

## Tesis de Posgrado

# Estudio químico de Gomphrena Martiana Moquin (Familia: Amarantacea)

Buschi, Carlos Alberto

1982

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Buschi, Carlos Alberto. (1982). Estudio químico de Gomphrena Martiana Moquin (Familia: Amarantacea). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1705\\_Buschi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1705_Buschi.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Buschi, Carlos Alberto. "Estudio químico de Gomphrena Martiana Moquin (Familia: Amarantacea)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1705\\_Buschi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1705_Buschi.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO QUIMICO DE *GOMPHRENA MARTIANA* MOQUIN  
( FAMILIA: AMARANTACEA )

CARLOS ALBERTO BUSCHI

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Ciencias Químicas

1982

1705  
e: 2,

**A mis padres**

**A mi esposa**

Agradezco a la Dra Alicia B. Pomilio, directora de esta tesis, por su interés en mi formación científica, su confianza y dedicación continua, así como por su capacidad para lograr dentro de un cálido grupo de trabajo un clima de aprendizaje constante.

Agradezco al Dr. Eduardo G. Gros, director de beca durante el transcurso de esta tesis, por su interés, apoyo y enseñanzas de él recibidas.

Agradezco también:

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme concedido Becas de Iniciación y Perfeccionamiento que hicieron posible la realización del presente trabajo.

Al Centro de Estudios Farmacológicos y Principios Naturales ( CEFAPRIN ) por cuyo intermedio recibí las becas antes mencionadas, por su importante apoyo y cordialidad que en todo momento manifestaron.

A los ingenieros A. Cabrera ( Instituto de Botánica Darwinion ) y A. T. Hunziker ( Museo Botánico, Cba. ) por el suministro e identificación del material vegetal.

Al Dr. J. C. Oberti ( Universidad de Cba. ) por el material vegetal enviado.

A la Dra. L. S. Rumi ( Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET ) por los estudios sobre acción citotóxica.

Al Dr. A. Viale ( Catédra de Microbiología e Inmunología, Dpto. de Química Biológica, FCEN-UBA ) por los estudios sobre actividad antimicrobiana.

Al Dr. J. Chopin ( Universidad Claude Bernard, Lion, Francia ) por el envío de una muestra de 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona sintética.

Al Dr. T. Matsumoto ( Universidad de Hiroshima, Japón ) por el suministro de una muestra sintética de 3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxiflavona.

Al Dr. A. S. Narula ( Universidad Nacional, Australia ) por el envío de una muestra de ciclolaudenol.

Al Dr. B. Frydman ( Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA ) por la realización de espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Al Lic. G. Aldomá por la realización de espectros de  $^1\text{H}$ -RMN.

A UMYMFOR ( CONICET-FCEN ) por la ayuda y equipo técnico suministrados.

A las Licenciadas M. Rivero y M. M. de Moglia por la realización de las cromatografías gas-líquido.

Al Sr. J. A. Aznarez por la realización de los espectros de masas y cromatografías gas-líquido acopladas a espectrometría de masas.

Al Sr. G. Arabehty, a los Doctores E. Michelotti y G. Burton, a la Srta. A. Arenaza y al Lic. A. Russo por los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN realizados.

A la Dra. B. B. Deferrari y a la Lic. Z. M. Marcote por los microanálisis realizados.

A la Dra. M. D. González , a los Licenciados A. M. Iribarren, C. D. Schteingart, R. D. Rofi y a los amigos y compañeros con los que compartí alegrías y frustraciones; por su invaluable ayuda para llevar adelante este trabajo.

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

## INDICE

### Capítulo I: FAMILIA AMARANTACEAE.

Familia <i>Amarantaceae</i>	1
Cromoalcaloides	2
Protoalcaloides	5
Saponinas	6
Ecdisteroides	9
Polifenoles	12
Género <i>Gomphrena</i>	14

### Capítulo II: ESTRUCTURAS, DISTRIBUCION e INTERRELACION BIOLOGICA DE FLAVONOIDES.

Localización en las distintas familias	19
6-hidroxiflavonas como trazadores filogenéticos en plantas superiores	22
Biosíntesis	23
Conversión de chalconas a flavonoides	23
Conversión de chalconas a flavanonoles	26
Hidroxilación del anillo B	28
Otros esquemas biosintéticos	
1.- $\alpha$ -hidroxichalconas como intermediarios	28
2.- Biosíntesis en hongos	30
Enzimas que intervienen	31
Biosíntesis de 6-hidroxiflavonoides	31
Formación de O-metil derivados	33
Origen del grupo metilendioxi	36
Regulación en la acumulación de fenilpropanoides	36
Metabolismo	38
Acción Farmacológica	39
Efecto antiateromatoso	40
Vasodilatador coronario	41
Acción antiinflamatoria	41
Efecto antitrombico y fragilidad capilar	42
Acción espasmolítica, antiviral, fungistática y bactericida	43



Acción diurética	44
Acción antitumoral	45

Capítulo III: METODOS ESPECTROSCOPICOS EN LA ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES.

1.- Espectrometría de masas	
Introducción	46
Flavonas y flavonoles	47
Fragmentos principales	50
Fragmentos provenientes de la reacción tipo retro Diels-Alder	53
Flavonas y 3-O-metilflavonoles con el anillo A trisustituido	55
5,7-dihidroxi-6- u 8-metoxiflavonas, flavonoles y metilflavonoles	56
2.- Espectroscopía de resonancia magnética protónica $^1\text{H}$ -RMN	
Introducción	60
Protones del anillo A	61
Distinción entre H-3, H-6 y H-8	62
Protones del anillo B	62
Glicósidos de flavonoides	66
Desplazamientos inducidos por solventes	67
Desplazamientos inducidos por reactivos paramagnéticos	72
3.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$ -RMN	75
Flavonas y flavonoles	77
Estudio de acoplamientos $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$	81
5-hidroxiflavonoides	82
Metoxiflavonas	84
Polimetoxiflavonas	87

Capítulo IV: ESTEROLES, 3-CETOESTEROIDES  $\alpha$ ,  $\beta$ -INSATURADOS Y TRITERPENOS TETRACICLICOS CON ANILLO CICLOPROPANO

$\Delta^7$ -esteroles	89
-----------------------	----

3-cetoesteroides $\alpha,\beta$ -insaturados	89
Formación y transformaciones	90
Triterpenos tetracíclicos con 9:19-ciclopropano	91
Biosíntesis	91
Espectrometría de masas de esteroides	
Derivados trimetilsililados de $\Delta^5$ -esteroides	93
Derivados trimetilsililados de $\Delta^7$ -esteroides	96
Fragmentaciones de 3-cetoesteroides $\alpha,\beta$ -insaturados	97
Espectrometría de masas de triterpenos tetracíclicos	101
 <u>Capítulo V: DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS</u>	
Objetivo del trabajo realizado	106
Extracción y tratamiento del material vegetal	106
1.- Estudio del Precipitado 1	
Análisis estructural de 3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxi flavona <u>98</u>	107
Análisis estructural de 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxifla vona <u>100</u>	112
Análisis estructural de 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona <u>101</u>	116
Análisis estructural de 3,5,7-trimetoxiflavona <u>104</u>	121
2.- Estudio de Residuo 1	
Hidrocarburos	124
Alcoholes	126
Triterpenos	127
Esteroides	134
Análisis estructural de 3,5,6,7-tetrametoxiflavona <u>114</u>	138
Análisis estructural de 7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona <u>115</u>	141
3.- Estudio de Residuo 2	
Análisis estructural de protoalcaloides	145
Análisis estructural de isoramnetina-3-O-robinobiósido <u>116</u>	148

Comparación y correlación de los datos espectroscópicos de flavonas  
5,6,7-trisustituidas

Espectrometría de masas	158
Espectroscopía de $^1\text{H}$ -RMN	164
Espectroscopía de $^{13}\text{C}$ -RMN	
Cálculo del desplazamiento químico de 5,7-dihidroxi- 6-metoxiflavonoides	173
Cálculo del desplazamiento químico de 5,6,7-trimeto- xiflavonoides	174
Efectos por:	
1.- Introducción de un metoxilo en C-3	176
2.- Metilación de HO-5	177
3.- Metilación de HO-7	179
4.- Formación del anillo metilendioxilo	179
5.- Entorno de los metoxilos	181

Comparación de *G. martiana* con otras especies del mismo  
género

Extracto de éter de petróleo de *G. martiana*, *G. boliviana* y  
*G. meyeniana*

Hidrocarburos	183
Triterpenos	184
Esteroles	186

*G. haenkiana*, *G. perennis*, *G. boliviana*, *G. meyeniana* y *G. martiana*

Ecdisterona <u>23</u>	194
Agliconas de flavonoides	198
Protoalcaloides	199
Conclusiones	199

Posible interrelación biosintética de los flavonoides de  
*G. martiana*

Acción citotóxica	203
Acción antimicrobiana	204

## Capítulo VI: PARTE EXPERIMENTAL

Métodos empleados	207
Estudio químico de <i>G. martiana</i>	211
Compuestos obtenidos del fraccionamiento del Precipitado 1	215
Compuestos obtenidos del fraccionamiento del Residuo 1	222
Compuestos obtenidos del fraccionamiento del Residuo 2	228
Estudio químico de <i>G. boliviana</i>	232
Estudio químico de <i>G. meyeniana</i>	237
Estudio químico de <i>G. haenkeana</i>	239
Resumen	241
Bibliografía	245

**CAPITULO I**

**FAMILIA AMARANTACEAE**

## FAMILIA AMARANTACEAE

Las *Amarantaceae* son hierbas anuales o perennes, arbustos o más raramente árboles, distribuidos en las zonas más cálidas de ambos hemisferios.

Según Schinz <sup>1</sup> esta familia está compuesta por aproximadamente 850 especies y 64 géneros pertenecientes a cuatro tribus, como se indica a continuación:

### I.- Subfamilia *Amaranthoideae* :

Tribu *Celosieae*: géneros *Deeringia*, *Pleuropetalum*, *Henonia*, *Celosia* y *Heimbstaedtia*.

#### Tribu *Amaranthiae*:

Subtribu *Amaranthinae*: géneros *Bosea*, *Allmania*, *Chamissoa*, *Charpentiera*, *Banalia*, *Apterantha*, *Lagrezia*, *Amaranthus*, *Acnida*, *Acanthochiton*, *Digera* y *Pleuropterantha*.

Subtribu *Achyranthinae* : géneros *Saltea*, *Sericostachys*, *Sericoconiopsis*, *Centemopsis*, *Kyphocarpa*, *Cyathula*, *Nelsia*, *Sericorema*, *Neocentenia*, *Centema*, *Leucosphaera*, *Pupalia*, *Marcelliopsis*, *Sericocoma*, *Leucosphaera*, *Volkensinia*, *Dasyphaera*, *Arthraenia*, *Aerva*, *Ptilotus*, *Sericocoma*, *Calicorema*, *Sericocomopsis*, *Stelbanthus*, *Mechowia*, *Nyssanthes*, *Centrostachys*, *Achyranthes*, *Achyropsis*, *Pandiaka*, *Nototrichium*, *Ptilotus*, *Dipteranthemon*, *Lopriorea*, *Chionothesis* y *Psilotrichum*.

### II.- Subfamilia *Gomphrenoideae*:

#### Tribu *Brayulineae* :

Subtribu *Brayulineinae*: sólo *Brayulinea*.

Subtribu *Tidestromiinae*: sólo *Tidestromia*.

#### Tribu *Gomphreneae*:

Subtribu *Froelichiinae* : géneros *Froelichia*, *Froelichiella*, *Pfaffia*, *Gossypianthus* y *Althernanthera*.

Subtribu *Gomphreniarae*: géneros *Woehleria*, *Dicranus*, *Gomphrena*, *Pseudogomphrena*, *Iresine*, *Lithophila* y *Phyloxerus*.

Entre las características anatómicas de dicha familia se destaca la existencia de vellos externos y ausencia de vellos glandulares ( internos ), no conociéndose otros órganos de excre

sión interna.

El estudio botánico de esta familia no está muy desarrollado en nuestro país, conociéndose sin embargo los trabajos de Pedersen <sup>2,3</sup> referentes a claves de identificación de las especies.

No se ha encarado un estudio sistemático de esta familia que permita relacionar los distintos géneros desde el punto de vista fitoquímico y establecer así las características diferenciales de cada tribu. Los estudios realizados previamente centraron su atención en la identificación de betacianinas y ecisteroides.

Las características químicas de esta familia puede resumirse así <sup>4</sup> :

- 1.- Presencia de cromoalcaloides ( betacianinas y betaxantinas ) como pigmentos.
- 2.- Acumulación de oxalato de calcio.
- 3.- Marcada tendencia a acumular sustancias hemolíticas ( en particular, saponinas triterpénicas ).
- 4.- Acumulación de nitratos.
- 5.- Acumulación de betaínas.
- 6.- Carencia de catequinas, leucoantocianas, ác. elágico, ác. gálico y pinitol.

En general, las *Amarantaceae* están relacionadas con las *Chenopodiaceae* siendo la diferencia principal entre ambas la formación de auténticos alcaloides por parte de estas últimas.

### CROMOALCALOIDES

Betacianinas y betaxantinas: las antocianas 1 son los pigmentos rojos y azules más difundidos en la naturaleza, que han sido halladas en casi todas las familias pertenecientes a las *Angiospermae*. Sin embargo otro tipo de pigmentos, denominados betacianinas 2 ( rojos ) y betaxantinas 3 ( amarillos ), que poseen nitrógeno en su estructura como heteroátomo, reemplazan a las sales de oxonio mencionadas, en las plantas pertenecientes al orden *Centrospermae* ( Fig. 1 ). Así, se encontraron betacianinas en 8 familias

( *Aizoaceae*, *Amarantaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae* y *Portulacaceae* ) <sup>5</sup> agrupadas en el orden *Centrospermae*.

Llama la atención que hasta el momento no se ha observado coexistencia de antocianinas y betacianinas en una misma planta. Estas últimas pueden encontrarse acompañadas por otra clase de pigmentos flavonoídicos. La presencia de betacianinas en lugar de antocianinas en las familias mencionadas ( orden *Centrospermae* ) y su ausencia en todos los órdenes restantes provee una de las correlaciones entre química y morfología más sorprendentes hasta el momento <sup>6</sup>. Estos cromocalcoides están presentes principalmente en flores y frutos, aunque también se encuentran en raíces y tallos; pueden formarse en condiciones patológicas como malnutrición o ataque de insectos. Se desconoce su función en los vegetales excepto cuando están presentes en flores donde pueden tener un papel similar a las antocianinas en la polinización por aves e insectos. Se ha demostrado que las betacianinas son glicósidos de betanidina 4 <sup>7</sup> y su epímero en C-15, isobetanidina ( Fig. 1).

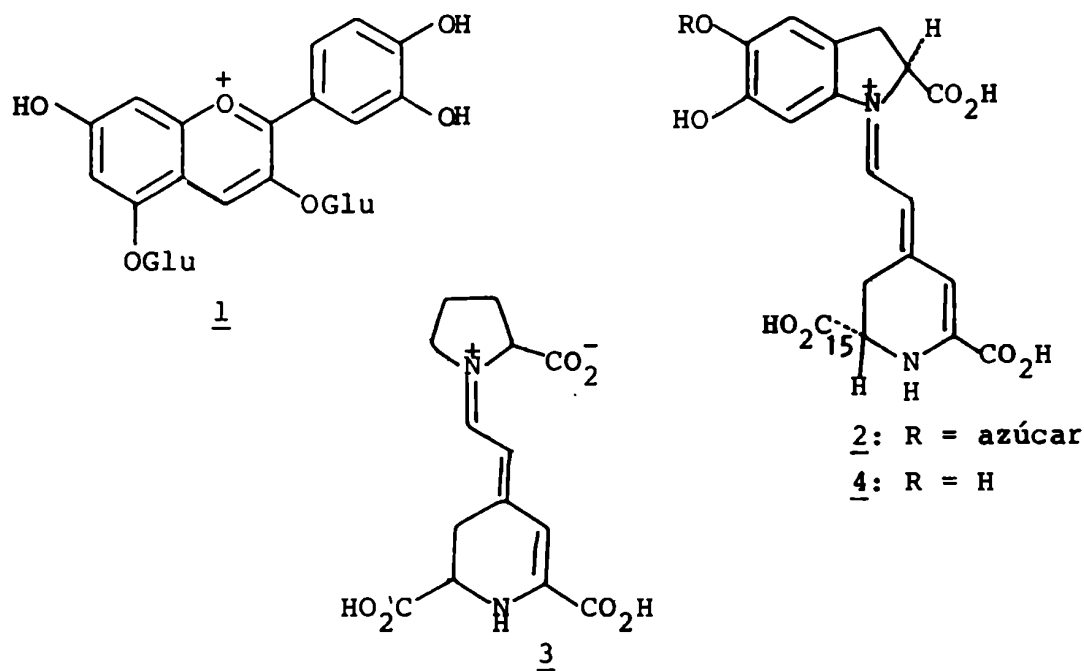


Figura 1: Colorantes presentes en los vegetales.



Se conocen las estructuras de pocas betacianinas, entre ellas betanina 5 ( betanidina-5-O- $\beta$ -D-glucopiranosido ), isobetanina ( isobetanidina-5-O- $\beta$ -D-glucopiranosido ), amarantina ( betanidina-5-O-[2-O-( $\beta$ -D-glucopiranosiluronil)- $\beta$ -D-glucopiranosido] ) 6 e isoamarantina ( isobetanidina-5-O-[2-O-( $\beta$ -D-glucopiranosiluronil)- $\beta$ -D-glucopiranosido] ). Se identificaron también betacianinas aciladas, como iresinina I 7 aislada de *Iresine herbstii* <sup>8</sup> ( Fig. 2 ).

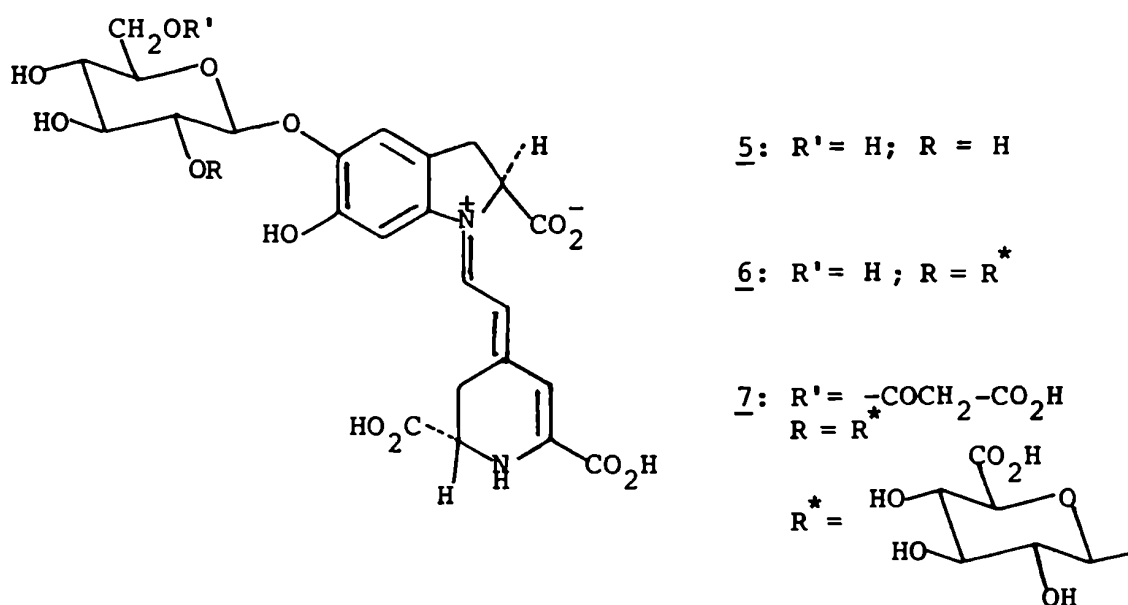
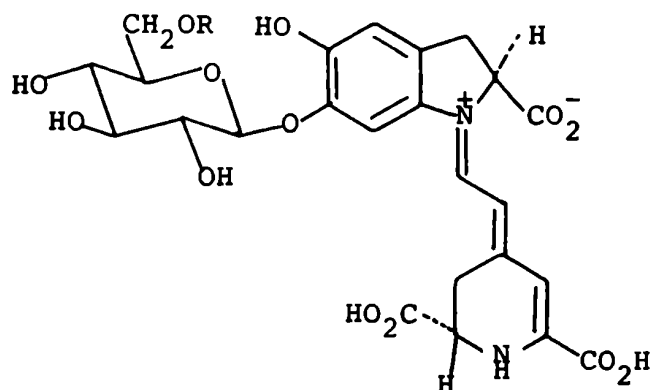


Figura 2: Estructuras de algunas betacianinas aisladas de la familia *Amarantaceae*.

Se comprobó además la presencia de betacianinas en especies de los géneros *Amaranthus*, *Aerva*, *Alternanthera*, *Celosia*, *Froelichia*, *Gomphrena* y *Tidestromia* <sup>4,9</sup>.

Respecto al género *Gomphrena* sólo se identificaron algunas de las betacianinas presentes en *G. globosa* <sup>10</sup> resultando ser 8 pigmentos violetas llamadas gonfréninas I-VIII ( Fig. 3 ).



Gonfrenina I: R = H

Gonfrenina III: R =  $-\text{COCH}=\text{CH}-p\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$  (*cis-p-cumarillo*)

Gonfrenina V: R =  $-\text{COCH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_3\text{-4-hidroxi-3-metoxi}$  (*trans-ferulillo*)

Figura 3: Estructuras de betacianinas aisladas de *Gomphrena globosa*.

Se tuvo evidencia de la presencia de estos pigmentos en *Gomphrena martiana* sin realizar caracterización alguna <sup>11</sup>.

### PROTOALCALOIDES

Si bien no se conocen alcaloides auténticos en esta familia, excepto la 4-metoxi-6-cantirona <sup>8</sup> aislada de una especie endémica de Hawai, *Charpentiera oboata* <sup>12</sup>, se encuentran muy difundidas las betaínas y compuestos nitrogenados menores, que se han agrupado bajo el nombre de protoalcaloides.

La betaína <sup>9</sup> se halla distribuida en la naturaleza por ser producto del metabolismo vegetal. Por tanto, su presencia en la familia en estudio no es llamativa, pero sí es específica la acumulación de grandes cantidades de esta sustancia en *Amaranthaceae*; por ej.: en *Amaranthus caudatus* ( 2,18 % ), *Amaranthus retroflexus* ( 0.96 % ) y *Amaranthus lividus* ( 0.53 % ) <sup>4</sup>. Este hecho se re

pite en la familia *Chenopodiaceae* del mismo orden que *Amarantaceae*.

La trigonelina 10 resultó ser otra betaína presente en *Amaranthus retroflexus*<sup>13</sup>, acompañada de colina 11. Se aislaron además betaína y colina de *Amaranthus paniculatus*<sup>14</sup>, *Achyranthes aspera*<sup>15</sup> y *Achyranthes faurieri*<sup>16</sup> ( Fig. 4 )

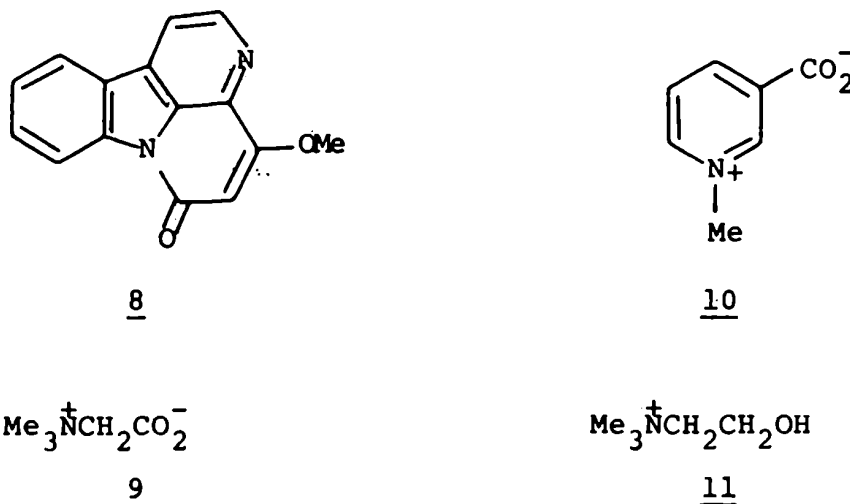


Figura 4: Alcaloides aislados de la familia *Amarantaceae*.

### SAPONINAS

Se encuentran muy distribuidas en las *Amarantaceae*, ya que a pesar de haber sido estudiado un número pequeño de especies, la mayoría de ellas presentaban este tipo de compuestos<sup>4</sup>.

Se aislaron saponinas triterpénicas de semillas de *Achyranthes aspera*<sup>17-19</sup>, planta originaria de la India con propiedades diuréticas y antiespasmódicas, identificadas como:

Saponina A: ácido  $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucuropiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-oleanólico 12.

Saponina B:  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 28)-éster de la saponina A 13 ( Fig. 5 )

También se encontraron en semillas de *Achyranthes bidentata*<sup>20</sup>, *Amaranthus spinosus*<sup>21</sup> y *Alternanthera philoxerous*<sup>22</sup>. En todos los casos resultaron ser 3-O-glicósidos del ácido oleanólico.



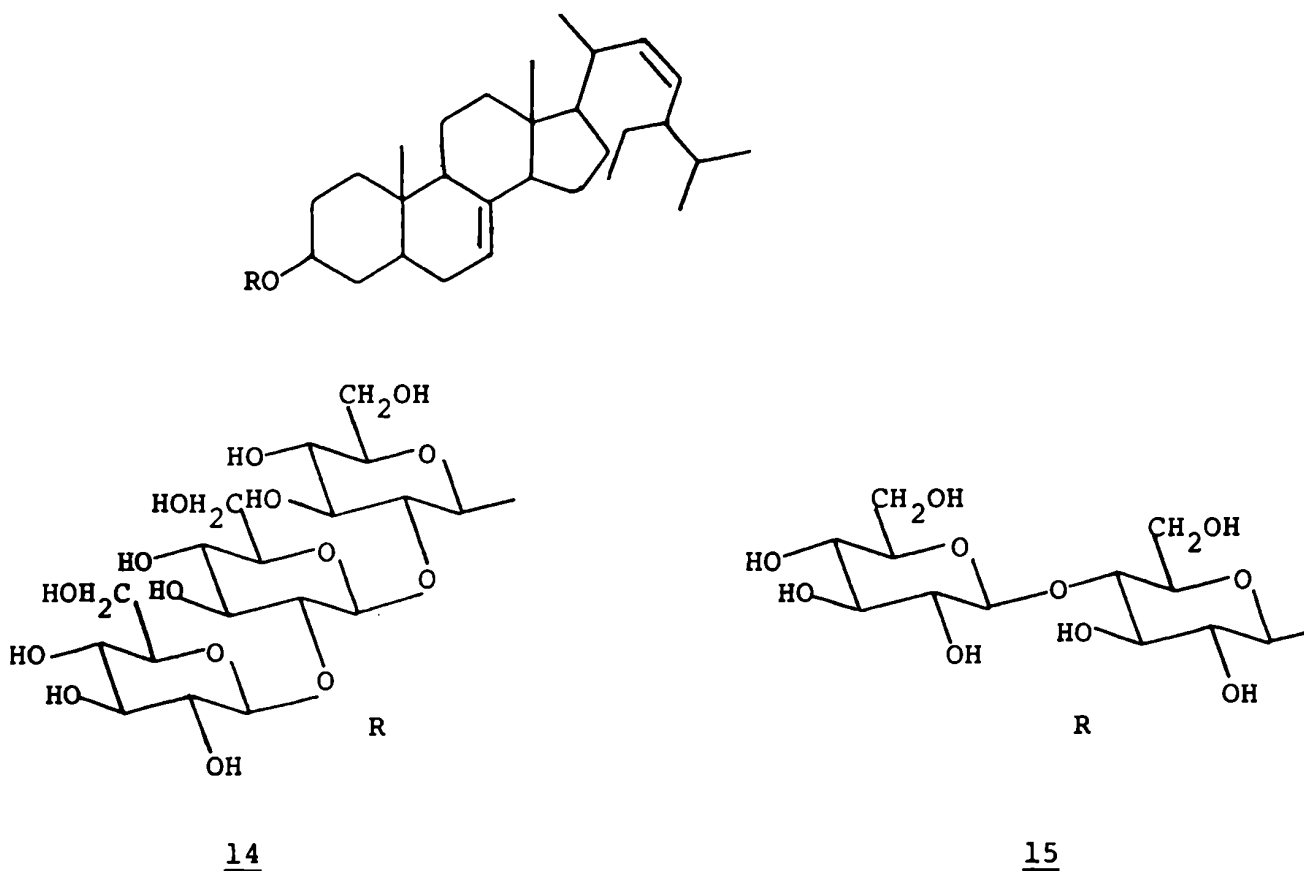


Figura 6: Saponinas esteroidales aisladas de *Amaranthus spinosus*.

### SESQUITERPENOS, ESTEROLES y TRITERPENOS

Se detectaron lactonas sesquiterpénicas en hojas de distintas especies de *Iresine*, identificándose sólo las presentes en hojas de *Iresine celosioides* como iresina 16<sup>24</sup> ( 0,36 % ), dihidroiresona 17 ( 0,0004 % ), dihidroiresina 18 e isoiresina 19<sup>25</sup> ( Fig. 7 ).

Se encontraron triterpenos y esteroides en las siguientes especies:

*Iresine prinqli*: 0,001 % de fridelina y 0.012 % de esteroides ( Fig. 8 ) ( mezcla de estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol y

$\alpha$ -espinasterol, en parte esterificados con ácido benzoico <sup>26</sup> .

*Alternanthera sessilis*: lupeol <sup>27</sup> , 24-metilencicloartanol, cicloeucalenol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol,  $\alpha$ -espinasterol, 5 $\alpha$ -estigmast-7-en-3-ol y los palmitatos de los esteroides precedentes <sup>28</sup> ( Fig. 8 ) .

*Achyranthes faurieri*:  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -glucósido, estigmasterol-3-O- $\beta$ -glucósido, estigmasterol y sitosterol <sup>16</sup> .

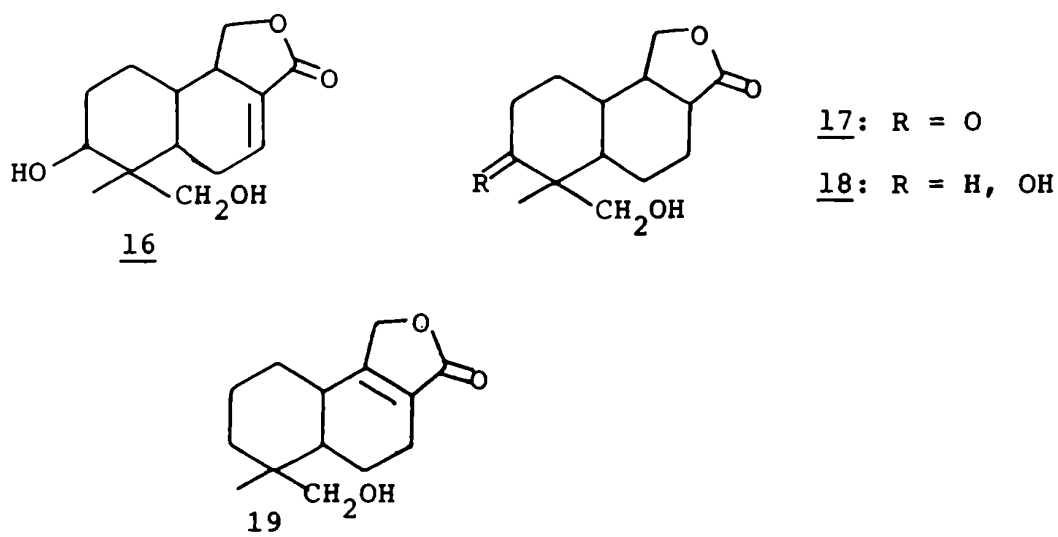
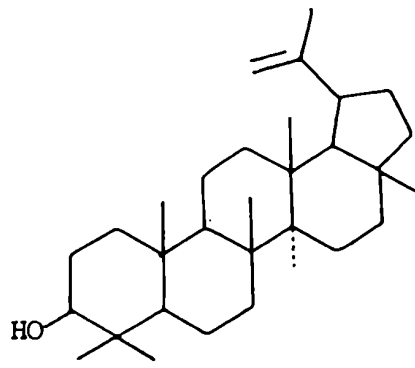


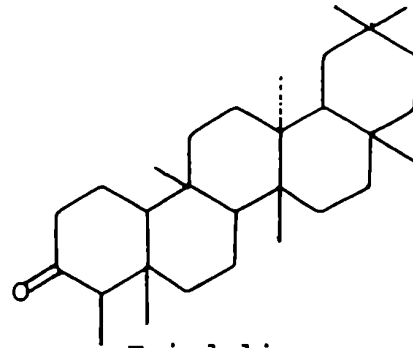
Figura 7: Sesquiterpenos aislados de *Iresine celosioides*.

### ECDISTEROIDES

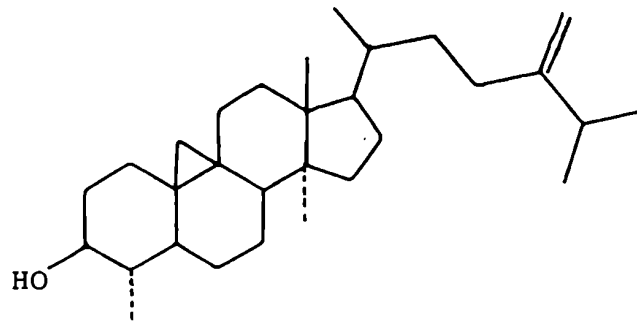
Las fitoecdisonas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal <sup>29,30</sup> , siendo la más difundida la ecdisterona 20 compuesto de 27 carbonos aislado de *Polipodium japonicum*, *Trillium smallii*, especies de *Ajuga* <sup>31</sup> y de pino australiano <sup>32</sup> . La estructura de este compuesto resultó coincidente con la crusteodisona 20, hormona de muda de insectos.



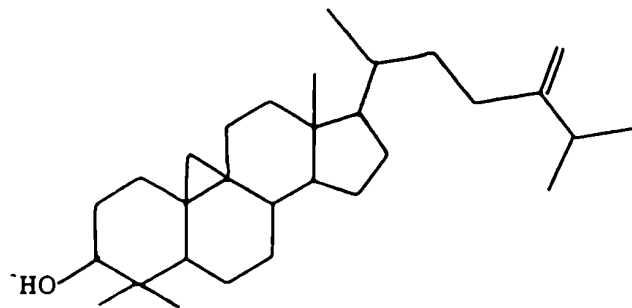
Lupeol



Friedelina



Cicloeucaleanol



24-metilencicloartanol

Figura 8: Triterpenos y esteroides de *Alternanthera sessilis*.

Dentro de las *Amarantaceae* se encuentran en relativa abundancia este tipo de compuestos <sup>33</sup> con estructura normal como 20 y 21, y en el género *Cyathula* con la particularidad de poseer lactonas de 5 y 6 miembros en la cadena lateral.

Ecdisterona 20 e inocosterona 21 se aislaron de *Achyranthes aspera*, *A. rubrofusca*, *A. longifolia* y *Cyathula prostrata* <sup>34-37</sup>, ( Fig. 9 ).

