,2), 161 (31,6), 159 (21,4), 149 (19,9), 148 (19,9), 147 (16,8), 145 (19,4), 137 (25,5), 135 (28,1), 134 (30,1), 133 (28,1), 131 (22,4), 123 (17,3), 122 (25,0), 121 (33,2), 120 (21,9), 119 (21,4), 117 (17,9), 111 (20,4), 109 (39,3), 108 (21,4), 107 (50,5), 106 (14,3), 105 (39,8).

Isomultiflorenona 43 EM m/e (%): 425 ($M^+ + 1$, 12,5), 424 (M^+ , 39,6), 409 ($M^+ - \text{Me}$, 10,6), 301 (19,6), 300 (18,0), 259 (12,5), 258 (11,8), 257 (anillos A + B + C + Me-26, 80,4), 245 ($\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}$, 18,0), 218 (anillos A y B, 6,3), 206 (29,4), 205 (anillos D y E, 100), 185 (11,0), 173 (5,5), 171 (22,7), 162 (12,5), 147 (7,8), 143 (21,2), 142 (9,8), 135 (8,6), 134 (5,5), 131 (5,8), 128 (12,2), 119 (12,9), 109 (24,7), 107 (7,5), 105 (7,5).

Hopenona 44 EM m/e (%): 425 ($M^+ + 1$, 27,2), 424 (M^+ , 88,2), 356 (18,1), 354 (10,1), 341 (11,5), 314 (13,9), 313 (37,6), 311 (15,7), 298 (9,4), 219 (14,6), 218 (anillos D y E + C-11 + C-12, 25,4), 217 (12,2), 207 (5,6), 206 (26,5), 205 (anillos A y B, 100), 204 (37,3), 203 (21,2), 191 (19,2), 190 (17,4), 189 (anillos D y E, 71,1), 177 (17,8), 175 (27,2), 173 (9,4), 163 (24,4), 162 (10,8), 161 (25,4), 149 (41,1), 148 (21,3), 147 (34,1), 145 (10,5), 137 (16,0), 136 (24,4), 135 (61,0), 134 (30,3), 133 (36,6), 125 (13,9), 123 (49,5), 122 (33,1), 121 (72,1), 120 (22,6), 119 (39,7), 110 (25,8), 109 (99,7), 108 (48,1), 107 (83,3), 106 (13,6), 105 (47,4)

Los datos de EM de triterpenonas arriba enumerados corresponden a los fragmentos de m/e 105 y mayores ya que son generalmente los que brindan

información estructural, sin embargo los EM se realizaron abarcando desde m/e 40.

La identidad de los compuestos 40 (germaniconona), 41 (lupenona) y 44 (hopenona) fue corroborada por CGL capilar mediante comparación con los respectivos testigos.

CGL capilar (DB-1, temp. 1 minuto a 180°C, 180 --> 300°C, 5°C/min.):

t_R min: 28,20 (germaniconona 40), 28,92 (lupenona 41), 33,22 (hopenona 44).

Análisis de los aldehidos

La fracción N° 3 presentaba por CCD de silicagel (hexano-AcOEt, 98:2) principalmente dos manchas de $R_f = 0,60$ y $0,55$ que revelaban con óleum/calor de color rosado, típico de ceras, y marrón respectivamente,

Por sucesivas cromatografías en columnas de silicagel a mediana presión, utilizando como solventes de elución un gradiente de polaridad creciente hexano-AcOEt, 99:1 hasta 9:1, y en otro caso mezclas de hexano-AcOEt, 98:2 a 0:100 se aisló el componente de menor R_f .

Sin embargo, por CGL capilar y CGL-EM se comprobó que se trataba de una serie homóloga.

CGL capilar (SP-2110, 12 m. de long., d. i. 0,25 mm, espesor del film 0,25 μm , temp. 230°C, isotérmica):

t_R minutos (fórmula, %): 1,39 ($\text{n-C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}$ 45, 0,25), 1,91 ($\text{n-C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$ 46, 1,78), 2,58 ($\text{n-C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}$ 47, 0,57), 3,41 ($\text{n-C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}$ 48, 0,35), 4,81 ($\text{n-C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}$ 49, 95,15), 6,94 ($\text{n-C}_{28}\text{H}_{56}\text{O}$ 50, 0,30), 8,01 ($\text{n-C}_{30}\text{H}_{60}\text{O}$ 51, 1,60).

CGL-EM (SE-30 3%, 1,8 m de long., temp. 1 min a 150°C, 150 --> 290°C, 10°C/min), para el compuesto mayoritario se obtuvo:

$\text{n-C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}$ 49 m/e (%) 380 (M^+ , 0,8), 363 (M-OH, 2,6), 362 (M-H₂O, 9,4), 336 (M-44, 0,6), 335 (0,5), 334 (336-28, 2,0), 281 (0,7), 209 (0,5), 197 (0,5), 195 (0,6), 182 (0,5), 181 (0,8), 169 (0,5), 168 (0,7), 167 (1,1), 155 (1,0), 154 (0,8), 153 (1,9), 141 (1,0), 140 (1,1), 139 (3,5), 127 (1,6), 126 (1,8), 125 (6,8), 113 (2,9), 112 (3,3), 111 (32,3), 99 (5,1), 98 (6,0), 97 (92,4), 85 (72,5), 84 (9,8), 83 (100), 71 (72,1), 70 (32,8), 69 (64,5), 57 (67,2), 56 (66,0), 55 (79,1), 44 (85), 43 (75,7), 42 (5,5), 41 (69,2).

Por sucesivas recristalizaciones se aisló el n-hexacosanal 49 puro:

$^1\text{H-RMN}$ (100 MHz, benceno- d_6): δ 0,89 (3 H, t. ancho, J 6 Hz, H-26), 1,34 (46 H, s ancho, metilenos), 1,83 (2 H, d t, J 2 Hz y 7 Hz, H-2), 9,35 (1 H, t, J 2 Hz, CHO).

$^{13}\text{C-RMN}$ (25 MHz, CDCl_3): ppm 14,34 (C-26), 22,32 (C-3), 22,91 (C-25), 28,88, 29,39, 29,60 y 29,90 (C-4 a C-23), 32,12 (C-24), 44,13 (C-2), 202,88 (C-1).

$^{13}\text{C-RMN}$ (25 MHz, benceno- d_6): ppm 14,31 (C-26), 22,28 (C-3), 23,10 (C-25), 29,41, 29,80 y 30,17 (C-4 a C-23), 32,30 (C-24), 43,82 (C-2), 200,22 (C-1).

Análisis de los alcoholes

La fracción N° 4 se purificó por cromatografía en columna de silicagel eluyendo con CH_2Cl_2 y CH_2Cl_2 -MeOH, 99:1. Algunas de las subfracciones obtenidas daba una única mancha ($R_f = 0,5$, CHCl_3) que revelaba marrón claro (óleo, calor) y luego de un tiempo morado, característico de los alcoholes lineales. Otras subfracciones revelaban, además, una mancha marrón ($R_f = 0,65$, CHCl_3) de aldehídos lineales.

Los alcoholes lineales se analizaron por CGL con testigos en condiciones isotérmicas.

CGL (OV-17 3%, 1,2 m de long., temp. 210°C):

t_R minutos (fórmula, %): 2,06 ($\text{n-C}_{24}\text{H}_{50}\text{O}$ 52, 1,11), 3,07 ($\text{n-C}_{25}\text{H}_{52}\text{O}$ 53, 0,33), 3,95 ($\text{n-C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}$ 21, 98,30), 7,48 ($\text{n-C}_{28}\text{H}_{58}\text{O}$ 54, 0,27).

Por recristalización con acetona se obtuvo n-hexacosanol 21 puro.

CGL-EM (OV-17 3%, 1,8 m de long., temp. $50 \rightarrow 290^\circ\text{C}$, $15^\circ\text{C}/\text{min}$):

EM m/e (%): 364 ($\text{M-H}_2\text{O}$, 9,9), 336 ($364 - \text{CH}_2 = \text{CH}_2$, 4,3), 308 ($336 - \text{CH}_2 = \text{CH}_2$, 0,9), 280 (1,1), 266 (1,2), 253 (0,6), 252 (1,3), 238 (1,5), 224 (1,8), 210 (2,1), 195 (2,8), 181 (3,7), 167 (5,4), 153 (8,3), 139 (13,0), 125 (28,0), 111 (57,0), 97 (93,0), 83 (98,0), 73 (2,6), 71 (84,3), 69 (91,0), 59 (0,5), 57 (100,0), 55 (84,0), 45 (2,1), 43 (89,6), 41 (32,0).

Pf (recrist. acetona): $78,5-79,5^\circ\text{C}$; lit.: 80°C [WEAST, 1980].

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 0,82 (3 H, t def., J 6,5 Hz, $-\text{CH}_3$), 1,20 (48 H, s, $-(\text{CH}_2)_{24}$), 1,49 (1 H, s, OH), 3,55 (2H, t, J 6,5 Hz, CH_2OH).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3): ppm 14,14 (C-26), 22,71 (C-25), 29,71 (C-4 a C-22), 31,93 (C-24), 32,84 (C-2), 63,14 (C-1).

Análisis de los esteroides

La fracción N° 5 (0,77 g), que dió positivo el ensayo de Liebermann-Burchard para compuestos esteroidales, fue purificada en columna de silicagel a mediana presión, eluyendo sucesivamente con n-hexano- CH_2Cl_2 , 1:1; CH_2Cl_2 ; CH_2Cl_2 -MeOH, 99:1 y 9:1. Las subfracciones fueron monitoreadas por CCD de silicagel y se combinaron aquellas que dieron una única mancha violeta (H_2SO_4 10% etanol, calor) de $R_f = 0,25$ (CH_2Cl_2).

Se analizó por CGL, CGL-EM y CGL capilar con mezcla de testigos elucidándose grupos de Δ^5 -esteroides, Δ^7 -esteroides, 3-cetoesteroides y un estigmastanol.

CGL capilar (DB-1, temp. 300°C , isotérmica):

t_R minutos (compuesto, %): 7,47 (colesterol 32, 1,37), 8,01 (Δ^7 -colesterol 55, 1,27), 8,70 (campesterol 22, 8,48), 9,10 (estigmasterol 23, 24,17), 9,27 (Δ^7 -campesterol 56, 1,04), 9,96 (sitosterol 24, 49,41), 10,09 (dihidrositosterol 25, 6,90), 10,44 (campesterona 57, 0,53), 10,69 (Δ^7 -sitosterol 58, 2,60), 10,92 (Δ^7 -estigmasterona 59, 0,86), 11,95 (sitosterona 60, 1,99).

CGL capilar-EM (Ultra-1, temp. $200 \rightarrow 300^\circ\text{C}$, $15^\circ\text{C}/\text{min}$):

t_R minutos: 11,24 (colesterol 32), 11,84 (Δ^7 -colesterol 55), 12,66 (campesterol 22), 13,26 (estigmasterol 23), 13,41 (Δ^7 -campesterol 56), 14,36 (sitosterol 24), 14,45 (dihidrositosterol 25), 14,64 (campesterona 57), 14,91 (Δ^7 -sitosterol 58), 15,10 (Δ^7 -estigmasterona 59), 16,16 (sitosterona 60).

Colesterol 34 m/e (%): 387 ($\text{M}^+ + 1$, 29,2), 386 (M^+ , 100), 371 (M-Me, 31,2), 368 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$, 39,7), 353 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{Me}$, 32,5), 301 ($\text{M}^+ - 85$, 49,1), 275 ($\text{M}^+ - 111$, 37,5), 273 ($\text{M}^+ - \text{cad. lat.}$, 21,0), 255 ($273 - \text{H}_2\text{O}$, 19,0), 247 ($\text{M}^+ - 139$, 7,4), 231 ($\text{M}^+ - \text{cad. lat.} - 42$, 17,9), 229 ($273 - 27 - 17$, 7,4), 213 ($255 - 42$, 23,1), 173 (10,5), 163 (16,8), 161 (18,1), 160 (13,5), 159 (8,7), 149 (10,5), 145 (27,9), 143 (12,0), 135 (14,4), 133 (19,6), 131 (16,1), 129 (6,6), 121 (17,0), 120 (13,7).

Δ^7 -Cholesterol 55 m/e (%): 387 ($M^+ + 1$, 28,5), 386 (M^+ , 100), 371 (M-Me, 30,7), 353 (5,9), 273 (M^+ - cad. lat., 17,8), 256 (10,9), 255 (273- H_2O , 27,4), 246 (M^+ - cad. lat.-27, 6,4), 231 (M^+ - cad. lat.- 42, 17,1), 229 (246-17, 16,2), 213 (273-18-42, 8,5), 207 (7,5), 173 (7,2), 157 (6,1), 149 (7,2), 147 (7,7), 143 (6,6), 135 (14,5), 131 (6,6), 123 (8,8).

Campesterol 22 m/e (%): 401 ($M^+ + 1$, 29,6), 400 (M^+ , 100), 385 (M-Me, 29,3), 382 (M^+ - H_2O , 39,9), 367 (M^+ - H_2O - Me, 28,5), 315 (M^+ -85, 43,2), 289 (M^+ - 111, 27,6), 273 (M^+ - cad. lat., 18,9), 261 (M^+ - 139, 5,5), 255 (273- H_2O , 17,1), 231 (M^+ - cad. lat.- 42, 16,8), 213 (273-18-42, 22,4), 178 (11,1), 173 (10,1), 163 (15,7), 161 (19,3), 145 (25,9), 135 (13,3), 133 (17,3), 131 (15,5), 121 (15,9).

Stigmasterol 23 m/e (%): 413 ($M^+ + 1$, 23,0), 412 (M^+ , 68,9), 397 (M-Me, 6,1), 394 (M^+ - H_2O , 5,0), 379 (M^+ - H_2O - Me, 7,3), 369 (M^+ -43, 8,9), 351 (369- H_2O , 15,8), 300 (M^+ - 112, 20,2), 273 (M^+ - cad. lat., 3,3), 272 (10,2), 271 (M^+ - cad. lat.- 2H, 19,6), 255 (273-18, 17,4), 159 (21,4), 145 (20,0), 133 (21,8), 131 (11,8), 123 (12,5), 121 (10,8).

Δ^7 -Campesterol 56 m/e (%): 401 ($M^+ + 1$, 33,9), 400 (M^+ , 100), 386 (10,0), 385 (M-Me, 31,5), 273 (M^+ - cad. lat., 6,5), 256 (10,9), 255 (273- H_2O , 35,4), 246 (M^+ - cad. lat.- 27, 7,0), 231 (M^+ - cad. lat.- 42, 12,4), 229 (246-17, 18,0), 215 (5,9), 213 (273-18-42, 11,5), 207 (7,2), 187 (5,7), 185 (5,7), 159 (5,9), 147 (6,7), 145 (8,0), 143 (7,2), 134 (11,1), 133 (6,7), 131 (13,9), 122 (6,7), 120 (7,8).

Sitosterol 24 m/e (%): 415 ($M^+ + 1$, 19,7), 414 (M^+ , 63,1), 399 (M-Me, 16,9), 396 (M^+ - H_2O , 24,7), 381 (M^+ - H_2O - Me, 17,5), 329 (M^+ -85, 24,4), 303 (M^+ - 111, 12,5), 275 (M^+ - 139, 3,3), 273 (M^+ - cad. lat., 10,9), 246 (M^+ - cad. lat.- 27, 1,3), 229 (3,8), 213 (273-18-42, 12,9), 178 (7,3), 163 (10,2), 159 (13,4), 145 (19,4), 133 (13,1), 131 (11,7), 121 (10,5).