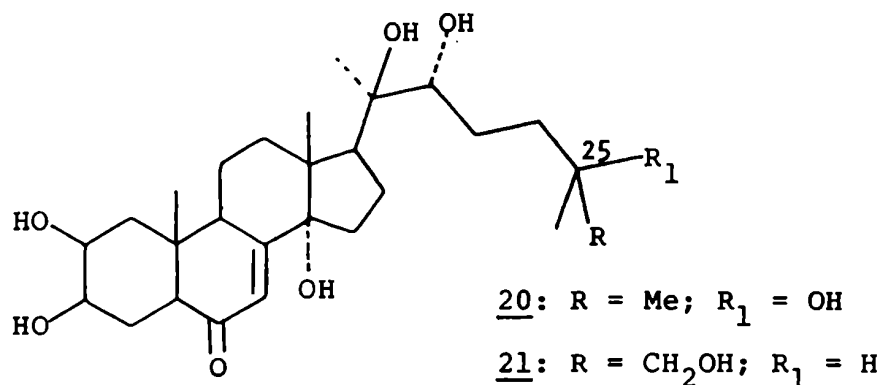


Figura 9: Estructura de ecdisterona 20 e inocosterona 21

La configuración absoluta de inocosterona 21 se determinó como una mezcla epimérica en C-25 de 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,20 ( R ), 22 ( R ), 26-hexahidroxiprost-7-en-6-ona <sup>38</sup>.

La planta *Cyathula capitata*, utilizada en medio Oriente como tónico y diurético, posee sustancias lactónicas de 29 carbonos que producen metamorfosis de insectos. Entre ellas se encuentran ciasterona <sup>39</sup> 22, capitasterona <sup>39</sup> 23, sengosterona <sup>40,41</sup> 24, preciasterona <sup>42</sup> 25, isociasterona 26 y epiciasterona <sup>43,44</sup> 27 y ecdisteroides sin grupo lactónico como amarasterona A 28 y amarasterona B 29 <sup>45</sup>, ( Fig. 10 ).

Se aisló también un metabolito de estos ecdisteroides en *Cyathula capitata* que se identificó como 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,14 $\alpha$ -trihidroxi-5- $\alpha$ -pregn-7-en-6,20-diona <sup>46</sup> 30. Es también interesante mencionar que se registró una patente sobre la extracción de rubrosterona 31 aislada de diversas plantas pertenecientes a la familia *Amarantaceae* <sup>47</sup>, que resultó ser útil como hormona de muda, ( Fig.11 ).



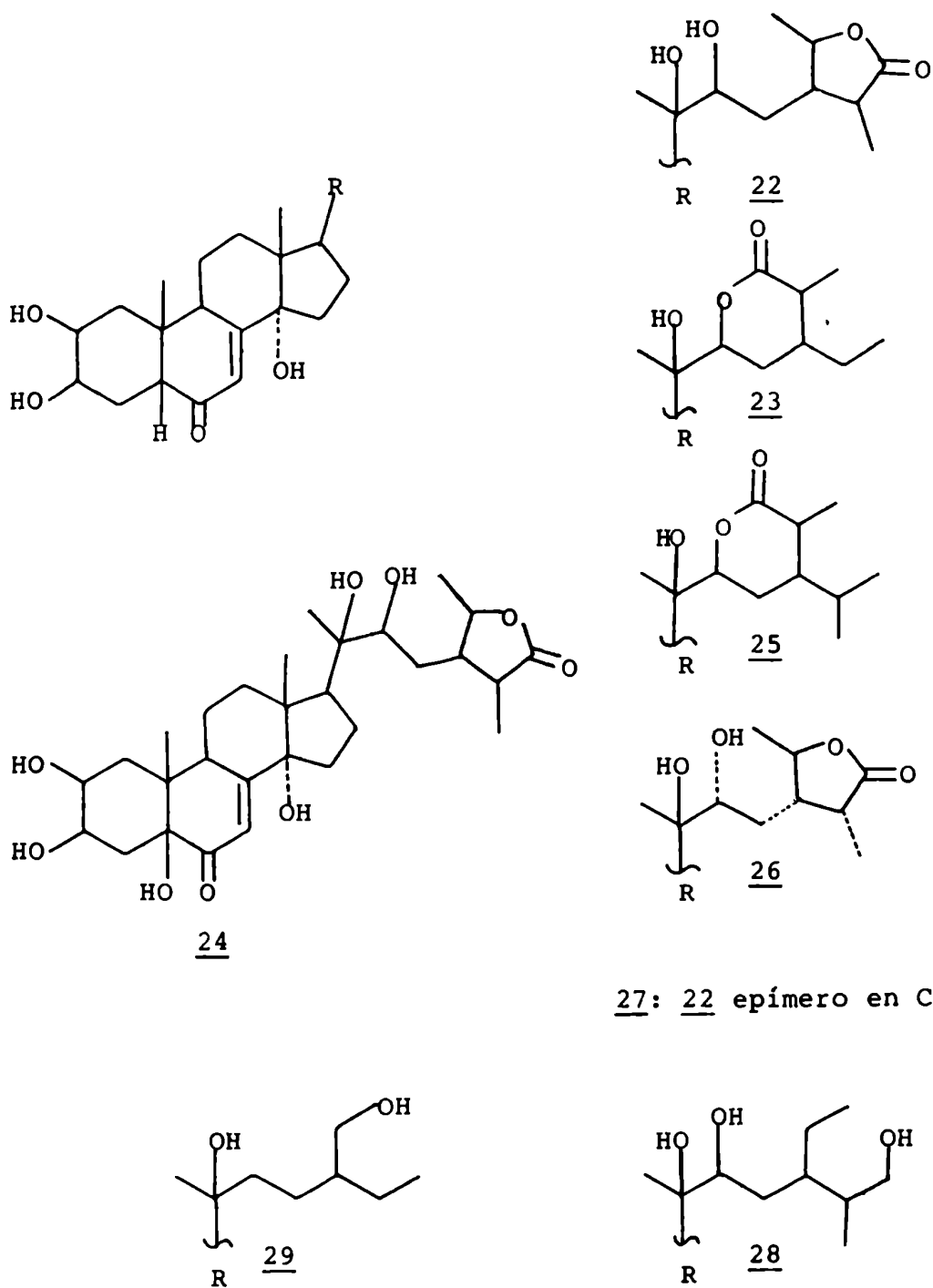
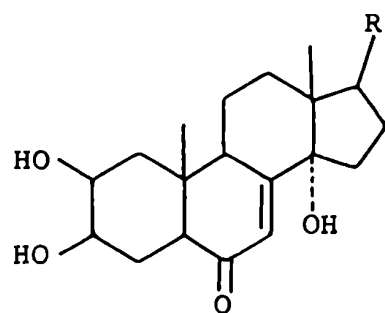


Figura 10: Ecdisteroides aislados de *Cyathula capitata*.



30: R = COMe

31: R = H

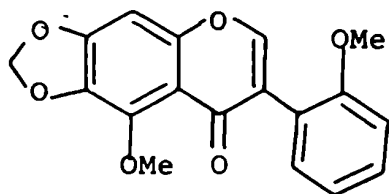
Figura 11

### POLIFENOLES

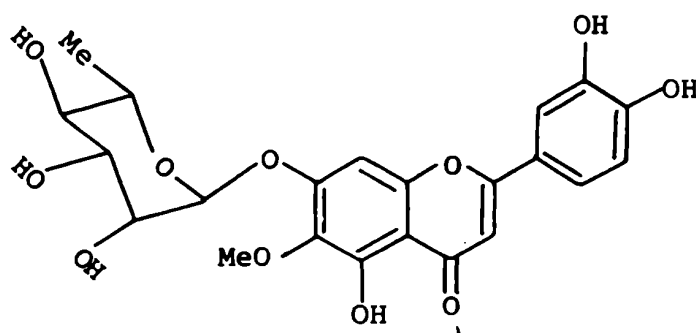
La familia *Amarantaceae* es pobre en polifenoles <sup>4</sup>. Se han identificado O-glicósidos de quercetina en especies del género *Amaranthus* y de canferol en el género *Celosia* <sup>4,48-50</sup>.

Un flavonoide con estructura llamativa, denominado tlatlacuayina 32, se obtuvo de *Iresine celosioides* y posee un grupo metilendioxilo unido a los C-6 y C-7 y un metoxilo en C-2' como características más salientes <sup>51</sup>.

Otro O-glicósido menos común, 6-metoxiluteolina-7-O- $\alpha$ -L-ramnósido 33 de *Alternanthera phylloxeroides* <sup>52</sup>, resultó ser uno de los compuestos responsables de la preferencia alimentaria hacia esta planta manifestada por insectos fitófagos como el escarabajo *Agasicles*.



32



33



GENERO GOMPHRENA

Existen unas 90 especies en ambos hemisferios, predominantemente en las regiones tropicales. En la Argentina crecen alrededor de 30 especies <sup>55,56</sup> .

Los estudios químicos realizados hasta el presente se refieren principalmente al aislamiento de betacianinas <sup>10</sup> y un flavonol <sup>54</sup> de *G. globosa*, aislamiento e identificación de eodisterona de *G. celosioides* <sup>57</sup> y detección de betacianinas en *G. martiana* <sup>11</sup> .

La planta *Gomphrena martiana*, objeto de estudio de esta tesis, fue descrita originariamente por Moquín <sup>58</sup> . Es una hierba perenne de Sudamérica austral, conocida vulgarmente como "solo" <sup>59</sup> o "yerba de pollo" <sup>55</sup> , de uso en medicina popular. Hieronimus indica que esta especie junto con otras relacionadas tiene propiedades diuréticas y es a su vez suavemente laxante y emoliente <sup>59</sup> .

No se conoce, sin embargo, trabajo alguno en nuestro país vinculado a los aspectos químicos y medicinales de esta planta.

**CAPITULO II**

**ESTRUCTURA, DISTRIBUCION E**

**INTERRELACION BIOLOGICA DE FLAVONOIDES**

ESTRUCTURAS, DISTRIBUCION E INTERRELACION BIOLOGICA DE FLAVONOIDES

Esta familia de metabolitos secundarios es una de las más distribuidas dentro de las plantas superiores.

Se caracterizan todos ellos por tener un esqueleto común, de 15 carbonos, que puede esquematizarse como  $C_6-C_3-C_6$ . A esta fórmula general responden un número grande de compuestos; los principales son: flavonas, flavonoles, chalconas, flavanonas, auronas e isoflavonas ( Fig. 12 ).

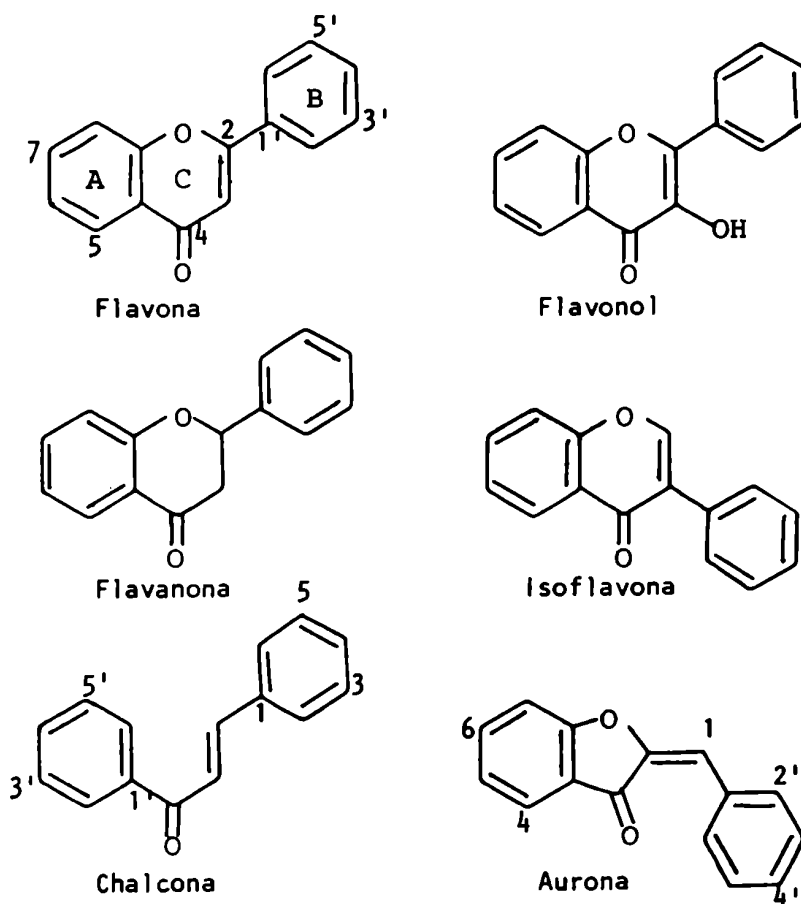
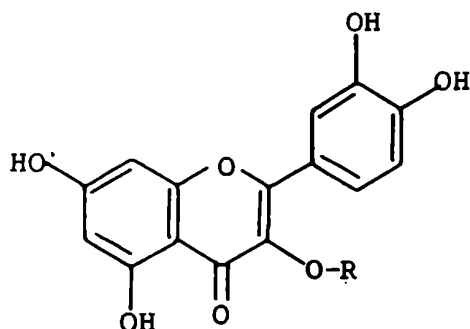


Figura 12: Principales tipos de flavonoides.

Se conocen más de 2000 flavonoides hasta el presente, los compuestos más abundantes dentro de este grupo son las flavonas y flavonoles ( 3-hidroxi~~flavonas~~ ), encontrándose principalmente como glicósidos, por ej.: rutina 36, que al ser solu-



36, R =  $\alpha$ -L-ramnosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosilo

bles en agua se encuentran fundamentalmente en el líquido celular.

Se conocen también un gran número de flavonoides libres ( agliconas: 460; 121 flavonas, 175 flavonoles, 46 flavanonas, 26 dihidroflavonoles, 47 chalconas, 6 dihidrochalconas y 39 C-metilderivados ) que sufren un incremento constante, así en 1975 sólo se habían descrito 334<sup>60</sup>. Debe notarse que no se han encontrado en la naturaleza todos los derivados metilados posibles para cada esquema de sustitución de las agliconas de flavonoides. Así, se conocen 4 de los 7 posibles metil éteres de la galangina ( 3,5,7-trihidroxi~~flavona~~ ), 10 de 15 para el canferol ( 3,5,7,4'-tetra~~hidroxi~~flavona ) y 19 de 31 en el caso de quercetina ( 3,5,7,3',4'-penta~~hidroxi~~flavona ) ( Fig. 13 ) .

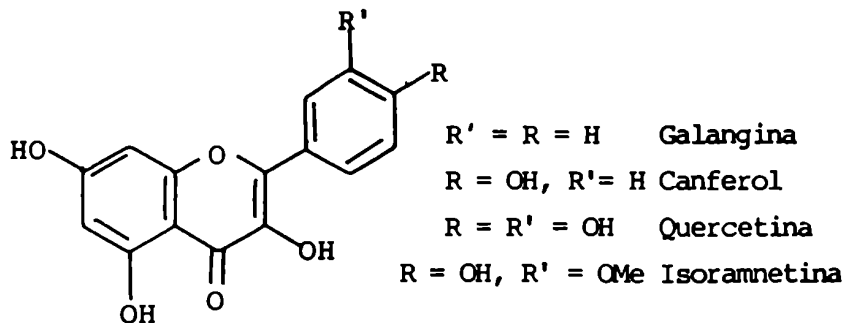
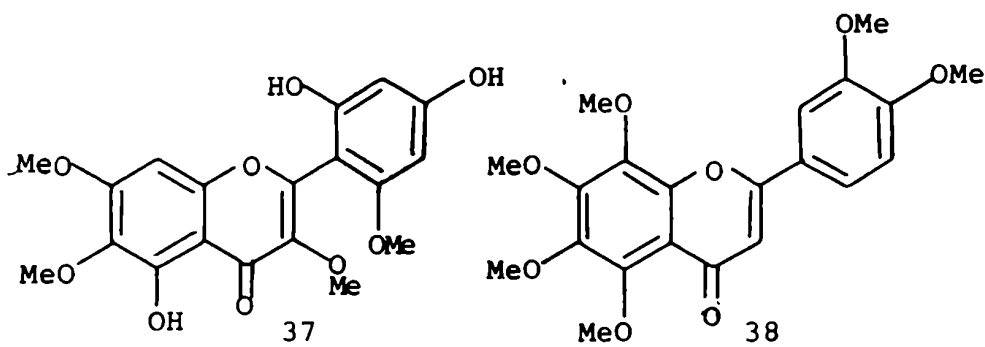


Figura 13

Los flavonoides muy sustituidos tienden a encontrarse en forma altamente metilada. Así, por ejemplo se aisló 5,4',6'-trihidroxi-3,6,7,2'-tetrametoxiflavona 37 del exudado del helecho *Notholaena asehenborneana*<sup>61</sup> y 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona 38 de cáscaras de *Citrus reticulata*<sup>62</sup>.



Dentro de las estructuras no usuales de flavonas y flavonoles, las más difundidas son las que presentan sustituyentes adicionales en las posiciones 6- y 8-. La sustitución en posición 2'- es rara y su aparición dispersa, mientras que son aún más raras las sustituciones en 6,2'- y 8,2'-.

#### Localización dentro del vegetal

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

Los monometil éteres como isoramnetina, aparecen frecuentemente como glicósidos. A su vez, la isoramnetina y canferol ( Fig. 13 ), están ampliamente distribuidos como agliconas. Su naturaleza lipídica no permite su acumulación en el líquido celular, sino en zonas extracelulares, por ej.: glándulas oleosas en cáscara de *Citrus*.

Debe existir una correlación entre la presencia de agliconas libres y ciertas estructuras vegetales. Hänsel<sup>63</sup> fue quien primeramente prestó atención a estas correlaciones. Al



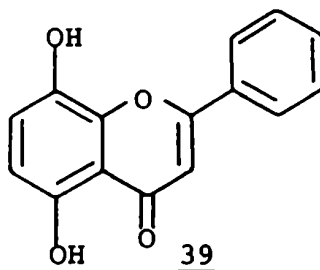
gunas plantas, en conexión con sus actividades metabólicas, desarrollan estructuras anatómicas especializadas por medio de las cuales ciertos productos pueden ser excretados. En especial, plantas productoras de aceites esenciales, poseen estructuras de almacenaje como celdas, cavidades y conductos oleosos.

Hänsel arriva a las siguientes conclusiones:

1.- Flavonoides glicosidados: ( antocianas, glicósidos de flavonoles tipo rutina 36 ) se encuentran en las vacuolas como pigmentos disueltos en el líquido celular ( tipo A ) .

2.- Hidroxiflavonoides libres: se encuentran en plantas leñosas, preferentemente en tejidos muertos, como excreciones de la madera ( tipo B ).

3.- Flavonoides lipofílicos: poseen un número bajo de hidroxilos y un número grande de metoxilos. Se encuentran principalmente en cavidades o excreciones celulares, o como constituyentes de las ceras epicuticulares de las hojas ( tipo C ), por ej.: la primetina 39 recubre las hojas de numerosas especies de *Primula* y la nobiletina 38 se encuentra en las excreciones de frutos de *Citrus* <sup>60,63</sup> .



En algunos casos las agliconas de flavonoides también se localizan abundantemente en la parte externa de las hojas, como ejemplo se pueden citar las harinas externas de helechos de las *Gymnogrammoideae*, especialmente las pertenecientes a los géneros *Cheilanthes*, *Notholaena* y *Pityrogramma* y harina de especies de *Primula*.

En el caso del género *Larrea* (*Zygophyllaceae*) las a-

gliconas son constituyentes de una resina que cubre las hojas y ramas <sup>64</sup>. Se encontraron también flavonoides en la capa epicuticular de hojas de *Eucalyptus* ( *Myrtaceae* ) entre los numerosos ejemplos de flavonoides depositados externamente.

Como las sustancias fenólicas generalmente tienen una actividad antibacteriana significativa, se supuso que su acumulación en tejidos tendría como fin actuar como barrera contra la invasión de microorganismos. Esto está de acuerdo con lo postulado por Swain <sup>60</sup> respecto a que los flavonoides metilados lipofílicos serían una protección adecuada contra microorganismos a causa de la facilidad que presentan para atravesar membranas. El hecho de que dos flavonoides se encuentren al menos en trazas en las capas epicuticulares de una variedad de vegetales parece favorecer esta hipótesis.

#### Localización en las distintas familias

En base a los estudios realizados hasta el momento se verifica que las agliconas de flavonoides se acumulan en ciertas familias y géneros. Debe recordarse, sin embargo, que las plantas son estudiadas generalmente por algún interés, farmacológico, quimiotaxonómico, etc., y también que sólo ciertas áreas geográficas han sido analizadas en detalle.

En la Tabla 1 se ve la distribución de agliconas en algunas familias y se indican el número de flavonoides encontrados en cada una de ellas. La familia *Asteraceae* citada en primer lugar presenta flavonas y flavonoles sustituidos en posición 6- y 8-. Es sorprendente que todos los flavonoides encontrados en esta familia estén restringidos a una sola tribu ( *Tubuliflorae* ), que es la única que posee vellos glandulares, conductos oleosos y conductos resinosos o simples celdas de látex que producen aceites esenciales y bálsamos.

Dentro de las *Leguminosae* ( segundo lugar en la Tabla 1 ) la mayoría de las agliconas son flavonoles, muchos de los cuales son 5-desoxi o bien 6- u 8- sustituidos. Esta familia raramente posee estructuras secretoras, pero ciertos repre-

sentantes leñosos producen bálsamos, aunque la familia como un todo no forma metabolitos liposolubles. Es sorprendente por tanto que esta familia ocupe el segundo lugar.

Las *Rutaceae*, con cavidades oleosas <sup>60</sup>, producen flavonas y flavonoles en abundancia, la mayoría de ellos sustituidos en las posiciones 6- y/u 8-. Harborne <sup>65</sup> indica que esta familia es extremadamente versátil en su capacidad sintética para producir un amplio rango de flavonoides altamente sustituidos, caracterizados por el alto grado de metilación y grupos adicionales en posiciones 6- , 8- o 2'-, presencia de grupos metilendioxilo y cadenas isoprenoides.

Tabla 1: Distribución de agliconas de flavonoides en distintas familias de plantas.

	Flavonas	Flavonoles	Flavanonas	Dihidroflavonoles	Chalconas	Dihidrochalconas	Flavonoides C-Metilados
<i>Asteraceae</i>	46	63	16	4	12	-	-
<i>Leguminosae</i>	18	25	-	11	13	-	1
<i>Polypodiaceae</i>	9	31	6	-	4	2	13
<i>Rutaceae</i>	23	25	2	-	4	-	-
<i>Betulaceae</i>	9	34	6	1	1	-	
<i>Lamiaceae</i>	34	7	-	1	-	-	
<i>Rosaceae</i>	2	8	9	4	2	-	-
<i>Didieraceae</i>	-	13	-	-	-	-	11
<i>Zygophyllaceae</i>	3	14	2	1	1	-	-
<i>Pinaceae</i>	2	3	2	4	1	-	8
<i>Salicaceae</i>	-	13	4	1	1	1	-
<i>Rubiaceae</i>	18	-	-	1	-	-	

## Filogenia

Es el estudio del origen y evolución de los taxones. En el caso de las *Angiospermae*, el mayor grupo de plantas ( 250.000 ), es difícil entender su evolución ya que existen muy pocos fósiles como evidencia. Sin embargo, se construyeron árboles filogenéticos basados en la evaluación de las relaciones morfológicas existentes. Las principales tendencias dentro de la evolución vegetal están ampliamente aceptadas, así por ej.: las *Angiospermae* son más avanzadas que las *Gimnospermae*.

Es de interés la comparación de los componentes químicos de especies primitivas con los de especies avanzadas. En el caso de los flavonoides, hay una tendencia evolutiva general hacia estructuras más complejas y los compuestos más sustituidos se concentran en familias altamente especializadas como por ej.: *Leguminosae*. En cambio, las estructuras más simples se encuentran en *Angiospermae* primitivas como *Magnolaceae* o *Ranunculaceae* y flavonoides aún más simples en órdenes menos desarrollados ( *Gimnospermae*, helechos y musgos ). El hecho de que la complejidad de los flavonoides está relacionada con el avance morfológico no constituye en sí mismo un conocimiento mayor de la evolución del vegetal. La química representa una contribución importante a la filogenia ( Tabla 2 ) porque el origen biosintético de la mayoría de los constituyentes vegetales es conocido o puede ser determinado. Así, diferentes flavonoides pueden colocarse secuencialmente en un determinado camino biosintético  $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$ , y es lícito aceptar que una planta que produce sólo A tiene a su disposición menos enzimas que la planta que produce E, por tanto A corresponde a un organismo más simple.

El reemplazo de flavonoles por flavonas está relacionado con la sustitución de hábitos leñosos por herbáceos. Por supuesto, pueden encontrarse excepciones pero la posibilidad de usar la información así obtenida para solucionar problemas biológicos incentiva el estudio de estos pigmentos <sup>66</sup>.

Tabla 2: Evolución estructural de los flavonoides.

Caracteres primitivos:

- 1.- 3-desoiantocianidinas
- 2.- flavonoles
- 3.- leucoantocianidinas
- 4.- chalconas, flavanonas y dihidrochalconas
- 5.- C-sustitución ( C-metilación, C-prenilación, C-glicosidación y formación de biflavonoides).

Caracteres avanzados:

a) Mutaciones ganadas:

- 1.- O-glicosidación compleja
- 2.- hidroxilación en C-6 y C-8
- 3.- hidroxilación en C-2'
- 4.- O-metilación
- 5.- oxidación de chalconas a auronas
- 6.- trihidroxilación del anillo B en antocianidinas..

b) Mutaciones pérdidas:

- 1.- reemplazo de flavonoles por flavonas
- 2.- eliminación de leucoantocianidinas
- 3.- eliminación de trihidroxilación en el anillo B de flavonoles.

6-Hidroxiflavonas como trazadores filogenéticos en plantas superiores

Este tipo de flavonas aparece irregularmente a nivel de especies, pero tiene interés filogenético comparar la distribución de las 6- y 8- hidroxiflavonas. Lo más sorprendente es que las 8-hidroxiflavonas se encuentran en familias correspondientes a las *Angiospermae*, que retienen muchas características morfológicas primitivas ( por ej.: *Ericaceae* ) o que pueden considerarse como primitivas ( *Ranunculaceae* ), las 6-hidroxiflavonas están presentes, en cambio, en familias altamente evolucionadas. Esto sugiere que aparte del desarrollo evolutivo flavonol → flavona, ha habido también un cambio en el sitio de hidroxilación del anillo A de la posición 8- a 6- ; una tendencia evolutiva sería entonces: 8-hidroxiflavonas, 6- y 8-hidroxiflavonas, y 6-hidroxiflavonas<sup>67</sup>.

## BIOSINTESIS

Se logró considerable progreso en la elucidación de la biosíntesis de flavonoides con la ayuda de compuestos marcados isotópicamente.

Está bien establecido que el anillo A de los flavonoides e isoflavonoides se forma por la condensación cabeza-cola de 3 unidades de acetilo, mientras que el anillo B y los carbonos 2,3 y 4 se originan de una unidad intacta de fenilpropano. En el caso de los isoflavonoides, ocurre una migración del grupo arilo del C-2 al C-3 durante la biosíntesis<sup>68</sup>, ( Fig. 14 )

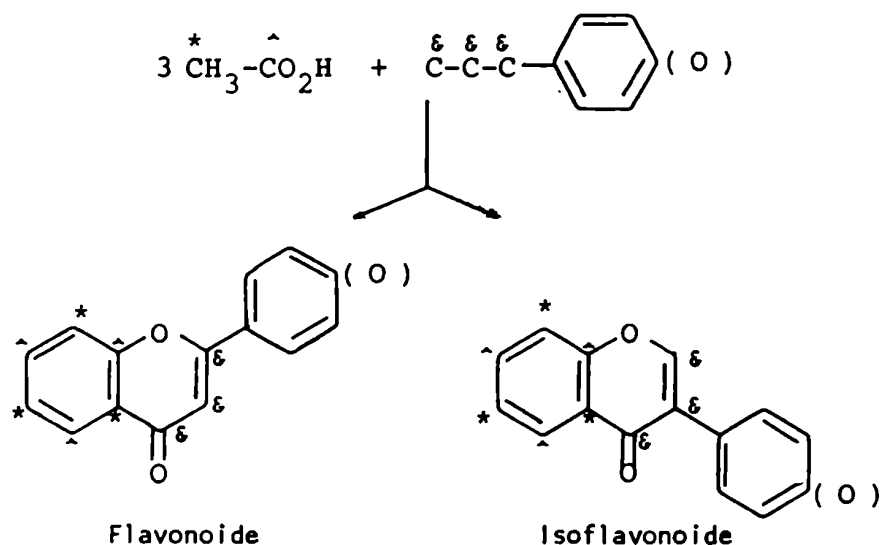
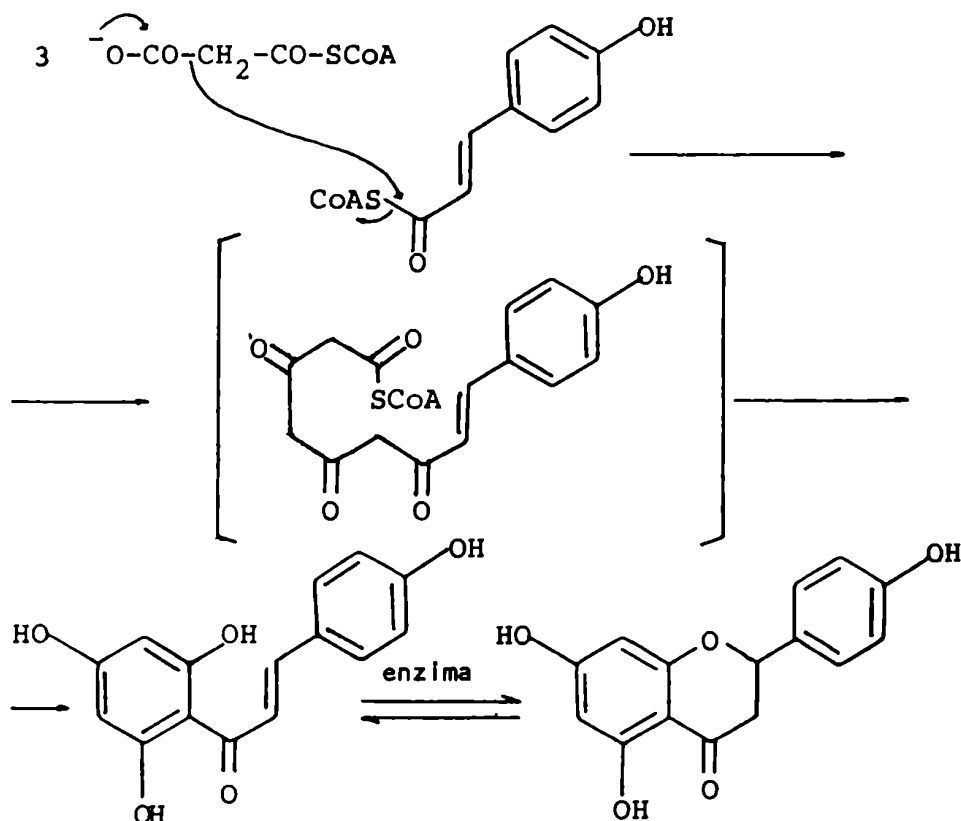


Figura 14: Origen de los átomos de carbono en flavonoides e isoflavonoides.

Grisebach<sup>69</sup> postuló que la primera reacción en la biosíntesis de flavonoides era la condensación de un ácido cinnámico activado con 3 moléculas de malonil coenzima A. El primer intermediario estable formado es una chalcona, ( Fig. 15 ). La chalcona formada se encuentra en equilibrio enzimático con la flavanona<sup>70</sup>.

### Conversión de chalconas a flavonoides

Las chalconas y flavanonas han demostrado ser pre-

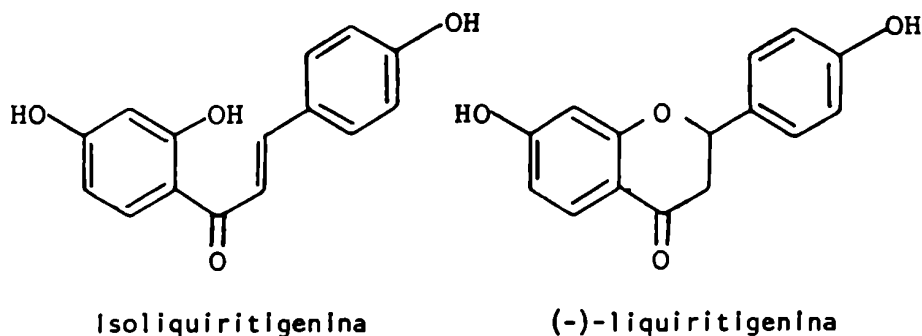


**Figura 15:** Formación hipotética de una chalcona a partir de malonil CoA y p-cumaroil CoA.

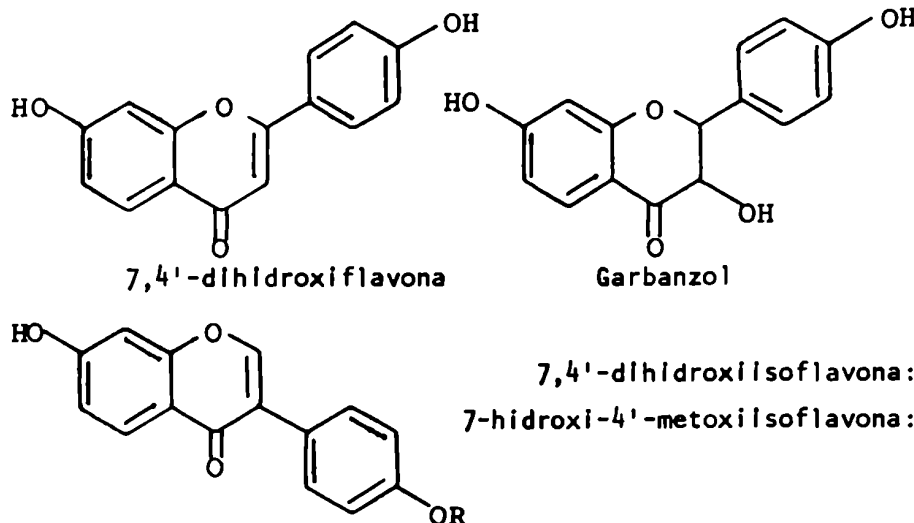
cursores de muchas clases de flavonoides. Sin embargo, estudios enzimáticos y experiencias *in vitro* demostraron que ambas son interconvertibles y quedaba por saber cuál de las dos era realmente el precursor.

Wong <sup>71,72</sup> y Grisebach <sup>73</sup> efectuaron experiencias paralelas con brotes de trébol (*Trifolium subterraneum*) y brotes de garbanzo (*Cicer arietinum*) utilizando:

- 1.- (<sup>14</sup>C)-isoliquiritigenina diluida con una cantidad igual de (-)-liquiritigenina sin marcar.
- 2.- (-)-(<sup>14</sup>C)-liquiritigenina diluida con isoliquiritigenina.



Se aislaron y purificaron los productos radiactivos del trébol: 7,4'-dihidroxi flavona , 7,4'-dihidroxiisoflavona ( daidzeína ) y 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona. De los brotes de garbanzo se aisló 7,4'-dihidroxi flavanonol (garbanzol) .



Las actividades específicas presentadas por estos productos fueron mayores en el caso 1.- . Estos resultados indican, contra lo esperado <sup>74-76</sup> , que las flavonas e isoflavonas se forman más directamente a partir de las chalconas.

Las relaciones biogénicas se indican en la Figura 16, si bien no está totalmente claro cómo ocurren estas transformaciones.



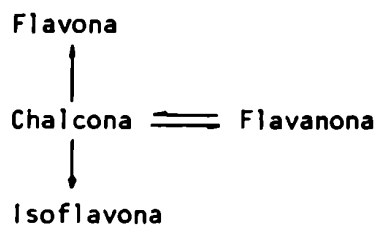


Figura 16: Relaciones biosintéticas entre distintos flavonoides.