Dihidrositosterol 25 m/e (%): 417 ($M^+ + 1$, 30,8), 416 (M^+ , 100), 401 (M-Me, 38,8), 398 (M^+ - H_2O , 2,7), 383 (M^+ - H_2O - Me, 14,9), 290 (12,4), 234 (M^+ - cad. lat.- 41, 48,2), 233 (M^+ - cad. lat.- 41- H, 75,2), 217 (15,0), 216 (22,7), 215 (57,8), 165 (23,8), 147 (10,8), 135 (10,6), 124 (11,1), 123 (11,3), 122 (13,8), 121 (18,4).

Campesterona 57 m/e (%): 399 ($M^+ + 1$, 17,2), 398 (M^+ , 48,7), 383 (M-Me, 12,4), 356 (M^+ -cetena, 16,9), 275 (M-123, 26,8), 271 (M^+ - cad. lat., 8,6), 230 (10,8), 229 (356-cad. lat.-42, 40,8), 161 (10,8), 159 (13,1), 149 (19,4), 148 (12,7), 147 (19,1), 135 (20,1), 133 (18,5), 131 (11,1), 125 (13,4), 124 (anillo A + C-6, 100), 123 (18,8), 122 (11,1), 121 (10,5), 120 (10,8).

Δ^7 -Sitosterol 58 m/e (%): 415 ($M^+ + 1$, 30,4), 414 (M^+ , 100), 399 (M-Me, 19,6), 381 (M^+ -Me-H₂O, 4,6), 273 (M^+ - cad. lat., 17,4), 255 (273-H₂O, 41,9), 246 (M^+ - cad. lat.-27, 6,8), 231 (M^+ - cad. lat.- 42, 16,0), 229 (246-17, 14,2), 213 (273-18-42, 14,0). 173 (6,2), 161 (11,3), 159 (9,2), 149 (5,1), 147 (13,9), 145 (11,2), 135 (10,9), 134 (7,5), 133 (13,2), 131 (9,3), 123 (6,6), 122 (5,5), 121 (10,6), 120 (6,3).

Δ^7 -Estigmasterona (espinasterona) 59 m/e (%): 411 ($M^+ + 1$, 18,9), 410 (M^+ , 54,3), 396 (11,6), 368 (M^+ -cetena, 11,3), 367 (M^+ -isopropilo), 299 (M^+ -111), 298 (M^+ -112), 297 (27,7), 283 (15,2), 281 (10,7), 272 (14,6), 271 (M^+ - cad. lat., 45,7), 270 (26,5), 269 (42,7), 268 (11,9), 256 (10,7), 253 (14,0), 245 (M^+ -cad.lat.-27 con transf.de H, 21,0), 243 (M^+ -cad.lat.-28), 231 (12,5), 229 (M^+ -cad. lat.-anillo D con transf. de H, 14,3), 227 (10,4), 175 (11,9), 161 (16,8), 159 (12,8), 149 (21,0), 147 (22,6), 145 (15,5), 137 (11,6), 135 (16,1), 133 (19,8), 131 (11,9), 124 (16,1), 123 (23,8), 121 (22,9). Pico base m/e 55.

Sitosterona 60 m/e (%): 413 ($M^+ + 1$, 15,8), 412 (M^+ , 49,2), 397 (M-Me, 10,4), 370 (M^+ -cetena, 17,7), 355 (M^+ -42-15, 6,7) 327 (M^+ -85, 7,1), 289 (M-123, 28,6), 288 (M^+ -124, 26,0), 271 (M^+ - cad. lat., 10,8), 230 (8,9), 229 (370 - cad. lat., 37,5), 161 (10,8), 149 (14,5), 148 (10,8), 147 (16,7), 135 (16,5), 133 (10,9), 125 (10,6), 124 (anillo A + C-6, 100), 123 (13,9), 122 (8,8), 121 (14,8).

Cabe señalar que los EM de estos esteroides se registraron desde m/e 40, pero se indicaron en el texto los iones desde m/e 120, dado que se consideran los fragmentos diagnósticos de esta familia de compuestos.

ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO

Sobre 14 g del extracto metanólico se realizó la marcha de alcaloides. Por otro lado, se disolvieron 42,3 g de este extracto en metanol-acetato de etilo, se agregó poliamida para columna (masa extr.: masa poliamida, 2:3), previamente lavada sucesivamente con cloruro de metileno, agua y metanol, y se evaporaron los solventes.

La pastilla resultante se sometió a percolaciones sucesivas con cloruro de metileno, agua y metanol; por evaporación de los respectivos solventes se obtuvieron 6,5 g de percolado de cloruro de metileno (1,0 % relativo a planta seca), 17 g de residuo acuoso (2,8 % rel. a planta seca) que no se estudió, y 15 g de percolado metanólico (2,3 % rel. a planta seca).

MARCHA DE ALCALOIDES

Dado que el extracto metanólico mostró por CCD de alúmina varias manchas anaranjadas al revelar con el reactivo de Dragendorff [VÁGUJFALVI, 1960], se sospechó la presencia de alcaloides.

Para aislar y fraccionar a los mismos, se realizó en primer lugar una marcha analítica para poder de esta manera determinar las condiciones de pH adecuadas para las extracciones. Así, se disolvió un gramo del extracto metanólico seco en ácido sulfúrico 1 N, filtrando el insoluble en ese medio. Sobre esta solución acuosa ácida se realizaron extracciones con cloruro de metileno, descartándose esta fase orgánica.

A continuación la fase acuosa ácida se extrajo con cloruro de metileno, llevándola previamente a pH= 8, 9, 10 y 11 con NH_4OH y luego con Na_2CO_3 sólido.

Se analizaron las fases orgánicas y la solución acuosa final por CCD de alúmina y de celulosa desarrollando con mezclas, en distintas proporciones, de CH_2Cl_2 - $\text{MeOH-NH}_4\text{OH}$ y CH_2Cl_2 - NH_4OH respectivamente, a fin de seleccionar los pH de extracción adecuados.

Los alcaloides solubles en agua se precipitaron como complejos de Reinecke. La solución acuosa final se trató, a pH= 11, 8, 5 y 1, con una solución saturada de la sal de Reinecke ($\text{Cr}(\text{SCN})_4(\text{NH}_3)_2\text{NH}_4$).

Sólo se obtuvo precipitado de color rosado fuerte a pH= 11. Luego se disolvió este sólido en acetona, se descartó el insoluble y se llevó la solución a sequedad. Esta sal compleja fue tratada con resina de intercambio

aniónico Amberlite IRA-400 (forma HO-) en etanol (batch, 2 horas). La resina fue llevada previamente a forma hidroxilica con NaOH 1 M y lavada con agua bidestilada hasta neutralidad. Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo, liberándose así las bases.

Análogamente se realizó una marcha de alcaloides con fines preparativos, partiendo de 13 gramos de extracto. Las fases orgánicas extraídas a pH 8 y 11, fueron concentradas en evaporador rotatorio poniendo baño de agua-hielo en el balón de recolección del solvente, para verificar si se arrastraba algún compuesto volátil; por CCD de estas fracciones se comprobó la ausencia de alcaloides relativamente volátiles y gran diversidad de alcaloides extraídos a pH= 8 (0,12 g) y 11 (0,14 g).

Purificación de los alcaloides extraídos a pH= 8:

Se realizó una cromatografía en columna de alúmina neutra eluyendo con CH_2Cl_2 -MeOH-NH₄OH, 50:0,1:0,1 y agregando cantidades crecientes de metanol.

Se seleccionó una fracción que por CCD de alúmina (CH_2Cl_2 -MeOH-NH₄OH, 45:5:0,1) revelaba de color anaranjado con Dragendorff, para analizarla por CGL-EM. Las condiciones con las cuales se logró mejor resolución fueron por CGL capilar-EM (Ultra-2, 2 minutos a 90°C, 90°C --> 250°C, 10°C/min):

t_R min: 12,88 (lolinina 61), 13,31 (N-formillolina 62).

Lolinina 61 EM m/e (%): 196 (M⁺, 5,8), 181 (M⁺-Me, 3,6), 167 (M⁺-CHO⁺, 2,7), 153 (M⁺-COMe⁺, 7,3), 124 (M⁺-C₃H₅NO⁺, 18,1), 123 (M⁺-C₃H₆NO, 37,2), 111 (M⁺-CHNMeCOMe, 32,6), 110 (M⁺-CH₂NMeCOMe⁺, 6,7), 96 (6,8), 95 (43,7), 83 (111-CO, 15,6), 82 (110-CO, 100), 81 (9,3), 56 (16,2), 55 (82-CH₂=CH₂, 11,7), 43 (CH₃CO⁺, 87,1), 42 (71,9).

N-Formillolina 62 EM m/e (%): 182 (M⁺, 0,2), 181 (M⁺-1, 0,1), 167 (M⁺-Me, 0,1), 154 (M⁺-CO, 6,9), 153 (M⁺-CHO⁺, 3,9), 124 (M⁺-NMeCHO⁺, 3,8), 123 (M⁺-NHMeCHO, 7,2), 111 (M⁺-CHNMeCHO, 7,5), 110 (M⁺-CH₂NMeCHO⁺, 9,2), 96 (124-CO, 6,8), 95 (23,6), 83 (111-CO, 17,2), 82 (110-CO, 100), 80 (19,7), 69 (21,5), 68 (15,0), 55 (82-CH₂=CH₂, 22,2), 42 (71,9).

Purificación de los alcaloides extraídos a pH= 11:

Se sometió este subextracto a una cromatografía en columna de alúmina

neutra eluyendo sucesivamente con CH_2Cl_2 -MeOH-NH₄OH, 50:1:0,15; 50:5:0,15 y 8:2:0,15.

Se analizó una fracción que por CCD revelaba una única mancha pero que por CGL capilar evidenció ser una mezcla de compuestos.

CGL capilar-EM (Ultra 2, temp. 2 min a 90°C, 90°C --> 250°C, 10°C/min):

t_R min.: 7,85 (lolina 63), 8,21 (N-metillolina 64), 15,08 (Δ^5 -N-acetillolina, 65).

Lolina 63 EM m/e (%): 154 (M^+ , 2,3), 125 (M^+ -NH=CH₂, 0,9), 124 (M^+ -NHMe', 5,4), 123 (M^+ -NH₂Me, 11,3), 111 (M^+ -C₂H₅N, 15,3), 110 (M^+ -CH₂NMe', 29,1), 96 (124-CO, 8,5), 95 (124-CHO', 29,4), 83 (111-CO, 29,0), 82 (110-CO, 100), 80 (21,8), 68 (27,0), 67 (17,4), 55 (82-CH₂=CH₂, 28,4), 44 (51,5), 42 (87,5).

N-Metillolina 64 EM m/e (%): 168 (M^+ , 1,6), 153 (M^+ -Me', 2,0), 125 (M^+ -NH=CH₂, 3,7), 124 (M^+ -NMe₂', 17,4), 123 (M^+ -NHMe₂, 34,8), 111 (M^+ -C₃H₇N, 6,5), 110 (M^+ -C₃H₈NMe', 5,8), 96 (124-CO, 17,9), 95 (123-CO, 61,8), 83 (111-CO, 13,8), 82 (110-CO, 100), 80 (32,0), 58 (50,2), 55 (82-CH₂=CH₂, 25,2), 42 (91,9).

Δ^5 -N-Acetillolina 65 EM m/e (%): 195 (7,6), 194 (M^+ , 65,2), 193 (M^+ -1, 11,1), 165 (M^+ -29, 3,7), 150 (165-Me', 1,6), 138 (2,7), 136 (5,2), 122 (M^+ -NMeCOMe', 1,2), 110 (9,0), 109 (M^+ -C₄H₇NO, 70,9), 94 (122-CO, 6,4), 82 (110-CO, 40,6), 81 (109-CO, 12,4), 68 (10,4), 66 (13,3), 56 (18,2), 55 (100), 54 (17,5), 43 (CH₃CO⁺, 3,7), 42 (45,0).

Obtención de las bases libres a partir de los reineckatos y purificación de los alcaloides:

Los alcaloides se liberaron del complejo de Reinecke en forma análoga a la utilizada en la marcha analítica.

Por sucesivas cromatografías en columna de alúmina neutra eluyendo con CH_2Cl_2 -MeOH-AcOH, 50:1:1,5, y de silicagel usando como solvente MeOH-AcOH, 10:0,2 se obtuvo una fracción que por CCD de alúmina (CH_2Cl_2 -MeOH-AcOH, 10:1:0,1) presentaba una única mancha rojiza de Rf= 0,38 al revelar con Dragendorff, obteniéndose así el compuesto 66 en forma de acetato.

Colina 66, forma acetato ¹H-RMN (100 MHz, D₂O): δ 2,07 (s, 3H, CH₃COO-), 3,25 (s, 9 H, ⁺N(CH₃)₃), 3,56 (m, 2 H, -CH₂-N⁺-), 4,10 (2 H, m, HOCH₂-).

Pf. picrato: 250-252°C (recrist. etanol); Pf picrato testigo: 250-251°C;
Pf. mezcla: 250-252°C.

ESTUDIO DEL PERCOLADO DE CLORURO DE METILENO

Se sometieron 6 g de este percolado a una cromatografía rápida en columna seca de silicagel usando gradientes de CH_2Cl_2 -AcOEt, 98:2 a 0:100 y AcOEt-MeOH, 99:1, 97:3 y 9:1. Se agruparon en cinco fracciones (1-5), todas impurificadas con gran cantidad de clorofilas y otros pigmentos.

Las fracciones 1, 2 y 3 contenían principalmente clorofilas, alcoholes lineales y esteroides semejantes a los del extracto de éter de petróleo.

Posteriormente, la fracción 4 (0,4 g) se purificó por cromatografía en columna de silicagel eluyendo con CH_2Cl_2 -AcOEt, 9:1 y 8:2 dando, entre otras dos subfracciones. La primera subfracción 4a correspondía a (-)-pinoresinol 67 (46 mg), cuya pureza fue corroborada por CGL (OV-17 3% y DB-1 capilar) y CLAR (RP-18). La segunda subfracción 4b (10 mg) estaba compuesta por trazas de pinoresinol y otro compuesto de menor R_f que fue aislado y purificado por CLAR (RP-18, MeOH- H_2O , 9:11) e identificado como (-)-(1S, 2S, 5S, 6R)-2-(4-hidroxifenil)-6-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-3,7-di-oxabicyclo[3.3.0]octano 68

La fracción 5 se recristalizó de acetato de etilo para tratar de eliminar la gran cantidad de pigmentos presentes. El precipitado (126 mg) se purificó por cromatografía en columna de silicagel (AcOEt-MeOH, 97:3). Se eluyeron tres subfracciones. La subfracción 5a no se analizó; la subfracción 5b se repurificó por cromatografía en columna de silicagel (AcOEt) y se aislaron glicósidos esteroidales. En la subfracción 5c se detectaron lignanos.

La subfracción 5c se sometió a una cromatografía en columna de silicagel, eluyendo con AcOEt-MeOH, 98:2. Se obtuvo una fracción mayoritaria (4mg) que por HPTLC (AcOEt-MeOH, 9:1) revelaba dos manchas moradas (H_2SO_4 10%) de naturaleza fenólica (FeCl_3 2% en EtOH), las cuales se separaron por CLAR (RP-18, MeOH- H_2O , 37:63) y se identificaron como (-)-Pinoresinol-4-O- β -D-glucopiranosido 69 y (+)-Medioresinol-4-O- β -D-glucopiranosido 70.

(-)-(1 S, 2 R, 5 S, 6 R)-2,6-di-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-3,7-dioxabicciclo
[3,3,0]octano ((-)-Pinoresinol) 67
 $[\alpha]_D -30,7^\circ$ (CHCl₃; c= 0,9).

EM m/e (%): 359 (M+1, 3,6), 358 (M⁺, 22,8), 357 (2,5), 327 (4,8), 206
(Ar₁C₅H₇O⁺, 10,3), 180 (Ar₁CHCHCH₂OH⁺, 14,4), 179 (Ar₁COCH₂CH₂⁺, 12,5), 164
(14,5), 163 (180-OH⁺, 32,8), 152 (Ar₁CHO⁺, 97,5), 151 (Ar₁CO⁺, 100), 137
(Ar₁CH₂⁺, 62,8), 131 (75,0), 132 (163-31, 8,1), 124 (42,8), 123 (Ar₁⁺, 10,0),
121 (MeO-Ph-CO⁺, 4,5), 117 (21,3), 109 (36,9), 103 (14,4), 93 (PhOH⁺, 5,6), 91
(16,7), 81 (27,5), 77 (25,0), 73 (15,6), 65 (18,6), 55 (35,6), 53 (11,2).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 3,11 (2H, m, H-8 e H-8'), 3,87 (2H, dd, J 2,8 y 8,9
Hz, superp, parcial, con señales de OMe, H-9 ax e H-9' ax), 3,91 (6H, s, 2 x
OMe), 4,25 (2H, dd, J 7,1 y 8,9 Hz, H-9 ec e H-9'ec), 4,74 (2H, d, J 3,6, H-7
e H-7'), 5,66 (2H, s ancho, 2 x OH; intercambia con D₂O), 6,79-6,91 (6H, m, H
arom).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): ppm 54,1 (C-8'y C-8), 55,9 (2 x OCH₃), 71,7 (C-9 y
C-9'), 85,9 (C-7 y C-7'), 108,6 (C-2 y C-2'), 114,3 (C-5 y C-5'), 118,9 (C-6 y
C-6'), 132,9 (C-1 y C-1'), 145,2 (C-4 y C-4'), 146,7 (C-3 y C-3').

Las asignaciones fueron concordantes con la multiplicidad determinada
por el espectro SPDD (100 MHz, CDCl₃).

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆): ppm 53,8 (C-8'y C-8), 55,8 (2 x OCH₃), 71,1 (C-9 y
C-9'), 85,3 (C-7 y C-7'), 110,4 (C-2 y C-2'), 115,0 (C-5 y C-5'), 118,9 (C-6 y
C-6'), 132,3 (C-1 y C-1'), 137,4 (C-1), 146,1 (C-4 y C-4'), 147,6 (C-3 y
C-3').

(-)-(1S, 2S, 5S, 6R)-2-(4-hidroxifenil)-6-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-
3,7-dioxabicciclo[3,3,0]octano 68
 $[\alpha]_D -110^\circ$ (CHCl₃; c 0,03).

EM m/e (%): 328 (M⁺, 4,5), 327 (M-1, 1,4), 297 (2,4), 281 (3,2), 221 (4,1),
207 (21,1), 206 (Ar₁C₅H₇O⁺, 2,5), 205 (11,2), 191 (9,9), 180 (Ar₁CHCHCH₂OH⁺,
5,4), 179 (Ar₁COCH₂CH₂⁺, 4,7), 176 (Ar₂C₅H₇O⁺, 5,6), 175 (21,1), 163
(180-OH⁺, 16,6), 152 (Ar₁CHO⁺, 36,8), 151 (Ar₁CO⁺, 100), 150 (Ar₂CHCHCH₂OH⁺,
16,1), 149 (Ar₂COCH₂CH₂⁺, 13,7), 137 (Ar₁CH₂⁺, 64,5), 133 (150-OH⁺, 48,2), 132

(163-31, 7,7), 124 (17,5), 123 (Ar_1^+ , 14,4), 122 (Ar_2CHO^+ , 21,1), 121 (Ar_2CO^+ , 69,0), 107 (Ar_2CH_2^+ , 50,3), 94 (15,2), 93 (Ar_2^+ , 17,9), 91 (21,7), 81 (27,1), 77 (22,3), 73 (11,2), 69 (18,8), 65 (17,6), 55 (36,5), 44 (77,1), 40 (57,2).

Ar_1 = 3-metoxi-4-hidroxifenilo; Ar_2 = 4-hidroxifenilo.

CGL capilar-EM (DB-1, temp, 200 --> 300°C, 10°C/min,) t_R 68: 12,20 min.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 3,09 (1H, dd ancho, H-8), 3,31 (2H, m, H-8' e H-9'ax), 3,68 (2H, dd, J 3,2 y 9,5 Hz, H-9 eq e H-9'eq), 3,91 (3H, s ancho, OMe), 4,22 (1H, d, J 9 Hz, H-9 ax), 4,28 (1H, d, J 7 Hz, H-7), 4,73 (1H, d, J 4,1 Hz, H-7'), 5,62 (2H, s ancho, 2 x OH; intercambia con D_2O), 6,85 (2H, d, J 8,4 Hz, H-2' e H-6'), 6,80-6,91 (3H, m, H arom, del anillo guayacilo, 7,22 (2H, d, J 8,4 Hz, H-3' e H-5').

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3): ppm 49,9 (C-8'), 54,1 (C-8), 56,0 (OCH_3), 56,3 (OCH_3), 70,5 (C-9'), 71,7 (C-9), 81,4 (C-7'), 87,1 (C-7), 108,6 (C-2), 114,3 (C-5), 115,4 (C-3' y C-5'), 119,0 (C-6), 127,5 (C-2' y C-6'), 129,9 (C-1'), 132,9 (C-1), 145,2 (C-4), 146,7 (C-3), 157,5 (C-4').

(-)-Pinoresinol-4-O- β -D-glucopiranosido 69

$[\alpha]_D - 80,4^\circ$ (MeOH, c 0,1).

^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD): δ 3,14 (2H, m, H-8 e H-8'), 3,72 (2H, m, H-9 ax e H-9' ax), 3,85 (3H, s, OMe), 3,86 (3H, s, OMe), 4,26 (2H, m, H-9 eq e H-9' eq), 4,75 (2H, d, J 5 Hz, H-7 e H-7'), 6,76 (1H, d, J 8,2 Hz, H-5'), 6,82 (1H, dd, J 1,7 e 8,2 Hz, H-6'), 6,93 (1H, dd, J 1,9 e 8,5 Hz, H-6), 6,94 (1H, d, J 1,7 Hz, H-2'), 7,04 (1H, d, J 1,9 Hz, H-2), 7,15 (1H, d, J 8,5 Hz, H-5). La señal del H-1" enmascarada por señal del agua.

^{13}C -RMN (50 MHz, DMSO-d_6): ppm 53,9 (C-8' y C-8), 55,8 (OCH_3), 56,0 (OCH_3), 61,2 (C-6"), 70,1 (C-4"), 71,2 (C-9 y C-9'), 73,3 (C-2"), 76,7 (C-3"), 77,0 (C-5"), 85,0 (C-7'), 85,3 (C-7), 100,3 (C-1"), 110,3 (C-2'), 110,7 (C-2), 115,2 (C-5'), 115,4 (C-5), 118,3 (C-6), 118,8 (C-6'), 132,3 (C-1'), 135,3 (C-1), 146,1 (C-4'), 146,0 (C-4), 147,7 (C-3'), 149,1 (C-3).

" = glucosa.

(+)-Medioresinol 4-O-β-D-glucopiranosido 70

$[\alpha]_D + 3,1^\circ$ (Me₂CO, c 0,1).

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆): δ 3,12 (2H, s ancho, H-8 e H-8'), 3,20-3,60 (7H, m, H- y HO-azúcar), 3,62 (2H, m, H-9 ax e H-9' ax), 3,75 (6H, s, 2xOMe), 3,76 (3H, s, OMe), 4,14 (2H, m, H-9 eq e H-9' eq), 4,60 (1H, d, J 5 Hz, H-7'), 4,68 (1H, d, J 5 Hz, H-7), 4,90 (1H, d, J 7,5 Hz, H-1"), 5,03-5,30 (3H, m, HO-azúcar), 6,60 (2H, s, H-2' e H-6'), 6,62-7,06 (3H, m, H-2, H-5 e H-6), 8,29 (1H, s, ArOH).

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆): ppm 53,8 (C-8'y C-8), 56,0 (OCH₃), 56,6 (OCH₃), 60,8 (C-6"), 69,8 (C-4"), 71,1 (C-9 y C-9'), 73,4 (C-2"), 76,8 (C-3"), 77,2 (C-5"), 85,0 (C-7'), 85,2, (C-7), 100,3 (C-1"), 103,8 (C-2'y C-6'), 110,7 (C-2), 115,4 (C-5), 118,3 (C-6), 131,5 (C-1'), 135,3 (C-4'y C-1), 146,0 (C-4), 148,0 (C-3'y C-5'), 149,1 (C-3).

" = glucosa.

Hidrólisis enzimática de los compuestos 69 y 70

Ambos glicósidos de lignanos se hidrolizaron separadamente con una solución de β-glucosidasa (2 mg/ml) en buffer acetato 0,1 M (pH 5,0) a 37°C durante una noche, Luego se diluyó con agua y se extrajeron las agliconas con cloruro de metileno.

La fase acuosa se filtró por cartuchos de Sep-Pak C-18 y se analizó por CLAR analítica identificándose glucosa.

CLAR (columna: Fast Carbohydrate, interc. ligando Pb, estireno-divinilbenceno sulfonado, dp= 9 μm, 100 x 7,8 mm, detector de índice de refracción, solvente: agua, flujo: 0,4 ml/min) t_R = 6,50 min.

Las agliconas se identificaron respectivamente por CGL, CGL-EM capilar y rotación óptica como (-)-pinoresinol y (+)-medioresinol 71.

EM y $[\alpha]_D$ (CHCl₃) y t_R por CGL del (-)-pinoresinol resultaron concordantes con los del compuesto 67.

(+)-Medioresinol 71

$[\alpha]_D 60,4$ (CHCl₃, c= 0,05).

CGL capilar-EM (DB-1, temp, 200 --> 300°C, 10°C/min): $t_R = 15,55$ min.
 EM m/z (%): 388 (M^+ , 4,6), 281 (4,7), 221 (4,6), 210 ($Ar_3CHCHCH_2OH^+$, 5,2),
 209 ($Ar_3COCH_2CH_2^+$, 4,8), 207 (22,5), 206 ($Ar_1C_5H_7O^+$, 2,5), 205 (8,0), 193
 (210-HO \cdot , 8,3), 182 (Ar_3CHO^+ , 18,3), 181 (Ar_3CO^+ , 36,9), 180 ($Ar_1CHCHCH_2OH^+$,
 9,4), 179 ($Ar_1COCH_2CH_2^+$, 3,4), 167 (Ar_3CH_2 , 28,2), 163 (180-OH \cdot , 12,3), 162
 (193-31, 3,1), 161 (13,7), 154 (Ar_3H^+ , 11,6), 153 (Ar_3^+ , 6,1), 152 (Ar_1CHO^+ ,
 16,3), 151 (Ar_1CO^+ y 181-30, 58,7), 137 ($Ar_1CH_2^+$, 36,9), 132 (163-31, 3,8),
 131 (21,5), 124 (10,1), 123 (Ar_1^+ , 10,3), 121 (MeO-Ph-CO $^+$, 3,2), 93 (PhOH $^+$,
 6,7), 91 (9,3), 81 (9,7), 77 (11,8), 73 (11,7), 69 (6,7), 65 (10,3), 55
 (18,1), 44 (100), 40 (83,9).

$Ar_1 = 3$ -metoxi-4-hidroxifenilo; $Ar_3 = 3,5$ -dimetoxi-4-hidroxifenilo.

Hidrólisis ácida de los glicósidos esteroidales

Los glicósidos esteroidales (3 mg) aislados de la subfracción 5b, fueron hidrolizados con HCl 6% en MeOH. La mezcla de reacción se calentó hasta disolución de los glicósidos y se agregaron gotas de agua hasta turbidez. La mezcla se calentó en tubo cerrado a 75°C por dos horas. Luego se neutralizó con $NaHCO_3$, se evaporó el solvente y el residuo se particionó con $CH_2Cl_2-H_2O$, 1:1.

Las agliconas, que estaban en la fase orgánica, se analizaron por CGL capilar, CGL capilar-EM y CGL capilar con mezcla de testigos.

CGL capilar (DB-1, temp. 200 --> 300°C, 10°C/min):

t_R min (compuesto, %): 12,08 (colesterol 32, 11,3), 12,27 (Δ^7 -colesterol 55, 14,2), 13,39 (campesterol 22, 13,9), 13,66 (estigmasterol 23, 14,5), 14,28 (sitosterol 24 + dihidrositosterol 25, 30,8), 15,27 (Δ^7 -sitosterol 58, 15,3).

CGL capilar-EM (Ultra-1, temp. 200 --> 300°C, 15°C/min.):

t_R min.: 11,24 (colesterol 32), 11,84 (Δ^7 -colesterol 55), 12,66 (campesterol 22), 13,26 (estigmasterol 23), 14,36 (sitosterol 24), 14,45 (dihidrositosterol 25), 14,91 (Δ^7 -sitosterol 58, 15,3).

Los espectros de masas fueron similares a los informados para los esteroides libres (ver extracto de éter de petróleo).

La fase acuosa, que contenía los azúcares, se desalificó mediante resina Amberlite MB-3 (con indicador de timolftaleína). Se prepararon los

correspondientes alditoles acetilados, según la técnica general ya descrita, y se los cromatografió por CGL con mezcla de testigos en distintas condiciones.

CGL capilar (SP-2330, 30 m long., d. int. 0,25 mm, espesor del film 0,20 μ m):

t_R min. (compuesto, %): 7,02 (arabinitol peracetilado, 54,7), 8,84 (xilitol peracetilado, 28,9), 15,84 (glucitol peracetilado, 16,4).

Así, los azúcares presentes en los glicósidos esteroidales resultaron ser arabinosa, xilosa y glucosa.

ESTUDIO DEL PERCOLADO METANÓLICO.

Se comenzó el aislamiento de los compuestos por cromatografía de permeación de geles en columna de Sephadex LH-20 eluyendo con metanol. La cantidad de muestra máxima que se pudo sembrar para lograr una separación aceptable fue de 0,5-0,7 g, por lo que debieron realizarse muchas corridas cromatográficas. Las cromatografías se monitorearon por CCD de silicagel (CH_2Cl_2 -MeOH, 8:2 y 9:1) y se reagruparon en seis fracciones. Las fracciones 1 a 3 revelaron lignanos y glicósidos esteroidales presentes en el percolado de cloruro de metileno. En la fracción 4 se detectaron principalmente glicósidos de flavonoides, mientras que en la fracción 5 predominaban las agliconas de estos últimos. La fracción 6 contenía en cambio, un compuesto de naturaleza distinta a la de un flavonoide que revelaba de color anaranjado-amarronado con óleum y calor.