Conversión de chalconas en flavanones

Según experiencias realizadas por Grisebach<sup>68</sup> existen dos caminos posibles para convertir chalconas en flavanones: formación de un epóxido y posterior transformación de éste en flavanonol, u oxidación directa de una flavanona ( Fig. 17 ) .

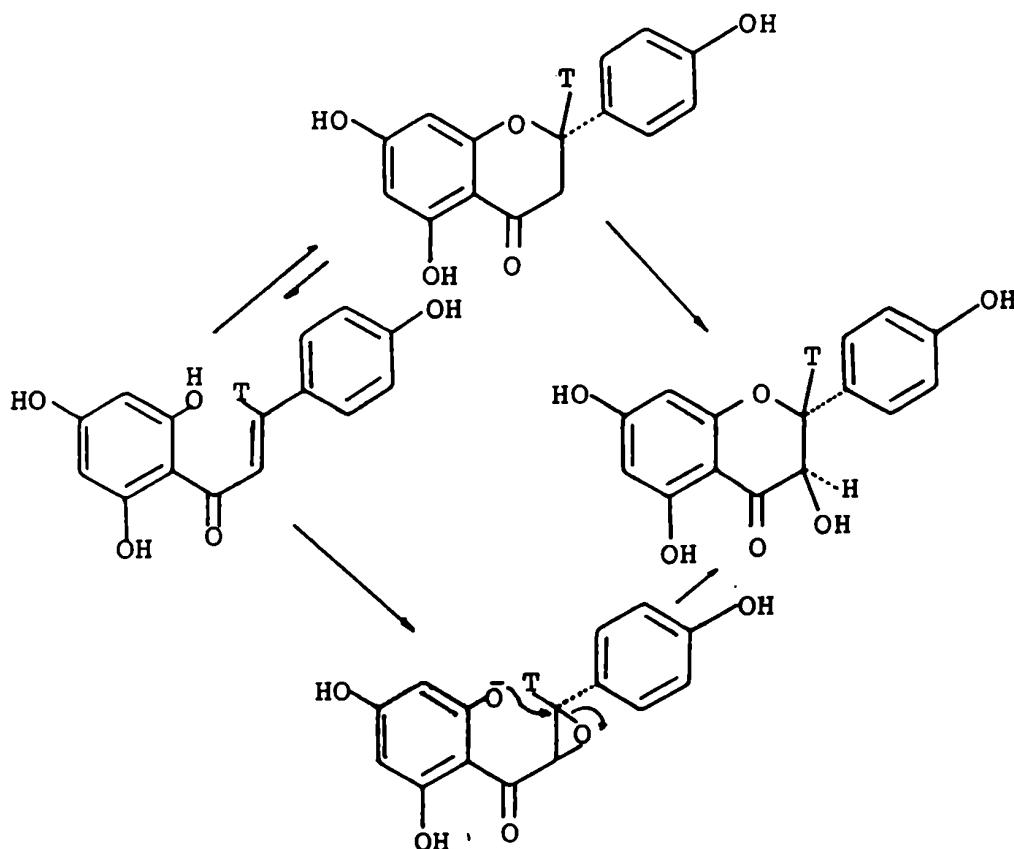


Figura 17: Posibles caminos para la formación de 3-hidroxiflavanonas a partir de chalconas / flavanonas.

El hecho de que se conozcan oxigenasas que pueden sustituir átomos de hidrógeno ecuatoriales por hidroxilos, sin cambiar la configuración, induce a pensar que las 3-hidroxiflavanonas se formen a partir de flavanonas por medio de este tipo de enzimas.

Las 3-hidroxiflavanonas pueden considerarse precursores de flavonoles y antocianinas. Como se aislaron naringenina, naringenina-7-O-glucósido, dihidrocanferol y dihidrocanferol-7-O-glucósido de flores productoras de antocianinas de *Mathiola incana* (*Cruciferae*), los cuales iniciaron la síntesis de antocianinas en flores aciánicas de líneas genéticas definidas de la especie mencionada, estos productos deben ser intermediarios en la síntesis de antocianinas. Los 7-O-glucósidos actúan probablemente como reserva de agliconas que son el verdadero sustrato. Posiblemente los glucósidos son más estables que los fenoles o están involucrados en el transporte <sup>77</sup> ( Fig. 18 ).

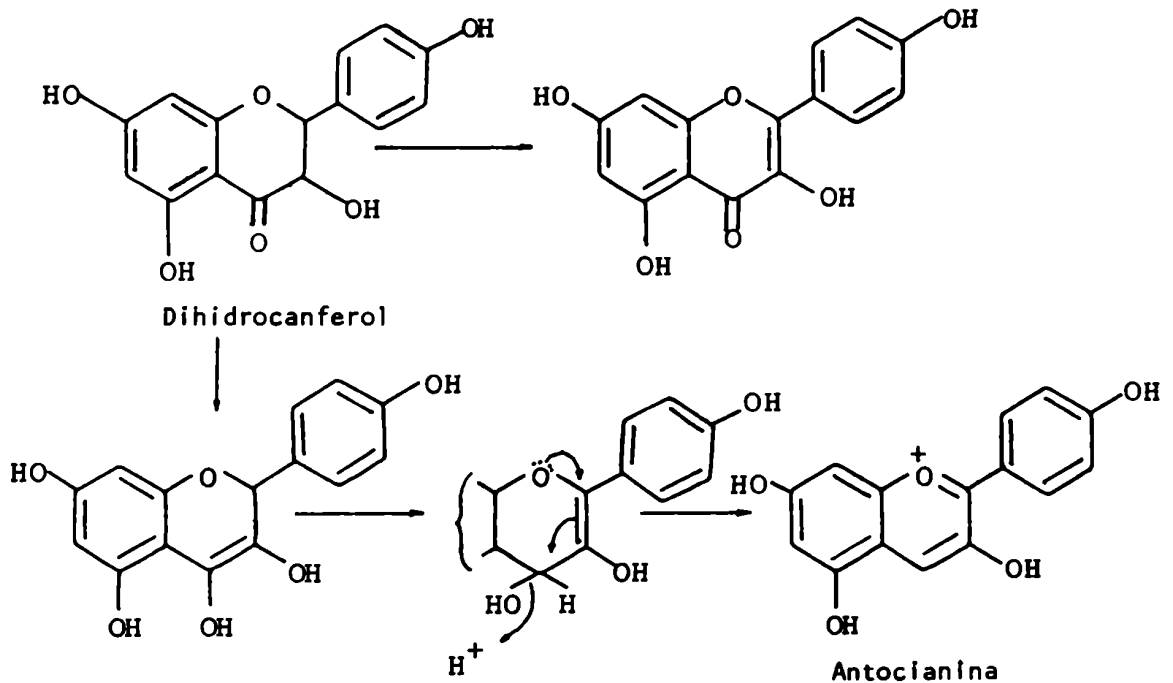


Figura 18: Posible conversión de flavanoles en flavonoles y antocianinas.

Recientemente <sup>78</sup> se confirmó que la chalcona es intermediaria en la biosíntesis de flavonoides incubando una suspensión de células de tejido de perejil con ( 1,2-<sup>13</sup>C )-acetato y analizando los flavonoides aislados mediante espectroscopía de <sup>13</sup>C-RMN. El enriquecimiento observado en <sup>13</sup>C confirma que el acetato contribuye primariamente a la formación del anillo A del flavonoide. Los esquemas de acoplamiento entre átomos de <sup>13</sup>C adyacentes del anillo A indican que la dirección de ciclación del mismo ocurre al azar en los compuestos analizados ( canferol y apigenina ), hecho que sólo se produce si el compuesto intermediario es una chalcona.

### Hidroxilación del anillo B

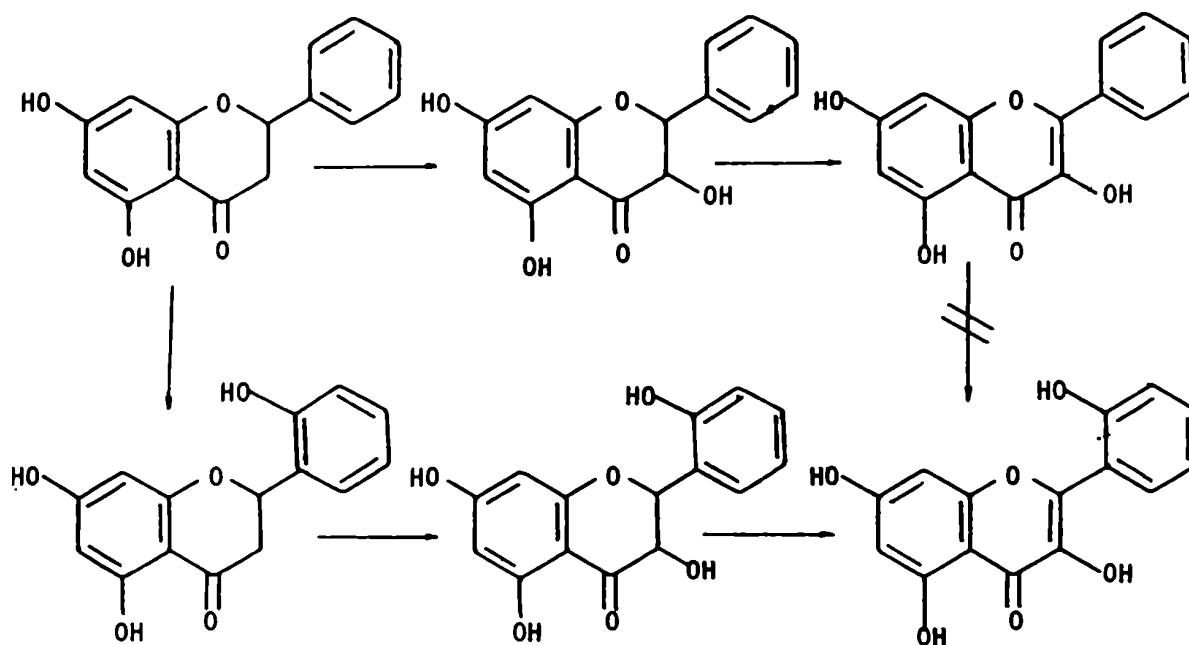
Se investigó la incorporación de dihidrocanferol y dihidroquercetina en los flavonoles canferol y quercetina, demostrándose que dihidrocanferol es precursor de ambos flavonoles y dihidroquercetina lo es solamente de quercetina <sup>79</sup>. A su vez se comprobó que dihidrocanferol es mejor sustrato para la hidroxilación en C-3' que el canferol <sup>80</sup>, lo cual está de acuerdo con que la hidroxilación del anillo B ocurra a nivel de flavanona / chalcona <sup>81</sup> y no a nivel flavona / flavonol.

Los resultados anteriores se esquematizan en la Fig. 19, para los flavonoides de *Datisca cannabina* <sup>82,83</sup>.

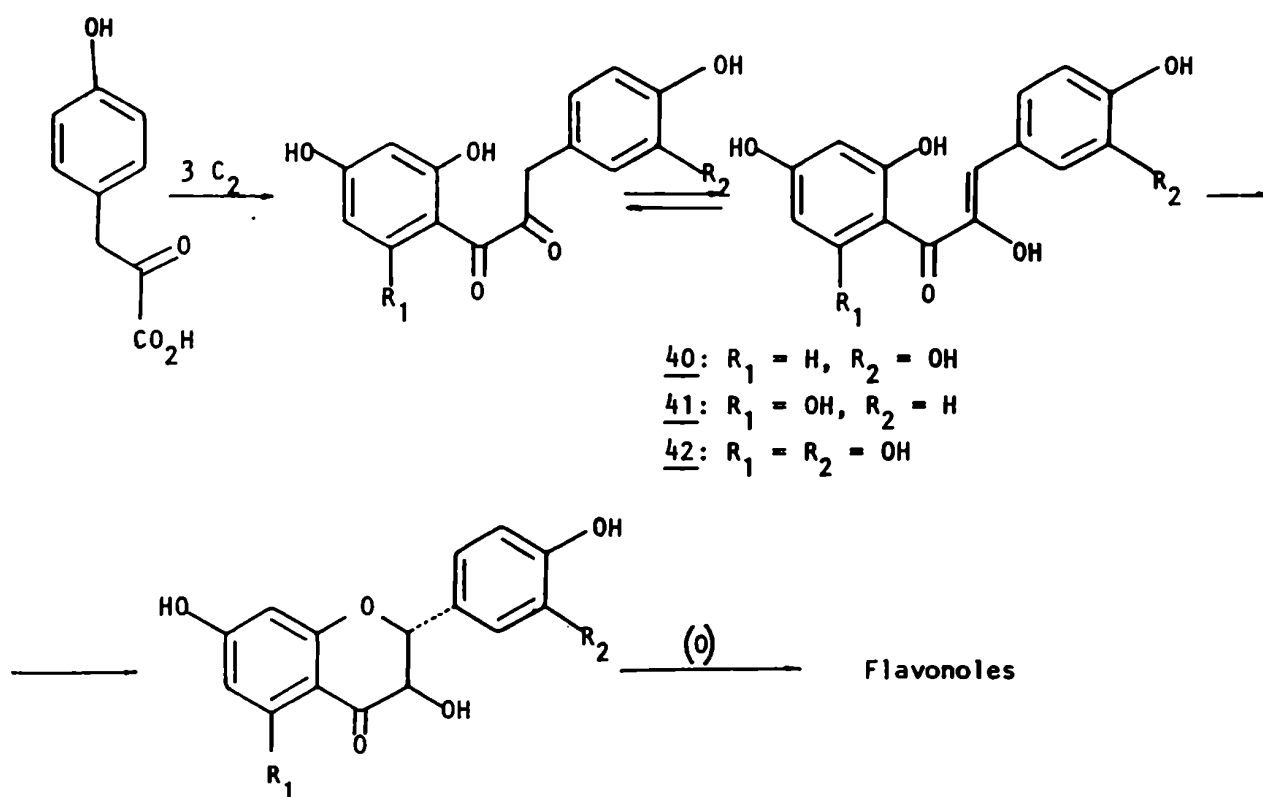
### Otros esquemas biosintéticos

#### 1.- $\alpha$ -hidroxichalconas como intermediarios:

Este tipo de compuestos como  $\alpha,2',4',3,4$ -pentahidroxichalcona 40 <sup>84</sup>,  $\alpha,2',4',6',4$ -pentahidroxichalcona 41 y  $\alpha,2',4',6',3,4$ -hexahidroxichalcona 42 <sup>85</sup> se originan por reemplazo de un ácido cinámico por uno del tipo fenil pirúvico <sup>86</sup>. La ciclación de la forma enólica de  $\alpha$ -hidroxichalconas puede dar cuenta de la biogénesis de 2,3-*cis* y 2,3-*trans* dihidroxiflavanoles <sup>87</sup>, permitiendo un camino biosintético alternativo, ( Fig. 20 ).



**Figura 19:** Hidroxilación del anillo B.



**Figura 20:**  $\alpha$ -hidroxichalconas como intermediarios en la biosíntesis de flavonoides.

## 2.- Biosíntesis en hongos:

La cloroflavina y el correspondiente compuesto decolorado poseen un origen biosintético excepcional y además se localizan sólo en hongos. Su biosíntesis en *Aspergillus candidus* se origina de una unidad  $C_6-C_1$  y cuatro precursores de dos carbonos, Fig. 21.

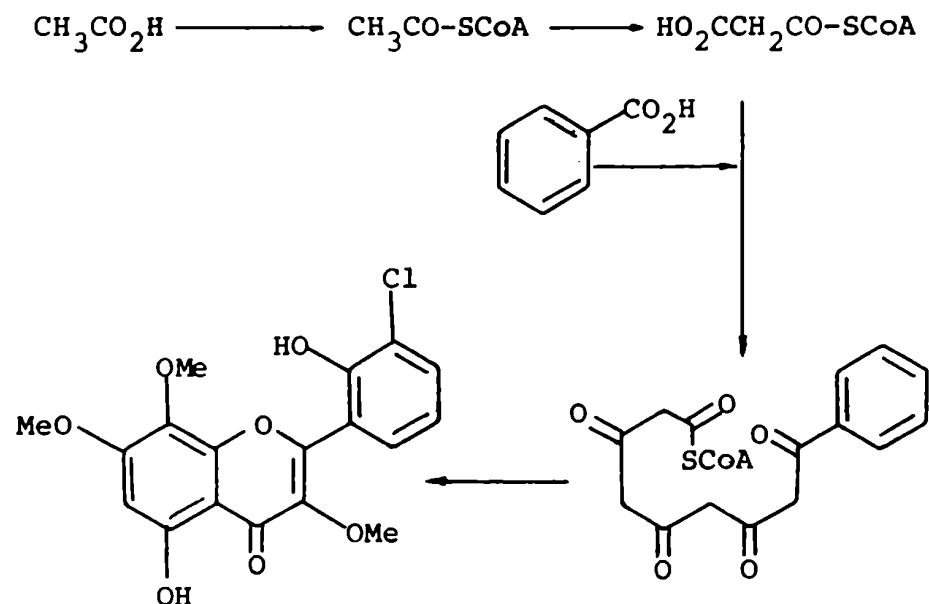


Figura 21: Biosíntesis de Cloroflavina

Esto se verifica analizando los productos de degradación alcalina y la distribución de la marca en 4,5-dimetoxi resorcinol y ác. 3-clorosalicílico, derivados de los anillos A y B respectivamente, provenientes de ( $1-^{14}C$ )-acetato, ( $\alpha-^{14}C$ )-cinamato y ( $\beta-^{14}C$ )-cinamato (Tabla 3).

Se ve que ( $\alpha-^{14}C$ )-cinamato marca al anillo A de una manera importante, mientras que ( $1-^{14}C$ )-acetato no marca exclusivamente al anillo A, lo cual se justifica si los C-3 y C-4, así como el anillo A, provienen de acetato. La distribución de marca presentada por el ( $\alpha-^{14}C$ )-cinamato se debe a su metabolismo previo a acetato.

Tabla 3: Distribución de radiactividad en los productos de degradación de cloroflavina.

Precursor	4,5-dimetoxiresorcinol	ác. 3-clorosalicílico	BaCO <sub>3</sub> *
( $\beta$ - <sup>14</sup> C)-cinamato		103	102
( $\alpha$ - <sup>14</sup> C)-cinamato	48.2	3.7	
(7- <sup>14</sup> C)-benzoato	2.1	97.6	96
(1- <sup>14</sup> C)-acetato	66.5	1.3	

\* CO<sub>2</sub> proveniente de la descarboxilación del ác. 3-clorosalicílico

La incorporación de (7-<sup>14</sup>C)-benzoato es consistente con el camino propuesto <sup>88</sup>.

### Enzimas que intervienen en la biosíntesis

Las enzimas presentes en la biosíntesis de flavonoides pueden ejemplificarse con las cinco que intervienen en la biosíntesis de apiina, 5,7,4',-trihidroxi flavona-7-O-[ $\beta$ -D-apiofuranosil (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosido] <sup>89</sup>, en perejil:

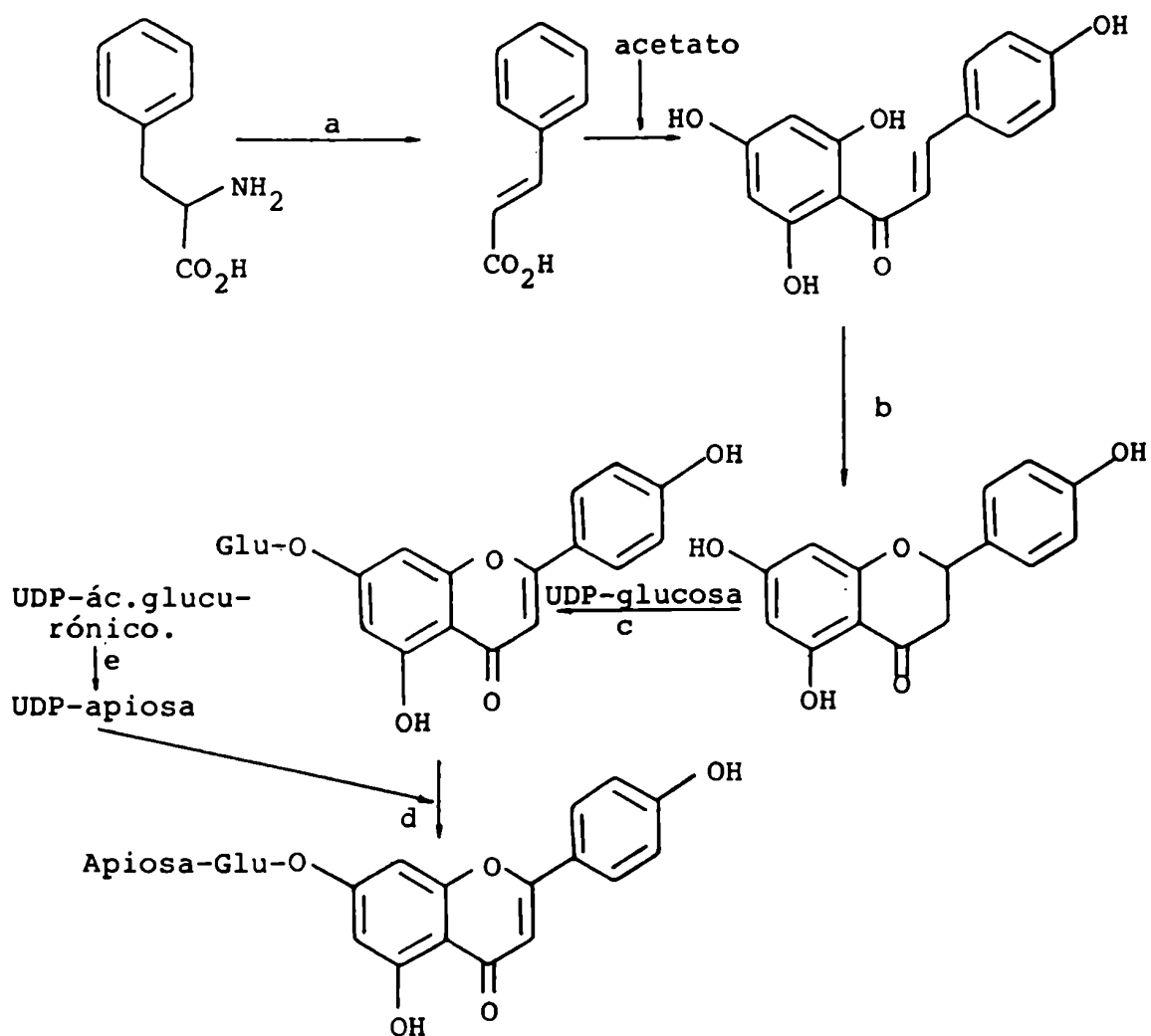
- 1.- fenilalanina-amoniaco-liasa ( FAL ) <sup>90,91</sup>.
- 2.- chalcona-flavanona isomerasa <sup>76,92,93</sup>.
- 3.- UDP-apiosa sintetasa <sup>94</sup>.
- 4.- glucosil transferasa y
- 5.- apiosil transferasa <sup>95</sup>.

La acción de las mismas se esquematiza en la Fig. 22.

### Biosíntesis de 6-hidroxi flavonoides

No existen trabajos al respecto, excepto el estudio de la biosíntesis de la 7-hidroxi-6,4'-dimetoxiisoflavona ( afrormosina ) <sup>43</sup>.

Los brotes de *Onobrychis viciifolia* ( Leguminosae ) acumulan cantidades significativas de afrormosina durante los primeros días de germinación. Se administraron como precursores



- a- Fenilalanina-amonfaco-llasa.
- b- Chalcona-flavanona-isomerasa.
- c- UDP-glucosa-apigenina-7-0-glicosil transferasa.
- d- UDP-aplosa-apigenina-glucósido apiosil transferasa.
- e- UDP-apiosa sintetasa.

**Figura 22:** Algunas de las reacciones enzimáticas involucradas en la biosíntesis de apiina.





grupo metilo de S-adenosil-L-metionina al HO-3' de luteolina ( 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona ) para formar crisoeriol, observándose que sólo los *o*-dihidroxifenoles son sustratos de esta enzima específica para HO-3' del flavonoide ( *meta* respecto a C-1' ). Por ello, esta enzima puede clasificarse como S-adenosil-L-metionina-*ortodihidroxifenol-meta*-O-metiltransferasa. Una actividad mayor se observó en un extracto libre de células de la cáscara del fruto de *Citrus mitis* ( *Rutaceae* ) . Este extracto cataliza la O-metilación de casi todos los hidroxilos de un gran número de flavonoides, indicando la presencia de *o*- ( 5- ), *m*- ( 6-, 8-, 3'- ) , *p*- ( 7-, 4'- ) y 3-O-metiltransferasas <sup>99</sup>. Los extractos enzimáticos se ensayaron en su actividad metilante utilizando S-adenosil-L-(<sup>14</sup>C-Me)-metionina y midiendo la incorporación de radiactividad en los productos expresada en porcentaje de la de quercetina ( =100% ) cuando fue ensayada como sustrato.

La O-metilación de los flavonoides a sus di-, tri- o tetrametil derivados parece ocurrir a través de una secuencia coordinada de pasos de metilación que pueden ocurrir en la superficie de un complejo enzimático.

Se puede obtener una relación entre el esquema de sustitución de los hidroxilos de los sustratos probados, su habilidad aceptora y la densidad electrónica negativa ( DEN ). Los flavonoides con hidroxilos vecinales en posiciones 5,6,7 u 8 que no poseen sustituyentes en el anillo B muestran una mayor O-metilación y DEN ( y por tanto mayor poder nucleófilo ) en las posiciones 6- y 8-. El esquema general de metilación es: 6 > 8 > 7 > 5 ( Tabla 5 ). La sustitución del anillo B afecta la nucleofilicidad de los hidroxilos del anillo A.

Esta tendencia concuerda con la encontrada en los flavonoides naturales que son principalmente metilados en las posiciones 6- u 8-.

Tabla 5: O-metilación *in vitro* de flavonoides por extractos libres de células de *Citrus*.

Flavonoides con hidroxilos vecinales en el anillo A	Derivados O-metilados	Actividad* relativa	DEN**
5,6-dihidroxi-flavona	6-	62	0,1386
	5-	22	0,0865
	5- y 6-	16	-
7,8-dihidroxi-flavona	8-	90	0,0369
	7-	5	+ 0,0542
	7- y 8-	5	-
6,7-dihidroxi-4'-metoxi-isoflavona	6-	77	0,1390
	7-	23	0,1066
6,7,4'-trihidroxi-isoflavona	6-	80	0,0985
	6- y 4'-	10	0,0235 (4')
	7- y 4'-	10	0,0360 (7)
5,6,7-trihidroxi-flavona	6-	40	0,3009
	5- y 6-	60	0,1409 (5)
	6- y 7-	60	0,1114 (7)
5,7,8-trihidroxi-flavona	8-	55	0,2089
	7- y 8-	45	0,0819 (7)
5,7,8,4'-tetrahidroxi-flavona	8-	60	0,2495
	4'-	40	0,1519
5,7,8-trihidroxi-4'-metoxi-flavona	8-	60	0,2089
	7-	40	0,0819
5,6,7,4'-tetrahidroxi-flavona	4'-	65	0,1395
	6- y 4'-	35	0,0213 (6)
3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi-flavona	3,6,7,3'-	70	0,2960 (3)
	3,7,3'-	30	0,1086 (3')
			+ 0,0821 (6)
			+ 0,0032 (7)

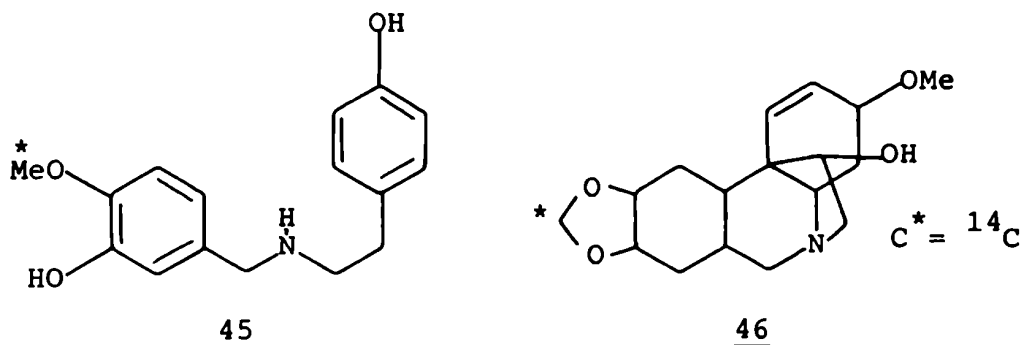
\* Determinada por autoradiografía después de efectuar CCD de la mezcla de reacción.

\*\* Densidad electrónica negativa.

### Origen biosintético del grupo metilendioxi

Se estudió en alcaloides de *Amaryllidaceae*, observándose que el fenol 45 marcado con  $^{14}\text{C}$  en ambos carbonos de la cadena ( 81% ) y en el metoxilo ( 19% ), se incorpora en el alcaloide haemantamina 46 <sup>100</sup>, sin degradación previa. La haemantamina derivada biológicamente tenía un 20% de actividad en el grupo metilendioxi.

Este grupo, por lo tanto, se forma por ciclación oxidativa del metoxilo a metilendioxi descartándose la posibilidad de formación por demetilación y reacción con un equivalente biosintético del formaldehído. El carbono metilénico se aisló como formaldehído luego de una hidrólisis con ác. sulfúrico <sup>101</sup>.



### Regulación en la acumulación de fenilpropanoides

La acumulación de flavonoides y otros polifenoles derivados de fenilalanina se consideraba como un proceso controlado a nivel enzimático <sup>89</sup>. Sin embargo, en las condiciones fisiológicas en que se encuentran las células vegetales, la actividad enzimática no debe ser necesariamente el principal factor limitante <sup>102</sup>, pues existe además el control a nivel de sustrato.

Un mecanismo de control funciona aparentemente en el suministro de sustrato en la primera etapa biosintética de los ácidos cinámicos, flavonoides y otros compuestos relacionados,

que es la desaminación de fenilalanina catalizada por la fenilalanina-amoníaco-liasa ( FAL ). En contra de la primera afirmación ( control enzimático ) debe considerarse lo siguiente:

1.- Se observa declinación en algunos casos de la actividad de FAL y acumulación de antocianas.

2.- La administración de fenilalanina puede provocar un aumento considerable en la acumulación de antociana en la mayoría de los casos <sup>103</sup> .

En general, se verifica que cualquier cambio de actividad de FAL no produce variación en la velocidad de acumulación de flavonoides. En cambio, es probable que la capacidad desaminante de los tejidos sea siempre suficiente para consumir toda la fenilalanina que no entró en la síntesis proteica y que queda disponible para la acción enzimática de FAL durante el metabolismo normal de la célula.

Una evidencia simple del papel limitante de la fenilalanina es la acción estimulante sobre la acumulación de polifenoles cuando se administra el aminoácido externamente.

Bajo la influencia de factores externos agraviantes ( radiación gama, agentes patógenos, etc. ) se producen disturbios metabólicos. En estas condiciones, aumenta la concentración de fenilalanina ( se inhibe la síntesis de proteínas ) y aumenta la biosíntesis de compuestos fenólicos como respuesta a estos ataques. También existe un balance entre el metabolismo de proteínas y la formación de flavonoides. En condiciones favorables para la síntesis proteica disminuye en general la acumulación de fenilpropanos, mientras que cualquier condición que produzca la inhibición de síntesis proteica o que acelere el recambio y degradación catabólica de proteínas estimula el proceso. De hecho, brotes de varias plantas productoras de flavonoides producen menos flavonoides durante períodos de intensa síntesis proteica, inducida por N-fertilización y producen más flavonoides cuando crecen en soluciones de fenilalanina. La biosíntesis de flavonoides puede ser un camino para liberarse de compuestos fenólicos que provienen de la

fenilalanina y tirosina liberadas por las proteínas y puede ser también un medio para reservar grupos fenilo <sup>104</sup>. El camino que lleva a la formación de flavonoides se considera por tanto un camino catabólico de los aminoácidos aromáticos que se forman durante la evolución del metabolismo de las plantas para bloquear la producción de compuestos tóxicos provenientes de la degradación proteica en un caso, y también para la recuperación de estos productos en la circulación general de materia orgánica en plantas <sup>105</sup>.

### Metabolismo de los flavonoides

Las transformaciones sufridas por los flavonoides en microorganismos y mamíferos <sup>106</sup> siguen dos caminos principales:

1.- Ruptura del anillo heterocíclico produciendo CO (proveniente de C-3) y dos ácidos benzoicos representando a los anillos A y B.

2.- Ruptura oxidativa del anillo A para producir ácidos propiónicos o valéricos sustituidos.

El conocimiento del catabolismo de flavonoides en plantas superiores es menor. En el caso de los flavonoles ampliamente distribuidos como canferol y quercetina, varias plantas mostraron que estos marcados con <sup>14</sup>C eran degradados e incorporados en lignina <sup>107</sup>.

Hösel y Barz <sup>108</sup> describen que un preparado enzimático de *Cicer arietinum* transforma a flavonoles en 2,3-dihidroxi-flavanonas y que canferol, quercetina y datiscetina (3,5,7,2'-tetrahidroxiflavona) se catabolizan en cultivos libres de células a ác. *p*-hidroxibenzoico, 3,4-dihidroxibenzoico y *o*-hidroxibenzoico respectivamente originados a partir del anillo B, no encontrándose floroglucinol entre los metabolitos del anillo A <sup>109</sup>.

En hongos se observó que la flavanona era transformada por *Gibberella fujikuroi* en 4'-hidroxiflavanona <sup>110</sup>. La fermentación de flavanona con *Gibberella saubinetti* dio el 4'-hidroxi derivado como mayor producto de transformación y ác. sali-

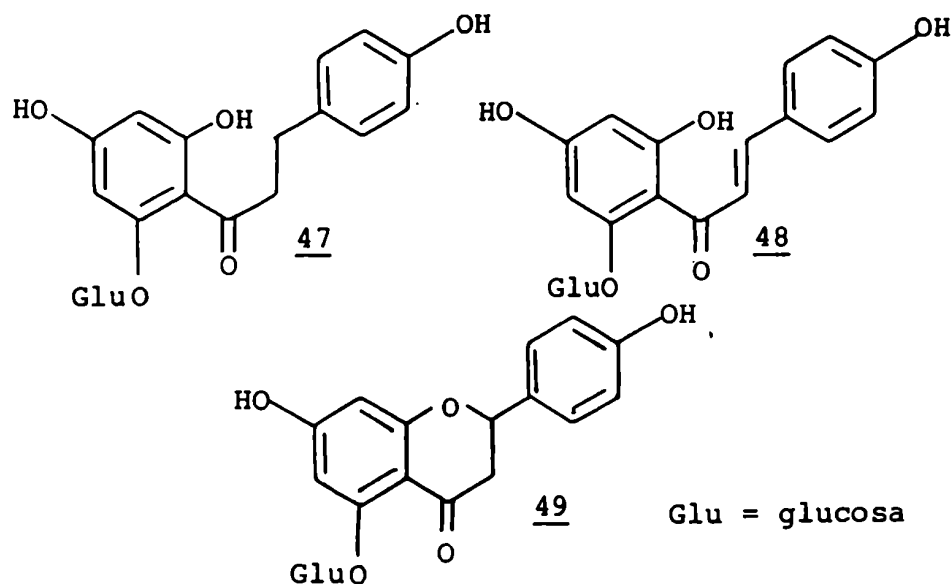
cílico como producto de degradación.

Sin embargo *G. fujikuroi* y *Aspergillus niger* no dieron productos reconocibles <sup>111</sup> .

## ACCION FARMACOLOGICA

### Efecto y uso de drogas con flavonoides

No se logró con los flavonoides correlacionar totalmente las observaciones en animales de experimentación con las experiencias clínicas. Independientemente de que los flavonoides sean fármacos polipotentes de valor, o sustancias poco activas, se trata de un grupo de compuestos con una gran variación estructural y con un comportamiento físico-químico diferencial ( coeficientes de partición ). Midiendo la toxicidad de las sustancias sobre animales inferiores ( lombrices, gusanos, insectos ) se muestra la relación estrecha entre coeficientes de partición y toxicidad. Dentro de una serie homóloga de compuestos , los menos solubles en agua son los que presentan mayor toxicidad. Así, los derivados hidroxilados son menos tóxicos que los correspondientes metoxilados, y los derivados no sustituidos son más tóxicos comparados con los compuestos hidroxilados. Existen ejemplos de estrecha especificidad estructural sobre la acción. Los glicósidos de flavonoles y flavanas tipo rutina y naringenina son inocuos, no presentando efectos tóxicos aun después de administrar en humanos más de 60 mg de rutina por día durante 5 años y aun con dosis masivas. En cambio la floridzina 47 que es un glicósido de dihidrochalcona comparable en solubilidad con la rutina, presenta una acción llamativa pues conduce a un cuadro similar a una diabetes renal; disminuye el umbral de glucosa en los riñones y sobreviene un aumento patológico de eliminación de glucosa en orina. Otros compuestos relacionados con los anteriores como isosalipurpósido 48 y salipurpósido 49, componentes de *Helichrysum arenarium*, no presentan acción renal <sup>63</sup> .



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

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

Aunque existen pocos datos, llama la atención que plantas con acción diurética y tónica venosa tienen como sustancias secundarias saponinas (*Aesculus*, *Solidago*, *Betula*); por ello las experiencias en animales con soluciones modelo de flavonoides puros son menos activas (1 : 2) que extractos de plantas con igual concentración de flavonoides.

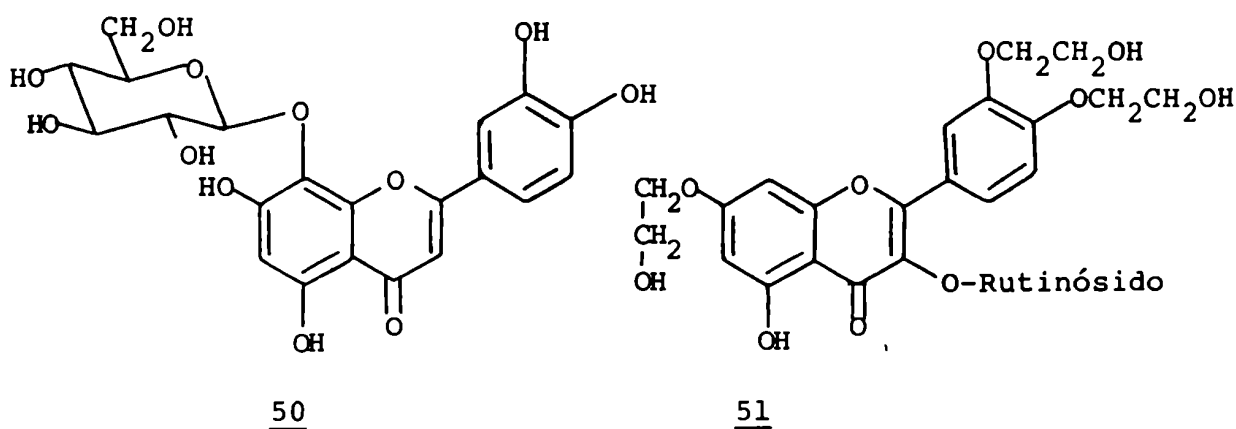
#### Acción terapéutica de drogas y flavonoides puros

- 1.- Efecto antiateromatoso: se demostró en conejos

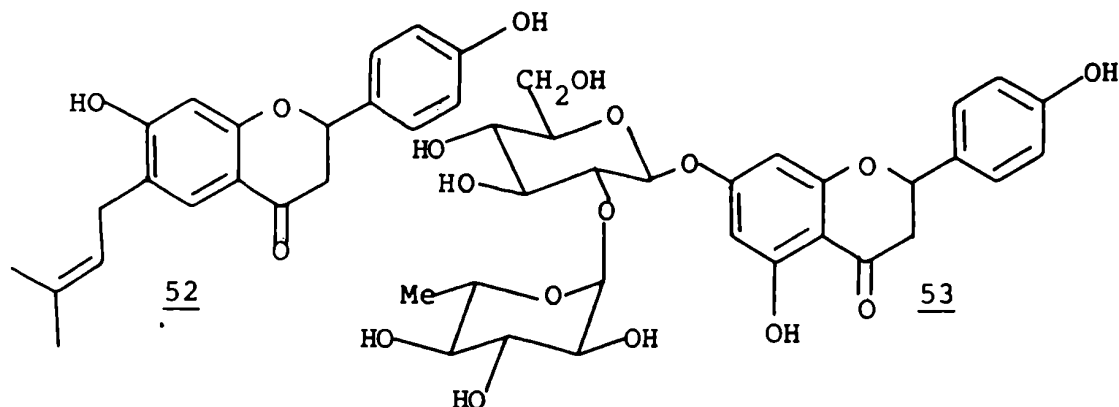
y ratones con aterosclerosis experimental que al administrarles rutina y luteolina ( 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona ) se producía una disminución de depósitos ateroscleróticos en aorta <sup>112,113</sup> . También mezclas de quercetina y canferol producen un gran efecto antiateromatoso comparado con los correspondientes glicósidos <sup>114</sup> .

2.- Vasodilatador coronario: se determinó en corazón aislado de conejo y de gato *in vivo* que el hiperósido ( quercetina-3-O-galactósido ) aumenta el flujo coronario y presenta también función antiarrítmica <sup>115,116</sup> .

3.- Acción antiinflamatoria: la gospina 50, aislada de *Hibiscus vitifolius*, actúa como antiinflamatorio no esteroideo, como la fenilbutazona, reduciendo edemas y la permeabilidad capilar producida por agentes flogísticos <sup>117-119</sup> . También el Venalot, constituido por cumarina y tris-(O-β-hidroxiethyl)-rutinósido 51 <sup>120</sup> reduce el edema pancreático y necrosis. La flavanona barachinina 52, aislada de *Psoilea coy-lifolia*, presenta una gran acción antiinflamatoria y antipirética <sup>121</sup> igual que la presentada por otros flavonoides <sup>122</sup> , entre ellos naringenina-7-O-neohesperidósido 53 <sup>123</sup>



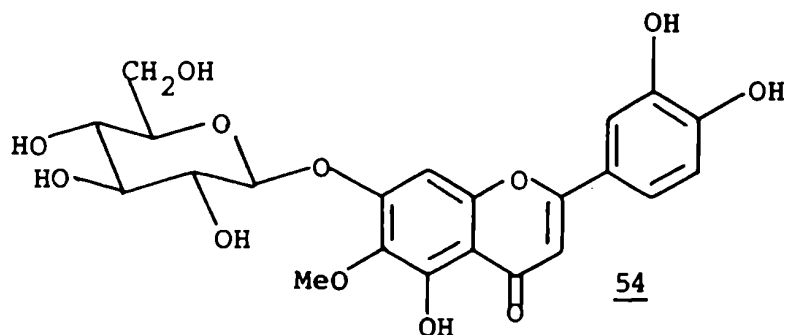




4.- Efecto antitrómbico: los flavonoides que poseen al menos dos metoxilos presentan un efecto antiadhesivo poderoso y pueden ser efectivos en combinación con anticoagulantes <sup>124</sup>, por ej.: la combinación de nobiletina con heparina provee una mayor protección contra la formación de trombos que cualquiera de los compuestos por separado <sup>125</sup>.

Otros flavonoides (rutina, naringenina, etc.) aumentan la supervivencia de ratas con dieta trombogénica <sup>126</sup>.

5.- Fragilidad y permeabilidad capilar: los flavonoides se mostraron eficaces en disminuir la fragilidad y permeabilidad capilar, entre ellos el Venoruton P<sub>4</sub> (tris-O-(β-hidroxi-etil)rutinosido 51) <sup>127</sup>, patuletina, acacetina, gosipina, nepetina 54, rutina, escutelareina y narigenina <sup>128-131</sup>



6.- Acción espasmolítica: diversos flavonoides actúan espasmolíticamente (anulan convulsiones de los órganos

con músculos lisos ). Así por ejemplo, se relaciona el uso medicinal popular de camelia con la presencia de apigenina y flavonoides relacionados; la acción espasmolítica de *Sucars liquiritiae* se vincula al contenido de liquiritigenina e isoliquiritigenina <sup>63</sup> . En general, las agliconas resultaron más activas, aumentando la acción a mayor número de hidroxilos siendo los compuestos más activos aquellos con HO-7 y HO-4' tanto para flavonas como flavonoles <sup>132,133</sup> . Por ej.: la 3,7,8,3',4'-pentahidroxi-flavona es efectiva como espasmolítico <sup>134</sup> .

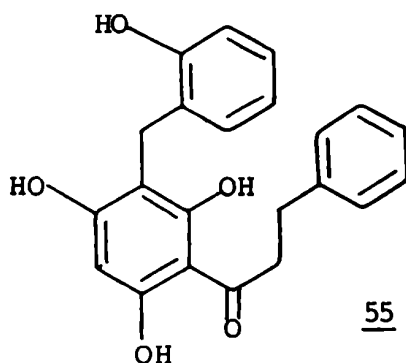
7.- Acción antiviral: procianidina, pelargonina y quercetina demostraron poseer actividad antiviral contra el *Herpesvirus hominis* . La luteolina mostró también una gran actividad virostática contra *H. suis* <sup>135</sup> . La quercetrina ( quercetina-7-O-glucósido ) elimina las infecciones virales de influenza tipo A en tejidos de ratón y en embriones de pollo <sup>136</sup> . La 5,6,7,8-tetrametoxi-4'-hidroxi-flavona presenta acción contra *Rhinovirus* tipo 13 <sup>137</sup> . En general los flavonoides ejercen efecto antiviral demostrándose *in vitro* la inhibición de su multiplicación. Aunque se observan distintas actividades para diversos compuestos no existe aparentemente una relación estructura-actividad aparente <sup>138</sup> .

8.- Acción fungistática y bactericida: los flavonoides en algunos casos actúan como defensa de determinados vegetales contra agentes externos, por ej.: la nobiletina es el principal agente fungistático presente en mandarinas resistentes al " mal seco " ( responsable: *Deuteroma tracheiphila* ) <sup>139</sup> . También especies de manzanos resistentes presentan en raíz un alto contenido de compuestos fenólicos ( glicósidos de quercetina y canferol ) en contraste con especies susceptibles <sup>140</sup> .

Los flavonoides son fungicidas no tóxicos para humanos y animales domésticos, por eso pueden usarse en fumigación de plantaciones <sup>141</sup> .

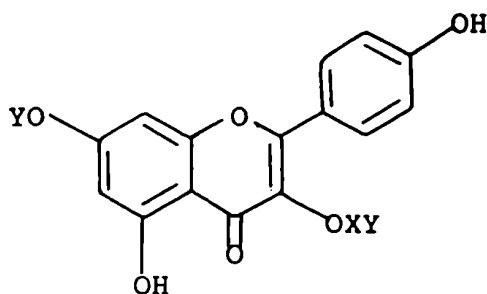
También los complejos metálicos de quercetina exhiben propiedades antibacteriales y fungicidas siendo los de Hg y Pb los más efectivos. Si bien tienen limitado valor terapéutico por su alta toxicidad pueden ser útiles en uso externo <sup>142</sup> .

Los C-bencilflavonoides aislados de *Uvaria chamae* mostraron poseer acción antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium smegmatis* a nivel comparable al que presenta el sulfato de estreptomicina <sup>143</sup> ( por ej.: uvareti-na 55 ). La reducción del enlace 2-3 parece aumentar esta actividad <sup>144</sup> .



9.- Acción diurética: no se conoce el mecanismo de acción diurética de determinadas drogas con flavonoides. Para esta acción se utilizan las siguientes plantas medicinales <sup>63</sup> *Polygonum aviculare*, *P. hydropiper*, *Ononis spinosa*, *Prunus spinosa*, *Sambucus nigra*, *Filipendula ulmaria* y *Viola tricolor*.

La robinina aumenta la diuresis en animales con mayor efectividad por administración *i.v* o *i.p* que oralmente <sup>145</sup> .



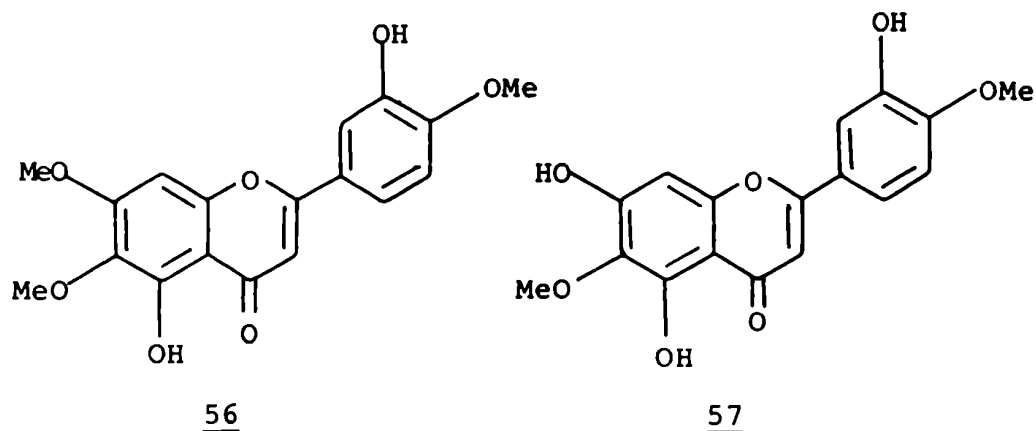
Robinina

X = D-galactosa

Y = L-ramnosa

10.- Actividad antitumoral: aparentemente no existe una relación acción-estructura y se considera que a pesar de la actividad ocasional que presentan determinados compuestos, no está garantizada su utilidad como agentes antitumorales <sup>146</sup>.

Una serie de flavonas aisladas del extracto alcohólico de *Eupatorium semiserratum*, entre ellas eupatorina 56, presentan actividad contra carcinoma humano nasofaríngeo mantenido en un cultivo de células ( KB ) <sup>147</sup>. De *Helenium amarum* se aisló nepetina 57, flavona que presenta actividad antitumoral <sup>148</sup>.



**CAPITULO III**

**METODOS ESPECTROSCOPICOS EN LA  
ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES**

## METODOS ESPECTROSCOPICOS EN LA ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE FLAVONOIDES

### 1.- ESPECTROMETRIA DE MASAS

#### Introducción

La espectrometría de masas de impacto electrónico fue aplicada exitosamente a todas las clases de agliconas de flavonoides puras o en mezclas, ya un número de glicósidos, tanto C-glicosil como O-glicosil flavonoides <sup>149</sup> .

La mayoría de las agliconas de flavonoides presentan intensos picos correspondientes al ión molecular ( $M^+$ ), que es a menudo pico base. La derivatización no es necesaria salvo que se efectúe una cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CGL - EM), en cuyo caso la trimetilsililación <sup>150</sup> o la permetilación <sup>151</sup> ofrecen una adecuada volatilidad.

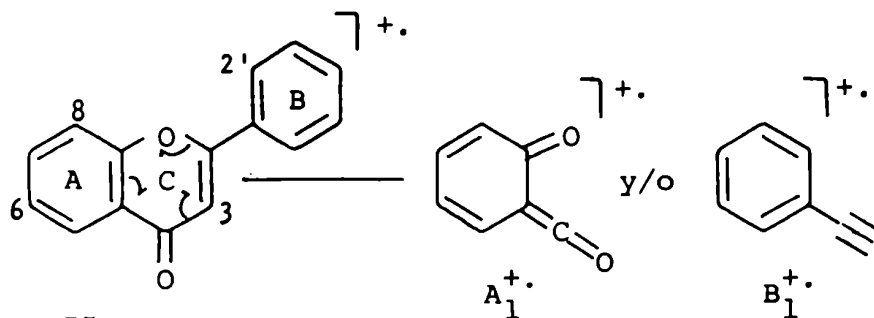
En el caso de glicósidos de flavonoides no derivatizados, el ión molecular es raramente observado y los derivados permetilados o peracetilados dan fragmentos de baja intensidad. Son particularmente útiles los derivados trimetilsililados de glicósidos, ya que dan una idea de la secuencia de unión de los azúcares presentes en el mismo <sup>152,153</sup> .

Las fragmentaciones más útiles en cuanto a identificación estructural de agliconas son las que involucran la formación de fragmentos que contienen intactos a los anillos A y B, que se designan como camino I y camino II en la figura 23 . Es de notar que el camino I produce normalmente dos iones,  $A_1^+$  y  $B_1^+$ , cuya relación es indicativa de la distribución de carga en el ión molecular.

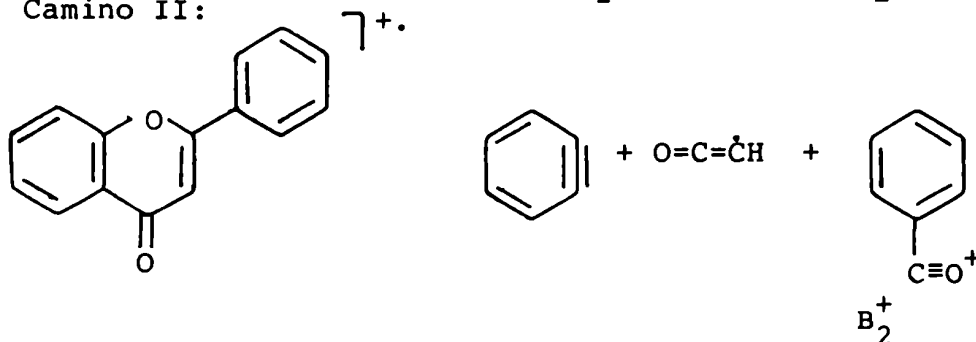
En cambio, el camino II da predominantemente una sola especie cargada  $B_2^+$  .

Kingston apreció que estos dos caminos son competi

Camino I:



Camino II:



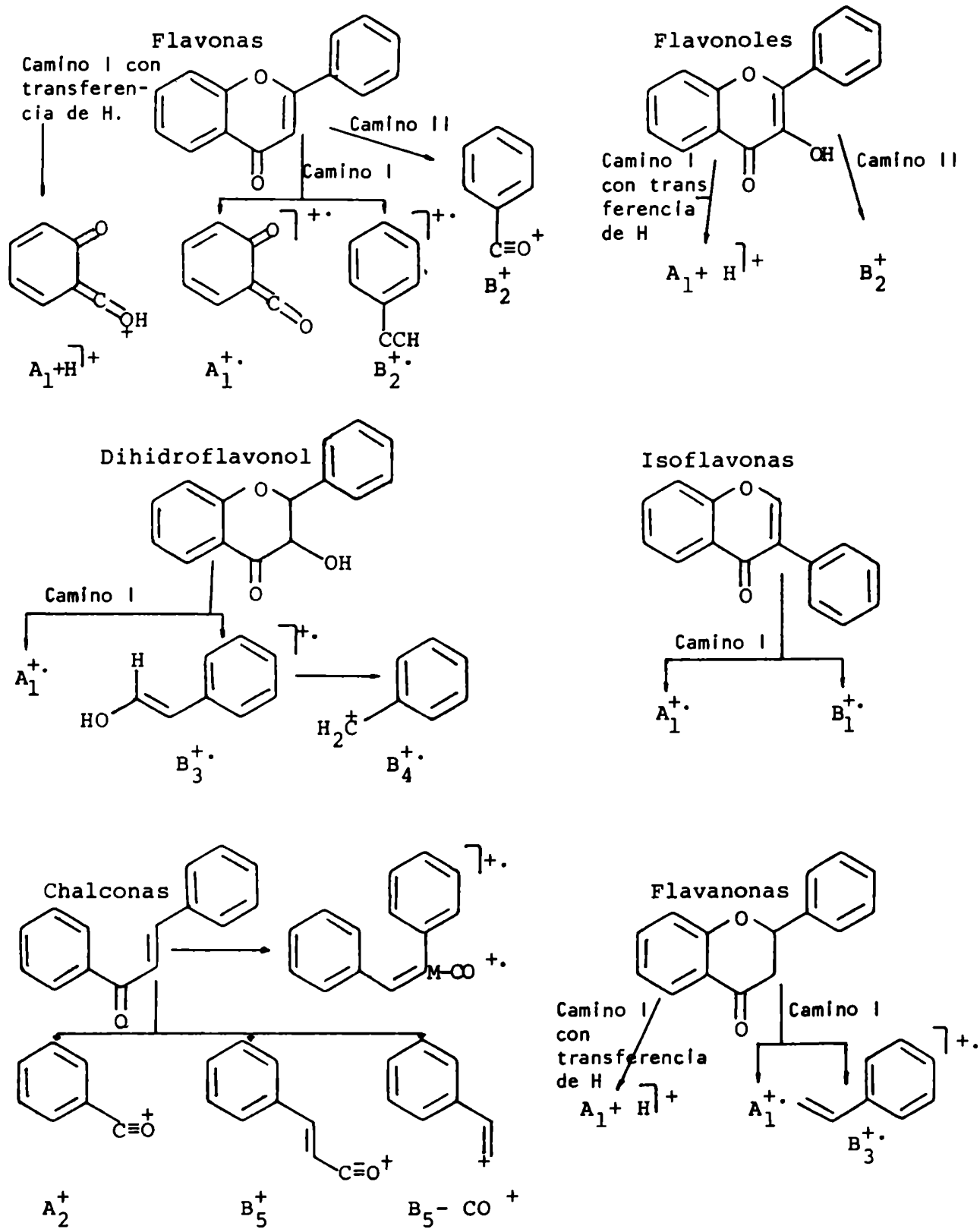
**Figura 23:** Principales fragmentos presentes en los espectros de masas de flavonoides.

vos y que las intensidades combinadas de  $B_2^+$  y  $(B_2 - CO)^+$  son aproximadamente inversamente proporcionales a  $A_1^+$  y  $B_1^+$ .<sup>154</sup> Excepto en el caso de chalconas, los caminos de fragmentación más importantes que sufren las agliconas de flavonoides (flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y dihidroflavonoles) son similares<sup>149</sup> (Fig. 24).

### Flavonas y flavonoles

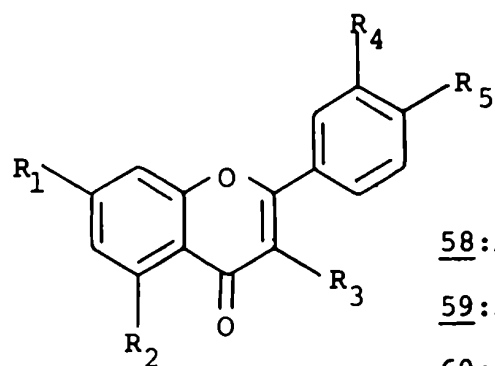
Las flavonas no poseen un centro o sitio de fácil ruptura, por lo tanto el ión molecular es siempre intenso en el espectro de masas de estos compuestos.

Las flavonas con menos de 4 grupos hidroxilo, muestran iones de moderada intensidad para los fragmentos correspondientes a la ruptura retro Diels-Alder (Flavonoide  $\rightarrow A_1^+ + B_1^+$ ), por ej.: flavona 58, apigenina 59 y acacetina 60; en cambio, éstos son de menor importancia en compuestos altamente sustituidos como la isoramnetina 61.<sup>155</sup>



**Figura 24:** Fragmentaciones con valor diagnóstico en los espectros de masas de diferentes tipos de agliconas de flavonoides.





58:  $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$

59:  $R_1=R_2=R_5=OH$ ;  $R_3=R_4=H$

60:  $R_1=R_2=OH$ ;  $R_5=OMe$ ;  $R_3=R_4=H$

61:  $R_1=R_2=R_3=R_5=OH$ ;  $R_4=OMe$

En el caso de la flavona 58<sup>156</sup>, el pico base es el ión molecular y se observan fragmentos correspondientes a  $M-H)^+$ ,  $M-CO)^+$ ,  $A_1^+$ ,  $A_1-CO)^+$  y  $B_1^+$  (Fig. 25). La sustitución en los anillos A y B puede determinarse examinando los iones  $A_1^+$ ,  $B_1^+$  y  $B_2^+$ .

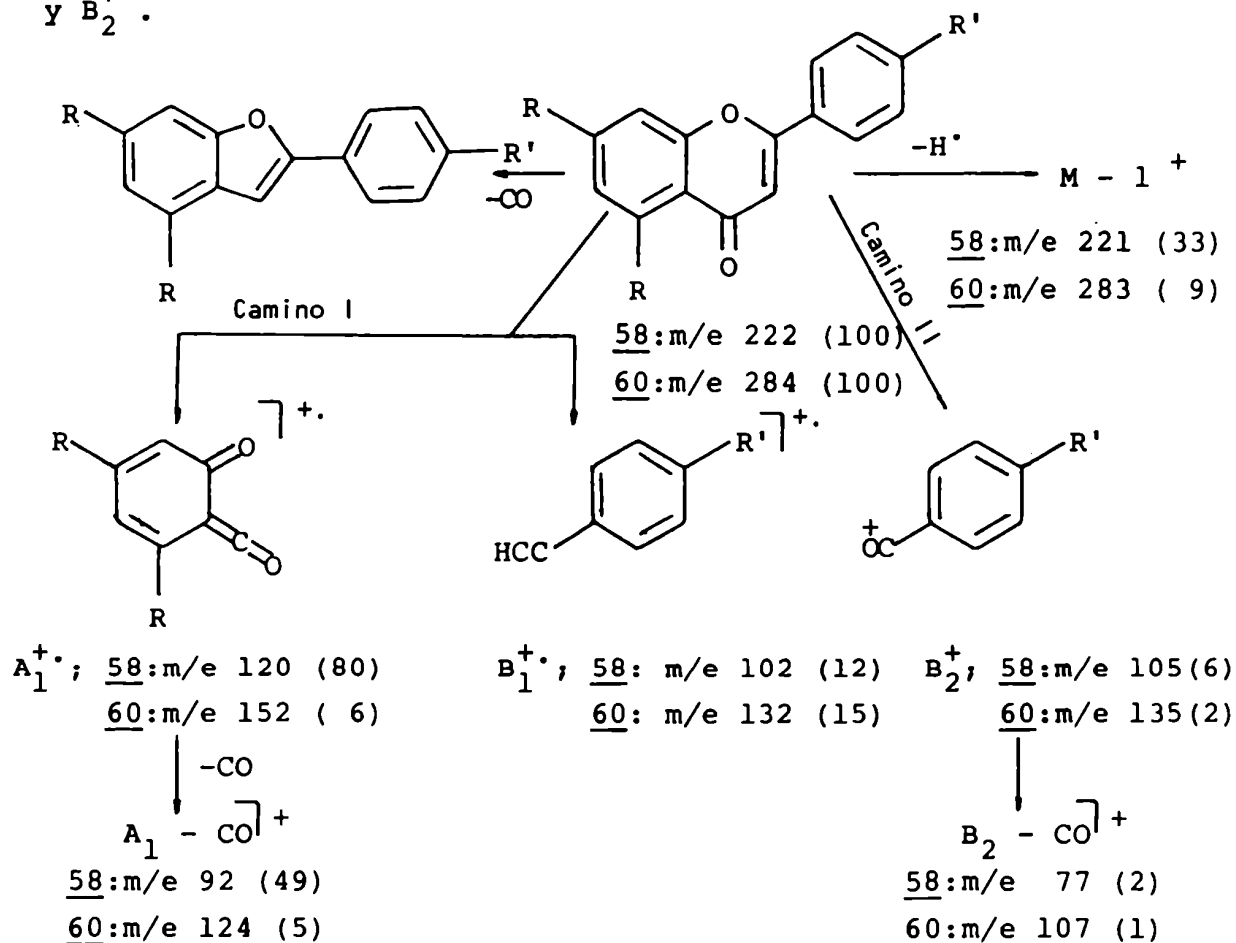


Figura 25: Intensidades relativas de los espectros de masas de flavona 58 y acetina 60.

Por ejemplo, la acacetina 60<sup>157</sup> produce un fragmento  $A_1^+$  a 32 una mayor que la flavona 58 dando cuenta que el anillo A se encuentra sustituido por dos hidroxilos. De la misma manera, el fragmento  $B_2^+$  aparece a 30 una mayor que el correspondiente de la flavona, valor que corresponde a la presencia de un metoxilo adicional con respecto a ésta.

Otros fragmentos significativos incluyen la formación de un ión  $M - H$  de origen incierto <sup>154</sup>,  $(M - CO)^+$ ,  $(A_1 - CO)^+$  y  $(B_2 - CO)^+$ . Se observan también fragmentos doblemente cargados, característicos de compuestos altamente aromáticos.

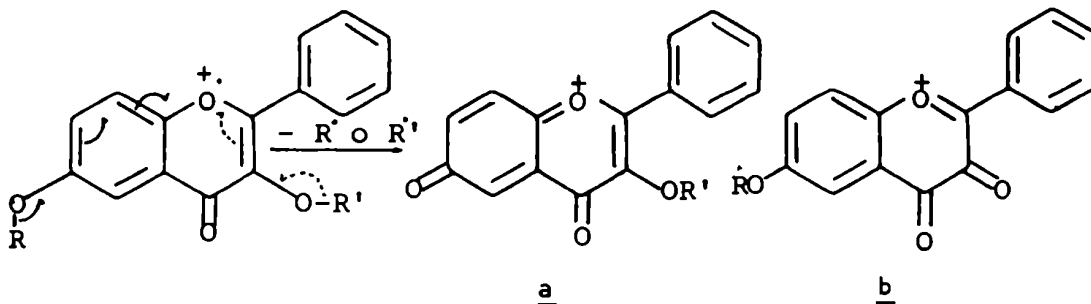
Como puede observarse las flavonas simples brindan caminos de fragmentación bien definidos, obteniéndose espectros con pocos picos que indican el número y ubicación de los sustituyentes en los anillos constituyentes.

En el caso de flavonas con cuatro o más sustituyentes oxigenados ( hidroxilos y metoxilos ) no se observan los picos correspondientes a la reacción retro Diels-Alder y en el espectro dominan los iones  $M$ ,  $M - Me$ ,  $M - CO$  y  $M - CO - Me$ .

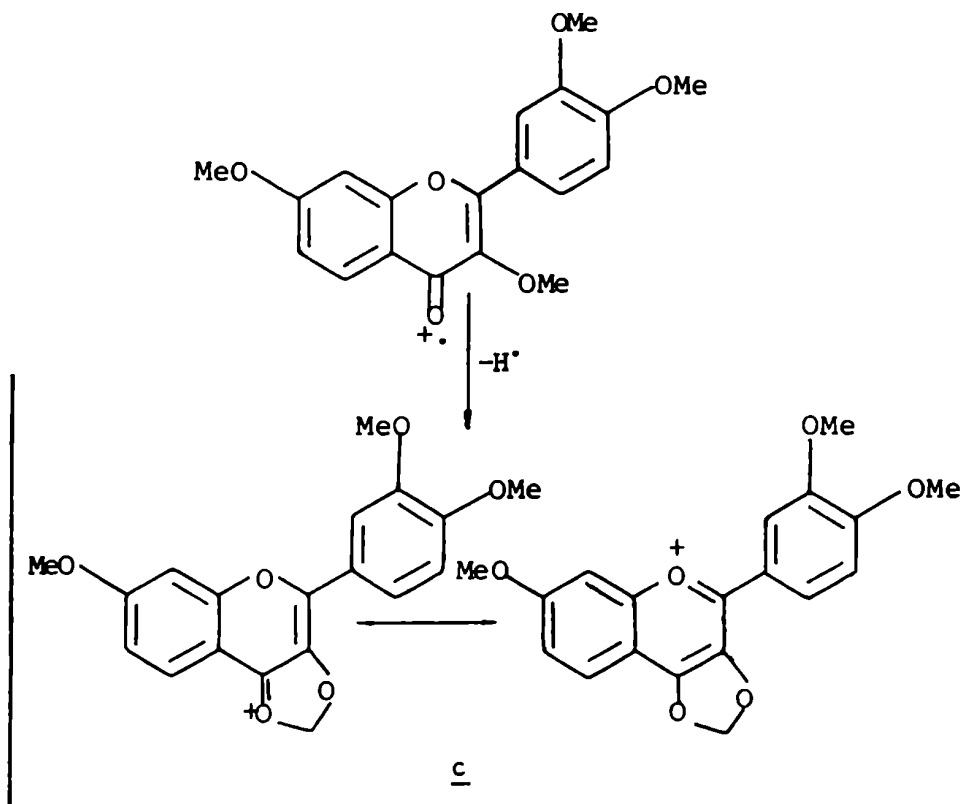
### Fragmentos principales

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

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



2.- Los flavonoides que poseen un metoxilo en C-3 o C-5 pierden un átomo de hidrógeno. Kingston <sup>154</sup> propone que el carbonilo ionizado desplace a un átomo de hidrógeno de uno de esos grupos formando un catión estabilizado c .

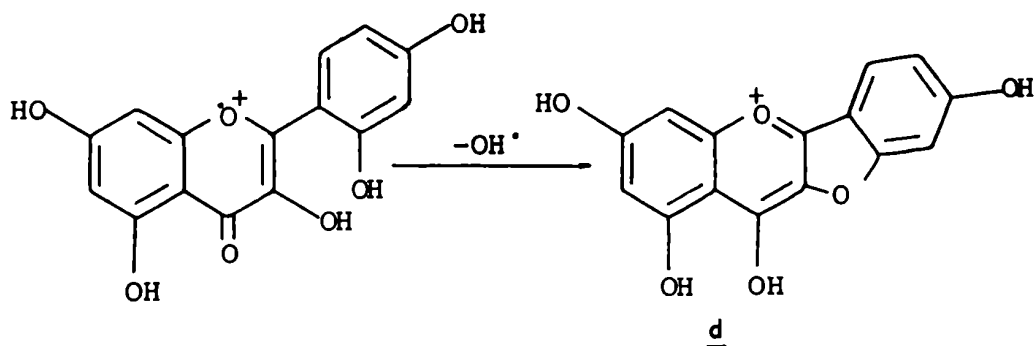


M - Me: este ión es abundante en todos los espectros de masas de las 6- u 8-metoxiflavonas, pues esta pérdida está favorecida debido a la formación del catión tipo quinona a ( o el isomérico derivado de una 8-metoxiflavona ) . Este proceso compite con fragmentaciones como M - H , que se ve muy reducida ; por ejemplo , en la 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona, en la que el pico base es el fragmento M - Me no se observa M - H .

Las 3-metoxiflavonas también presentan un fragmento M - Me moderado, presumiblemente debido a la formación de un catión del tipo b . Sin embargo, en este caso es importante la formación del ión M - H reduciéndose la intensidad del M - Me . La presencia de M - Me )<sup>+</sup> intenso es diagnóstico de 3- ,

6- u 8-metoxiflavonas, mientras que la ausencia de este pico no excluye la presencia de un MeO-3.

M - OH: este tipo de pérdida es muy importante en el caso de 3,2'-dihidroxi<sup>+</sup>flavonas y es el pico base d en el espectro de masas de la 3,5,7,2',4'-pentahidroxi<sup>+</sup>flavona.