Purificación de los glicósidos de flavonoides

La fracción 4 se sometió a una cromatografía en columna de silicagel H a mediana presión, usando como eluyentes CH_2Cl_2 -MeOH, 98:2, 97:3 y 9:1. Principalmente se obtuvieron cuatro subfracciones. La subfracción 4a contenía agliconas de flavonoides.

La subfracción 4b se analizó por HPTLC de silicagel (CH_2Cl_2 -MeOH-AcOH, 8:2:0,01, revelador: óleum y calor) dando manchas de $R_f = 0,45$ (marrón), 0,40 (amarilla, estela amarronada). Luego se purificó por cromatografía en columna de permeación en geles (Sephadex LH-20; MeOH) obteniéndose una muestra que reveló principalmente una mancha amarilla de $R_f = 0,7$ (óleum) por HPTLC-RP18 (MeOH-agua, 57:43). Además presentaban estelas y manchas marrones en el origen

que se eliminaron al prefiltrarlas (Sep Pak-RP18). Finalmente por CLAR (RP-18; 8 x 250 mm, dp= 10 μ m; MeOH-agua, 56:44; F= 2 ml/min, detección a λ = 291 nm) se aisló canferol-3-O- β -D-glucopiranosido 72.

La subfracción 4c presentó un precipitado blanco que por CCD RP-18 reveló una única mancha correspondiente a acetina-7-O- β -D-rutinósido 73.

Los componentes de la subfracción 4d revelaban una mancha alargada amarilla por HPTLC de Rf= 0,18-0,20 (CH_2Cl_2 -MeOH-AcOH, 8:2:0,01, óleum) y fueron purificados por CLAR, obteniéndose apigenina-7-O- β -D-rutinósido 74 (t_R = 23 min.) y apigenina-7-O- β -D-neohesperidósido 75 (t_R = 31 min) (MeOH-agua, 55:45; F= 1,5 ml/min.).

Purificación de las agliconas

La fracción 5 se cromatografió en columna de silicagel H a mediana presión eluyendo con mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH, 96:4 a 0:100. Las fracciones que dieron ensayo de Shinoda positivo se sometieron nuevamente a una cromatografía de permeación (Sephadex LH-20, MeOH). Se repitió este procedimiento hasta obtener tricina 76, canferol 77 + orobol 78, canferol 77 + orobol 78 + apigenina 79 y canferol-3-O- β -D-glucopiranosido 72. La presencia de estos flavonoides se confirmó por comparación con testigos. En particular el orobol y el canferol no se resolvieron en placa delgada. Como el orobol se detectó por CLAR analítica, su aislamiento de la muestra se efectuó por CLAR semipreparativo.

HPTLC de silicagel (CH_2Cl_2 -MeOH, 94:6): Rf= 0,53 (apigenina 79); 0,54 (canferol 77 + orobol 78) y 0,64 (tricina 76).

CLAR (μ Bondapak C18, 5x250 mm; detección UV 291 nm; metanol-agua, 6:4; F= 1 ml/min):

t_R min: 5,87 (orobol 78), 5,93 (tricina 76), 6,28 (apigenina 79), 7,54 (canferol 77).

Purificación de la fracción 6

Por CCD de silicagel de esta fracción se detectó, entre otras, una mancha de Rf = 0,35 (CH_2Cl_2 : MeOH, 94:6) que no se intensificaba al exponerla a vapores de amoníaco, y revelaba de color anaranjada-amarronada con óleum/calor

y luego fucsia al exponerla posteriormente a la luz UV. Con el objeto de aislar esta mancha, la fracción 6 se purificó por cromatografía en columna de permeación en geles (Sephadex LH-20, MeOH) y luego por cromatografía en columna de silicagel H (CH₂Cl₂-MeOH, 96:4 a 0:100), obteniéndose un sólido blanco-beige correspondiente al compuesto **80** (*trans-resveratrol*).

5, 7, 4'-Trihidroxi- 3', 5'-dimetoxiflavona (tricina) **76**:

UV λ (MeOH) nm: 243 (h), 270, 304 (h), 346; + NaOMe: 262, 276 (h), 318, 413; + NaOAc: 247 (h), 276, 318, 364; + NaOAc/H₃BO₃: 270, 306 (h), 348; + AlCl₃: 278, 306, 368 (h), 392; + AlCl₃/HCl: 280, 304, 358, 386.

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 3,90 (6 H, s; OCH₃ 3' y 5'), 6,24 (1 H, d, J_m 2 Hz, H-6), 6,59 (1 H, d, J_m 2 Hz, H-8), 6,97 (1 H, s, H-3), 7,34 (2 H, H-2' e H-6').

¹³C-RMN (25 MHz, DMSO-d₆): ppm 56,3 (2 x OCH₃ 3' y 5'), 94,2 (C-8), 98,9 (C-6), 103,2 (C-3), 104,2 (C-2' y C-6'), 120,1 (C-10), 142,9 (C-1'), 148,0 (C-3' y 5'), 157,2 (C-5), 161,0 (C-9), 163,2 (C-2 y C-4'), 181,3 (C-4).

5, 7, 4'-Trihidroxiflavonol (canferol) **77**:

UV λ (MeOH) nm: 266, 322(h), 365; + NaOMe: 277, 315, 414 (desc.); + NaOAc: 275,2, 304, 386; + NaOAc/H₃BO₃: 267, 320 (h) 367; + AlCl₃: 267, 303 (h), 350, 423; + AlCl₃/HCl: 268, 303 (h), 348, 424.

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆): 6,20 (1 H, d, J_m 2 Hz, H-6), 6,45 (1 H, d, J_m 2 Hz; H-8), 6,95 (2 H, d, J 8 Hz, H-3' e H-5'), 8,05 (2 H, d, J 8 Hz, H-2' e H-6').

5, 7, 3', 4'-Tetrahidroxiisoflavona (orobol) **78**:

UV λ (MeOH) nm: 262, 294 (h), 340 (sh); + NaOMe: 269, 334 (descomp.); + NaOAc: 270, 322; + NaOAc/H₃BO₃: 266, 294 (h); + AlCl₃: 270, 298 (h), 365; + AlCl₃/HCl: 273, 371.

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 6,11 (1 H, d, J_m 2 Hz, H-6), 6,43 (1 H, d, J_m 2 Hz, H-8), 6,95 (1 H, d, J 8 Hz, H-5'), 7,50 (2H, m, H-2' e H-6'), 8,52 (1 H, s, H-2).

Canferol-3-O-β-D-glucopiranosido (astragalina) 72:

UV λ (MeOH) nm: 266, 300(h), 350; + NaOMe: 274, 326, 400; + NaOAc: 272, 306, 360; + NaOAc/H₃BO₃: 266, 350; + AlCl₃: 272, 304, 350, 392; + AlCl₃/HCl: 276, 302, 346, 396.

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 3,85-3,30 (m, otros H azúcar), 5,40-4,80 (s ancho, Ar-OH), 5,45 (1 H, d ancho, J_{aa} 8 Hz, H-1^G), 6,10 (1 H, d, J_m 2 Hz, H-6), 6,30 (1 H, d, J_m 2 Hz; H-8), 6,90 (2 H, d, J 8 Hz, H-3' e H-5'), 8,05 (2 H, d, J 8 Hz, H-2' e H-6').

¹³C-RMN (25,2 MHz, DMSO-d₆): ppm 60,8 (C-6^G), 69,8 (C-4^G), 74,1 (C-2^G), 76,3 (C-3^G), 77,0 (C-5^G), 93,8 (C-8), 97,4 (C-6), 101,0 (C-1^G), 103,5 (C-10), 114,9 (C-3' y C-5'), 120,7 (C-1'), 130,5 (C-2' y C-6'), 132,8 (C-3), 155,4 (C-2), 156,5 (C-9), 159,9 (C-4'), 160,8 (C-5), 164 (C-7), 176,6 (C-4).

c = glucosa.

Acacetina-7-O-β-D-rutinósido (linarina) 73:

UV λ (MeOH) nm: 268, 332; +NaOMe: 274, 394; + NaOAc: 270, 326; + NaOAc/H₃BO₃: 268, 334; + AlCl₃: 274, 300, 344, 382; + AlCl₃/HCl: 276, 300, 342, 386.

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) ppm: 1,10 (3 H, m, H-6^R), 3,80 (3 H, s, -OCH₃),, 3,90-3,20 (m, H-C-OH de azúcares, la señal no pudo ser integrada dado que coincide con la señal de agua en DMSO), 4,57 (1 H, br s, H-1^R), 5,25-5,00 (1 H, s ancho, w1/2 15 Hz, H-1^G), 6,47 (1 H, d, J_m 2 Hz, H-6), 6,80 (1 H, d, J_m 2Hz, H-8), 6,95 (1 H, s, H-3), 7,15 (2 H, d, J 8 Hz, H-3' e H-5'), 8,10 (2 H, d, J 8Hz, H-2' e H-6'), 12,90 (1 H, s ancho, intercambia con D₂O, OH-5),

¹³C-RMN (25 MHz, DMSO-d₆): ppm 17,7 (C-6^R), 55,4 (OCH₃), 66 (C-6^G), 68,2 (C-5^R), 69,5 (C-4^G), 70,2^a (C-3^R), 70,6^a (C-2^R), 71,9 (C-4^R), 73,1 (C-2^G), 75,5 (C-5^G), 76,1 (C-3^G), 94,6 (C-8), 99,5^b (C-1^R), 99,8^b (C-1^G), 100,4 (C-6), 103,6 (C-3), 105,3 (C-10), 114,5 (C-3' y 5'), 122,5 (C-1'), 128,2 (C-2' y 6'), 156,7 (C-9), 160,9 (C-5), 162,2^c (C-4'), 162,7^c (C-2), 163,7 (C-7), 181,7 (C-4).

R = ramnosa; c = glucosa.

Apigenina-7-O-β-D-rutinósido (isoroifolina) 74:

UV λ (MeOH) nm: 268, 336; + NaOMe: 268, 300(h), 394; + NaOAc: 266, 348, 400; +

NaOAc/H₃BO₃: 266, 338; + AlCl₃: 272, 298, 346, 384; + AlCl₃/HCl: 274, 298, 344, 384.

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,14 (3 H, m; H-6^R), 3,70-3,20 (otros protones de azúcares), 4,57 (1 H, d, J_{ee} 2 Hz; H-1^R), 5,04 (1 H, d, J_{aa} 7 Hz; H-1^G), 6,13 (1 H, d, J_m 2 Hz; H-6), 6,45 (1 H, s; H-3), 6,59 (1 H, d, J_m 2 Hz; H-8), 6,92 (2 H, d, J 8 Hz; H-3' e H-5'), 7,90 (2 H, d, J 8 Hz; H-2' e H-6').

R = ramnosa; G = glucosa

Apigenina-7-O-β-D-neohesperidósido (roifolina) 75:

UV λ (MeOH) nm: 266, 300(h), 350; + NaOMe: 276, 326, 404; + NaOAc: 274, 310(s), 386; + NaOAc/H₃BO₃: 266, 300(h), 352; + AlCl₃: 270, 304, 352, 400; + AlCl₃/HCl: 276, 302, 348, 396.

¹H-RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 1,18 (3 H, d, J 6 Hz, H-6^R), 3,20-3,70 (otros H de azúcares), 4,40 (1 H, d, J_{ee} 2 Hz; H-1^R), 5,20 (1 H, d, J_{aa} 7 Hz; H-1^G), 6,05 (1 H, d, J_m 2 Hz; H-6), 6,25 (1 H, s; H-3), 6,80 (1 H, d, J_m 2 Hz; H-8), 6,85 (2 H, d, J 9 Hz; H-3' e H-5'), 7,95 (2 H, d, J 9 Hz; H-2' e H-6').

¹³C-RMN (25 MHz, DMSO-d₆): ppm 19,2 (C-6^R), 60,8 (C-6^G), 68,0 (C-5^R), 69,0 (C-2^R), 70,8 (C-4^G y C-3^R), 71,8 (C-4^R), 76,6 (C-2^G), 77,1^a (C-5^G), 77,6^a (C-3^G), 94,7 (C-8), 96,7 (C-6), 98,2 (C-1^G), 101,7 (C-1^R), 104,4 (C-3), 105,6 (C-10), 115,6 (C-3' y C-5'), 124,9 (C-1'), 130,2 (C-2' y C-6'), 159,0 (C-9), 161,9 (C-5 y C-4'), 162,9^b (C-7), 163,0^b (C-2), 180,8 (C-4),

R = ramnosa; G = glucosa

Las señales con el mismo supraíndice pueden intercambiarse.

Trans-resveratrol 80

UV λ (MeOH) nm: 218, 306, 336 (h) A: 1,19267 y 1,53196, 11,5 μg/ml.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 675, 805 y 830 (def. C-H fuera del plano, anillos arom. sustituidos); 965 (def. fuera del plano, trans RCH=CHR), 990, 1010, 1150 1390, 1450, 1470; 1520 y 1595 (tens. C=C arom.); 1615 (tens. C=C alif.); 3280(ancha, tens. O-H).

¹H RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 4,67 (3H, s, ancho, 3xOH, Interc. con D₂O), 6,24 (1H, t, J 2 Hz, H-4), 6,52 (2H, d, J 2 Hz, H-2 e H-6), 6,83 (2H, d, J 8,6 Hz,

H-3' e H-5'), 7,05 y 6,82 (2H, ambos d, J 16 Hz, H- α e H- α'), 7,40 (2H, d, J 8,6 Hz, H-2' e H-6').

^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD): ppm 102,6 (C-4), 105,7 (C-2 y C-6), 116,4 (C-3' y C-5'), 126,8 (C- α'), 128,7 (C-2' y C-6'), 129,3 (C- α), 130,3 (C-1'), 141,2 (C-1), 158,1 (C-4'), 159,4 (C-3 y C-5).

Las asignaciones estuvieron de acuerdo con la multiplicidad determinada por el espectro de APT.

ESTUDIO QUÍMICO DE *FESTUCA HIERONYMI*

Material vegetal

Se utilizó la planta entera proveniente de Abra del Infiernillo, provincia de Tucumán, recolectada e identificada en febrero de 1989 por el Dr. J. Dubcovsky. Legado Dubcovsky (BAB 694). En el herbario de la FCEyN, UBA se encuentran depositados ejemplares bajo el código BAFC 1345 (Zallocchi).

Extracción del material vegetal

Las plantas enteras fueron secadas en estufa con circulación de aire a 30°C y luego molidas. Sobre 1,80 kg de planta se procedió a la extracción sucesiva con éter de petróleo (fracción 60-80°C) y metanol en un equipo de extracción continua tipo Soxhlet de capacidad adecuada, obteniéndose por evaporación a presión reducida 23,6 g de extracto de éter de petróleo (1,3 % relativo a planta seca) y 65,0 g de extracto metanólico (3,7 % rel. a planta seca). Sobre 500 g del marco vegetal se procedió a la extracción del mismo con agua destilada en un batch de 24 hs, con agitación, obteniéndose así el extracto acuoso.

ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO

Los componentes de este extracto se separaron primeramente mediante una cromatografía rápida en columna seca, para la cual se utilizaron 21 g de extracto y 350 g de silicagel G; como solvente de elución se usó n-hexano y mezclas de n-hexano-AcOEt de polaridad creciente (98:2, 97:3, 95:5, 9:1, 8:2, 7:3). Los eluidos se analizaron mediante CCD de silicagel con testigos, usando como solventes de desarrollo mezclas de n-hexano-AcOEt, 97:3 y 9:1, revelando posteriormente con luz UV y luego óleum/calor, reagrupándose así en 6 fracciones, en forma análoga a lo obtenido con *F. argentina*, de las cuales se estudiaron las fracciones 1, 3 y 5.

La fracción 1 (2 g) consistía en un sólido blanco que al ser analizado por CGL contra testigos y CGL-EM se identificó como una mezcla de hidrocarburos lineales.

La fracción 3 (8 g), al ser analizada por CCD de silicagel (n-hexano-AcOEt, 98:2; revelador: óleum/calor), presentaba 3 manchas con Rf 0,06 (marrón claro), 0,56 (marrón) y 0,76 (violeta), similares a testigos de alcoholes lineales, aldehídos lineales y ceras respectivamente. Se procedió a la separación de los mismos mediante otra cromatografía rápida en columna seca, eluyendo con n-hexano, n-hexano-CH₂Cl₂ 9:1 y 8:2, y n-hexano-AcOEt, 99:1, obteniéndose tres subfracciones. La subfracción 3a, presentaba por CCD una única mancha de ceras; la subfracción 3b, contenía aldehídos impuros, y en la subfracción 3c se encontraban los alcoholes lineales.

La subfracción 3b (1,4 g) se sometió a un exhaustivo proceso de purificación, ya que las ceras mayoritarias siempre tendían a entorpecer el aislamiento de los aldehídos. Se realizó una cromatografía en columna seca de silicagel G (n-hexano, n-hexano-AcOEt, 99:1, 98:2, 9:1, 8:2 y 7:3) y a continuación una cromatografía en columna a mediana presión de silicagel (n-hexano, n-hexano-AcOEt, 99:1) y cromatografía en placa preparativa.

Luego las fracciones más ricas en aldehídos se sembraron en varias placas de silicagel G, previamente extendidas. Las placas fueron desarrolladas con n-hexano-AcOEt, 97:3 y las bandas fueron desorbidas con cloruro de metileno. La banda correspondiente a los aldehídos fue repurificada mediante sucesivas cromatografías en columnas de silicagel eluidas con n-hexano-AcOEt, 99:1 y con n-hexano-AcOEt, 97:3 respectivamente, obteniéndose 4 mg de un sólido (Subfracción 3b.1) que por CCD de silicagel (n-hexano-AcOEt, 98:2) reveló solamente una mancha. Se efectuó CGL de este sólido contra testigos determinándose así la presencia de una serie de aldehídos lineales de cadena larga. La fracción de ceras no se analizó.

La subfracción 3b.2 correspondió por CCD a una serie de manchas color violeta (óleum/calor), de Rf menor que el de los aldehídos y similar al de los alcoholes lineales, que se analizaron por CGL-EM, verificándose así la presencia de cetonas lineales y triterpénicas.

La subfracción 3c (0,8 g) se sometió a sucesivas cromatografías en columnas de silicagel eluidas con n-hexano-AcOEt, 98:2 y CH₂Cl₂ respectivamente. Se obtuvo así un sólido blanco (5 mg) que por CGL contra

testigos y CGL-EM reveló la presencia de una serie homóloga de alcoholes lineales.

La fracción 5 (3,5 g) fue purificada por cromatografía rápida en columna seca de silicagel G (n-hexano-AcOEt, 9:1) y por cromatografía en columna de silicagel H (CH_2Cl_2), obteniéndose un sólido blanco-amarillento (10 mg). Posteriormente se analizó por CGL capilar y CGL-EM, determinándose de esta forma la presencia de compuestos esteroidales.

Análisis de los hidrocarburos

Se caracterizaron por CGL frente a testigos, confirmando su identidad por CGL-EM. CGL (OV-17 3%, 1,8 m de long., temp. 220°C , isotérmica):

t_R minutos (fórmula, %): 1,27 ($\text{n-C}_{19}\text{H}_{40}$ 1, 0,26), 1,77 ($\text{n-C}_{20}\text{H}_{42}$ 2, 8,66), 3,24 ($\text{n-C}_{22}\text{H}_{46}$ 4, 7,77), 4,25 ($\text{n-C}_{23}\text{H}_{48}$ 5, 0,32), 6,11 ($\text{n-C}_{24}\text{H}_{50}$ 6, 6,39), 8,12 ($\text{n-C}_{25}\text{H}_{52}$ 7, 1,48), 11,64 ($\text{n-C}_{26}\text{H}_{54}$ 8, 4,83), 15,64 ($\text{n-C}_{27}\text{H}_{56}$ 9, 4,29), 22,20 ($\text{n-C}_{28}\text{H}_{58}$ 10, 3,82), 30,73 ($\text{n-C}_{29}\text{H}_{60}$ 11, 29,98), 42,08 ($\text{n-C}_{30}\text{H}_{62}$ 12, 3,17), 57,88 ($\text{n-C}_{31}\text{H}_{64}$ 13, 20,80).

Los espectros de masas de estos compuestos se determinaron por CGL-EM, utilizando una columna OV-17 3%, 1,2 m de long., temp.: $50 \rightarrow 290^\circ\text{C}$, $10^\circ\text{C}/\text{min.}$, obteniéndose para uno de los compuestos mayoritarios el siguiente espectro:

$\text{n-C}_{31}\text{H}_{64}$ 13 m/e (%): 436 (M^+ , 3,8), 407 (M^+ -etilo, 0,8), 393 (1,4), 379 (2,0), 365 (2,3), 351 (2,4), 337 (2,6), 323 (2,8), 309 (3,4), 295 (3,4), 281 (4,0), 267 (4,2), 253 (5,2), 239 (5,7), 225 (6,9), 211 (8,1), 197 (9,8), 183 (10,9), 169 (13,6), 155 (19,8), 141 (22,4), 127 (28,0), 113 (39,4), 112 (11,7), 111 (18,0), 99 (57,8), 98 (13,5), 97 (31,0), 85 (92,6), 84 (16,4), 83 (29,0), 72 (9,5), 71 (99,4), 70 (23,6), 69 (22,0), 58 (8,8), 57 (100), 56 (18,4), 55 (16,0), 43 (56,0), 42 (3,1), 41 (6,4).

Análisis de las terpenonas

Se las analizó por CGL capilar y CGL capilar-EM (SPB-1, 30 m de long., d. i. 0,20 mm, espesor del film $0,25 \mu\text{m}$, temp. $150 \rightarrow 290^\circ\text{C}$, $10^\circ\text{C}/\text{min}$). Se encontró una serie homóloga de pocos miembros de metilcetonas lineales y un

grupo de cetonas triterpénicas pentacíclicas.

t_R min (fórmula): 7,73 (2-heptadecanona 81, $C_{17}H_{34}O$); 10,30 (2-nonadecanona 82, $C_{19}H_{38}O$); 12,37 (2-heneicosanona 83, $C_{21}H_{42}O$); 13,90 (2-tricosanona 84, $C_{23}H_{46}O$), 23,25 (α - ó β -amirenona 39); 23,47 (germaniconona 40); 24,19 (lupenona 41); 25,00 (multiflorenona 85); 25,47 (bauerenona 86).

2-Heneicosanona 83 EM m/e (%): 311 ($M^+ + 1$, 1,2), 310 (M^+ , 1,7), 295 ($M^+ - Me$, 1,1), 127 (2), 114 (1,4), 113 (2,0), 100 (1,6), 99 (1,3), 97 (4,8), 96 (6,8), 85 (ruptura δ , C_5H_9O , 13,4), 82 (9,3), 71 (ruptura γ , C_4H_7O , 55,8), 70 (5,8), 69 (13,8), 68 (5,8), 67 (5,7), 59 (90,7), 58 (reord. Mc Lafferty, C_3H_6O , 100), 57 (ruptura β , 23,8), 56 (5,9), 55 (18,1), 43 ($MeCO^+$, C_3H_7 , 34,3), 41 (9,5).

α - ó β -Amirenona 39 EM m/e (%): 425 ($M^+ + 1$, 0,6), 424 (M^+ , 2,1), 409 ($M^+ - Me$, 1,9), 219 (18,6), 218 (RDA, anillos D y E, 100), 205 (anillos D y E o anillos A y B, 17,1), 204 (14,7), 203 (218-Me de C-17, 80,7), 191 (5,5), 190 (6,5), 189 (anillos D y E -29, 29,0), 177 (5,6), 175 (11,2), 161 (11,0), 159 (5,2), 149 (13,7), 148 (8,7), 147 (17,0), 145 (9,3), 137 (20,2), 136 (19,1), 135 (27,7), 134 (11,8), 133 (218-15-70, 21,5), 131 (8,7), 123 (11,4), 122 (9,1), 121 (16,3), 120 (6,1), 119 (18,8), 109 (18,0), 108 (6,4), 107 (18,3), 105 (18,3).

Multiflorenona 85 EM m/e (%): 424 (M^+ , 0,6), 409 ($M^+ - Me$, 1,7), 272 (2,1), 271 ($C_{19}H_{27}O$, 5,6), 258 (5,6), 257 (anillos A + B + C + Me-26, 27,9), 246 (6,8), 245 ($C_{17}H_{25}O$, 35,6), 219 (19,2), 218 (anillos A y B + C-11 + C-12, 100), 206 (14,7), 205 (anillos D y E, 49,8), 204 (9,4), 203 (33,6), 191 (23,1), 190 (7,4), 189 (13,4), 185 (6,8), 175 (22,9), 173 (8,9), 171 (7,1), 163 (16,3), 162 (7,6), 161 (16,1), 159 (13,4), 157 (9,3), 151 (9,6), 150 (7,6), 149 (27,2), 148 (20,3), 147 (40,0), 145 (21,0), 143 (10,9), 142 (5,8), 137 (29,8), 136 (10,5), 135 (36,4), 134 (14,6), 133 (36,9), 131 (18,3), 128 (6,6), 125 (10,1), 123 (32,0), 121 (36,0), 120 (9,7), 119 (28,2), 117 (10,4), 111 (12,0), 109 (46,5), 107 (28,3), 105 (30,2).

Bauerenona 86 EM m/e (%): 424 (M^+ , 4,0), 409 ($M^+ - Me$, 17,5), 272 (7,4), 271 ($C_{19}H_{27}O$, 19,2), 258 (17,3), 257 (anillos A + B + C + Me-26, 82,0), 246 (17,5), 245 ($C_{17}H_{25}O$, 100), 231 (9,0), 229 (8,8), 219 (7,5), 218 (anillos A y B + C-11 + C-12, 11,5), 217 (8,5), 215 (10,5), 207 (30,1), 206 (9,9), 205 (anillos

D y E, 33,3), 204 (7,9), 203 (17,7), 191 (17,3), 189 (16,0), 187 (19,2), 185 (10,7), 175 (18,6), 173 (22,2), 171 (15,6), 169 (8,9), 165 (14,3), 163 (33,5), 161 (25,4), 159 (27,1), 157 (14,5), 151 (12,2), 149 (29,7), 148 (13,3), 147 (37,6), 145 (30,6), 143 (16,0), 138 (9,0), 137 (55,6), 136 (17,7), 135 (59,4), 134 (23,9), 133(66,9), 132 (13,7), 131 (39,5), 130 (11,2), 129 (23,3), 128 (19,5), 127 (11,4), 125 (29,7), 124 (17,7), 123 (84,9), 122 (25,9), 121 (92,5), 120 (24,1), 119 (74,4), 118 (11,1), 117 (27,6), 115 (16,2), 111 (18,8), 110 (12,4), 109 (77,4), 108 (15,8), 107 (58,6), 106 (13,0), 105 (66,9).

Los EM de germanicona **40** y lupenona **41** fueron similares a los hallados en *Festuca argentina* (ver cetonas triterpénicas *F. argentina*). Además la identidad de estas dos cetonas se corroboró por coinyección por CGL capilar con los respectivos testigos.

Análisis de los aldehídos

Por CGL capilar y CGL-EM se comprobó que se trataba de una serie homóloga.

CGL capilar (DB-1, temp. 250°C, isotérmica):

t_R minutos (fórmula, %): 3,28 (n-C₁₄H₂₈O **87**, 5,07), 4,20 (n-C₁₆H₃₂O **88**, 1,35), 5,70 (n-C₁₈H₃₆O **45**, 0,93), 7,21 (n-C₂₀H₄₀O **46**, 1,50), 9,18 (n-C₂₂H₄₄O **47**, 0,68), 11,38 (n-C₂₄H₄₈O **48**, 0,57), 14,24 (n-C₂₆H₅₂O **49**, 89,32), 18,04 (n-C₂₈H₅₆O **50**, 0,14), 22,86 (n-C₃₀H₆₀O **51**, 0,43).

CGL-EM (SE-30 3% 1,8 m de long., temp. $\xrightarrow{150^\circ}$ 290°C, 10°C/min): para el compuesto mayoritario se obtuvo un espectro similar al del n-hexacosanal **49** de *F. argentina*.

Análisis de los alcoholes

Los alcoholes lineales se analizaron por CGL con testigos en condiciones isotérmicas y por CGL-EM.

CGL (OV-17 3%, 1,20 m de long., temp. 260°C, isotérmica):

t_R minutos (fórmula, %): 9,03 (n-C₂₄H₅₀O **52**, 1,05), 11,04 (n-C₂₅H₅₂O **53**, 0,28), 13,76 (n-C₂₆H₅₄O **21**, 90,06), 16,91 (n-C₂₇H₅₆O **89**, 0,55), 21,10

(n-C₂₈H₅₈O 54, 5,06), 26,47 (n-C₂₉H₆₀O 90, 0,68), 33,28 (n-C₃₀H₆₂O 91, 1,77).

CGL-EM (OV-17 3%, 1,2 m de long., temp. 100 --> 290°C, 10°C/min); se registraron los espectros de los dos alcoholes mayoritarios, resultando el del n-hexacosanol 21 concordante con el de *F. argentina*.

n-Octacosanol 54 EM m/e (%): 410 (M⁺, 0,5), 364 (M-H₂O-28, 2,7), 196 (364-6x28, 3,0), 195 (4,8), 181 (6,2), 180 (2,5), 168 (4,0), 167 (8,3), 166 (3,5), 155 (3,7), 154 (5,0), 153 (12,0), 152 (4,6), 141 (5,2), 140 (6,9), 139 (18,0), 138 (6,9), 137 (3,1), 127 (6,2), 126 (9,5), 125 (34,0), 124 (9,5), 123 (4,2), 113 (9,0), 112 (14,6), 111 (59,0), 110 (13,2), 109 (5,2), 99 (15,4), 98 (20,5), 97 (100), 96 (30,3), 95 (8,8), 86 (2,7), 85 (40,6), 84 (27,3), 83 (91,0), 82 (56,6), 81 (12,0), 72 (3,3), 71 (61,7), 70 (35,3), 69 (59,0), 68 (32,6), 67 (10,5), 58 (4,1), 57 (86,0), 56 (27,7), 55 (28,0), 54 (2,9), 45 (2,8), 43 (21,7), 41 (4,0).