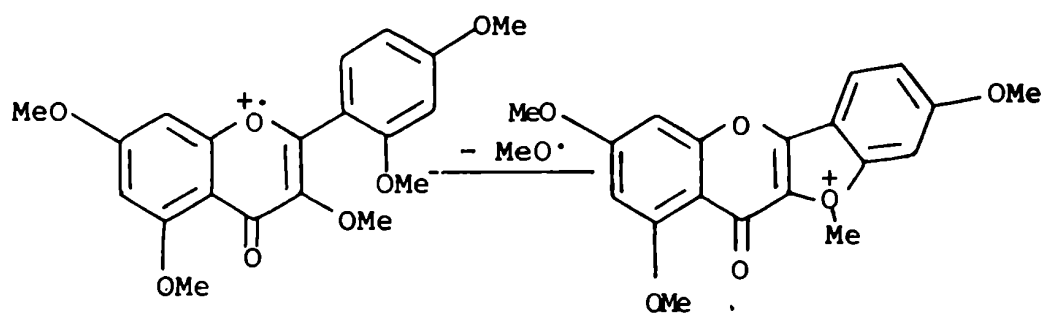


M - H<sub>2</sub>O: se demostró que todas las flavonas que tienen grupos metoxilo unidos a C-5 exhiben picos a M-17 y M-18. Sin embargo un número suficientemente grande de compuestos sin este grupo también presentan pérdidas significativas de OH y H<sub>2</sub>O. Por lo tanto, no resulta claro el proceso de esta pérdida.

M - H<sub>3</sub>O: se observó que los compuestos con metoxilos en C-3 y C-5 presentan este pico. Si bien no se conoce su génesis, puede ser útil como diagnóstico.

M - MeO: este ión es el pico base en el espectro de masas de 3,5,7,2',4'-pentametoxiflavona, indicando que la fragmentación característica de 3,2'-dihidroxi<sup>+</sup>flavonas se mantiene en sus metil éteres.

Otras metoxiflavonas presentan este ión pero con intensidad moderada.



M - MeCO: este ión es significativo en las 6- y 8-metoxiflavonas. Evidencias por iones metaestables y medidas hechas en alta resolución indican que estos iones se forman por pérdida de CO a partir de M - Me. Los compuestos que no tienen grupos metoxilo unidos a C-3, pierden CO a partir del ión tipo quinona e ( Fig. 26 ), como ocurre en benzo y naftoquinonas <sup>158</sup>.

También presentan fragmentos M - MeCO moderados las 3-metoxiflavonas, donde la pérdida de metilo seguida de CO proviene presumiblemente de la posición 3 <sup>155</sup> ( Fig. 27 ) .

Por lo tanto, la observación de un ión M - 43 intenso es diagnóstico de 3-, 6- u 8-metoxiflavona, pero no es concluyente en el caso de obtener picos pequeños.

#### Fragmentos provenientes de la reacción tipo retro Diels-Alder

A<sub>1</sub><sup>+</sup>, A<sub>1</sub> + H )<sup>+</sup>: como se mencionó previamente, estos fragmentos no son importantes en flavonas con más de cuatro sustituyentes oxigenados.

A<sub>1</sub> - Me )<sup>+</sup>: los espectros de masas de 6- u 8-metoxiflavonas muestran estos picos con moderada o gran intensidad.

La medición de picos metaestables confirma que el ión A - Me f ( Fig. 26 ) proviene de M - Me e en una etapa <sup>154</sup>.

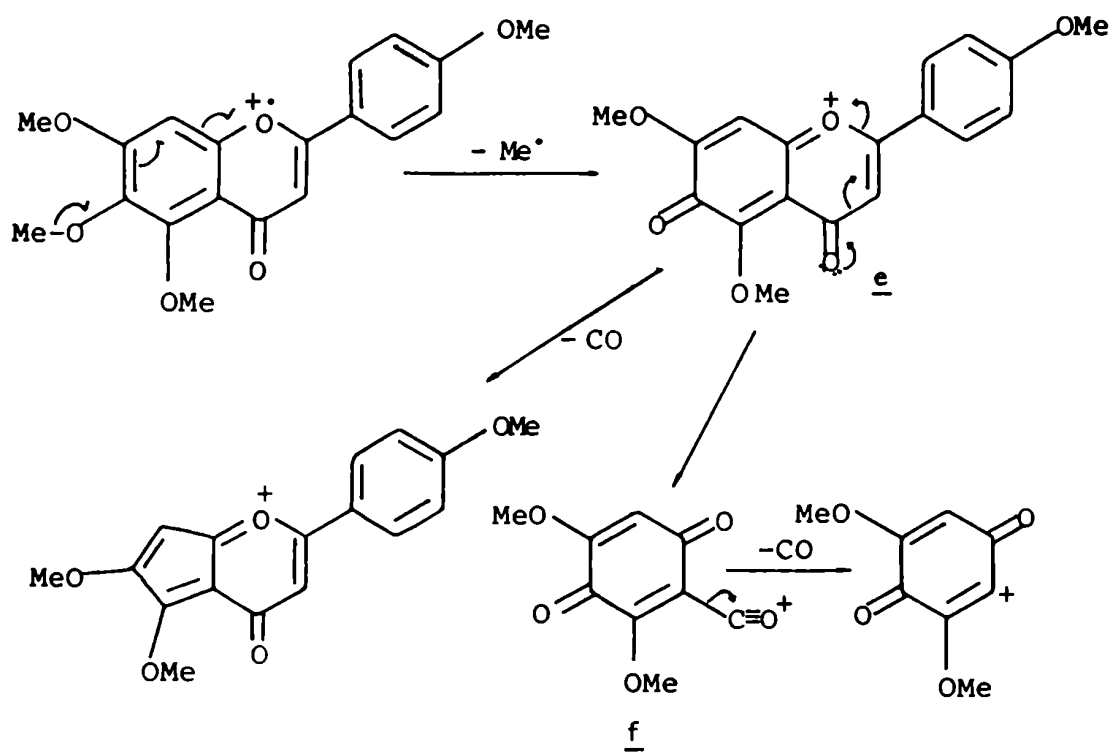


Figura 26

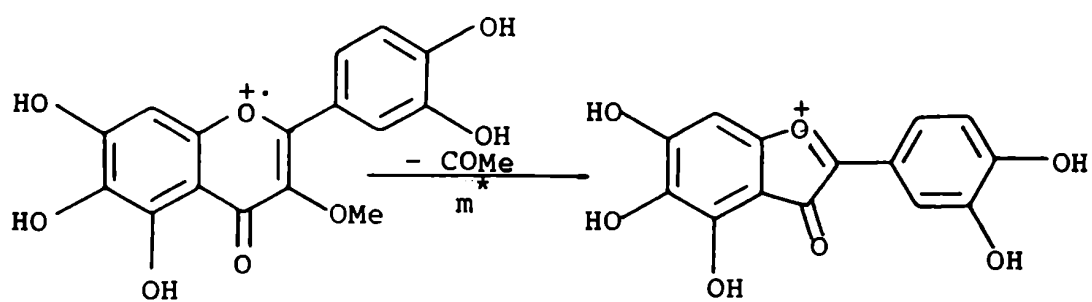


Figura 27

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

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

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

Iones doblemente cargados: estos picos son moderadamente intensos, como es de esperar en moléculas altamente insaturadas, y se encuentran frecuentemente en la misma zona de los iones  $A_1$ ,  $B_1$  y  $B_2$ , pudiendo distinguirse de estos últimos por presentar picos isotópicos a masas no enteras. El pico doblemente cargado más importante es  $M - CO )^{++}$ , aunque la razón no parece clara.

#### Flavonas y 3-O-metilflavonoles con el anillo A trisustituido

Es delicado distinguir entre flavonoides 5,6,7- y 5,7,8-trisustituidos, aunque un método adecuado<sup>159</sup>, y que requiere poca cantidad de muestra, se basa en comparar las in

tensidades relativas de los picos M, M - H, M - Me y M - H<sub>2</sub>O para una serie de compuestos isoméricos con sustitución 5,6,7- y 5,7,8- .

5,7-dihidroxi-6- u 8-metoxiflavonas, flavonoles y metil flavonoles: se puede generalizar que:

1.- Las 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavonas se diferencian de sus isómeros 8-metoxi, por la presencia de un ión M - H<sub>2</sub>O superior al 10 % y por presentar un ión molecular más abundante que M - Me y generalmente igual a 100 %. En cambio, en los segundos, el pico base es M - Me.

2.- Los 3-O-metilflavonoles metoxilados en C-6 se diferencian de los flavonoles y flavonas por la importancia del ión M - H ( mayor del 10 % ) .

3.- Los 3-O-metilflavonoles metoxilados en C-6 se diferencian estrictamente de las flavonas por la menor importancia del ión M - Me <sup>159</sup> ( Fig. 28, Tabla 6 ) .

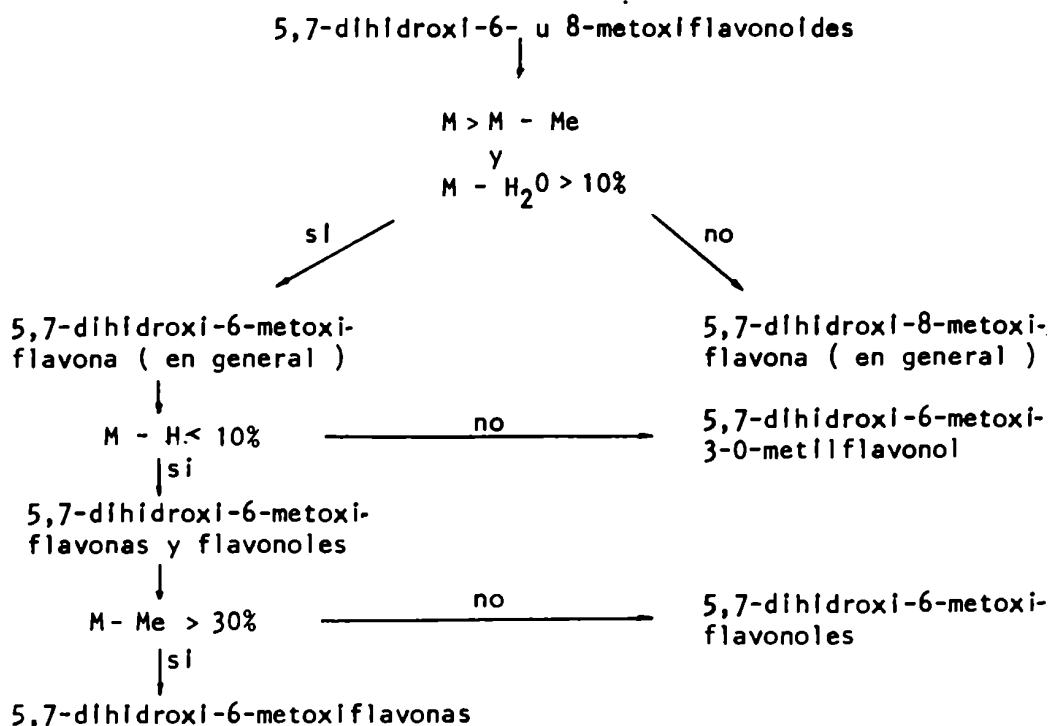


Figura 28: Diferenciación de flavonoides 5,6,7- y 5,7,8-trisustituídos



C-3	SUSTITUYENTES				M		M - H		M - Me		M - H <sub>2</sub> O	
	C-5	C-6	C-7	C-8	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%
	OH	MeO	OH		284	100	283	5	269	53	266	27
MeO	OH	MeO	OH		314	100	313	34	299	40	296	17
OH	OH	MeO	OH		300	100	299	3	285	13	282	21
	OH		OH	MeO	284	73	283	-	269			
MeO	OH		OH	MeO	314	93	313	15	299	100		
OH	OH		OH	MeO	300	81	299	3	285	100		

Tabla 6: Picos característicos en el espectro de masas de flavonoides 5,6,7- y 5,7,8-trisustituídos.

Posteriormente, Goudard *et al.*<sup>160</sup> pudieron diferenciar 5-hidroxi-6,7-dimetoxi y 5,7,8-trimetoxiflavonas (  $M > M - Me$  ) de 5-hidroxi-7,8-dimetoxi y 5,6,7-trimetoxiflavonas (  $M < M - Me$  ) respectivamente ( Tabla 7 ).

SUSTITUYENTES				M		M - Me	
C-5	C-6	C-7	C-8	m/e	%	m/e	%
OH	MeO	MeO		298	100	283	68
OH		MeO	MeO	298	61	283	100
MeO	MeO	MeO		312	33	297	100
MeO		MeO	MeO	312	100	297	64

Tabla 7: Picos característicos en el espectro de masas de flavonoides.

### Espectrometría de masas de glicósidos de flavonoides

La investigación de los espectros de masas de los O-glicósidos de flavonoides se realiza por medio de sus derivados metilados y perdeuterometilados<sup>161-164</sup>. Sin embargo, estos

métodos presentan la desventaja que la metilación no es siempre completa y el producto obtenido requiere una purificación posterior.

Como método alternativo, se utilizaron los trimetilsilil derivados <sup>152,153</sup> que son de fácil preparación y no requieren tratamientos posteriores.

### Características de los espectros de masas de los derivados trimetilsililados de O-glicósidos

1.- Ión molecular: en todos los espectros se detecta el ión molecular, intenso comparado con el que presentan los O-glicósidos metilados, de al menos 1 %. Se observa además un pico más intenso a  $M - Me$  con una abundancia relativa de hasta 40 %.

2.- Agliconas: los espectros de masas muestran que la ruptura del enlace aglicona-azúcar involucra transferencia de H o trimetilsililo ( R ), formando los fragmentos  $A + 2R$ ,  $A + H + R$ ,  $A + R$ ,  $A + 2H$ ,  $A + H$  y los correspondientes a 15 una menos. Los picos más intensos en los espectros de 3-O-glicósidos y 7-O-glicósidos son  $A + H$  y  $A + H - Me$ . Los 7-O-glicósidos difieren típicamente de los 3-O-glicósidos por presentar  $A + H - Me$  de aproximadamente 100 %, mientras que el pico más intenso de 3,7-O-di y triglicósidos es el  $M + H + R - Me$ .

3.- Azúcares, secuencia y punto de unión: la formación de los fragmentos correspondientes a los azúcares está siempre combinada con pérdida de hidrógeno. Se observan los iones correspondientes a azúcares terminales ( T ) y en el caso de disacáridos, el azúcar completo ( D ). Las masas típicas de los fragmentos T y D para diferentes azúcares son : m/e 828 ( soforosa ), 740 ( rutinosa, neohesperidosa y robinobiosa ), 464 ( ácido glucurónico ), 406 ( metiléster del ácido glucurónico ), 450 ( glucosa y galactosa ) y 362 ( ramnosa ). Se observan también fragmentos debidos a pérdidas de trimetilsilanol ( ROH ) a partir de los iones mencionados:  $T - ROH$  y  $D - ROH$ , y otros

adicionales a masas bajas debidos a azúcares trimetilsililados (  $m/e$  217, 204, 147, 117 y 73 ), siendo este último frecuentemente pico base.

No es posible por este método distinguir entre isómeros ( glucosa y galactosa o rutinosa y robinobiosa ). Sin embargo sí en un disacárido, deducir la secuencia de unión, pues el azúcar terminal produce un intenso ión T - H ( 30% ) acompañado de T - ROH.

Al separarse el azúcar terminal, la carga puede también permanecer en el resto de la molécula dando lugar a fragmentos denominados S.

La posición de la unión interglicosídica puede detectarse fácilmente en el caso de disacáridos con uniones 1—2 y 1—6, ya que los azúcares con unión 1—6 ( rutinosa, robinobiosa ) presentan sólo un pico debido al disacárido D - H. En cambio, los espectros de los azúcares con unión 1—2 ( neohesperidosa y soforosa ) muestran además del ión D - H, otro D - ROH, con  $m/e$  651 y 739 respectivamente.

En la figura 29 se ejemplifican las rupturas de la rutina ( quercetina-3-O-rutinósido ).

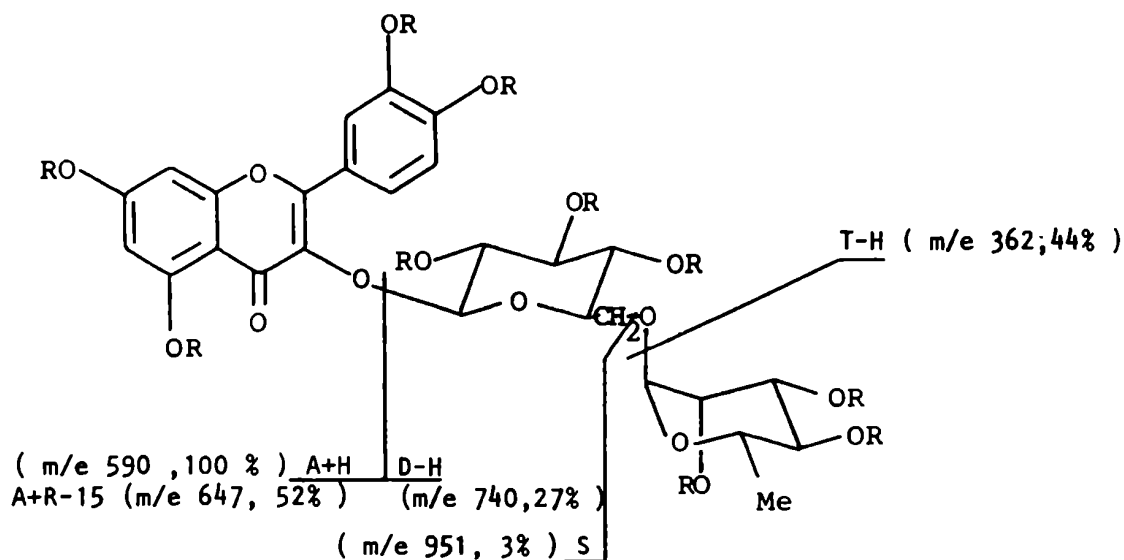


Figura 29

## 2.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA ( $^1\text{H}$ -RMN )

### Introducción

Massicot y Marthé <sup>165</sup> realizaron la primera correlación de las señales de los protones aromáticos, utilizando como solvente cloroformo deuterado. Sin embargo, como la mayoría de los flavonoides con un hidroxilo ubicado en una posición distinta de C-5 son insolubles en este solvente, no pudieron estudiar flavonoides polihidroxilados.

En 1964, Batterham y Highet <sup>166</sup> introdujeron como solvente dimetilsulfóxido deuterado ( DMSO- $d_6$  ) que tiene la ventaja de disolver tanto a agliconas como a glicósidos, evitando de esta manera la preparación de derivados. Como principal desventaja debe citarse el hecho que este solvente tiene alta temperatura de ebullición ( 189 °C ) por lo que no puede eliminarse fácilmente por destilación, y que además absorbe humedad atmosférica. Por esta última razón, en el espectro se observa una señal a aproximadamente 3,5 ppm que puede superponerse con las de otros protones del flavonoide.

Simultáneamente, Mabry <sup>167</sup> y Waiss <sup>168</sup> investigaron la utilidad de los derivados trimetilsililados para obtener los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los flavonoides que no eran solubles en cloroformo. Estos derivados presentan importantes ventajas:

1.- la síntesis e hidrólisis se efectúan cuantitativamente y en condiciones suaves. Debe tenerse particular cuidado en el caso de compuestos con hidroxilos unidos a C-5, ya que pueden hidrolizarse espontáneamente por efecto de la humedad ambiente. Para evitar esto último suele agregarse en el tubo de  $^1\text{H}$ -RMN unas gotas de agente sililante.

2.- los derivados trimetilsililados son solubles en cloroformo y en tetracloruro de carbono en todas las proporciones.

3.- los metilos del grupo trimetilsililo absorben entre 0,0 y 0,5 ppm por lo que no interfieren otras señales del espectro.

tro.

4.- de la comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los flavonoides parcial o totalmente sililados se puede obtener información sobre los H-3, H-6 y H-8 .

### Interpretación de los espectros

Protones del anillo A: en el caso de la 7-metoxiflavona la asignación de las señales es inmediata en base a las constantes de acoplamiento; el H-5 presenta una partición *orto* , el H-6 acoplamientos *orto* y *meta*, y el H-8 sólo *meta*.

Los protones unidos a C-6 y C-8 en flavonas, flavonoles e isoflavonas con sustitución 5,7-dihidroxi dan lugar a dos dobletes (  $J=2,5$  Hz ) en el rango de 6,0 y 6,5 ppm, apareciendo a campos mayores el H-6. Para las 5,7-dimetoxiflavonas estos hidrógenos aparecen a 6,36 y 6,57 ppm, mientras que en la 7-metoxiflavona los H-6 e H-8 se observan a 6,97 y 6,91 ppm respectivamente.

La adición de un metoxilo en C-5 debe producir la disminución de desplazamientos químicos de las posiciones *orto* y *para* al mismo. Para poder asignar las señales de cada uno de los hidrógenos, se compararon éstas de a pares, calculándose el desplazamiento producido y comparándolo con datos de desplazamiento tabulados:

1.-	H-6	6,36 ( efecto <i>orto</i> )	6,97 - 6,36 = 0,61
	H-8	6,57 ( efecto <i>para</i> )	6,91 - 6,57 = 0,34
2.-	H-6	6,57 ( efecto <i>orto</i> )	6,97 - 6,57 = 0,40
	H-8	6,36 ( efecto <i>para</i> )	6,91 - 6,36 = 0,55

Como previamente se había encontrado que el efecto de un metoxilo en posición *orto* era de 0,51 y en *para* de 0,33 ppm, el caso 1.- era el correcto. Por lo tanto, se asignó la señal a campos bajos a H-8 y la de campos altos a H-6 <sup>165</sup> . Las flavanonas y dihidroflavonoles 5,7-disustituídos presentan las señales de

H-6 e H-8 a campos mayores que las flavonas y flavonoles ( tabla 8 ) <sup>169,170</sup>

	H-6	H-8	Solvente
Flavonas y Flavonoles	6,25 - 6,30	6,46 - 6,55	DMSO
Flavonas y Flavonoles	6,00 - 6,20	6,30 - 6,50	TMS/Cl <sub>4</sub> C
Flavanonas y 3-hidroxi-flavanonas	5,85 - 5,95	5,92 - 5,95	DMSO
Flavanonas y 3-hidroxi-flavanonas	5,75 - 5,95	5,90 - 6,10	TMS/Cl <sub>4</sub> C

Tabla 8: Desplazamientos químicos ( ppm ) de H-6 e H-8.

Distinción entre H-3, H-6 e H-8: el único protón del núcleo flavonoídico que da una señal en la misma región que los H-6 e H-8 es el H-3 de las flavonas, que se observa como singulete cerca de 6,3 ppm. Ocasionalmente los H-3' y H-5' pueden también aparecer en esta zona del espectro. En flavonas 5,7-disustituidas, los H-6 y 8 aparecen como dobletes por lo que se diferencian fácilmente del H-3. Sin embargo, muchas flavonas tienen solamente un protón aromático en el anillo A ( por ej.: 5,6,7- o 5,7,8-trisustituidos ). Una técnica para distinguir los protones de C-3, 6 y 8 es comparar los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos totalmente trimetilsililados con el de un derivado conteniendo trimetilsililos en todos los hidroxilos excepto en el HO-5. De esta manera, el singulete correspondiente a H-3 sufre un desplazamiento a campos bajos en usualmente más de 0,15 ppm, mientras que el H-8 se desplaza a campos altos con la misma magnitud y el H-6 no se afecta <sup>169</sup>.

Protones del anillo B: los protones del anillo B se observan u-

sualmente entre 6,7 y 8,0 ppm, a campos más bajos que los correspondientes al anillo A. El esquema de señales observado para los protones del anillo B es característico del sistema de sustitución de éste y además sugiere el estado de oxidación del anillo C.

1.- Anillo B no sustituido: las isoflavonas, flavanonas y dihidrochalconas no sustituidas en este anillo, presentan una señal estrecha o aguda que es constante para un mismo tipo de sustancias; por ejemplo: flavanonas 7,42 ppm, dihidrochalconas 7,24 ppm. En cambio, en el caso de las flavonas, los protones del anillo B no sustituidos aparecen como dos grupos de señales mal resueltos a 7,83 y 7,50 ppm<sup>165</sup>, que integran para 2 y 3 hidrógenos respectivamente y se asignan fácilmente a los protones 2',6' y 3',4',5' respectivamente. Para este fin se calculó el efecto que tiene la introducción de un metoxilo en C-4' de la 5-hidroxi-7-metoxiisoflavona, cuyo espectro presenta una señal para 5 hidrógenos a 7,44 ppm. La 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavona, en cambio, muestra dos dobletes correspondientes al anillo B a 6,93 y 7,43 ppm atribuibles a H-3',5' y H-2',6' respectivamente, pues un metoxilo protege a la posición *orto* de una manera más pronunciada que a la *meta*. Se puede cuantificar así el efecto del metoxilo:

$$\begin{aligned} \text{efecto } \textit{orto} \text{ ( MeO ) } &: 7,44 \text{ ppm} - 6,93 \text{ ppm} = 0,51 \text{ ppm} \\ \text{efecto } \textit{meta} \text{ ( MeO ) } &: 7,44 \text{ ppm} - 7,43 \text{ ppm} = 0,01 \text{ ppm} \end{aligned}$$

En el caso, ahora, de la 5-hidroxi-7,4'-metoxiflavona, los protones del anillo B se observan a 7,00 y 7,83 ppm, pudiendo calcular el desplazamiento químico de los protones del anillo B en la 5-hidroxi-7-metoxiflavona utilizando los valores calculados para el desplazamiento producido por causa de un metoxilo en isoflavonas:

$$\begin{aligned} 1.- \quad 7,83 \text{ ppm} + 0,01 \text{ ppm} &= 7,84 \text{ ppm} \\ \quad 7,00 \text{ ppm} + 0,51 \text{ ppm} &= 7,51 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$2.- 7,83 \text{ ppm} + 0,51 \text{ ppm} = 8,34 \text{ ppm}$$

$$7,00 \text{ ppm} + 0,01 \text{ ppm} = 7,01 \text{ ppm}$$

Debido a que el primer grupo de valores es el más próximo al real, se llega a la conclusión que la señal a campos bajos es la de H-2' y 6'. La influencia de grupos metoxilos en las posiciones 3' y 4' son : *orto* ( 0,54 - 0,49 ppm ), *meta* ( 0,01 - 0,05 ppm ) y *para* ( 0,33 ppm ).

2.- Anillo B oxigenado en C-4': el espectro de este tipo de compuestos muestra dos dobletes con  $J \sim 8,5$  Hz, apareciendo el correspondiente a H-3' y 5', protegido por el sustituyente oxigenado de C-4' siempre a campos mayores que el de H-2' y 6'. La posición de este último doblete depende del estado de oxidación del anillo C, así por ej.: flavonas 7,70 - 7,90 ppm, flavonoles 7,90 - 8,10 ppm, flavanonas 7,10 - 7,30 ppm y dihidroflavonoles 7,20 - 7,40 ppm .

3.- Anillo B oxigenado en C-3' y C-4': en este caso, el esquema de señales es más complejo. El H-5' en flavonas y flavonoles trimetilsililados aparece como doblete centrado entre 6,70 y 7,10 ppm con  $J=8,5$  Hz. Las señales correspondientes a H-2' e H-6' usualmente se superponen apareciendo entre 7,20 y 7,90 ppm. La posición relativa de las señales de estos protones puede usarse para distinguir 3'-metoxi-4'-hidroxi de 3'-hidroxi-4'-metoxiflavonoles entre sí. La señal de H-2' está centrada a campos mayores que la de H-6' en flavonoles que contienen el grupo MeO-4'; lo contrario ocurre cuando un grupo MeO-3' está presente en un flavonol <sup>169</sup> .

4.- Anillo B oxigenado en C-3', C-4' y C-5': los H-2' y 6' se encuentran en flavonas y flavonoles a aproximadamente 7,20 ppm.



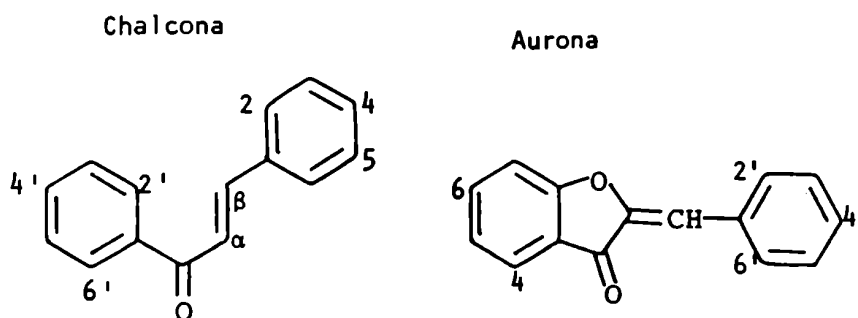
Efecto de sustitución en el anillo C: se estudió el efecto de introducir un metoxilo en C-3, comparando los espectros de la 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona y de la 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona, observándose un desplazamiento de 0,28 ppm para H-2' y 0,20 ppm para H-6' a campos más bajos <sup>165</sup>.

Se encontró considerable variación entre las distintas clases de flavonoides en relación a los hidrógenos del anillo C dependiendo del estado de oxidación del mismo.

En flavonas, el H-3 aparece como singulete centrado a aproximadamente 6,30 ppm que se superpone con las señales correspondientes al anillo A.

La señal correspondiente al H-2, en isoflavonas, se observa entre 7,60 y 7,80 ppm en  $\text{Cl}_4\text{C}$ ; al examinar estos compuestos usando  $\text{DMSO-d}_6$  como solvente, la señal se desplaza 1 ppm a campos más bajos, pudiendo usarse este hecho como diagnóstico.

En las chalconas, los H- $\alpha$  y H- $\beta$  aparecen como dobletes con  $J \sim 17$  Hz entre 6,70 - 7,40 ppm y 7,30 - 7,70 ppm respectivamente. El protón bencílico de las auronas produce un singulete entre 6,50 y 6,70 ppm.



Las flavanonas presentan un sistema tipo ABX; el H-2 absorbe a aproximadamente 5,20 ppm dando un cuarteto ( $J_{cis} = 5$  Hz;  $J_{trans} = 11$  Hz) por acoplamiento con cada uno de los hidrógenos de C-3. Los H-3 constituyen la parte AB del sistema y dan lugar a dos cuartetos superpuestos cerca de 2,80 ppm. Algunas líneas de los dos cuartetos pueden no ser observadas <sup>169</sup>.

## Glicósidos de flavonoides

### Señales correspondientes a los protones de azúcares

1.- Monosacáridos: el desplazamiento químico del protón anomérico de un azúcar unido directamente al hidroxilo de un flavonoide depende de la naturaleza del flavonoide, así como de la posición y estereoquímica de la unión.

En los glucósidos, el azúcar unido al HO-3 puede diferenciarse fácilmente del unido a C-4', C-5 o C-7 pues en estos últimos el protón de C-1'' ( protón anomérico ) aparece cerca de 5,00 ppm mientras que en un 3-O-glucósido de flavonoide aparece en aproximadamente 5,80 ppm. La glucosa forma comúnmente uniones  $\beta$  y como consecuencia el H-1'' presenta un acoplamiento *diaxial* con el H-2'' observándose un doblete con una constante de acoplamiento de aproximadamente 7 Hz. Los ramnósidos de los flavonoides se encuentran usualmente como  $\alpha$ -L-ramnósidos en los cuales el H-1'' presenta un acoplamiento *ecuatorial - ecuatorial* con  $J \sim 2$  Hz. Tanto en los 3- como en los 7-O-ramnósidos la señal del H-1'' se observa entre 5,00 - 5,30 ppm y el metilo ( H-6'' ) entre 0,80 - 1,20 ppm. En el caso de la quercetina-3-O-ramnósido se observa un doblete a 0,85 ppm (  $J = 6,5$  Hz ), mientras que en el 7-O-ramnósido esta señal es compleja y se observa a 1,20 ppm, lo cual se debe a la libre rotación de la ramnosa unida a C-7 <sup>169</sup> .

2.- Ramnoglucósidos: todos los ramnoglucósidos conocidos son rutinósidos o neohesperidósidos. Se diferencian en el punto de unión de la ramnosa a la glucosa y pueden distinguirse analizando los <sup>1</sup>H-RMN de los derivados trimetilsililados <sup>171</sup>. En los trimetilsilil éteres de 7-y 3-O-rutinósidos el H-1''' de la ramnosa se observa a 4,20 - 4,40 ppm (  $J \sim 2$  Hz ) y los protones del C-6''' como una señal compleja entre 0,70 y 1,00 ppm. En cambio, en los 3-y 7-O-neohesperidósidos el protón de C-1''' de la ramnosa absorbe entre 4,90 - 5,00 ppm (  $J = 2$  Hz ) y el me

tilo aparece como doblete entre 1,10 - 1,30 ppm (  $J = 6$  Hz ).

### Desplazamientos inducidos por solventes

Es conocido el hecho de que el benceno induce desplazamientos a campos altos de varias señales en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, lo cual se explicó en base a la forma plana del benceno y al diamagnetismo que presentan las zonas por encima y por debajo del anillo. Esto es particularmente útil para diferenciar señales de metoxilos magnéticamente no equivalentes entre sí <sup>172</sup>. Por ejemplo, en el 1,2,3-trimetoxibenceno los metoxilos aparecen como un singulete ancho en deuterocloroformo, pero en benceno los metoxilo 1 y 3 están desplazados a campos bajos en 0,38 ppm y el metoxilo de C-2 a campos altos en 0,11 ppm, presumiblemente por inhibición estérica en la solvatación del último <sup>172</sup>.

Bowie *et al.* <sup>173</sup> estudiaron una serie de compuestos metoxilados y observaron que, excepto el ejemplo ya mencionado, la resonancia de los metoxilos sufren un desplazamiento a campos altos al cambiar de un solvente inerte ( $\text{Cl}_4\text{C}$ ) a un solvente complejante como el benceno. Los resultados se resumen en la tabla 9.

Los resultados indican que los desplazamientos por solventes de 62 a 64 ( 0,44 a 0,45 ppm ) son virtualmente idénticos para un solo metoxilo unido a un anillo bencénico o en los C-1 o C-2 de un anillo naftalénico. En los dimetoxibencenos, 65 - 67, el isómero *meta* muestra un desplazamiento muy similar al anisol, en cambio los isómeros *orto* y *para* muestran desplazamientos menores. El desplazamiento observado para 1,3,5-trimetoxibenceno 68 es sólo ligeramente menor que el de 66. Pero los resultados obtenidos para el trimetilpirogalol 69 son diferentes: el metoxilo central está desprotegido en benceno con respecto a la ubicación de la señal en  $\text{Cl}_4\text{C}$ , mientras que los otros metoxilos están fuertemente protegidos. Este resultado es interesante ya que los efectos de protección y desprotección observados en una misma molécula dan cierta indicación de un comple-

Tabla 9: Desplazamientos químicos ( $\delta_{\text{CCl}_4}$ ,  $\delta_{\text{C}_6\text{H}_6}$ ) y desplazamiento por solvente ( $\Delta\delta = \delta_{\text{CCl}_4} - \delta_{\text{C}_6\text{H}_6}$ ) en ppm.

Compuestos	$\delta_{\text{CCl}_4}$	$\delta_{\text{C}_6\text{H}_6}$	$\Delta\delta$
Metoxibenceno <u>62</u>	3,77	3,33	+ 0,44
$\alpha$ -metoxinaftaleno <u>63</u>	3,99	3,54	+ 0,45
$\beta$ -metoxinaftaleno <u>64</u>	3,86	3,41	+ 0,45
1,2-dimetoxibenceno <u>65</u>	3,80	3,42	+ 0,38
1,3-dimetoxibenceno <u>66</u>	3,74	3,31	+ 0,43
1,4-dimetoxibenceno <u>67</u>	3,72	3,35	+ 0,37
1,3,5-trimetoxibenceno <u>68</u>	3,73	3,34	+ 0,39
1,2,3-trimetoxibenceno <u>69</u>	3,79 ( 1,3 ) 3,71 ( 2 )	3,41 ( 1,3 ) 3,82 ( 2 )	+ 0,38 ( 1,3 ) - 0,11 ( 2 )

amiento estereoespecífico. Además el pequeño desplazamiento por solvente observado para el *p*-dimetoxibenceno 67 en relación a 62 sugiere que la magnitud del desplazamiento depende de la naturaleza de un sustituyente adicional en *para*. Los resultados sugieren que los desplazamientos por solvente de las resonancias de los grupos metoxilo en metoxibencenos se incrementan al aumentar la capacidad atractora de electrones del sustituyente ubicado en *para*. Estos hechos son compatibles con una interacción dipolo-dipolo inducido pero no excluyen la posibilidad de que la interacción soluto-solvente aumente al disminuir la densidad electrónica del anillo aromático.

El uso de desplazamientos con distintos solventes fue utilizado también en la elucidación estructural de cumarinas <sup>174</sup>.

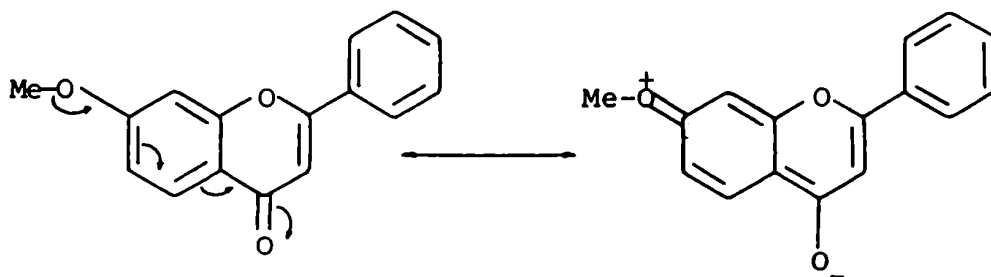
Wilson *et al.* <sup>175</sup> estudiaron estos efectos en flavonas determinando que si el entorno de un grupo metoxilo es definido, los desplazamientos producidos son característicos del tipo de sustituyentes vecinos a este, y frecuentemente también de la posición de sustitución. En la tabla 10 se dan intervalos de desplazamientos observados para grupos metoxilos ubicados en C-5,

C-7, C-2' y C-4' en ausencia de grupos *o*-metoxilo y *o*-hidroxilo.

Tabla 10: Diferencias de desplazamiento químico en  $Cl_3CD$  y  $C_6D_6$  para metoxilos unidos a C-3, C-5, C-7, C-2' y C-4' en ausencia de sustituyentes en posición *orto*.

Posición del metoxilo	Valores de $\Delta\delta$
C-3	-0,07 a +0,34
C-5	+0,43 a +0,58
C-7	+0,54 a +0,76
C-2'	+0,46 a +0,53
C-4'	+0,54 a +0,71

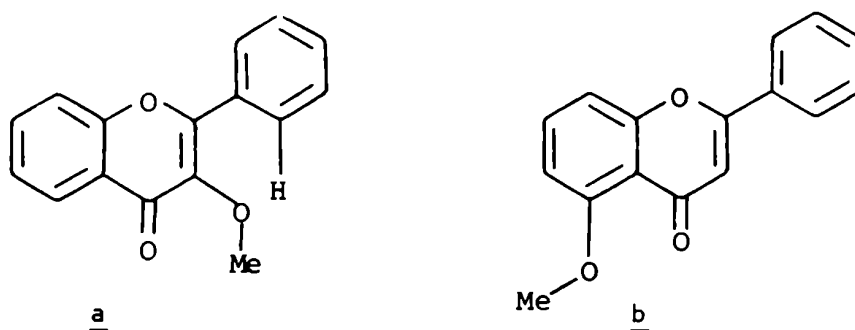
Debe tenerse en cuenta que la vecindad de un metoxilo unido a C-3 no puede ser alterada por sustitución de un carbono vecino. Por lo tanto, resulta aparente que metoxilos unidos a C-5, C-7, C-2' y C-4' sin sustituyentes en posición *orto* pueden diferenciarse de un MeO-3. Para grupos metoxilos aislados en C-5, C-7, C-2' y C-4' los corrimientos obtenidos son siempre mayores que el del anisol 62 ( 0,46 ) <sup>173</sup>. Esta observación es tá de acuerdo con la habilidad formal que tienen los grupos metoxilo de conjugarse con el grupo carbonilo.



Este efecto de conjugación disminuye la densidad electrónica en el átomo de oxígeno del metoxilo y aumenta la asociación del benceno a este sitio deficiente en electrones con un

aumento paralelo del efecto protector.

La resonancia del MeO-3 está desprotegida o ligeramente protegida en benceno. Esto sugiere que este grupo prefiere la conformación a, en la cual la asociación del benceno con el grupo carbonilo tendrá un efecto desprotector. Como el valor de  $\Delta\delta$  para el MeO-5 es sólo ligeramente menor en magnitud que los de metoxilos unidos a C-7, C-2' y C-4', se deduce que en ausencia de sustituyentes en C-6 la conformación preferida es la b.



En los compuestos estudiados por Wilson *et al.*<sup>175</sup> se observó que el metoxilo central, cuando existen tres grupos vecinales, sufre desplazamientos positivos o negativos ( +0,13 a -0,12 ), como se verificó con los compuestos 70 y 71 ( Fig. 30 ). Este comportamiento es análogo al presentado por el 1,2,3-trimetoxibenceno, y usado cautamente puede ser útil para indicar la presencia de tres metoxilos adyacentes en productos naturales. La razón para estos corrimientos pequeños, negativos o positivos, es debida probablemente a:

- 1.- Inhibición estérica en la solvatación del metoxilo central.
- 2.- Disminución de la solvatación del metoxilo central debido a la presencia de dos grupos donores de electrones en los metoxilos externos.
- 3.- Solvatación sólo en los metoxilos externos, de tal manera que la estereoquímica de la asociación ubique al metoxilo central en la zona de desprotección.

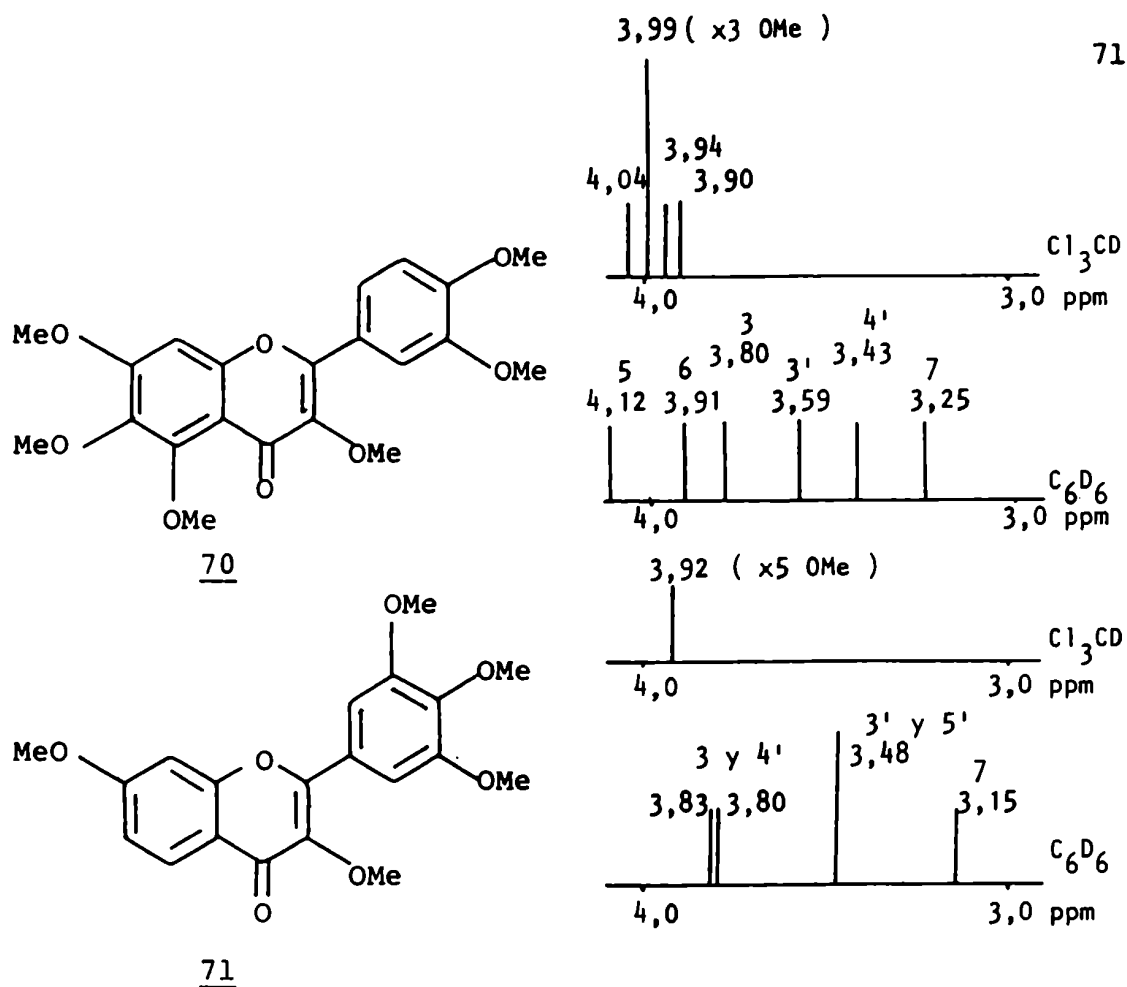
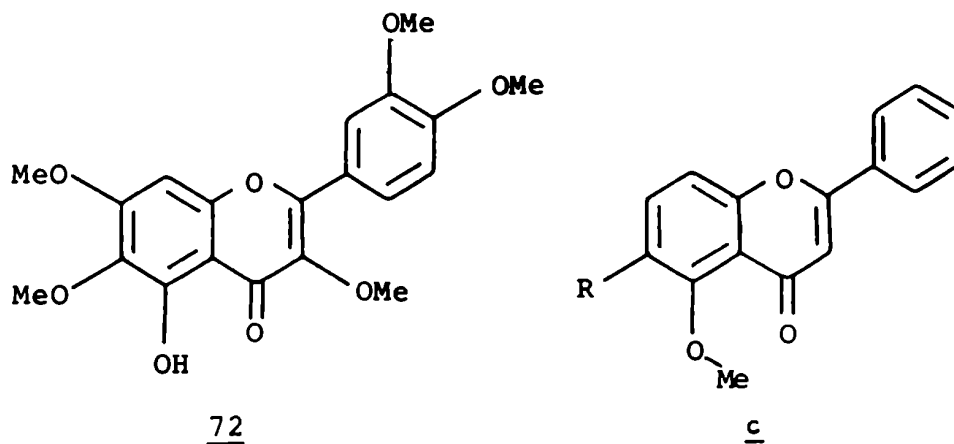


Figura 30

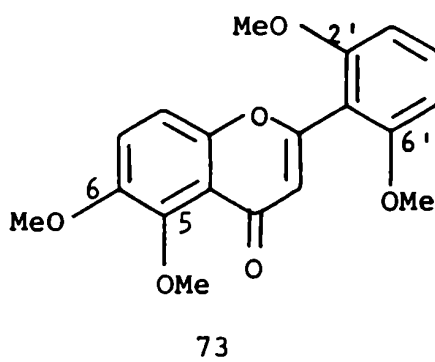
El átomo de oxígeno del anillo C, unido a C-9 debería tener un efecto similar al de un hipotético metoxilo unido a esa posición. De hecho se verifica en la 7,8-dimetoxiflavona que la resonancia correspondiente al MeO-8 sufre sólo pequeños desplazamientos. Similarmente un grupo metoxilo situado entre un hidroxilo y un metoxilo, donde ambos tienen la habilidad de conjugarse con el grupo carbonilo, tiene un desplazamiento pequeño (positivo o negativo); por ejemplo, en el compuesto 72, el MeO-6 se desplaza en +0,03 ppm.

El desplazamiento con solvente de MeO-5 sufre un cambio drástico en magnitud, de un valor relativamente grande (ver Tabla 10) a valores pequeños o negativos al introducir un grupo metoxilo en C-6. Este cambio está de acuerdo a lo esperado, ya que la introducción de un metoxilo en posición *orto* causa una disminución algebraica del valor de  $\Delta\delta$  y además un sustituyente en C-6 conducirá a una mayor población del conformero  $c_1$ ,



con el metilo del MeO-5 próximo al extremo negativo del dipolo del carbonilo; ésta es una zona de desprotección debido a la asociación del benceno al grupo carbonilo <sup>176</sup>.

Este desplazamiento característico fue útil en la elucidación estructural de zapotina 73 <sup>177</sup> en la cual el MeO-5 sufre un desplazamiento  $\Delta\delta = -0,03$  ppm, MeO-6  $\Delta\delta = +0,66$  y los metoxilos de C-2' y C-6'  $\Delta\delta = +0,56$ .



### Desplazamientos inducidos por reactivos paramagnéticos

El estudio de los desplazamientos inducidos por reactivos paramagnéticos; por ej.:  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  [tris(1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-7,7-dimetil-4,6-octadionato) de europio]; resultó un método adecuado para la elucidación estructural de flavonoi-



des. En particular, es útil para distinguir entre protones unidos a C-6 o C-8 en flavonas, ya que el H-6 muestra desplazamientos mayores que los presentados por el H-8.

Una manera de cuantificar los desplazamientos inducidos por estos reactivos es obtener el valor " S " , propuesto por Cockerill y Rackham <sup>178</sup> , que representa la pendiente de la recta obtenida al graficar el valor de desplazamiento químico contra la relación molar de  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  a flavonoide, de acuerdo a la ecuación:

$$\delta_E = \delta + S \cdot \frac{[\text{Eu}(\text{fod}_3)]}{[\text{flavonoide}]}$$

$\delta_E$  = desplazamiento químico del compuesto complejado

$\delta$  = desplazamiento químico del compuesto sin complejar

Los resultados se pueden resumir de esta manera <sup>179</sup>:

1.- el MeO-5 sufre los mayores desplazamientos (12,40 a 18,90 ppm ) indicando que la formación del complejo ocurre en la cercanía del carbonilo.

2.- el H-6 sufre desplazamientos considerables ( 5,70 a 7,20 ppm ) si se lo compara con H-8 ( 1,12 a 1,56 ppm )

3.- metoxilos unidos al anillo B muestran desplazamientos muy pequeños por estar alejados del sitio de formación del complejo.

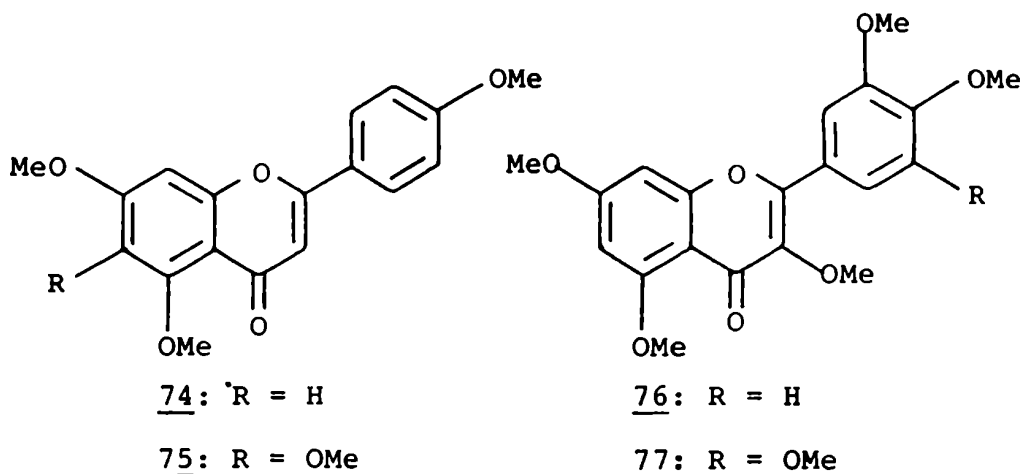
4.- el H-3 muestra desplazamientos pequeños ( -1,50 a 0,08 ppm ) así como MeO-3 ( 0,80 a 0,90 ppm ), si se compara con MeO-6 ( 5,16 ppm ) y MeO-7 ( 1,00 a 1,30 ppm ).

Como ejemplo pueden verse en la tabla 11 los valores de " S " para cuatro flavonas distintas. ( 74, 75, 76 y 77 ).

Es de notar que el H-3 del compuesto 75 presenta un desplazamiento a campos altos ( -1,54 ppm ) debido a un valor grande de  $\theta$  en la ecuación de Mc Connell-Robertson:

$$S = K ( 3 \cos^2 \theta - 1 ) / r^3 \quad \theta = \text{ángulo X-Eu-O}$$

$r = \text{distancia Eu-X}$



**Tabla 11:** Valores de " S " para distintos flavonoides

Posición	<u>74</u>	<u>75</u>	<u>76</u>	<u>77</u>
3	0,08	-1,54	0,80	0,92
5	13,34	12,34	14,08	18,88
6	6,32	5,16	5,70	7,16
7	1,12	1,02	1,28	1,14
8	1,56	1,18	1,12	1,30
2',6'	0	-0,50	0,46	0,46
3',5'	-0,02	-0,26	0,14	0,12
4'	0	-0,18	0,04	0,32

La ecuación de Mc Connell-Robertson indica los valores de S provocados por interacciones de pseudocontacto <sup>180</sup>.

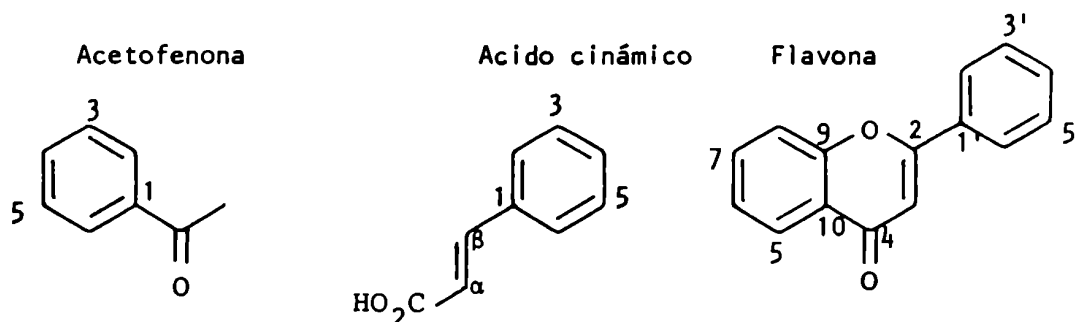
Otra manera de cuantificar el desplazamiento producido por reactivos de desplazamiento es el valor  $\Delta E_{u} = \delta_{Eu}^{n=1} - \delta_{Eu}^{n=0}$ . El procedimiento involucra la medida de la diferencia de desplazamiento en ausencia y presencia de un equivalente molar del reactivo de desplazamiento <sup>181,182</sup>. Este valor se adopta cuando se produce una curvatura considerable al graficar desplazamientos en función de la relación molar, en especial en el caso de  $Eu(DPM)_3$ , [tris(dipivalometanato) de europio].

Es interesante el uso de distintos reactivos de despla

zamiento <sup>182</sup> ya que algunas señales pueden desplazarse en sentido opuesto. En la 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona, el H-3 muestra distintos desplazamientos con  $\text{Eu}(\text{DPM})_3$  y  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  ( 2,04 y -4,50 ppm respectivamente ) lo que permite diferenciar a este hidrógeno del H-8.

### 3.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE <sup>13</sup>C ( <sup>13</sup>C-RMN )

Ternai y Markham <sup>183</sup> realizaron un estudio sobre flavonoides hidroxilados con el objeto de proveer conclusiones de base para el estudio de otros compuestos más complejos. Como trabajo preliminar se estudiaron acetofenonas y ácidos cinámicos modelo en el mismo sistema de solvente utilizado en el estudio de flavonoides (  $\text{DMSO}-\text{H}_2\text{O}$  ).



Los <sup>13</sup>C-RMN de las acetofenonas ( Tabla 12 ) presentan un singulete a campos bajos en la región de 205-208 ppm atribuido al carbono carbonílico y un singulete en la región de campos altos entre 27 y 35 ppm debido al carbono metílico.

En la 2,6-dihidroxiacetofenona, quedan sin asignar 4 señales. La señal a 162,5 ppm corresponde a los 2 carbonos sustituidos por oxígeno, y la señal a campos altos, 108,7 ppm a los carbonos *orto* a los hidroxilos, C-3 y C-5. El C-4 aparece a campos más bajos que el esperado para un carbono *meta* al sitio de hidroxilación ( 137,8 ppm ). El C-1 se observa a 111,7 ppm y es fácilmente identificable por su baja intensidad, debida a tiempos

de relajación largos y a un escaso incremento nuclear Overhauser. La asignación de otras acetofenonas se desprende de la anterior; por ejemplo, en la 2,4,6-trihidroxiacetofenona la introducción de un hidroxilo en C-4 provoca un desplazamiento de este carbono a campos más bajos en 27,6 ppm, los C-2 y C-6 a campos bajos en 2,8 ppm, los C-1 y C-3 / C-5 a campos más altos en 6 ppm y 12,6 ppm respectivamente. Todos estos desplazamientos son de la magnitud esperada por la aplicación de los datos de efectos de sustituyentes sobre el desplazamiento químico de carbonos de compuestos aromáticos <sup>184</sup>.

Tabla 12: Desplazamientos químicos ( $\delta_c$ ) de acetofenonas.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	Me
2-hidroxiacetofenona	121,1	116,9	116,6	138,2	118,9	132,9	207,3	28,3
2,4-dihidroxiacetofenona	114,3	165,0	103,7	165,6	109,7	135,2	205,1	27,3
2,6-dihidroxiacetofenona	111,7	162,5	108,7	137,8	108,7	162,5	207,3	34,4
2,4,6-trihidroxiacetofenona	105,7	165,2	96,1	165,5	96,1	165,2	205,0	33,6

Los espectros de <sup>13</sup>C-RMN de los ácidos cinámicos (Tabla 13) muestran una señal a aproximadamente 170,6 ppm devida al carbono carbonílico y otras correspondientes a metoxilos aromáticos a aproximadamente 57 ppm.

Tabla 13: Desplazamientos químicos ( $\delta_c$ ) de ácidos cinámicos.

	C <sub>β</sub>	C <sub>α</sub>	CO	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
ác. 4-hidroxicinámico	146,7	116,0	170,6	126,9	131,7	117,3	160,3	117,3	131,7
ác. 4-hidroxi-3-metoxicinámico	146,9	116,2	170,6	127,4	112,3	149,1	149,8	116,9	124,2
ác. 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico	147,2	116,6	170,6	126,3	107,0	149,2	138,8	149,2	107,0

El espectro del ácido 4-hidroxicinámico muestra dos señales intensas a 131,7 y 117,3 ppm que se asignan a dos pares de carbonos equivalentes C-2 / C-6 y C-3 / C-5. El C-1 ubicado en *para* al hidroxilo corresponde a la señal de 126,9 ppm.

Las señales restantes, a 146,7 y 111,6 ppm se deben a los carbonos vinílicos ( C-2 y C-3 en la numeración de la flavona ).

Flavonas y flavonoles: en el caso de la 5-hidroxi flavona, su espectro puede interpretarse en base al de la 2,6-dihidroxiacetofenona y al de la flavona propiamente dicha<sup>185</sup>. Para la asignación de los C-4, 7 y 10 se utilizó el primer modelo y para los C-1',2',3',4',5',6' y C-3 el espectro de la flavona ( Tabla 14 ). Las señales a 110,8 y 107,2 ppm son las correspondientes a C-6 y C-8, estas asignaciones se hacen en base al acoplamiento que presentan estos carbonos con el protón de HO-5<sup>186</sup>. En la flavona la señal correspondiente a C-2 se observa a 163,2 ppm y la introducción de un hidroxilo en C-5 no debería afectar la densidad electrónica en ese sitio, por lo tanto se considera que la señal de C-2 es aquella que aparece a 164,1 ppm. La señal de C-9 se observa en la flavona a 156,3 ppm y debería sufrir un desplazamiento a campos bajos por la introducción de un hidroxilo en *meta* y se atribuye por tanto a 159,8 ppm, mientras que la señal observada a 155,8 ppm corresponde al C-5.

El espectro de la 5,4'-dihidroxi flavona se aproxima al de la 5-hidroxi flavona, observándose principalmente cambios en las señales de los carbonos del anillo B. El nuevo carbono oxigenado, C-4', aparece como singulete a 161,7 ppm y los carbonos *orto* ( C-3' y C-5' ) *meta* ( C-2' y C-6' ) y *para* ( C-1' ) se desplazan en -12,2 ; +2,8 y -8,6 ppm respectivamente, de acuerdo con los valores aceptados para este tipo de sustitución.

Las asignaciones de las señales correspondientes a la apigenina ( 5,7,4'-trihidroxi flavona ) se hacen en base a las de 5,4'-dihidroxi flavona ). Esto es cierto para los carbonos de los anillos B y C, excepto el C-3 que no puede distinguirse inmediatamente del C-10. Estos dos carbonos se observan a 104,3 y 105,1 ppm. La primera señal es la menos intensa y por lo tanto corresponde al carbono cuaternario C-10. Esto se confirma comparando el desplazamiento químico del C-10 ( numeración correspondiente a las flavonas ) en acetofenonas y flavonas. La diferencia de desplazamiento químico de este carbono en la 2,6-dihidroxiacetofenona

Tabla 14: Desplazamientos químicos (  $\delta_c$  ) de flavonas y flavonoles

	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
Flavona	163,2	107,6	178,4	125,7	125,2	133,7	118,1	156,3	124,0	131,8	126,3	129,0	131,6	129,0	126,3
5-hidroxiflavona	164,1	105,6	182,9	155,8	110,8	135,6	107,2	159,2	110,1	130,5	126,4	128,9	132,0	128,9	126,4
5,4'-dihidroxi- flavona	165,5	103,9	183,4	156,4	111,4	136,2	108,0	160,0	110,5	121,9	129,2	116,7	161,7	116,7	129,2
5-hidroxil-4'-me- toxi flavona	164,1	104,0	182,6	155,7	110,6	135,2	107,0	159,7	109,9	119,2	128,2	114,5	163,4	114,5	128,2
5,7,4'-trihidro- xi flavona	165,5	104,3	183,2	158,7	100,3	164,9	95,6	162,0	105,1	122,7	129,8	117,3	161,8	117,3	129,8
5,7,3',4'-tetra- hidroxiflavona	165,1	103,9	182,6	158,2	99,9	164,3	94,9	161,6	104,8	123,1	114,4	145,9	149,8	117,0	120,1
3',4'-dihidroxi- flavona	164,2	105,4	177,9	125,7	125,1	134,4	118,4	156,1	123,6	122,9	114,0	145,8	149,5	116,6	119,5
3',4'-dimetoxi- flavona	162,6	105,8	176,6	125,0	124,6	133,6	118,1	155,6	123,7 <sup>*</sup>	123,3 <sup>*</sup>	110,5	149,3	152,3	112,5	120,0
5-hidroxil-3',4'- dimetoxiflavona	164,1	104,2	182,6	155,7	110,6	135,1	106,4	159,8	109,9	122,9	110,6	149,3	152,7	112,4	120,3
3',4'-dihidroxi- flavonol	147,7	138,1	173,8	125,4	125,4	134,5	118,8	155,5	121,5 <sup>*</sup>	123,4 <sup>*</sup>	116,3	145,4	148,1	116,7	121,7
5,7,3',4'-tetra- hidroxiflavonol	148,3 <sup>*</sup>	136,7	176,7	157,5	99,6	164,5	95,0	161,4	104,4	123,7	116,5	145,7	148,0 <sup>*</sup>	116,9	122,0

<sup>\*</sup> Las asignaciones pueden invertirse.  
Los valores se expresan en ppm respecto de TMS.

fenona y su flavona equivalente, 5-hidroxi<sup>u</sup>flavona, es de 1,5 ppm. Cuando este valor se aplica al del desplazamiento químico del equivalente a C-10 en 2,4,6-trihidroxiacetofenona, el valor calculado para C-10 en la apigenina es de 104,2 ppm. Por lo tanto, en este último compuesto se atribuye la señal a 104,3 ppm al C-10 y la de 105,1 ppm al C-3.

La introducción de un hidroxilo en C-7 de 5,4'-dihidroxi<sup>u</sup>flavona causa en las señales de los carbonos *orto*, C-6 y C-8, un desplazamiento a campos altos en aproximadamente 13ppm. Las únicas señales en esta zona son las de 100,3 y 95,6 ppm que se asignan a C-6 y C-8 respectivamente en base a los acoplamientos que presentan con el protón de HO-5. Se esperan también desplazamientos de los carbonos oxigenados C-5 y C-9, pero no en C-4' y C-2. De acuerdo a esto las señales a 165,5 y 161,8 ppm se asignan a C-2 y C-4' respectivamente. Las absorciones de C-5 y C-9 deben desplazarse a campos más bajos en aproximadamente la misma proporción; en base a esto les corresponden las señales de 158,7 y 162,0 ppm respectivamente. La restante a 164,9 ppm se asigna al C-7.

El 3',4'-dihidroxi<sup>u</sup>flavonol ( 3,3',4'-trihidroxi<sup>u</sup>flavona ) presenta un espectro con sólo 13 señales <sup>183</sup>. Sin embargo, una de ellas es muy intensa y debe representar a los C-5 y C-6 ( 125,4 ppm ) por analogía con el espectro de la flavona . La otra señal faltante corresponde a uno de los carbonos cuaternarios, C-1' o C-10, uno de los cuales se encuentra a 123,4 ppm. La señal faltante está superpuesta con la correspondiente a C-6' a 121,7 ppm, hecho que se comprueba estudiando el espectro acoplado con protón, en el cual la señal correspondiente a C-6' se elimina de esta región por acoplamiento. La señal a 123,4 ppm se asigna tentativamente al C-1' ya que en el espectro de 5,7, 3',4'-tetra<sup>u</sup>hidroxi<sup>u</sup>flavonol, donde el C-10 se encuentra alejado de la región, el C-1' aparece a 123, 7 ppm. La comparación con el espectro de la 3'4'-dihidroxi<sup>u</sup>flavona permite la asignación de la mayoría de las señales. Dos son completamente nuevas (147,7 y 138,1 ppm ) y deben representar a los C-2 y C-3, pues la intro-

ducción de un HO-3 tiene que producir un desplazamiento importante. En base a los efectos de sustituyentes, la señal correspondiente a C-2 debe sufrir un desplazamiento a campos altos, desde 164,2 a aproximadamente 151,0 ppm y el C-3 a campos bajos, de 105,4 a aproximadamente 132,0 ppm. Por tanto la señal a 147,7 ppm se considera representante de C-2 y la otra, a 138,1 ppm de C-3. Esto se confirma por la presencia de un singulete a 138,1 ppm en el espectro acoplado. Los desplazamientos observados son mayores que los esperados; esto es análogo a la relación entre 2-ciclohexenona y 2-hidroxiciclohexenona<sup>187</sup>. Sin embargo, el efecto de hidroxilación en la 2-ciclohexenona es de 17,2 ppm sobre C-2 y -32,1 ppm sobre C-3, mientras que en flavonas este efecto es de 29,2 y -16,8 ppm para los carbonos correspondientes. Estos últimos desplazamientos son similares a los observados en un anillo aromático y pueden deberse a la aromaticidad parcial del anillo C (pirona)<sup>191</sup>.

Los otros únicos carbonos afectados notablemente por la introducción del HO-3 son C-2' y C-6'. Estos dos carbonos y C-5' se encuentran a 121,7; 116,7 y 116,3 ppm. El C-5' es fácilmente identificable (116,7 ppm) porque carece de acoplamiento con hidrógenos *meta* en el espectro acoplado con protón. La señal a campos mayores corresponde al C-2' que sufrió, como C-6', un desplazamiento a campos bajos de aproximadamente 2 ppm.

Al comparar el espectro anterior con el de 3',4'-dimetoxiflavonol se encuentran diferencias notables en los carbonos del anillo B. Por ejemplo, se observan desplazamientos a campos más bajos de los carbonos sustituidos (C-3' y C-4') en aproximadamente 3 ppm, junto con desplazamientos a campos más altos, en 4 ppm, para C-2' y C-5'. Estos desplazamientos son mayores que los esperados por efecto de sustituyente<sup>184,188</sup> y se deben probablemente a interferencias estéricas entre los grupos metoxilo vecinos, provocando desviaciones de las reglas de aditividad<sup>189,190</sup>.



Estudio de los acoplamientos  $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ : es de utilidad para asignar las resonancias de carbonos específicos y debe efectuarse el estudio de los espectros totalmente acoplados de alta resolución; es de poca utilidad, en este caso, la técnica SFORD.

Weigert y Roberts <sup>192</sup> demostraron que las constantes de acoplamiento a 2 y 3 enlaces,  $^2\text{J}_{\text{CCH}}$  y  $^3\text{J}_{\text{CCCH}}$  en el benceno valen 1 y 7 Hz respectivamente. Por ejemplo, el espectro acoplado de la 5-metoxiflavona muestra un doble triplete para la resonancia asignada a C-4'; un doblete altamente espaciado  $^1\text{J} = 161$  Hz debido al protón unido directamente a C-4', y el triplete en que se parte cada una de las ramas del doblete con  $^3\text{J} = 7$  Hz indica que el C-4' es *meta* a dos hidrógenos. La resonancia del C-7 aparece como doblete ( $^1\text{J} = 164$  Hz) indicando que no tiene hidrógenos en relación *meta*. En el caso de monometoxiflavonas <sup>193</sup> los C-5 a C-8 pueden aparecer como dobletes ( $^1\text{J} = 165$  Hz) o doble dobletes, dependiendo de la presencia o ausencia de hidrógenos en posición *meta*.

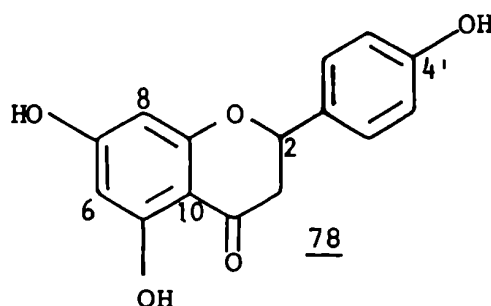
Los picos de baja intensidad debidos a carbonos cuaternarios son difíciles de observar en espectros acoplados porque pueden estar ocultos por absorciones más intensas originadas por la partición de carbonos unidos directamente a hidrógeno. Sin embargo, si pueden observarse con resolución adecuada, pueden dar información, especialmente referente a la sustitución en el anillo A. En el caso de monometoxiflavonas, el C-9 se observa como triplete con estructura fina, excepto en la 5-metoxiflavona donde se puede ver un doble doblete ( $^3\text{J} \sim 6$  Hz,  $^2\text{J} \sim 1$  Hz) ya que una posición *meta* se encuentra bloqueada por el sustituyente; y en la 7-metoxiflavona donde la partición no es clara pero no es un doble triplete.

El C-10 da también información acerca del esquema de sustitución del anillo A. En la 4'-metoxiflavona, el C-10 se observa claramente como un doble triplete. El valor de  $^3\text{J} = 7$  Hz en el triplete indica que el C-10 tiene 2 hidrógenos *meta*; en cambio en la 8-metoxiflavona este carbono aparece como doble doblete ( $^3\text{J} \sim 7$  Hz y  $^2\text{J} \sim 1$  Hz) ya que una posición *meta* está ocupada.

En general, las pequeñas particiones de un carbono de terminado con hidrógenos *orto* o *para* ( $^2J$  y  $^4J \sim 1$  Hz), se observan en algunos casos y no en otros. Estas pequeñas particiones por tanto, no son de utilidad debido a su incidencia irregular.

5-hidroxiflavonoides: este tipo de compuestos demostraron presentar acoplamientos spin-spin entre los carbonos aromáticos y el protón quelado del HO-5 ( C-5 - OH...OC-4 ) hecho que permite identificar a estos átomos.