Análisis de los esteroides

Se estudió la mezcla por CGL capilar, CGL capilar-EM y comparación con testigos.

CGL capilar (DB-1, temp. 300°C isotérmica):

t_R minutos (compuesto, %): 7,51 (colesterol 32, 1,8), 7,64 (dihidrocolesterol 92, 13,2), 8,06 (Δ⁷-colesterol 55, 2,6), 8,61 (Δ^{7,22}-campesterol 93, 1,6), 8,71 (campesterol 22, 7,0), 8,88 (dihidrocampesterol 94, 7,9), 9,09 (estigmasterol 23, 2,5), 9,27 (Δ⁷-campesterol 56, 2,4), 9,91 (sitosterol 24, 31,5), 10,11 (dihidrositosterol 25, 24,8), 10,70 (Δ⁷-sitosterol 58, 2,6), 10,88 (Δ⁷-estigmasterona 59, 2,2).

Los espectros de masas de estos compuestos se determinaron por CGL-EM utilizando una columna capilar Ultra-1, temp. 200 --> 300°C, 15°C/min.

Dihidrocolesterol 92 m/e (%): 389 (M⁺+1, 28,9), 388 (M⁺, 100), 374 (14,4), 373 (M-Me, 52,7), 355 (M⁺-H₂O-Me, 20,4), 262 (17,4), 234 (M⁺-cad. lat.-41, 70,9), 233 (M⁺-cad. lat.-42, 97,7), 219 (8,3), 217 (19,3), 216 (28,4), 215 (M⁺-cad. lat.-42-H₂O, 74,1), 201 (10,8), 166 (12,8), 165 (31,6), 161 (12,4), 159 (8,2), 149 (15,2), 148 (10,3), 147 (20,4), 145 (10,1), 137 (7,4), 136 (12,4), 135 (20,4), 134 (11,5), 133 (16,5), 124 (14,7), 123 (18,6), 122

(17,5), 121 (29,6), 120 (12,4).

$\Delta^{7,22}$ -Campesterol (24-metilcolesta -7,22-dien -3-ol) 93 m/e (%): 398 (M^+ , 39,8), 385 (M-Me, 29,3), 273 (M^+ - cad. lat., 28,3), 271 (M^+ - cad. lat.- 2 H, 100), 255 (M^+ - cad. lat.- H_2O , 33,6), 207 (M^+ - cad. lat.- C_6H_5 , 24,8).

Dihidrocampesterol 94 m/e (%): 403 (M^++1 , 27,2), 402 (M^+ , 87,5), 388 (11,8), 387 (M-Me, 43,6), 369 (M^+ - Me- H_2O , 16,7), 276 (M^+ - H_2O - 108, 15,7), 234 (M^+ - cad. lat.- 41, 65,5), 233 (M^+ - cad. lat.- 42, 89,5), 219 (10,1), 217 (22,3), 216 (30,0), 215 (M^+ - cad. lat.- 42- H_2O , 73,9), 207 (11,8), 166 (11,8), 165 (27,2), 161 (12,9), 149 (15,0), 147 (21,6), 136 (12,9), 135 (20,2), 133 (16,7), 124 (13,6), 123 (17,1), 122 (19,5), 121 (27,2), 120 (12,9). Pico base m/e 43.

Los EM de colesterol 32, Δ^7 -colesterol 55, campesterol 22, estigmasterol 23, Δ^7 -campesterol 56, sitosterol 24, dihidrositosterol 25, Δ^7 -sitosterol 58 y Δ^7 -estigmasterona 59 fueron similares a los obtenidos en *F. argentina*.

Al analizar esta fracción por CGL-EM en otras condiciones se detectó además una señal pequeña a t_R menores que el perfil de señales anteriores que también correspondió a un esterol.

CGL-EM capilar (DB-5, 15 m de long., d. i. 0,35 mm, espesor del film 0,25 μ m, temp. 180°C (1 min) --> 290°C, 20°C/min):

Estigmasta-1,3,5-trieno 95, $t_R = 6,72$ min.

EM m/e (%) 395 (M^++1 , 10,1), 394 (M^+ , 29,7), 379 (M^+ -Me, 30,4), 281 (8,2), 275 (an. C y D y cad. lat. con transf. H, 16,2), 253 (M^+ - cad. lat., 12,3), 211 (M^+ - cad. lat.- 42, 7,5), 207 (32,4), 159 (20,1), 158 (an. A y B y C-11, 32,1), 149 (42,9), 144 (33,8), 143 (158 - Me, 75,3), 135 (275- cad. lat., 100), 119 (an. A y B y transf. H, 49,1), 105 (39,9), 95 (47,8), 93 (275- cad. lat.- an.D, 32,3), 91 (43,1).

ENSAYOS TOXICOLÓGICOS DE *FESTUCA ARGENTINA* Y *FESTUCA HIERONYMI*

Preparación de las muestras

Se prepararon suspensiones acuosas de los respectivos extractos de éter de petróleo, metanólico y acuoso, así como de los percolados de cloruro de metileno, acuoso y metanólico del extracto metanólico correspondientes a *F. argentina* y *F. hieronymi*. También se ensayaron los extractos de *F. argentina* obtenidos de la marcha de alcaloides y de las fracciones provenientes del extracto acuoso.

En los casos de muy difícil dispersión se agregaron algunas gotas de Tween 80; también las muestras fueron colocadas en un baño ultrasónico durante unos minutos para lograr suspensiones estables hasta una concentración máxima de 100 mg/ml de agua.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones de la cepa CF1 de ambos sexos, de aproximadamente 20 g de peso promedio, realizando inyecciones i.p. en distintas dosis y concentraciones de cada uno de los extractos, percolados y fracciones. Se trabajó con lotes de 3 ratones, utilizando además en cada caso animales control y blancos.

Se realizaron necropsias completas de los ratones inyectados, y el examen histopatológico de los órganos afectados.

Estudios histopatológicos

Las muestras (0,5 cm x 0,5 cm x 1 cm) fueron fijadas en formol al 10% durante 24 a 48 hs e incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 5 μ m de espesor y fueron teñidos con hematoxilina/eosina.

Además se hicieron cortes por congelación y técnicas diferenciales de coloración para determinación de grasas (Rojo escarlata).

Las microfotografías fueron tomadas con un equipo Nikon FX-35A, Data Nikon Microphot-FX, con oculares CFW 10X y filtros ND-8 y ND-32, con varios aumentos. Se agradece a la Prof. Dra. Cristina Maggese (Lab. de Embriología animal, Depto. de Ciencias Biológicas, FCEN, UBA) por las facilidades de microscopía especializada.

Fraccionamiento del extracto acuoso de *Festuca argentina*

La suspensión acuosa proveniente de la extracción del marco vegetal con agua (batch, agitación, temperatura ambiente) se centrifugó a 2000 rpm hasta obtener una solución límpida. Se trabajó sobre este sobrenadante, luego de liofilizarlo, buscando los métodos de fraccionamiento adecuados desde el punto de vista toxicológico.

Precipitaciones del extracto acuoso con etanol

Se disolvieron 320 mg del extracto acuoso en 20 ml de agua. Se agregó etanol (previamente purificado de furfural por reflujo con NaOH y posterior destilación) en volúmenes crecientes de 10 unidades hasta precipitación. Ésto se logró experimentalmente con 70% de etanol (en volumen), se centrifugó a 2000 rpm y se filtró obteniéndose el Ppdo 70% (78 mg). La solución resultante se llevó, por agregados graduales de etanol, hasta una concentración del 90% en la que se logró nuevamente precipitación (Ppdo 90%, 62mg).

Se efectuaron ensayos toxicológicos en ratones inoculando suspensiones del Ppdo 70% (24mg/ml), del Ppdo 90% (19mg/ml) y de la solución remanente, resultando activa la fracción correspondiente al Ppdo 70%.

Dado lo útil que resultó este método separativo, por ser reproducible y permitir trabajar con grandes cantidades, se realizó nuevamente la precipitación con etanol partiendo de 660 mg de extracto acuoso, disueltos en 40 ml de agua. El Ppdo 70% fue purificado por reprecipitación con etanol 70%.

Diálisis del Ppdo 70%

Se realizó la diálisis del Ppdo 70% disuelto en 10ml de agua con una membrana de celulosa (A H Thomas Co.) con un tamaño de poro equivalente a un peso molecular aproximado de 12000, contra agua destilada (2 x 500 ml). Se dializó durante dos días, con agitación magnética en la solución externa a la membrana. Las dos fracciones resultantes se liofilizaron y pesaron correspondiendo a la suspensión interior de la bolsa 87,1 mg (Ppdo 70% int.) y a la solución exterior de la bolsa 11,6 mg (Ppdo 70% ext.).

Se efectuaron los ensayos toxicológicos sobre estas fracciones

resultando letal la suspensión interna de la bolsa del Ppdo 70% (24,9 mg/ml; 1 ml: muerte en 2,3 hs.; 0,5 ml: muerte en 9 hs.).

El análisis histopatológico y las inoculaciones de los ratones se realizaron en colaboración con el Dr. Carlos A. Mazzini y la médico-veterinaria Elvira Falzoni (PROPLAME-CONICET).

Determinación de la naturaleza química de los componentes de la fracción tóxica de *F. argentina*

La fracción interior de la bolsa de diálisis del Ppdo 70%, previa purificación por columnas de poliamida, se analizó cualitativamente por lectura a 280 nm y con el reactivo de Folin-Lowry [HARRIS, 1989; LOWRY, 1951] en un Spectronic 20, evidenciando la naturaleza proteica de la misma.

Por ello fue sometida posteriormente a electroforesis en distintas condiciones, resultando las siguientes las más adecuadas:

a) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE); con un gel 10% T, y corriéndolo bajo condiciones de corriente constante ($I_i = 25$ mA, $V_i = 50$ V.; $I_f = 25$ mA, $V_f = 90$ V.) hasta que el colorante azul de bromofenol alcanzó el extremo del gel, se observó una banda con movilidad correspondiente a compuestos de PM menores a 60.000.

La banda fue detectada no sólo por tinción con azul brillante de Coomassie 0,1% [LAEMMLI, 1970; BRADFORD, 1976], usando como solución transparentizante ácido acético 7%, como una banda azul sino también con el reactivo de ácido periódico-Schiff (PAS) [ZACCHARIAS, 1969]. Con este reactivo se observaron más bandas que con el anterior.

Como testigo se usó una solución de albúmina bovina 1 mg/ml (PM 68.000). El equipo empleado fue una fuente de bajo voltaje Sontec Científica, 0-200 volts, 0-250 mA y una cuba para electroforesis en placa vertical.

El procedimiento utilizado para SDS-PAGE en geles homogéneos de 10%T fue análogo al propuesto por Laemmli [LAEMMLI, 1970]; se prepararon de una solución stock de 30% de acrilamida y 0,8% en peso de N,N'-bis-metilenacrilamida.

La solución reguladora del gel separador fue Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) y 0,1% de dodecilsulfato de sodio (SDS) (Tris: Tris(hidroximetil)aminometano = 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol = $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$). Los geles se

polimerizaron químicamente por adición de 0,025% en volumen de TEMED (tetrametilendiamina) y persulfato de amonio.

La solución reguladora para el gel concentrador de 4% de acrilamida contenía Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) y 0,1% SDS y se polimerizaron de la misma forma que el gel separador.

La solución reguladora de los reservorios electródicos contenía glicina 0,192 M, Tris 0,025 M y SDS 0,1% p/v.

b) Isoelectroenfoque (IEF); se prepararon placas de poliacrilamida 5% con anfolitos Pharmalyte rango 3-9,5. Se desarrolló el IEF, con gradiente de pH: 3-10, a una potencia constante de 10 W.

Al revelar con azul brillante de Coomassie R-250 se observó una sola banda en la fracción Ppdo 70% int., en la zona de pH próxima a 6,5.

Como testigo se usó una mezcla de marcadores de pI. Se utilizó un equipo LKB, con una fuente de poder Macrodrive 5, cuba refrigerada Multiphor II y sistema termostático con circulación Multitemp II.

Los estudios electroforéticos se realizaron en colaboración con la Prof. Dra. Alcira B. Nesse y la Lic. María C. Romero (Lab. Análisis Biológicos, Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA).

RESUMEN

El estudio químico y toxicológico de *Festuca argentina* y el estudio comparativo con *Festuca hieronymi* se desarrollan en este trabajo de Tesis, que comprende, un Capítulo 1 introductorio donde se establecen los objetivos de esta investigación y se describen además el género *Festuca* y las dos especies estudiadas.

En el Capítulo 2 se indican las características químicas de la familia de las Gramíneas, ya que hasta hace unas décadas sólo se investigaban y se describían en la literatura los metabolitos secundarios de importancia económica obtenidos de la misma, como los hidratos de carbono y las proteínas. Así, se ubica al lector en el contenido de alcaloides, compuestos cianogénicos, lípidos, minerales, polifenoles, proteínas e hidratos de carbono detectado en esta familia.

El Capítulo 3 se refiere a la Química Ecológica. En la primera parte se describen las interacciones animal-animal, planta-animal, planta-planta (alelopatía, interacción parásito-huésped) y planta-microorganismo (micotoxinas, molécula señal, fitotoxinas, agentes antimicrobianos), debido a que en el estudio de estas plantas surgieron compuestos que intervienen en algunas de las interacciones mencionadas. Por ello, es necesario introducir al lector en los conceptos fundamentales de la Química Ecológica, en qué consisten los distintos tipos de interacciones conocidas hasta el momento, ilustrándolas con diversos ejemplos.

La segunda parte de este capítulo restringe la Química Ecológica a las Gramíneas, haciendo énfasis en la distinta problemática de los integrantes de esta familia, como por ejemplo los compuestos de defensa y los relacionados con interacciones parásito-huésped y planta-microorganismo.

En el capítulo 4 se describe a una familia de compuestos hallada en *F. argentina*, los lignanos, ya que no existen compilaciones químicas completas en la literatura. Comprende la clasificación, nomenclatura (ya que existen controversias en la literatura) y actividad biológica de los lignanos en general, y la biosíntesis, ejemplos y determinación estructural (EM, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN) de los lignanos derivados de los tetrahidrofurofuranos para lograr así una mejor comprensión de los espectros relacionados analizados en la

discusión de esta Tesis.

El capítulo 5 consiste en la discusión de la parte experimental de este estudio, detallándose la determinación estructural de los compuestos aislados de estas especies como así también la comparación de las sustancias halladas en los respectivos extractos de éter de petróleo.

Así, se identificaron los siguientes compuestos de *Festuca argentina*:

- a) Hidrocarburos lineales, $n\text{-C}_{12}\text{H}_{26}$ a $n\text{-C}_{31}\text{H}_{64}$ 1 a 20.
- b) Ceras, que por hidrólisis generaron:
 - alcoholes, n-hexacosanol 21, campesterol 22, estigmasterol 23, sitosterol 24, dihidrositosterol 25, β -amirina 26, germanicol 27, isobaurenol 28, lupeol 29, hopenol-a 30 y hopeol 31.
 - ácidos grasos, $\text{C}_{n:0}$ $n=12$ a 20, par 33, 34, 35, 36 y 38 y $\text{C}_{18:2}$ 37.
- c) Terpenonas, amirenona 39, germaniconona 40, lupenona 41, cicloartanona 42, isomultiflorenona 43 y hopenona 44.
- d) Aldehídos lineales, $n\text{-C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}$ a $n\text{-C}_{30}\text{H}_{60}\text{O}$ (n° par de átomos de carbono) 45 a 51.
- e) Alcoholes lineales, $n\text{-C}_{24}\text{H}_{50}\text{O}$ a $n\text{-C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}$ y $n\text{-C}_{28}\text{H}_{58}\text{O}$ 52, 53, 21 y 54.
- f) Esteroides, colesterol 32, Δ^7 -colesterol 55, campesterol 22, estigmasterol 23, Δ^7 -campesterol 56, sitosterol 24, dihidrositosterol 25, campesterona 57, Δ^7 -sitosterol 58, Δ^7 -estigmasterona 59 y sitosterona 60.
- g) Alcaloides, lolinina 61, N-formilolinina 62, lolina 63, N-metilolinina 64, Δ^5 -N-acetilolinina 65 y colina 66.
- h) Lignanós, (-)-pinoresinol 67, (-)-(1S, 2S, 5S, 6R)-2-(4-hidroxifenil)-6-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-3,7-dioxabicyclo[3,3,0]octano 68, (-)-pinoresinol-4-O- β -D-glucopiranosido 69 y (+)-medioresinol-4-O- β -D-glucopiranosido 70, y por hidrólisis enzimática de este último, medioresinol 71.
- i) Glicósidos esteroidales, cuya hidrólisis brindó como azúcares: arabinosa, xilosa y glucosa y como agliconas, colesterol 32, Δ^7 -colesterol 55, campesterol 22, estigmasterol 23, Δ^7 -campesterol 56, sitosterol 24, dihidrositosterol 25, Δ^7 -sitosterol 58.

- j) Flavonoides, canferol-3-O- β -D-glucopiranosido 72, acacetina-7-O- β -D-rutinósido 73, apigenina-7-O- β -D-rutinósido 74, apigenina-7-O- β -D-neohesperidósido 75, 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona 76, 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavonol 77, 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona 78, apigenina 79.
- k) Estilbeno, *trans*-resveratrol 80.

y de *Festuca hieronymi*:

- a) Hidrocarburos lineales n-C₁₉H₄₀ 1, n-C₂₀H₄₂ 2 y n-C₂₂H₄₆ a n-C₃₁H₆₄ 4 a 13.
- b) Terpenonas, 2-heptadecanona C₁₇H₃₄O 81 a 2-tricosanona C₂₃H₄₆O 84, amirenona 39, germaniconona 40, lupenona 41, multiflorenona 85 y bauerenona 86.
- c) Aldehídos lineales, n-C₁₄H₂₈O a n-C₃₀H₆₀O (n° par de átomos de carbono) 87, 88 y 45 a 51.
- d) Alcoholes lineales, n-C₂₄H₅₀O a n-C₃₀H₆₂O 52, 53, 21, 89, 54, 90 y 91.
- e) Esteroides, colesterol 32, dihidrocolesterol 92, Δ^7 -colesterol 55, $\Delta^{7,22}$ -campesterol 93, campesterol 22, dihidrocampesterol 94, estigmasterol 23, Δ^7 -campesterol 56, sitosterol 24, dihidrositosterol 25, Δ^7 -sitosterol 58, Δ^7 -estigmasterona 59, estigmasta-4,6-dien-3-ol 95.

Se describen también los estudios toxicológicos de ambas especies en animales de experimentación y los correspondientes estudios histopatológicos de los órganos afectados. Asimismo, se analizan comparativamente los resultados toxicológicos de *F. argentina* y de *F. hieronymi*, con los obtenidos anteriormente con *Poa huecu*, y con los existentes en literatura referidos a *F. arundinacea* y a especies de *Lolium*.

Por último, en el capítulo 6 se describe la parte experimental correspondiente a los resultados discutidos en el Capítulo anterior. Se detallan los equipos usados, las reacciones realizadas, los reveladores empleados en CCD y el procesamiento del material vegetal, indicando detalladamente las técnicas separativas y de purificación usadas en cada caso y los datos espectroscópicos (¹H-RMN, ¹³C-RMN, EM, UV e IR, según el caso) de las sustancias aisladas con las correspondientes asignaciones. Asimismo, se señalan los ensayos toxicológicos realizados con ambas especies en animales de experimentación.

Parte de este trabajo de investigación dio lugar a las siguientes publicaciones:

- 1) CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF ISOMERIC FLAVONE
7-O-RHAMNOGLUCOSIDES FROM OTHER GRASS FLAVONOIDS.
A. C. Casabuono y A. B. Pomilio.
An. Asoc. Quím. Argent. **77**, 479 (1989).

- 2) FLAVONOIDS OF FESTUCA ARGENTINA.
A. C. Casabuono y A. B. Pomilio.
Fitoterapia **61**, 284 (1990).

- 3) LIGNANS AND A STILBENE FROM FESTUCA ARGENTINA.
A. C. Casabuono y A. B. Pomilio.
Phytochemistry **35**, 479 (1994).

- 4) WAXES AND TRITERPENOIDS FROM FESTUCA ARGENTINA.
A. C. Casabuono y A. B. Pomilio.
En redacción.

- 5) LETHALITY OF FESCUE SPECIES.
A. C. Casabuono, E. Falzoni y A. B. Pomilio.
En redacción.

BIBLIOGRAFÍA

- AASEN, A. J. y Culvenor, C. C. J.; 1969a; *Austral. J. Chem.* 22, 2021.
- AASEN, A. J., Culvenor, C. C. J.; Finnie, E. P.; Kellock, A. W. y Smith, L. W.; 1969b; *Austral. J. Agric. Res.* 20, 71.
- ABE, F.; Yamauchi, T.; 1986; *Chem. Pharm. Bull.* 34, 4340.
- ADLER, G.; Kasprzyk, Z.; 1975, *Phytochemistry* 14, 627.
- AGRAWAL, P. K.; Rastogi, R. P. ; 1981; *Heterocycles* 16, 2181.
- AGRAWAL, P.K.; Thakur, R.; 1985; *Magn. Reson. Chem.* 23, 389.
- AGUAMAH, G.; Lancake, P.; Leworthy, D. P.; Page, J. A.; Pryce, R. .J; Strange, R. N.; 1981; *Phytochemistry* 20, 1381.
- AHMAD, V. U.; Bano, S.; Mohammad, F. V.; 1985; *Planta Med.*, 521.
- AKRAMOV, S. T.; Yunusov, S. Y.; 1968; *Khim. Prir. Soedin*, 298.
- AKRAMOV, S. T.; Yunusov, S. Y.; 1965; *Chem. Nat. Compd. (Engl. Transl.)* 1, 203.
- ALLEBONE, J.; Hamilton, R.; Bryce, T.; Kelly, W.; 1971; *Experientia* 27, 13.
- ALSAADAWI, I. S.; Rice, E. L.; Karne, T. K. B.; 1983; *J. Chem. Ecol.* 9, 761.
- APLIN, R. T.; Hornby, G. M.; 1966; *J. Chem. Soc. (B)*, 1078.
- ARAI, Y.; Yamaide, M.; Yamazaki, S.; Ageta, H.; 1991; *Phytochemistry* 30, 3369.
- ATAL, C. K., Dhar, K. L.; Pelter, A.; 1967; *J. Chem. Soc. (C)* 2228.
- AUDIER, H. E; Bengelmans, R.; Das, B. C.; 1966; *Tetrahedron Letters*, 4341.
- AXELSON, M.; Sjovall J.; Gustafson, B.; Setchell, K.; 1982; *Nature* 290, 659.
- BACON, C. W.; Siegel, M. R.; 1988; *J. Prod. Agric.* 1, 45.
- BACON, C. W.; Lyons, P. C.; Porter, J. K. y Robbins, J. D.; 1986; *Agron. J.* 78, 106.
- BAKER, G.; 1961; *Mem. Queensland Museum* 14, Pt.1, 1.
- BATES, R. B.; Morehead, S. R.; 1972; *Tetrahedron Letters*, 1629.
- BATHIROV, E. K. H.; Malkarinov, A.; Malinov, V.; Yagudaev, M.; 1985; *Khim. Prir. Soedin.*, 624.
- BELESKY, D. P.; Evans, J. J. y Wilkinson, S. R.; 1985; *Agron. J.* 77,796.

- BELESKY, D. P.; Robbins, J. D.; Stuedemann, J. A.; Wilkinson, S. R.; Devine, O. J.; 1987; *Agron. J.* **79**, 217.
- BELSKY, A.; 1987; *Am. Nat.* **129**, 777.
- BERRIE, A. M. M.; Knights, B. A.; 1972; *Phytochemistry* **11**, 2363.
- BERTONI, M. D.; Cabral, D.; Romero, N.; Dubcovsky, J.; 1993; *Bol. Soc. Argent. Bot.* **29**, 25.
- BJORNDAL, H.; Hellerqvist, C. G.; Lindberg, B. y Svensson, S.; 1970; *Angew. Chemie, Internat. Edit.* **9**, 619.
- BLANCO, M. 1976 Tesis N^o 1517, *Aislamiento y caracterización de sustancias presentes en extractos de especies del género Morrenia (Asclepiadaceas)*, Dpto. Qca. Org., FCEyN, UBA.
- BLUM, U.; Dalton, B. R.; 1985; *J. Chem. Ecol.* **11**, 279.
- BOCK, K.; Pedersen, C.; 1979; *Carbohydr. Res.* **71**, 319.
- BOCK, K.; Pedersen, C.; 1983; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41**, 27.
- BOVÉ, C., Conn, E. E.; 1961; *J. Biol. Chem.* **236**, 207.
- BRADFORD, M. B.; 1976; *Anal. Biochem.* **72**, 248.
- BREITMAIER, E.; Haas, G.; Voelter, W.; 1979; *Atlas of Carbon-13 NMR data; compuesto n^o 1239.*
- BROWN, F. J.; Djerassi, C.; 1980; *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 807.
- BUDZIKIEWICZ, H.; Wilson, J. M.; Djerassi, C.; 1963; *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3688.
- BUDZIKIEWICZ, H.; Djerassi, C. y Williams, D. H.; 1967; *"Mass Spectrometry of Organic Compounds"*, Holden-Day, San Francisco.
- BUSH, L. B.; Cornelius, P. L.; Buckner, R. C.; Varney, D. R.; Chapman, R. A.; Burrus II, P. B.; Kennedy, C. W.; Jones, T. A.; Saunders, J. J.; 1982; *Crop. Sci.* **22**, 941.
- CARTWRIGHT, D. W.; Langcake, P.; Pryce, R.; Leworthy, D.; Ride, J.; 1981; *Phytochemistry* **20**, 535.
- CHANG, M; Netzly, D. H.; Butler, L. G.; Lynn, D. G.; 1986; *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7858.
- CHIBA, M.; Hisada, S.; Nishibe, S.; Thieme, H.; 1980; *Phytochemistry* **19**, 335.
- CHIBA, M.; Okabe, K.; Hisada, S.; Shima, K.; Takemoto, T.; Nishibe, S.; 1979; *Chem. Pharm. Bull.* **27**, 2868.

- CLERC, J.; Pretsch, E.; Sternhell, S.; 1973; *Methoden der Analyse in der Chemie* 16, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt.
- COMPTON, S. J. y Jones C.G.; 1985; *Anal. Biochem.* 151, 369.
- CONNICK, W. J.; Bradons, J. M.; Legendre, M.; Vail, S. L.; Menges, R. .M; 1987; *J. Chem. Ecol.* 13, 463.
- COOPER, R.; Levy, E. C.; Lavie, D.; 1977; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 794.
- CUENCA, M. R.; Catalán, C. A.; Díaz, J. G.; Herz, W.; 1991; *J. Nat. Prod.* 54, 1162.
- CUNNINGHAM, I.; 1949; *Aust. Vet. J.* 25, 27.
- DE BUENO, M. A.; Alvarez, R. M.; coordinadores; 1985; *Jornada de actualización técnica para profesionales agropecuarios sobre festucosis*, 15 de marzo de 1985, Agencia de Extensión Rural del INTA de Trenque Lauquen.
- DEDIO, W.; Kaltsikes, P.; Larter, E.; 1969; *Phytochemistry* 8, 2351.
- DENT, J. W.; Aldrich, D. T. A.; 1963; *Nature* 198, 905.
- DEYAMA, T.; 1983; *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2993.
- DEYAMA, T.; Ikawa, T.; Nishibe, S.; 1985; *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3651.
- DEYAMA, T.; Ikawa, T.; Kitagawa, S.; Nishibe, S.; 1986; *Chem. Pharm. Bull.* 34, 4933.
- DI COSMO, F.; Straus, N. A.; 1985; *Experientia* 41, 1188.
- DIXON, R. A.; 1986; *Nature (London)* 324, 303.
- EHMANN, A.; 1974; *Phytochemistry* 13, 1979.
- EINHELLIG, F. A.; Eckrich, P. C.; 1984; *J. Chem. Ecol.* 10, 161.
- FARNSWORTH, N.; Pilewski, N.; Draus, F.; 1962; *Lloydia* 25, 312.
- FAUSCH, H.; Kündig, W.; Neukom, H.; 1963; *Nature* 199, 287.
- FORSEE, W. T.; Laine, R. A.; Elbein, A. D.; 1974; *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 248.
- FRAHN, J. L.; O'Keefe, D. F.; 1971; *Austral. J. Chem* 24, 2189.
- FRAHN, J. L.; Edgar, J. A.; Jones, A. J.; Cockrum, P. A.; Anderton, N.; Culvenor, C. C. J.; 1984; *Austral. J. Chem.* 37, 165.
- FREUDENBERG, K.; Sidhu, G.; 1960; *Tetrahedron Letters* 20, 3.
- FREUDENBERG, K.; Weinges, K; 1961; *Tetrahedron* 15, 115.