Entre los carbonos  $sp^2$  del compuesto 78 se espera que C-10, C-6 y C-8 resuenen a campos más altos. El espectro acoplado a protón en la zona de 90 a 105 ppm muestra las resonancias de dos metinos y un carbono cuaternario. Los dos múltiples asignables a C-6 y C-8 difieren en su estructura fina. El C-6 presenta un doble triplete debido al acoplamiento con H-8 y HO-5. Esta asignación se confirma al observar el espectro luego de intercambiar con  $D_2O$ , que transforma la señal del C-6 en un doble doblete. La constante de acoplamiento  $^3J[C-6 - C-5-OH]$  es igual a  $4,5 \mp 1,0$  Hz. La señal correspondiente a C-8 se observa siempre como un doble doblete. El C-10 presenta un doble triplete centrado a 101,5 ppm y colapsa a un triplete luego del intercambio con  $D_2O$ ,  $^3J[C-10 - C-5-OH] = 4,5 \mp 1,0$  Hz. Los C-5, C-7 y C-9 deben ser los carbonos cuaternarios más desprotegidos y se asignan a tres señales entre 162 y 167 ppm.



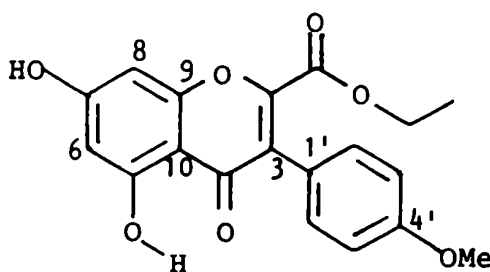
Al comparar los espectros acoplados sin y con intercambio con  $D_2O$  se verifica que todas las señales correspondientes a esos carbonos presentan acoplamientos con HO-5. La señal

centrada a 166,5 ppm, doble triplete, se convierte en un triplete luego del intercambio con  $D_2O$  y se asignó a C-7. La menor de las dos constantes se atribuye a  ${}^4J [C-7 - C-5-OH] = 1,5 \mp 0,5$  Hz y la mayor proviene de acoplamiento de igual magnitud con los dos protones geminales unidos a C-6 y C-8;  ${}^2J [C-7 - C-6-H] = {}^2J [C-7 - C-8-H] = 3,0 \mp 0,5$  Hz. Lo correcto de esta asignación se verificó comparando las constantes de acoplamiento geminales del C-4 con los H-3 y H-5 en la 2,4,6-trihidroxiacetofenona, que sirvió como compuesto modelo;  ${}^2J [C-4 - C-3-H] = 3,2$  Hz.

El C-5 del compuesto 78 aparece a 163,3 ppm como un multiplete simétrico de seis líneas que se simplifica a triplete luego del intercambio con  $D_2O$ ;  ${}^2J [C-5-OH] = 5,0 \pm 0,5$  Hz. Las constantes de acoplamiento que involucran a HO-5 son comparables a las observadas en el tolueno entre los carbonos del anillo y los protones metílicos  ${}^2J [C-1-CH] = 6,0$  Hz;  ${}^3J [C-2-CH] = 4,2$  Hz.

La comparación de los desplazamientos químicos de los C-10, C-5 y C-6 en los derivados protónicos y deuterados de 78 muestran pequeños desplazamientos a campos altos en los últimos ( -0,06; -0,39 y -0,07 ppm )<sup>194</sup>.

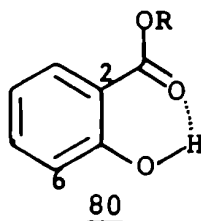
Chang<sup>195,196</sup> realizó, utilizando también estos principios, la asignación de la isoflavona 79. Basándose en las re-



79

glas de aditividad es difícil diferenciar C-5, C-7, C-9 y C-4'; y C-8, C-6, y C-3 de C-1'. Sin embargo, un detallado análisis de las constantes de partición  ${}^{13}C - {}^1H$  a larga distancia permitió resolver las ambigüedades. Se analizó el espectro acoplado con protón en acetona- $d_6$ . El C-4' muestra un multiplete no re-

suelto a 160,2 ppm debido a acoplamiento con los protones del metoxilo, con H-2' e H-6' y posiblemente con H-3' e H-5'. El C-9 presenta un solo protón a dos enlaces ( H-8 ) y se observa por tanto como doblete a 157,5 ppm. Un triplete a 161,1 ppm se asigna a C-7 ya que es el único carbono que presenta dos protones a dos enlaces ( H-6 e H-8 ). El C-5 está partido en dos dobletes debidos al acoplamiento con H-6 y HO-5. Este último acoplamiento provoca una partición adicional para el C-6,  ${}^3J[\underline{\text{C}}-6 - \underline{\text{C}}-5-\underline{\text{OH}}] = 7 \text{ Hz}$ ; que se observa como doblete de dobletes a 99,6 ppm, mientras que el C-8 aparece como doblete de dobletes a 94,0 ppm. El C-10 se observa como cuarteto ( doble triplete con dos ramas superpuestas ) debido a particiones con H-6, H-8 y HO-5. Se observa en este caso y el anterior que las particiones  ${}^{13}\text{C}-{}^1\text{H}$  a tres enlaces son estereoespecíficas,  ${}^3J[\underline{\text{C}}-10 - \underline{\text{C}}-5-\underline{\text{OH}}] = 4,3 \text{ Hz}$  (*sin*) y  ${}^3J[\underline{\text{C}}-6 - \underline{\text{C}}-5-\underline{\text{OH}}] = 7 \text{ Hz}$  (*anti*). Esto es similar a lo que ocurre en sistemas olefínicos<sup>197</sup> y en el compuesto 80, donde se observa que  ${}^3J[\underline{\text{C}}-2 - \underline{\text{C}}-1-\underline{\text{OH}}] = 4,4 \text{ Hz}$  (*sin*) es menor que  ${}^3J[\underline{\text{C}}-6 - \underline{\text{C}}-1-\underline{\text{OH}}] = 8,3 \text{ Hz}$  (*anti*).



El C-1' de 79 se distingue fácilmente de C-3 por sus constantes de acoplamiento a 3 enlaces (  ${}^3J[\underline{\text{C}}-1'-\underline{\text{C}}-2'-\underline{\text{C}}-3'-\underline{\text{H}}] = 8,0 \text{ Hz}$  ), mientras que  ${}^3J[\underline{\text{C}}-3-\underline{\text{C}}-1'-\underline{\text{C}}-2'-\underline{\text{H}}] = 4,0 \text{ Hz}$ . El singulete a 151,2 ppm se asigna al C-2 que es el único carbono aromático sin protones a 2 y 3 enlaces.

Metoxiflavonas: a fin de determinar la influencia de un grupo metoxilo en cada uno de los carbonos de un flavonoide se efectuaron los espectros de  ${}^{13}\text{C}$ -RMN de los distintos derivados mono metoxilados<sup>198,199</sup> ( Tabla 15 ) .

**Tabla 15:** Desplazamiento químico ( $\delta_c$ ) de monometoxiflavonas 199

	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
Flavona	163,0	107,3	178,0	125,4	124,9	133,5	117,9	156,0	123,7	131,5	126,0	128,8	131,3	128,8	126,0
5-metoxiflavona	162,2	108,1	176,3	159,0	109,8	133,8	107,4	157,3	113,8	130,7	125,6	128,6	131,1	128,6	125,5
6-metoxiflavona	162,4	105,8	176,6	105,2	156,6	122,6	119,5	150,1	123,8	131,0	125,8	128,7	131,3	128,7	125,8
7-metoxiflavona	163,5	106,4	176,2	125,8	114,0	162,5	100,6	157,1	116,8	131,1	125,8	128,7	131,1	128,7	125,8
8-metoxiflavona	162,4	107,1	176,9	115,8	124,7	107,1	149,1		125,2	131,6	126,4	129,1	131,6	129,1	126,4
2'-metoxiflavona	160,5	112,3	177,0	124,8	124,4	133,2	117,9	155,6	122,8	120,0	157,4	111,2	132,4	120,5	128,7
3'-metoxiflavona	162,2	106,9	176,9	125,1	124,4	133,8	118,0	155,3	123,0	132,2	111,4	159,5	117,3	129,9	118,3
4'-metoxiflavona	162,6	105,2	176,6	124,8	124,4	133,5	117,8	155,3	123,0	127,7	114,3	161,8	114,3	127,7	

Los valores se expresan en ppm respecto de TMS.  
Se utilizó DMSO- $d_6$  como solvente.

En la mayoría de los casos, se asignan las señales usando los efectos conocidos provocados por la introducción de un metoxilo en un anillo aromático<sup>184,188</sup>. En derivados simples del benceno, los carbonos *orto* a un metoxilo se protegen en aproximadamente 15 ppm y los carbonos *para* en 9 ppm. Los carbonos con relación *meta* son escasamente afectados. Por lo tanto, un cambio secuencial de la posición del metoxilo alrededor del anillo A y del anillo B resultará en una protección secuencial de los carbonos *orto* al metoxilo. Los valores de la tabla 15<sup>179</sup> permiten calcular el efecto real que produce un metoxilo en un flavonoide restando el valor de desplazamiento observado para un determinado carbono del correspondiente en la flavona sin sustituir. Los desplazamientos inducidos en posición *orto* por un metoxilo son irregulares. Un metoxilo unido a C-2' desplaza al C-3' en aproximadamente 17 ppm a campos altos y al C-1' en 12 ppm. En cambio, un metoxilo unido a C-3' desplaza 14 ppm a C-4' y C-2', mientras que un MeO-4' desplaza a los carbonos 3' y 5' en aproximadamente 15 ppm. Por tanto, en el anillo B los desplazamientos observados son similares a los registrados en bencenos simples  $\pm 3$  ppm.

Sin embargo, la sustitución en el anillo A produce una gran dispersión en los valores de desplazamiento. Por ejemplo, un MeO-5 desplaza a C-6 en 15 ppm y al C-10 en sólo 10 ppm. Un MeO-6 desplaza al C-7 en 10 ppm y al C-5 en 20 ppm, y un metoxilo unido a C-8 desplaza a C-9 en 10 ppm y a C-7 en 17 ppm. Es decir que los desplazamientos determinados para derivados simples del benceno, no pueden aplicarse para los sustituyentes en el anillo A.

La utilidad de los datos de la tabla 15 depende de su aplicabilidad a otras flavonas más altamente sustituidas. Se compararon los valores de  $\delta_C$  calculados y obtenidos experimentalmente para 5,7,3',4'-tetrametoxiflavonol<sup>198</sup>.

El valor básico de C-5 en la 5-metoxiflavona es 159,4 ppm, pero como el efecto de un MeO-7 sobre C-5 es de +1,4 ppm, el valor esperado sería entonces de 161 ppm, muy cercano al ob-

servado.

	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
Valor real	162,8	95,5	164,0	92,3	160,3	106,0
Valor calculado	161	99	164	91	160	108
	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
Valor real	123,6	110,3	148,6	150,1	110,8	120,4
Valor calculado	124	111	145	148	115	121

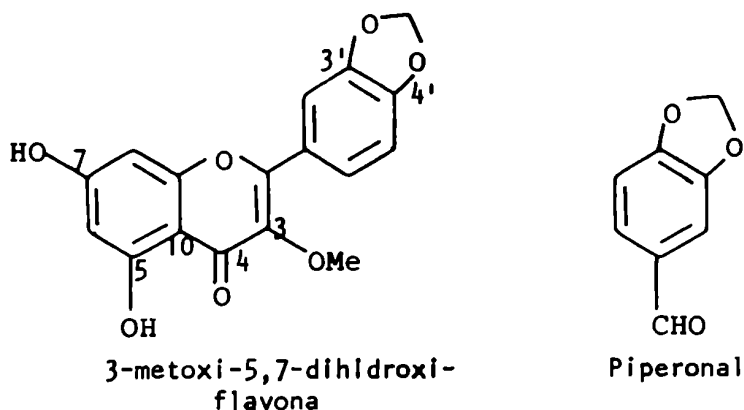
La coincidencia en general es buena, pero los C-3', C-5' y C-6 muestran desviaciones importantes entre los valores de desplazamiento químico experimentales y calculados. Es probable que esto se deba a factores estéricos.

Polimetoxiflavonas: Cambie *et al.*<sup>200</sup> determinaron los  $^{13}\text{C}$ -RMN de unos 20 polimetoxiflavonoles, pudiendo obtener las siguientes conclusiones:

1.- Carbonos del anillo C: en compuestos con el grupo MeO-5, el C-4 se observa a un valor medio de 172,1 ppm mientras que en 5-hidroxi flavonoides se produce un desplazamiento a campos bajos de aproximadamente 6 ppm a un valor medio de 178,0 ppm. El C-3 se observa a 138,9 ppm ya que tiene en general un entorno bien definido. Lo mismo ocurre con C-2 que se observa en compuestos con MeO-3 a 152,9 ppm. Pequeñas variaciones en el esquema de sustitución del anillo B no afectan su desplazamiento químico. En el espectro enteramente acoplado de 5,7-dihidroxi-3-metoxi-3',4'-metilendioxi flavona, la señal correspondiente a C-2 es un triplete con  $J = 3$  Hz debido al acoplamiento bencílico con los H-2' e H-6'. En la 5-hidroxi-3,7,8,4'-tetrametoxi flavona se observa como triplete con  $J = 4,5$  Hz.

2.- Carbonos del anillo B: en el espectro totalmente acoplado de 5,7-dihidroxi-3-metoxi-3',4'-metilendioxi flavona se observa que: C-1' aparece como doblete ( $J = 6,8$  Hz) a 123,9 ppm, por acoplamiento con H-5'; C-2' como doblete ( $^1J = 167$  Hz;  $^3J = 8,8$  Hz), centrado a 107,9 ppm, por acoplamientos con H-2' y H-6'; C-3' se observa como una señal ancha no resuel

ta a 147,7 ppm mientras que el C-4' se ve como un triplete a 149,5 ppm (  $J = 8,8$  Hz ) con acoplamiento con H-2' y H-6'; el C-5' es un doblete con  $^1J = 167$  Hz, mientras que C-6' se ve como doblete (  $^1J = 166$  Hz,  $^3J = 5,9$  Hz ). La apariencia de estas señales es similar a la presentada por el piperonal.



3.- Carbonos del anillo A: las asignaciones se efectuaron por analogía con otros casos, por el estudio del espectro parcialmente y totalmente acoplado .

En el caso de 5,7-dihidroxi-3-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavona son posibles para el C-5 y C-7 cinco acoplamientos a dos enlaces. El único observado es el existente entre C-5 y el protón del hidroxilo fuertemente unido por puente de hidrógeno con el oxígeno carbonílico (  $J = 3,0$  Hz ).



**CAPITULO IV**

**ESTEROLES, 3-CETOESTEROIDES  $\alpha,\beta$ -INSATURADOS Y  
TRITERPENOS TETRACICLICOS CON ANILLO CICLOPROPANO**

ESTEROLES, 3-CETOESTEROIDES  $\alpha,\beta$ -INSATURADOS Y TRITERPENOS TETRACICLICOS CON ANILLO CICLOPROPANO

$\Delta^7$ -ESTEROLES

La coexistencia de  $\Delta^5$  y  $\Delta^7$ -esteroles es de interés biogénico. Akhtar *et al.*<sup>201,202</sup> demostraron que en animales, el  $\Delta^7$ -colesterol es precursor del colesterol por intermedio de  $\Delta^{5,7}$ -dienes. Se supone que en los vegetales funciona un mecanismo análogo y que los  $\Delta^7$ -esteroles son precursores de los  $\Delta^5$ -esteroles<sup>203,204</sup> ( Fig. 31 ), y que la ausencia de los  $\Delta^{5,7}$ -dienes intermediarios se debería a la rápida hidrogenación del enlace  $\Delta^7$ . Un argumento en apoyo de esta hipótesis es el hecho de que la planta *Nicotiana tabacum* tiene la capacidad de convertir estigmast-7-en-3- $\beta$ -ol en sitosterol<sup>205</sup>

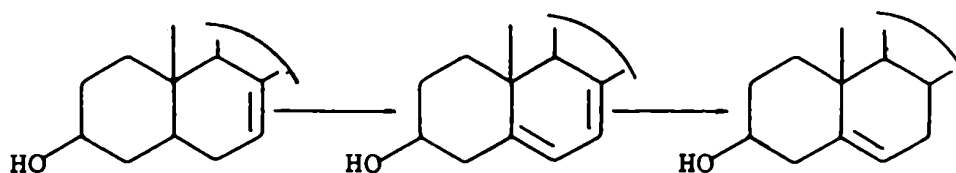


Figura 31

Los  $\Delta^7$ -esteroles, están muy distribuidos en la naturaleza. El estigmast-7-en-3- $\beta$ -ol (  $\Delta^7$ -sitosterol ) se aisló e identificó de numerosos vegetales: *Momordica charantia*<sup>206</sup>, *Spinacea oleracea*<sup>207</sup>, semillas de girasol<sup>208</sup> y semillas de *Lactuca sativa*<sup>209</sup>

3-CETOESTEROIDES  $\alpha, \beta$ -INSATURADOS

Los esteroles, ésteres y glicósidos de esteroles son productos típicos del metabolismo de plantas superiores.

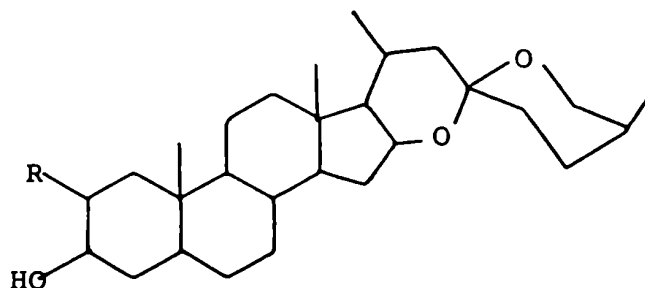
Es poco, en cambio, lo que se conoce sobre cetoesteroides, en particular compuestos con el agrupamiento 4-en-3-ona.

Se encontró estigmast-4-en-3-ona ( sitosterona ) en tejidos de *Apocynum cannabinum*<sup>210</sup>, corteza de especies de pino<sup>211</sup> madera de *Quassia amara*<sup>212</sup>, cultivo de tejido de soja ( *Glycine max* )<sup>213</sup>, *Pinus radica*<sup>214</sup>, callos de tejido de *Stephania cepherantha*<sup>215</sup>, *Quercus glauca*<sup>216</sup> y en raíz de *Cannabis sativa*<sup>217</sup> junto a campest-4-en-3-ona y estigmast-4,22-dien-3-ona.

#### Formación y transformación de 3-cetoesteroides en vegetales:

Se encontró que en algunos vegetales los esteroides se metabolizan a 3-cetoesteroides, como por ejemplo: los homogenatos de hojas de *Cheiranthus cheiri* transforman sitosterol en sitosterona<sup>218</sup>, mientras que en *Solanum tuberosum* el colesterol forma colest-4-en-3-ona y 26-hidroxicolesterol. Se comprobó que ambos compuestos constituyen parte de las primeras etapas de la biosíntesis de sapogeninas y alcaloides esteroidales<sup>219</sup>

En *Digitalis lanata*<sup>220</sup> la colestenoona actúa como intermediaria en la biosíntesis de tigogenina 81 y gitogenina 82



81: R = H

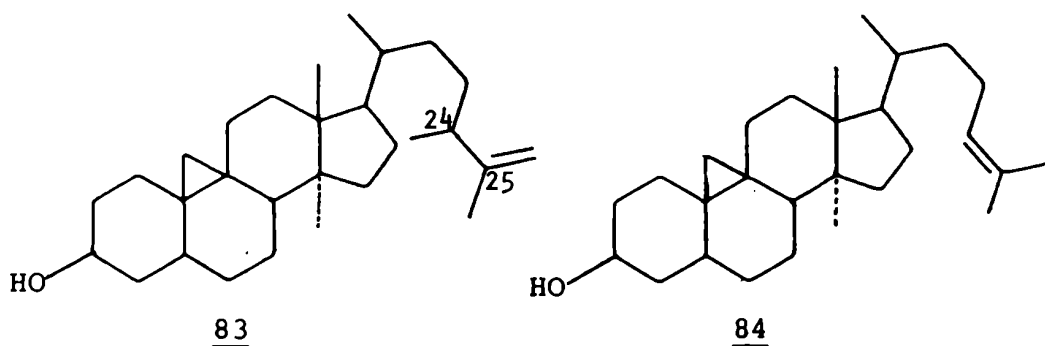
82: R = OH

Otro estudio sobre *Solanum tuberosum* demostró que colesterol se transformaba en colestenoona y ésta en colestán-3- $\alpha$ -ol y colestán-3- $\beta$ -ol<sup>221</sup>. En homogenatos de hojas de *Digitalis purpurea*, *Cheiranthus cheiri* y *Straphanthus kombe* la colestenoona se transforma en 5 $\alpha$ -colestán-3-ona<sup>222</sup>.

TRITERPENOS TETRACICLICOS CON 9:19-CICLOPROPANO

El ciclolaudenol 83 se aisló por primera vez de opio<sup>223</sup>, determinándose que contenía en su estructura un grupo vinilideno y un anillo ciclopropánico, con el mismo núcleo que el cicloartenol 84. La estructura fue determinada poco tiempo después y se concluyó que se trataba de 24-metil- $\Delta^{25}$ -cicloartenol<sup>224</sup>.

Este compuesto se aisló de distintas fuentes vegetales, como rizomas de *Blechnum filiforme*<sup>225</sup>, lípidos cuticulares y citoplasmáticos de *Nicotiana tabacum*<sup>226</sup> y *Meliatus major*<sup>227</sup>.

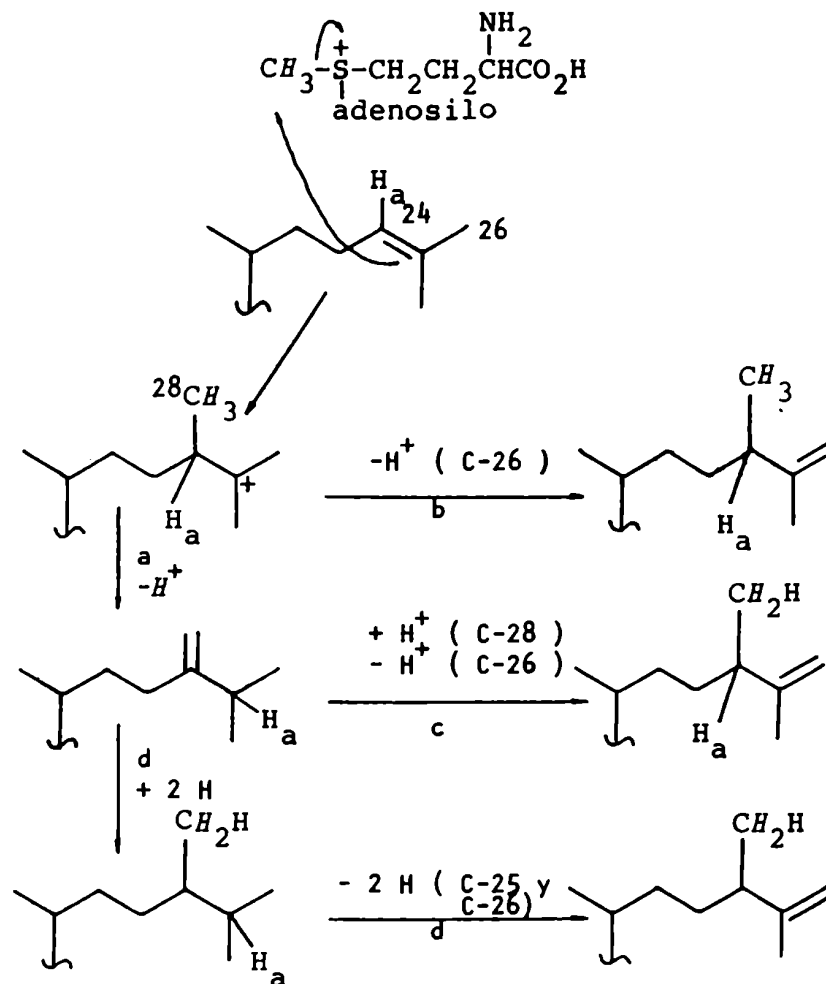


Biosíntesis:

La biosíntesis de esteroides típicos de plantas requiere la introducción de un grupo alquilo en la cadena lateral. En este proceso, es necesaria la participación de S-adenosilmetionina como donador de grupos alquilo, un  $\Delta^{24}$ -esterol como precursor, migración de un hidrógeno de C-24 a C-25 y la formación de un 24-metilenesteroide por pérdida de un protón del grupo alquilo que ingresó<sup>228-231</sup> (ruta a, Fig. 32).

Sin embargo, en triterpenos como el ciclolaudenol con un grupo metileno unido a C-25 se requiere una modificación en el mecanismo<sup>232</sup> como las indicadas en la figura 32 por las rutas b, c y d.

Estudios realizados sobre la biosíntesis del triterpe-



**Figura 32:** Biosíntesis de la cadena lateral de ciclolaudenol. Los H provienen del grupo metilo de la metionina, mientras que  $\text{H}_a$  surge del H-4 pro R del ácido mevalónico.

no en rizomas de *Polipodium vulgare*<sup>233</sup>, permiten suponer que el camino seguido corresponde a la ruta b, donde el ión carbonio formado se estabiliza por pérdida de un protón de uno de los metilos terminales. Un mecanismo similar parece operar en cultivos libres de células de especies de *Trebouxia* y *Scenedesmus*<sup>234</sup>

ESPECTROSCOPIA DE MASAS DE ESTEROIDES

Los esteroides naturales se encuentran normalmente en mezclas complejas, siendo por lo tanto, la cromatografía gaseosa de gran utilidad para su análisis, en particular cuando se acopla a espectrometría de masas. Este estudio se realiza con frecuencia usando derivados trimetilsililados, ya que presentan modos característicos de fragmentación de los cuales se pueden desprender detalles estructurales.

Derivados trimetilsililados de  $\Delta^5$ -esteroides:

Los dos fragmentos que presentan mayor abundancia relativa son invariablemente los que se observan a m/e 129 y m/e correspondiente a M-129<sup>235</sup>. La ocurrencia de este par de fragmentos se toma como característica de este tipo de estructura. Diekman y Djerassi<sup>236</sup> determinaron que el ión m/e 129 estaba constituido por los carbonos 1,2 y 3 del esqueleto ( Fig. 33 )

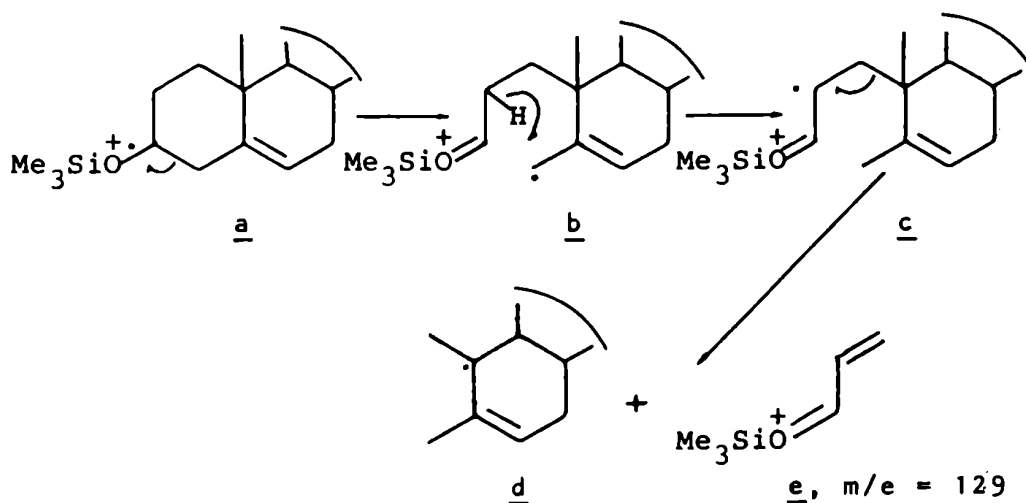


Figura 33

En este esquema, estas fragmentaciones ocurren ya que la ruptura de los enlaces 3-4 y 1-10 está favorecida por la activación alílica, la transferencia de hidrógeno desde C-2 procede a través de un intermediario de 6 centros y el ión m/e 129 es conjugado y posee un número par de electrones.

En el caso de derivados del tipo 4-alkilcolesterol, se observa una estabilización del ión M - 129 produciéndose retención de carga en la unidad hidrocarbonada. Djerassi, postuló el esquema de fragmentación que se ve en la figura 34.

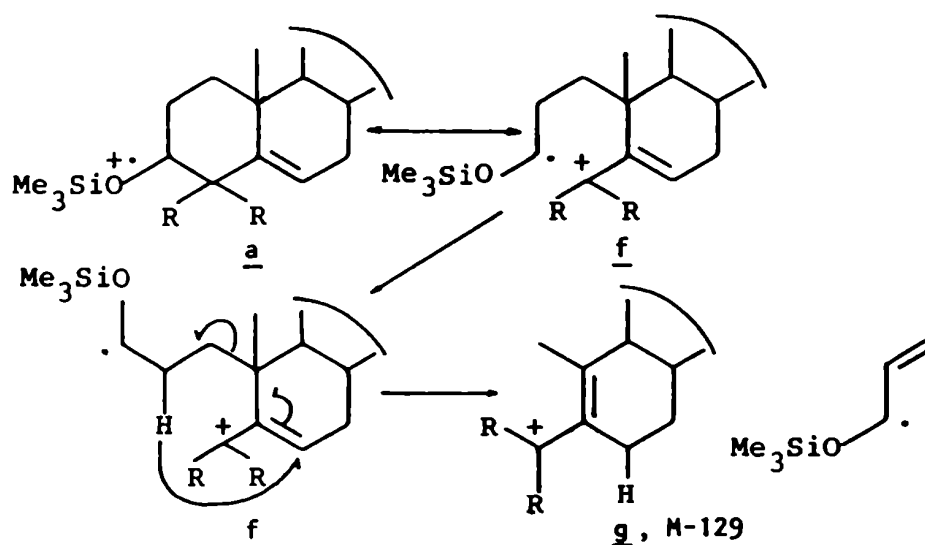


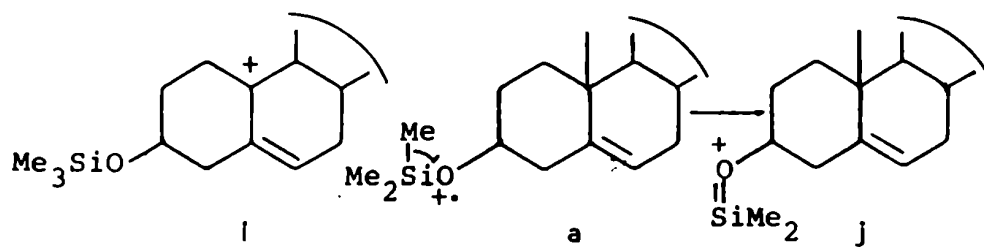
Figura 34

En la medida que aumenta el número de grupos alquilo en C-4 se estabiliza el ión carbonio y predomina el camino f→g, intensificándose la abundancia relativa del ión M - 129.

En el caso de los derivados trietilsililados se observa el ión m/e 171. Este ión h, se produce por una fragmentación análoga a la a→e que produce el ión m/e 129 en los derivados trimetilsililados.

Los otros picos presentes, si bien no poseen valor diagnóstico, se pueden ejemplificar en el espectro de masas del colesterol:

M - 15: ( 13% ) corresponde a la pérdida de radical metilo a partir del ión molecular. Si bien la pérdida del metilo-19 unido a C-10 produce un catión alílico i, el sitio más activo para la pérdida de metilo es el átomo de silicio ( a → j ).



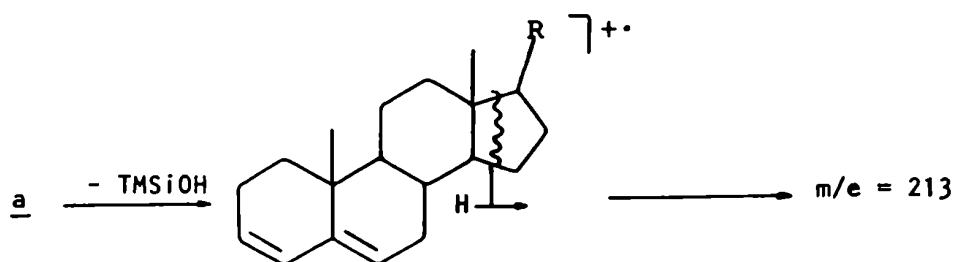
Esta predicción se basa en el hecho de que el ión  $m/e$  471 (  $M - C_2H_5$  ) es el más intenso en el espectro de masas del derivado trietilsililado del colesterol. En este caso, no se observó la pérdida de metilo, correspondiente a la pérdida de Me-19 (  $m/e$  485 ).

M - 90: por determinaciones de alta resolución se verificó que el fragmento  $m/e$  368 (  $M - 90$ , 66% ) se debe a la pérdida de trimetilsilanol (  $TMSiOH$  ). El H-3 no participa en esta pérdida, en cambio, aparentemente sí lo hacen H-1 e H-4.

M - ( 90 + 15 ): corresponde a la pérdida de trimetilsilanol y metilo, muy probablemente Me-19.

$m/e$  255: proviene de la pérdida de  $TMSiOH$  y de la cadena lateral ( 12% ).

$m/e$  213: corresponde a la pérdida de  $TMSiOH$ , cadena lateral y tres carbonos del anillo D acompañados por una transferencia de hidrógeno de la especie que retiene la carga.

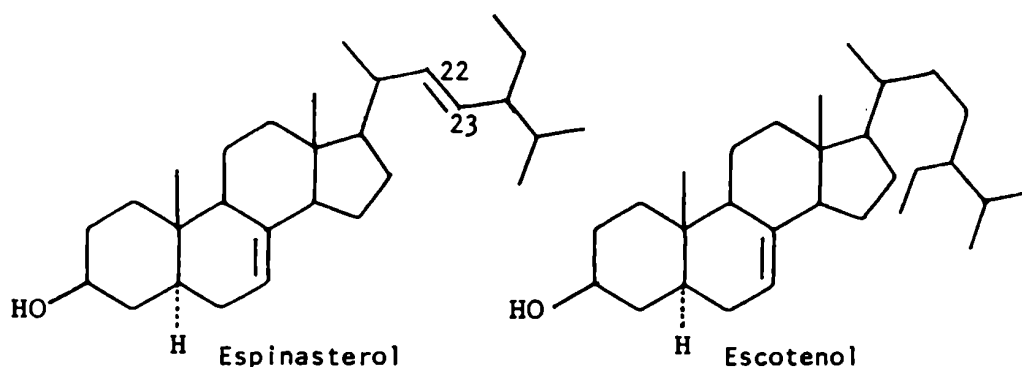




### Derivados trimetilsililados de $\Delta^7$ -esteroles:

Son característicos de estos compuestos los fragmentos m/e 255, por pérdida de TMSiOH y de la cadena lateral; y los iones m/e 213 y 229 formados por pérdida de TMSiOH, de la cadena lateral y parte del anillo D <sup>237,238</sup>. No presentan los picos característicos de  $\Delta^5$ -esteroles a m/e 129 y M - 129.

Como ejemplo, Farines *et al.* <sup>239</sup>, identificaron en aceite de semilla de *Argania spinosa* 5 $\alpha$ -estigmast-7,22(E)-dien-3- $\beta$ -ol ( espinasterol ) y 5 $\alpha$ -estigmast-7-en-3- $\beta$ -ol ( escotenol ).



El CGL - EM de sus derivados trimetilsililados mostró los iones moleculares a m/e 484 y 486 respectivamente, correspondientes con los de esteroides de C-29 con dos y un doble enlace. El espinasterol presenta un fragmento con m/e 345 correspondiente a la pérdida de 139 una desde el ión molecular (  $C_{10}H_{19}$  ) . lo cual indica que la cadena lateral posee un doble enlace. La hidrogenación parcial de este doble enlace durante la fragmentación para dar el fragmento m/e 343, por transferencia de hidrógenos del anillo D, prueba que ese enlace está ubicado entre las posiciones 22 - 23 <sup>240</sup>. ( Fig 35 ).