- FUSHIYA, S.; Sato, Y.; Nozoe, S.; Nomoto, K.; Takemoto, T.; Takagi, S.; 1980; *Tetrahedron Letters* 21, 3071.
- GALLO, G. G.; 1979; "Plantas tóxicas para el ganado en el cono sur de América", EUDEBA.
- GARG, V. K.; Nes, W. R.; 1984; *Phytochemistry* 23, 2919.
- GHOSAL, S.; Banerjee, P. K.; Banerjee, S. K.; 1970; *Phytochemistry* 9, 429.
- GHOSAL, S.; Kumar, Y.; Chakrabarti, D.; Lal, J.; Singh, S. K.; 1986; *Phytochemistry* 25, 1097.
- GILPIN, J.; Mc Lafferty, F.; 1957; *Anal. Chem.* 29, 990.
- GORIN, P. A. J.; Mazurek, M.; 1975; *Can. J. Chem.* 53, 1212.
- GOTTLIEB, O.; 1972; *Phytochemistry* 11, 1537.
- GTSTEN, H.; Salzwedel, M.; 1967; *Tetrahedron* 23, 187.
- HABERMEHL, G. G.; Busam, L.; Stegemann, J.; 1984; *Z. Naturforsch., Sec. C* 39, 212.
- HARBORNE, J. B.; Williams, C. A.; 1976; *Biochem. Syst. Ecol.* 4, 267.
- HARBORNE, J. B.; 1982; "Introduction to Ecological Biochemistry", 2nd Ed., Academic Press, London.
- HARBORNE, J. B.; 1986; *Nat. Prod. Rep.* 3, 323.
- HARBORNE, J. B.; 1989; *Nat. Prod. Rep.* 6, 85.
- HARRIS, E.L.V. y Angal, S. (eds); 1989; *Protein Purification Methods: A practical approach*, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
- HARTLEY, R. D., Keen, A. S.; 1984; *Phytochemistry* 23, 1305.
- HARWOOD, L. M.; 1985; *Aldrichim. Acta* 18, 25.
- HATHWAY, D. E.; 1962; *Biochem. J.* 83, 80.
- HAWORTH, R.; 1936; *Ann. Reports on Progr. Chem. (Chem. Soc. London)* 33, 266.
- HEGNAUER, R.; 1963; "Chemotaxonomie der Pflanzen", vol II; Ed. Birkhäuser, Basilea - Stuttgart.
- HEGNAUER, R.; 1986; "Chemotaxonomie der Pflanzen" vol VII; Ed. Birkhäuser Basilea, Stuttgart & Berlin.
- HEISEY, R. M.; Delwiche, C. C.; 1985; *J. Ecol.* 73, 729.

- HOFMAN, J.; Masojídková, M.; 1973; *Phytochemistry* **12**, 207.
- HOVELAND, C. S.; Haaland, R. L.; King Jr., C. C.; Anthony, W. B.; Clark, E. M.; Mc Guire, J. A.; Smith, L. A.; Grimes, H. W.; Holliman, J. L.; 1980; *Agron. J.* **72**, 1064.
- INGHAM, J. L.; 1976; *Phytochemistry* **15**, 1791.
- IRIBARREN, A. M.; Pomilio, A. B.; 1983; *J. Nat. Prod.* **46**, 752.
- IRIBARREN, A. M.; Pomilio, A. B.; 1984; *Phytochemistry* **23**, 2087.
- IRIBARREN, A. M.; Pomilio, A. B.; 1985; *Phytochemistry* **24**, 360.
- IUPAC; 1989; IUPAC-IUB. *Joint Commission on Biochemical Nomenclature of Lignans and Neolignans, Propuesta*: JCBN 25.2, Abril 1989.
- JACOBSON, D.; Miller, W.; Seath, D.; Yates, S.; Tookey, H.; Wolff, I.; 1963; *J. Dairy Sci.* **46**, 416.
- JARES, E. A.; Tettamanzi, M. C.; Pomilio, A. B.; 1990; *Phytochemistry* **29**, 340.
- JOHNSON, H.; Hatch, M.; 1968; *Phytochemistry* **7**, 375.
- JONES, F. S.; Arnold, J. F.; 1917; *J. Exper. Medicine* **26**, 805.
- JURD, L.; Horowitz, R. M.; 1961; *J. Org. Chem.* **26**, 2561.
- KANETA, M.; Sugiyama, N.; 1973; *Agric. Biol. Chem.* **37**, 2663.
- KHAN, K.; Shoeb, A.; 1985; *Phytochemistry* **24**, 628.
- KINJO, J.; Fukui, K.; Higuchi, H.; Nohara, T.; 1991; *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1623.
- KITAGAWA; S.; Hisada, S.; Nishibe, S.; 1984; *Phytochemistry* **23**, 1635.
- KNIGHTS, B. A.; 1967; *J. Gas Chromatogr.* **5**, 273.
- KNIGHTS, B. A.; 1968; *Phytochemistry* **7**, 2067.
- KOBAYASHI, M.; Ohta, Y.; 1983; *Phytochemistry* **22**, 1257.
- KOKKE, W.; Pak, C. S.; Fenical, W. H.; Djerassi, C.; 1979; *Helv. Chim. Acta* **62**, 1310.
- KOLATTUBUDY, P. E.; 1967; *Phytochemistry* **6**, 963.
- KUBO, I.; Murai, Y.; 1991; *J. Nat. Prod.* **54**, 1115.
- LAEMMLI, U.K.; 1970; *Nature* **227**, 680.

- LAMBERTON, J. A.; 1965; *Austral. J. Chem.* **18**, 911.
- LIN-GEN, Z.; Seligmann, O.; Jurcic, K.; Wagner, H.; 1982; *Planta Med.* **45**, 172.
- LISBOA, B. P.; 1964; *J. Chromatogr.* **16**, 136.
- LOWRY, O. H.; Rosenbrough N. J.; Farr A. L. y Randall R. J.; 1951; *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- LUDWING, C.; Nist, B.; Mc Carthy, J.; 1974; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1186.
- LYONS, P. C.; Plattner, R. D. y Bacon, C. W.; 1986; *Science* **232**, 487.
- MABRY, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M.; 1970; "*The Systematic Identification of Flavonoids*". Ed. Springer, N. York, Heidelberg, Berlin.
- MAC RAE, W. D.; Towers, G. H. N.; 1984; *Phytochemistry* **23**, 1207
- MACKAY, M. F.; van Donkelaar, A.; Culvenor, C. C. J.; 1986; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1219.
- MARCOS, M.; Jimenez, C.; Villaverde, M. C.; Riguera, R.; Castedo, L.; Stermitz, F.; 1990; *Planta Med.* **56**, 89.
- MARKWALDER, H., Neukom, H.; 1976; *Phytochemistry* **15**, 836.
- MARTINEZ, A., Dubcovsky, J.; 1988; *Can. J. Bot.* **66**, 468.
- MASSANET, G. M.; Pando, E.; Rodriguez-Luis, F.; Zubla, E.; 1989; *Fitoterapia* **60**, 3.
- MAYAMA, S.; Tani, T.; 1981; *Tetrahedron Letters* **22**, 2103.
- McNAUGHTON, S. J.; 1986; *Am. Nat.* **128**, 765.
- MEKSURIYEN, D.; Nanayakkara, N. P. D.; Phoebe, C. H. Jr; Cordell, G. A.; 1986; *Phytochemistry* **25**, 1685.
- MIDDLETON, J.; 1984; *Experientia* **40**, 299.
- MUDZHIRI, L.; 1988; Chem. Abstr. 111 (9): 72962y. *Pharmaceuticals containing Eleutherococcus extracts for the inhibition of ethanol addiction.* MUDZHIRI, L.; Alkhazashvili, G.; Kalatozishvili, E.; Chekurishvili, G.; Brekhman, I.; Bulanov, A.; Polozhentseva, M.; Brit. U. K. Pat. Appl. GB 2198041 A1 8 Jun 1988.
- NES, W. R.; Krevitz, K.; Joseph, J.; Nes, W. D.; Harris, B.; Gibbons, G. F.; Patterson, G. F.; 1977; *Lipids* **12**, 511.
- NEUNER-JEHLER, N.; Nesvadba, H.; Spiteller, G.; 1965; *Mh. Chem.* **96**, 321.
- NICORA, E. G.; 1978; Gramineae. En "*Flora Patagónica*", vol. VIII, parte III, pág. 118, Ed. Colección Científica del Instituto Nacional de

- Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina.
- NISHINO, C.; Mitsui, T.; 1973; *Tetrahedron Letters*, 335.
- OGUNKOYA, L.; 1981; *Phytochemistry* 20, 121.
- OHMOTO, T.; Ikuse, M.; 1970; *Phytochemistry* 9, 2137.
- OKAJIMA, H.; Smith, D.; 1964; *Science* 4, 317.
- OSSKE, G.; Schreiber, K.; 1965; *Tetrahedron* 21, 1559.
- PARODI, L. R.; 1935; *Physica* 11, 498.
- PARODI, L. R.; 1950; *Rev. Arg. Agron.* 17, 163.
- PARTRIDGE, L. G.; Midgley, I.; Djerassi, C.; 1977; *J. Am. Chem. Soc.* 99, 7686.
- PATTERSON, G.; 1971; *Analyt. Chem.* 43, 1165.
- PELTER, A.; Stainton, P.; Barber, M.; 1966; *J. Heterocyclic Chem.* 3, 191.
- PELTER, A.; 1967; *J. Chem. Soc. (C)*, 1376.
- PELTER, A.; Ward, R.S.; Venkata Rao, E.; Sastry, K.V.; 1976; *Tetrahedron* 32, 2783.
- PERREAUX, D.; Maralte, H.; Meyer, J. A.; 1986; *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 28, 323.
- PETERS, N. K.; Frost, J. W.; Long, S. R.; 1986; *Science* 233, 977.
- PETERSON, G. L.; 1979; *Anal. Biochem.* 100, 201.
- PIERPOINT, W. S.; 1986; *Phytochemistry* 25, 1595.
- POLLARD, C.; 1982; *Biochem. Syst. Ecol.* 10, 245.
- POMILIO, A. B.; Rofi, R. D.; Gambino, M. P.; Mazzini, C. A.; Langenheim, R. T. Debenedetti de; 1989; *Toxicon* 27, 1251.
- PRYCE, R. J.; 1972; *Phytochemistry* 11, 1355.
- RAHMAN, M. M. A., Dewick, P. M.; Jackson, D. E.; Lucas, J. A.; 1990a; *Phytochemistry* 29, 1841.
- RAHMAN, M. M. A.; Dewick, P. M.; Jackson, D. E.; Lucas, J. A.; 1990b; *Phytochemistry* 29, 1971.
- RATERA, E. L.; 1973; *Guía bibliográfica de las plantas tóxicas para el ganado en la República Argentina*, Cesarini Hnos Editores, Argentina.

- RICHELET, J. A.; 1915; *Bol. Min. Agr.* **17**, 163.
- RITCHIE, R. G. S.; Cyr, N.; Korsch, B.; Koch, H. I.; Perlin, A. S.; 1975; *Can. J. Chem.* **142**.
- ROBBINS, J. D.; Sweeny, J. G.; Wilkinson, S. R.; Burdick, D.; 1972; *J. Agric. Food Chem.* **20**, 1040.
- ROWAN, D. D.; Hunt, M. B.; Gaynor, D. L.; 1986; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 935.
- RUSSELL, G. B.; Connor, H. E.; Purdie, A. W.; 1976; *Phytochemistry* **15**, 1933.
- RYHAGE, R.; Ställberg-Stenhagen, S.; Stenhagen, E.; 1959; *Arkiv Kemi* **18**, 179.
- SADTLER; 1976; *The Sadtler Standard Spectra*; espectro de $^1\text{H-RMN}$ n^o 6803. Sadtler Research Laboratories Inc., EEUU.
- SCHLUBACH, H. H.; 1965; *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* **23**, 46.
- SCHMIDT, J.; Huneck, S.; 1979; *Org. Mass Spectrom.* **14**, 656.
- SCHOENTAL, R.; 1984; *Chem. Ber.* **20**, 1108.
- SETCHELL, K.; Lawson, A.; Conway, E.; Taylor, N.; Kirk, D.; Cooley, G.; Farrant, R.; Wynn, S.; Axelson, M.; 1980; *Nature* **287**, 740.
- SHAPIRO, R.; Djerassi, C.; 1964; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2825.
- SMITH, D.; Groteleueschen, R. D.; 1966; *Crop Science* **6**, 263.
- SMITH, R. M.; Martin-Smith, M., 1978; *Phytochemistry* **17**, 1307.
- SPEGAZZINI, C.; 1897; *Rev. Fac. Agron. Veterin. La Plata* **3**, 584.
- SPENCER, P. A.; Towers, G. H. N.; 1988; *Phytochemistry* **27**, 2781.
- STAHL, E.; Kaltenbach, U.; 1961; *J. Chromatogr.* **5**, 351.
- STOESSL, A.; 1966a; *Tetrahedron Letters*, 2287.
- STOESSL, A.; 1966b; *Tetrahedron Letters*, 2849.
- STOTHERS, J. B.; Lauterbur, P. C.; 1964; *Can. J. Chem.* **42**, 1563.
- STRONGMAN, D. B.; Strunz, G. M.; Yu, C.; Calhoun, L.; 1988; *J. Chem. Ecol.* **14**, 753.
- SUGAWARA, K.; Sugawara, F.; Strobel, G.; 1985; *J. Org. Chem.* **50**, 5631.
- SUGIYAMA, M. y Kikuchi M.; 1991; *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 483.

- TALAPATRA, S. K.; Sengupta, S.; Talapatra, B.; 1968; *Tetrahedron Letters* 57, 5963.
- TALVITIE, A.; Mannila, E.; Hamunen, A.; 1987; *Finn. Chem. Lett.* 14, 43.
- TAYLOR, R. J.; Shaw, D. C.; 1983; *Can. J. Bot.* 61, 279.
- THOMPSON, H. W.; Vago, E. E.; Corfield, M. C.; Orr, S. F. D.; 1950; *J. Chem. Soc.*, 214.
- THOMPSON, H. W.; Vago, E. E.; Corfield, M. C.; Orr, S. F. D.; 1950; *J. Chem. Soc.*, 214.
- TOKÉS, L.; Jones, G.; Djerassi, C.; 1968; *J. Am. Chem. Soc.* 90, 5465.
- TOOKEY, H. L.; Yates, S. G.; 1972; *An. Quím. (Madrid)* 68, 921.
- TSUKAMOTO, H.; Hisada, S.; Nishibe, S.; 1984; *Chem. Pharm. Bull.* 32, 2730.
- TULLOCH, A. P.; 1981; *Canad. J. Bot.* 59, 1213.
- UMEZAWA, T.; Davin, L.; Yamamoto, E.; Kingston, D.; Lewis, N.; 1990; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1405.
- VAN SUMERE, C.; De Pooter, H.; Ali, H.; Degrauw-Van Bussel, M.; 1973; *Phytochemistry* 12, 407.
- VON UNRUH, G.; Spitteller, G.; 1970; *Tetrahedron* 26, 3329.
- VOUKOU, D.; Margaris, N. S.; Lynch, J. M.; 1984; *Soil Biol. Biochem.* 16, 509.
- VÁGUJFALVI, D.; 1960; *Planta Med.* 8, 34.
- WALDSCHMIDT-LEITZ, E.; Kling, H.; 1967; *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* 25, 251.
- WEAST; 1980; *"Handbook of Chemistry and Physics"*, Weast, ed. 61, CRC Press.
- WEEDON, C. M.; Mantle, P. G.; 1987; *Phytochemistry* 26, 969.
- WEIDENHAMER, J. D.; Marton, T. C.; Romeo, J. T.; 1987; *J. Chem. Ecol.* 13, 1481.
- WESTON, L.; Burke, B.; Putnam, A.; 1987; *J. Chem. Ecol.* 13, 403.
- WILLIAMS, C. A.; Murray, B. G.; 1972; *Phytochemistry* 11, 2507.
- WILLIAMS, C. A.; Harborne, J.; 1974; *Phytochemistry* 13, 1141.
- WILSON, S. R.; Sawicki, R. A.; Huffman, J. C.; 1981; *J. Org. Chem.* 46, 3887.
- WONG, E.; 1980; *New Zeal. J. Sci.* 23, 39.