Ambos compuestos presentan fragmentos a m/e 255 y 213 característicos de  $\Delta^7$ -esteroides, como se detalló anteriormente.

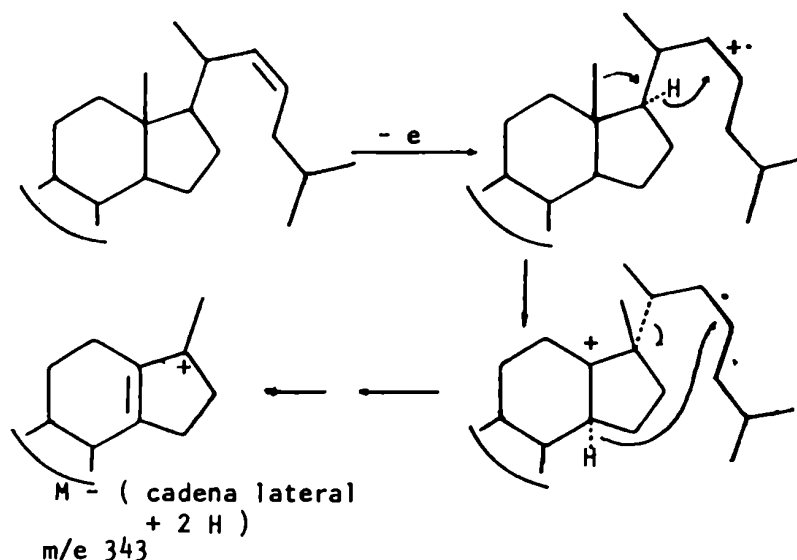


Figura 35

### Fragmentaciones de 3-cetoesteroides $\alpha,\beta$ -insaturados:

El comportamiento en espectrometría de masas de 3-cetoesteroides  $\alpha,\beta$ -insaturados, en particular 3-ceto-4-en-esteroides, fue investigado tempranamente debido a la presencia de este tipo de compuestos entre las hormonas esteroidales biológicamente activas<sup>241</sup>.

Estudios realizados por Shapiro y Djerassi<sup>242</sup> sobre este tipo de compuestos, determinaron el mecanismo de formación del fragmento más importante en cuanto a valor diagnóstico  $m/e$  124. Este proceso involucra la ruptura del anillo B y la transferencia de dos hidrógenos desde los C-8 y C-11. Con esta información, la fragmentación puede ocurrir de dos maneras diferentes, dependiendo de que la primera transferencia de hidrógeno provenga de C-8 (  $a \rightarrow c$  ) o de C-11 (  $a' \rightarrow c'$  ); la segunda transferencia de hidrógeno proviene de una posición activada alílicamente, ( Fig. 36 ).

Posteriormente se pudo determinar que el primer paso es la transferencia de hidrógeno de C-8 y la segunda transferencia proviene principalmente de C-11 y C-14<sup>243</sup>.

En general, los cetoesteroides saturados no exhiben

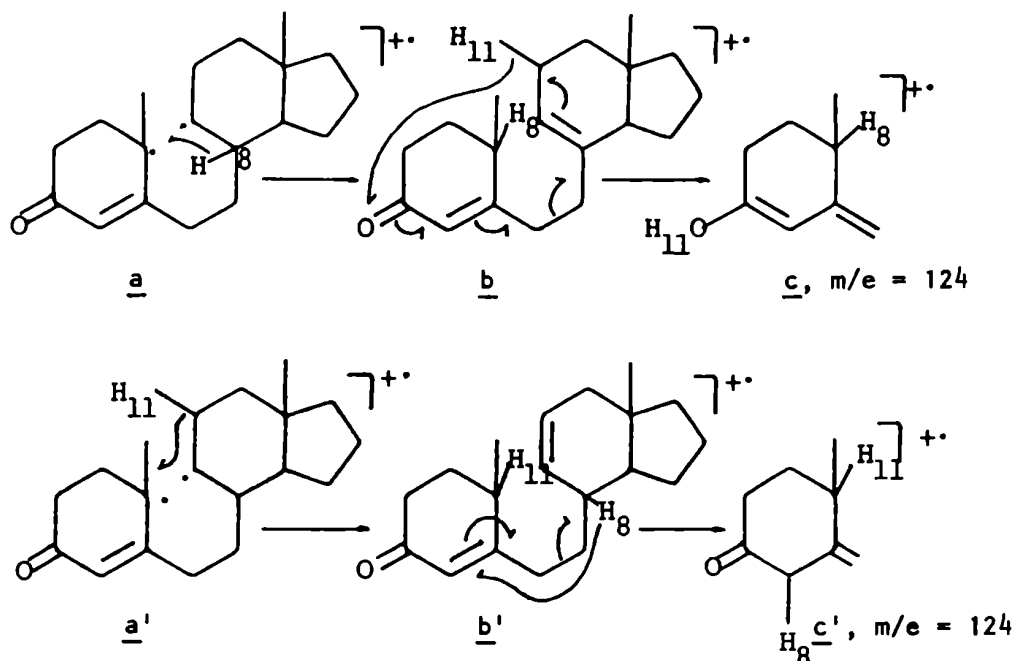


Figura 36

fragmentaciones características que los diferencien entre sí ( androstan-3-ona y colestán-3-ona ). Sin embargo, los derivados  $\alpha, \beta$ -insaturados exhiben una fragmentación característica de tipo general observable en presencia de distintos sustituyentes<sup>242</sup>.

Es interesante analizar las diferencias existentes entre  $\Delta^1, 5\alpha$ -androstén-3-ona 85 y  $\Delta^4$ -androstén-3-ona 86.

El compuesto 85 presenta tres fragmentos importantes a m/e 230, 188 y 122. El ión m/e 230 proviene de la pérdida de cetena del anillo A. El ión m/e 122 proviene de la ruptura de las uniones 6-7 y 9-10 sin aparentes transferencias de hidrógeno. El ión m/e 188, correspondiente a la fórmula  $C_{14}H_{20}$ , proviene de una descomposición que involucra la ruptura de al menos 3 uniones carbono-carbono. ( Fig. 37 ).

El espectro de 86 presenta iones m/e 230, 187, 149 y 124. Los que aparecen en ambos compuestos a masas menores carecen de valor diagnóstico. El ión m/e 230 proviene de la pérdida de cetena del anillo A y los iones m/e 149 y 124 se generan por ruptura de las uniones 6-7 y 9-10 acompañadas de transferen

cia de hidrógeno. El ión  $m/e$  187 corresponde a  $C_{14}H_{19}$  y se genera por distintos tipos de rupturas que las que forman el fragmento a  $m/e$  188 del compuesto 85 ( Fig 38 )

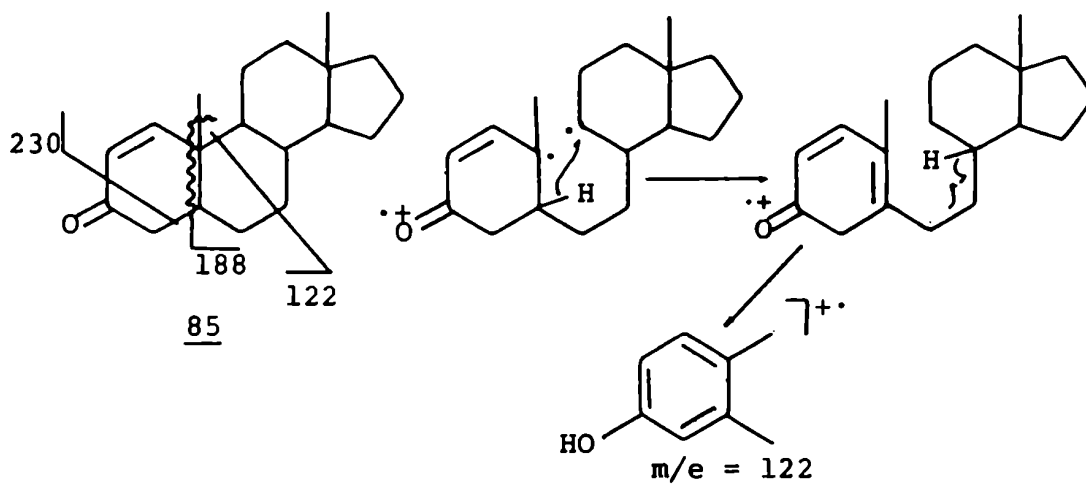


Figura 37

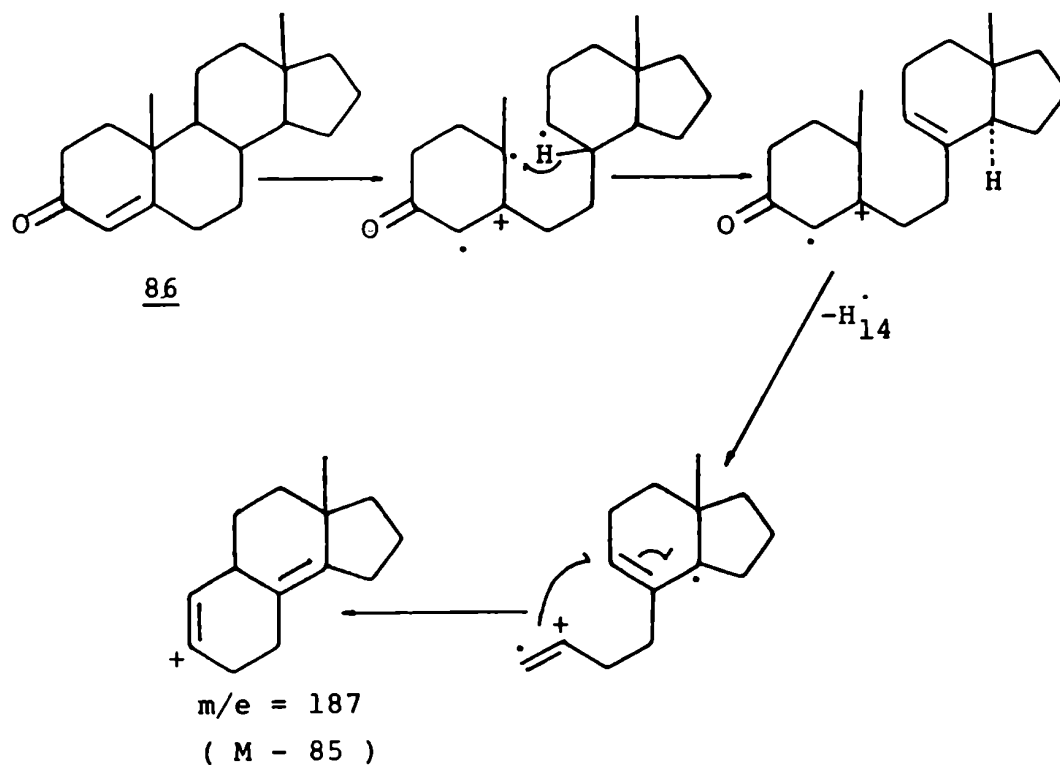
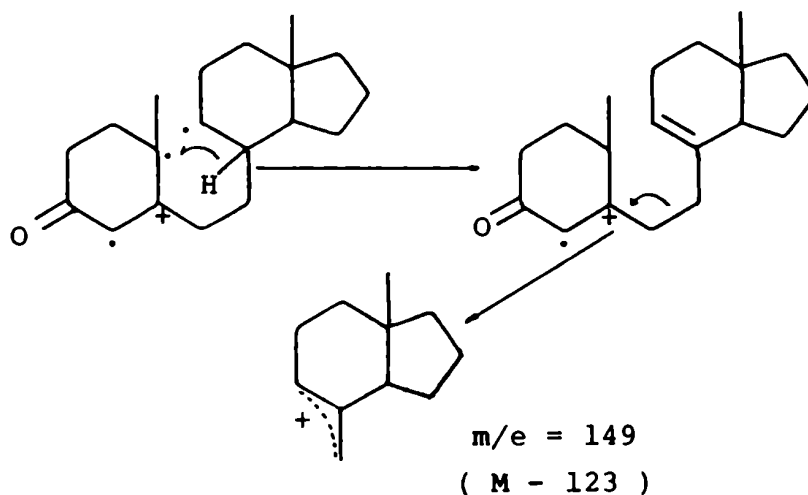
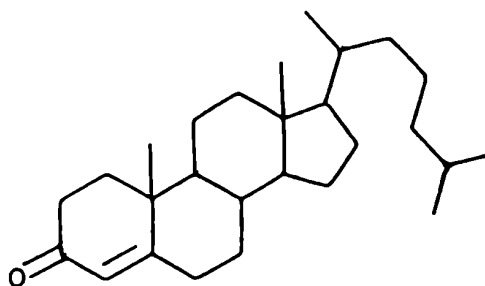


Figura 38

El ión  $m/e$  149 resulta de la fisión de las uniones 6-7 y 9-10 con retención de carga en la posición hidrocarbonada, acompañada por transferencia de un hidrógeno al fragmento que lleva oxígeno.



El espectro de masas de la colest-4-en-3-ona 87 presenta los siguientes fragmentos <sup>244</sup>:  $m/e$  ( % ); 384 (  $M^+$ , 60 ); 369 (  $M - Me$ , 5 ); 342 (  $M - CH_2CO$ , 11 ); 299 (  $M - 85$ , 5 ); 271 (  $M - 113$ , 5 ); 261 (  $M - 123$ , 12 ); 229 ( 271 - 42, 70 ); 124 ( anillo A, 100 ).



87

ESPECTROMETRIA DE MASAS DE TRITERPENOS TETRACICLICOS CON LA UNIDAD 9:19-CICLOPROPANO

Los espectros de masas de estos compuestos presentaron dos tipos distintos de rupturas:

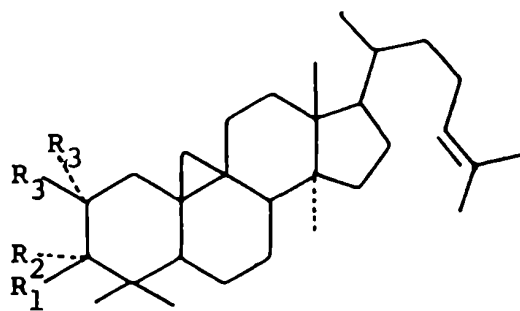
- 1.- fragmentos inducidos por la presencia de anillo ciclopropano.
- 2.- fragmentos producidos por la pérdida o ruptura de la cadena lateral.

Fragmentos producidos por la presencia del anillo 9:19-ciclopropano:

La influencia del anillo ciclopropano se manifiesta en el espectro de masas por la aparición de un fragmento a de masa par <sup>245,246</sup>. La posición de este pico es independiente de la sustitución en C-4, así como de la función oxigenada de C-3, pero se desplaza al variar la cadena lateral.

En el espectro de masas del cicloartenol 84; su acetato 88; 2,2-d<sub>2</sub>-cicloartenol 89; 2,2,3-d<sub>3</sub>-cicloartenol 90, cicloartenona 91 y 2,2-d<sub>2</sub>-cicloartenona 92, el fragmento a se observa a m/e 286. Se desplaza a m/e 288 en el cicloartanol 93 indicando que la cadena lateral es retenida en el fragmento. El acetato de polinasterol 94, que no tiene metilos unidos a C-4, pero posee la misma cadena lateral que el cicloartanol, presenta este pico también a m/e 288. Un pico similar, desplazado en 14 una respecto del acetato de cicloartenol se observa en cicloaudenol 83 a m/e 300. De lo anterior se desprende que el anillo A se pierde en el curso de la fragmentación que conduce al fragmento a.

Este fragmento se forma por ruptura del anillo ciclopropano y su formación requiere la pérdida del anillo A junto con los carbonos 6 y 19. La ausencia de experiencias con compuestos marcados isotópicamente no permite dilucidar este punto. Dos posibles rutas son las indicadas en las figuras 39 <sup>245</sup> y figura 40 <sup>246</sup>



84:  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{H}$

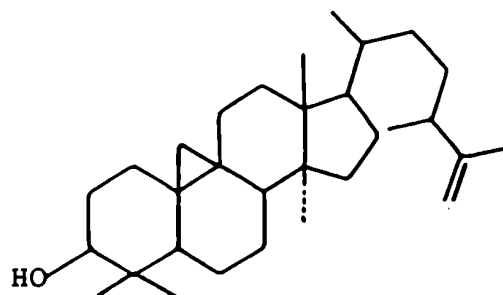
88:  $R_1 = \text{OAc}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{H}$

89:  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{D}$

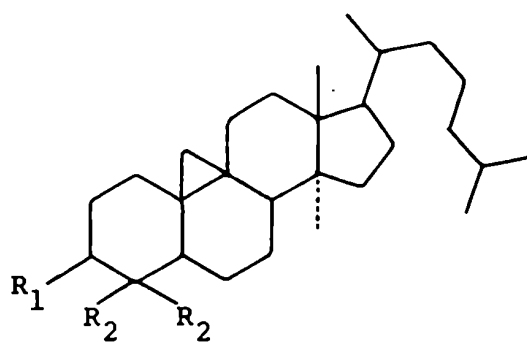
90:  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{D}$

91:  $R_1, R_2 = \text{O}$ ;  $R_3 = \text{H}$

92:  $R_1, R_2 = \text{O}$ ;  $R_3 = \text{D}$

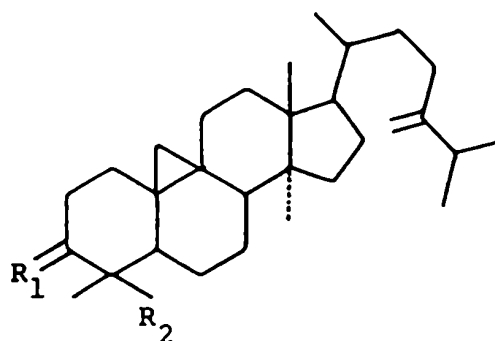


83



93:  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{Me}$

94:  $R_1 = \text{OAc}$ ;  $R_2 = \text{H}$



95:  $R_1 = \text{H, OAc}$ ;  $R_2 = \text{H}$

96:  $R_1 = \text{H, OAc}$ ;  $R_2 = \text{Me}$

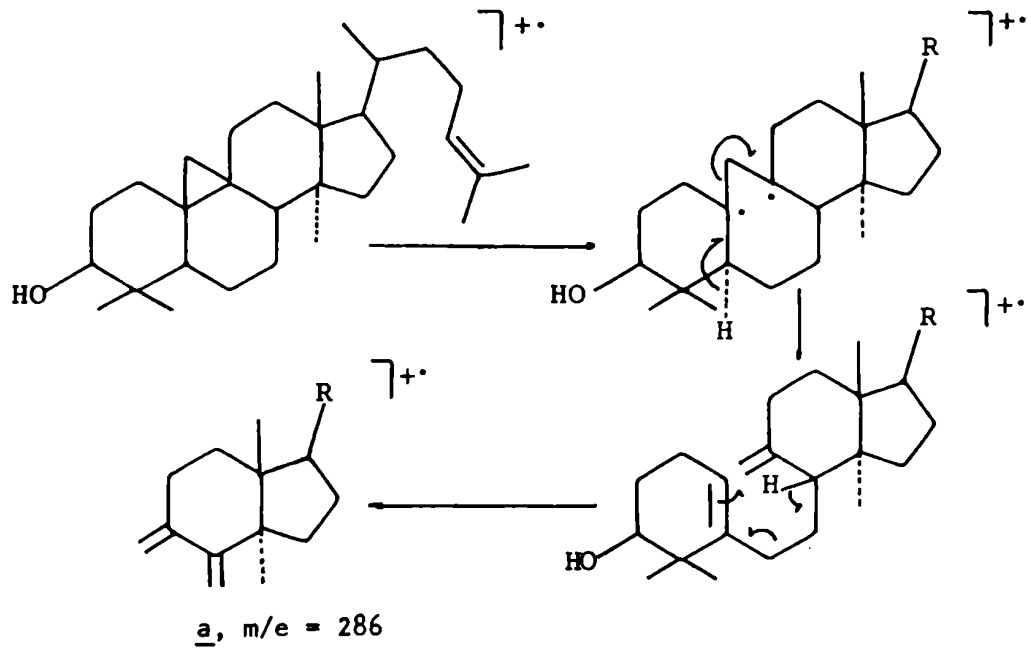


Figura 39

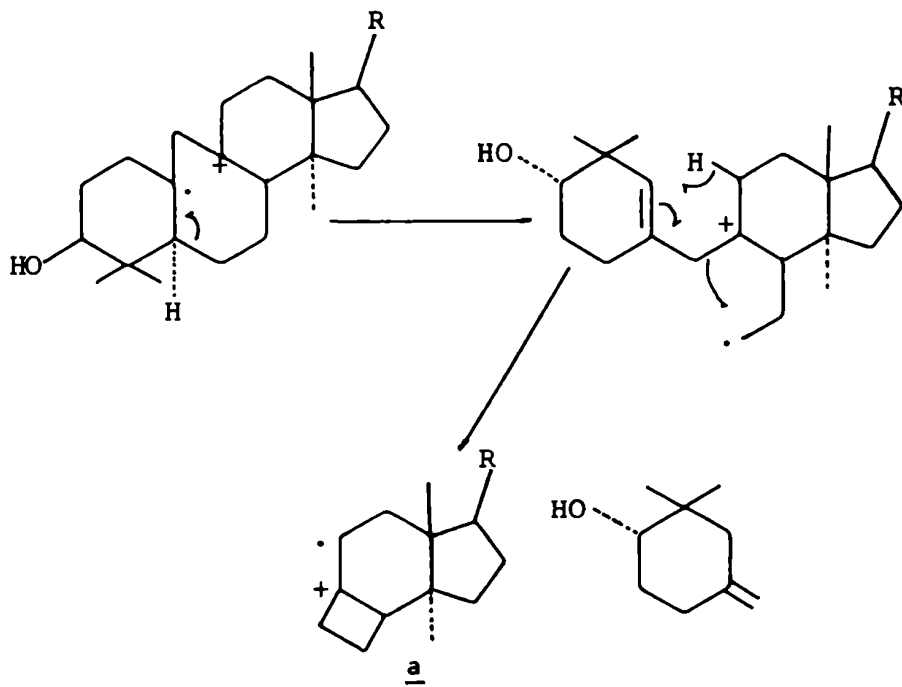


Figura 40



El espectro del cicloartenol 84 muestra un pico b, a m/e 339 ( M - 18 - 69 ). Este fragmento no se desplaza en el espectro de 2,2,3-d<sub>3</sub>-cicloartenol 90 o acetato de cicloartenol 89. Un pico similar presenta el ciclolaudenol 83 a m/e 353 . En cambio, el acetato de eucalenol 95, que tiene un solo metilo en C-4, y el acetato de polinasterol 94, que no está sustituido en C-4, muestran este fragmento a M - 60 - 55 y M - 60 - 41 respectivamente. Esto indica claramente que los carbonos 2,3 y 4 se pierden en la formación del ión b.

Otro fragmento c, se observa a M - 18 - 43 en los espectros de masas de algunos compuestos con hidroxilo libre unido al C-3 de esta serie y que posee cadenas laterales distintas. El acetato de cicloeucalenol 95, con un solo metilo en C-4, muestra este pico a M - 60 - 43. Se cree que ni la cadena lateral ni el C-4 están involucrados en este proceso de fragmentación. Compuestos marcados con deuterio en C-2 y C-3, 89 y 90, sugieren que estos dos carbonos se retienen en este ión.

#### Fragmentos producidos por la pérdida de la cadena lateral:

Se observa un pico d correspondiente a la ruptura de la cadena lateral entre C-17 y C-20 en todos los compuestos de esta serie, así como también fragmentos d - 18 o d - 60 dependiendo de la presencia de un hidroxilo o acetoxilo en C-3.

La cadena lateral que posee un doble enlace puede eliminarse a veces junto con dos hidrógenos del anillo , aunque el fragmento proveniente de tal proceso parece ser menos pronunciado para este tipo de triterpenos tetracíclicos que en el caso de esteroides.

El espectro de masas del acetato de 24-metilencolesterol 97 o el acetato de fucosterol muestra un fragmento intenso a m/e 296 que se origina probablemente como se indica en la figura 41. Esta fragmentación no ocurre en triterpenos tetracíclicos con 9:19-ciclopropano, que tienen un metileno unido a C-24, 95 y 96.

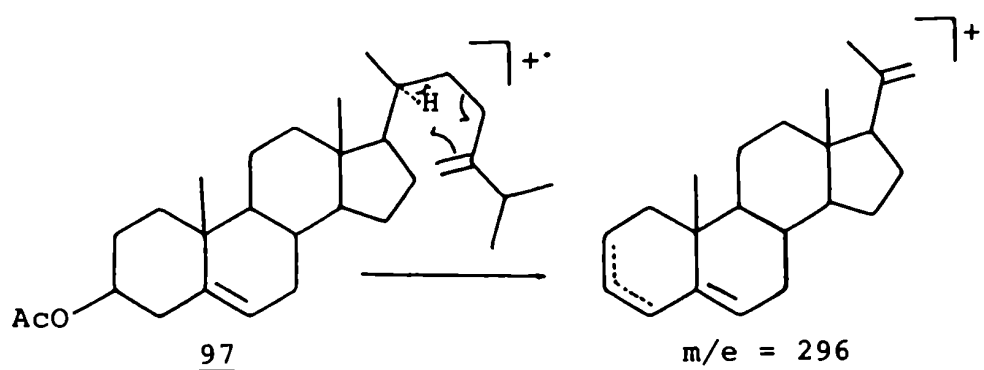


Figura 41

En la tabla 16, se resumen las rupturas mencionadas para triterpenos tetracíclicos.

Tabla 16: Principales fragmentos observados en el espectro de masas de triterpenos tetracíclicos.

Compuesto	$M^+$	ión <u>a</u> $m/e$	ión <u>b</u> $m/e$	ión <u>c</u> $m/e$	ión <u>d</u> $m/e$
<u>84</u>	426	286	339	365	315 - 297
<u>88</u>	468	286	339	365	357 - 297
<u>89</u>	428	286	339	367	317 - 299
<u>90</u>	429	286	339	368	318 - 300
<u>91</u>	424	286	-	-	313
<u>92</u>	426	286	-	-	315
<u>93</u>	428	288	341	367	315 - 297
<u>94</u>	442	288	341	-	329 - 269
<u>83</u>	440	300	353	379	315 - 297
<u>95</u>	468	300	353	365	343 - 283
<u>96</u>	482	300	353	379	357 - 297

**CAPITULO V**

**DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS**

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

### Objetivo del trabajo realizado

La finalidad de este trabajo ha sido aislar e identificar los componentes orgánicos de *Gomphrena martiana* Moquín ( familia *Amarantaceae* ), hierba utilizada en la medicina popular ( pág. 14 ).

Paralelamente resultaba de interés la búsqueda de otro tipo de acciones distintas a las atribuidas a esta planta. Por ello se probó la actividad antitumoral y antimicrobiana de distintos extractos y mezclas enriquecidas en determinados componentes.

El escaso conocimiento de la química de esta familia indujo a realizar un estudio comparativo sobre especies argentinas del mismo género.

### Extracción y tratamiento del material vegetal

La planta *Gomphrena martiana* fue recolectada en los meses de febrero y marzo en las provincias de Salta y Jujuy, no encontrándose diferencias significativas entre las distintas partidas.

La planta seca y molida, se extrajo con éter de petróleo como se indica en la parte experimental. Al concentrar y enfriar el extracto obtenido se separó un precipitado, Precipitado 1; por evaporación del filtrado se obtuvo un residuo oscuro, Residuo 1. A continuación se extrajo el residuo vegetal seco con etanol. Al enfriar el extracto etanólico se separó por filtración un abundante precipitado constituido por nitrato de potasio; y por evaporación del filtrado se obtuvo el Residuo 2.

Los compuestos aislados e identificados de esta planta surgieron de las separaciones cromatográficas del Precipitado 1, Residuo 1 y Residuo 2.

## 1.- ESTUDIO DEL PRECIPITADO 1

El fraccionamiento del Precipitado 1, condujo a los compuestos 98, 100, 101 y 104, los cuales dieron reacción de Shinoda ( HCl / Mg ) positiva <sup>247</sup>. Esta reacción se utiliza para caracterizar flavonoides.

### Análisis estructural del flavonoide 98

Por sucesivas recristalizaciones del Precipitado 1 con etanol, se obtuvo un producto cristalino 98 que presentó en el espectro ultravioleta ( U.V. ) dos absorciones a 313 y 269 nm, características de flavonas y flavonoles <sup>169</sup>.

Su espectro de <sup>1</sup>H-RMN ( Fig. 42 ) mostró dos singuletes a 3,87 y 4,12 ppm que integraban para 3 hidrógenos cada uno, característicos de grupos metoxilos aromáticos; un singulete correspondiente a dos hidrógenos a 6,02 ppm debido a un grupo metilendioxi; un singulete a 6,63 ppm asignable a H-6 o

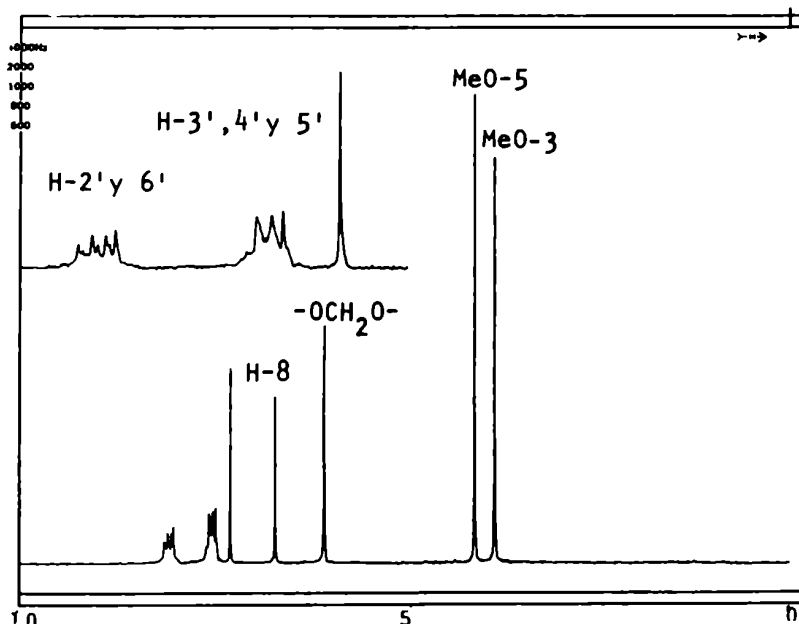


Figura 42: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de 98, en Cl<sub>3</sub>CD ( 90 MHz ).

H-8 y dos multipletes centrados a 7,43 y 8,00 ppm que integraban para 3 y 2 hidrógenos respectivamente, correspondientes a un anillo B sin sustituir <sup>166</sup>.

Su espectro de masas presentó un ión molecular a m/e 326 que coincide con una fórmula de  $C_{18}H_{14}O_6$ . La ubicación de los sustituyentes en el anillo A surgió del análisis de los fragmentos correspondientes a la ruptura tipo retro Diels-Alder. De ellos sólo se observó el fragmento  $A_1^+$  ( m/e 194 ) indicativo de un anillo A con un metoxilo y un grupo metilendioxilo. La presencia de iones a m/e 105 y 77 correspondientes a benzoilo y fenilo respectivamente, evidenció la ausencia de sustitución en el anillo B. Por lo tanto, el segundo metoxilo, observado por <sup>1</sup>H-RMN, debía encontrarse ubicado en C-3 ya que además, el ión m/e 297 (  $M - H_2O^+$  ) sugería que podía tratarse de una 3,5-dimetoxiflavona <sup>154</sup> ( Fig. 43 ).

Para resolver la ubicación exacta de los sustituyentes en el anillo A se procedió a realizar el espectro de <sup>1</sup>H-RMN en benceno deuterado, aprovechando la propiedad de este solvente de inducir desplazamientos diferenciales de los grupos metoxilo de acuerdo a la sustitución en los carbonos vecinos a los mismos <sup>175</sup> (pág. 67 ). Como no se observaron desplazamientos significativos en el espectro mencionado, se dedujo que las posiciones *orto* a ambos metoxilos debían estar ocupadas. Es de notar, que el grupo metilendioxilo sufre un desplazamiento (  $\Delta\delta = \delta_{CDCl_3} - \delta_{C_6D_6}$  ) de 0,89 ppm, que coincide con el esperado para un metoxilo con posición *orto* libre ( Fig. 44 ) , por consiguiente al menos una posición vecina a este grupo no estaba sustituida. Esto confirmaba la observación hecha por espectrometría de masas, que uno de los metoxilos debía estar unido a C-3.

El segundo metoxilo podía encontrarse en C-5 o bien en C-8, con el grupo metilendioxilo unido a los C-6 y C-7 en ambos casos. Para aclarar esta disyuntiva se procedió a efectuar una demetilación específica para MeO-5 con  $AlCl_3$  <sup>248,249</sup>, obteniéndose un compuesto fenólico 99.

Este flavonoide 99 resultó clave para elucidar la estructura de 98.

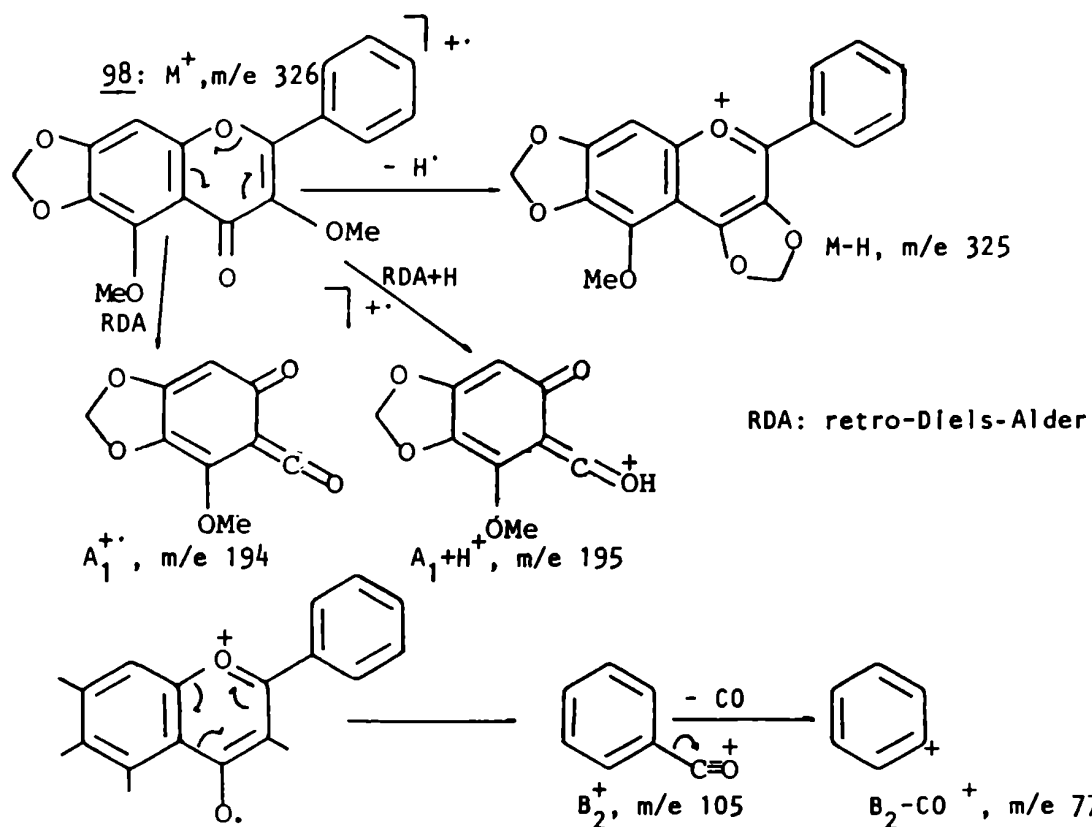
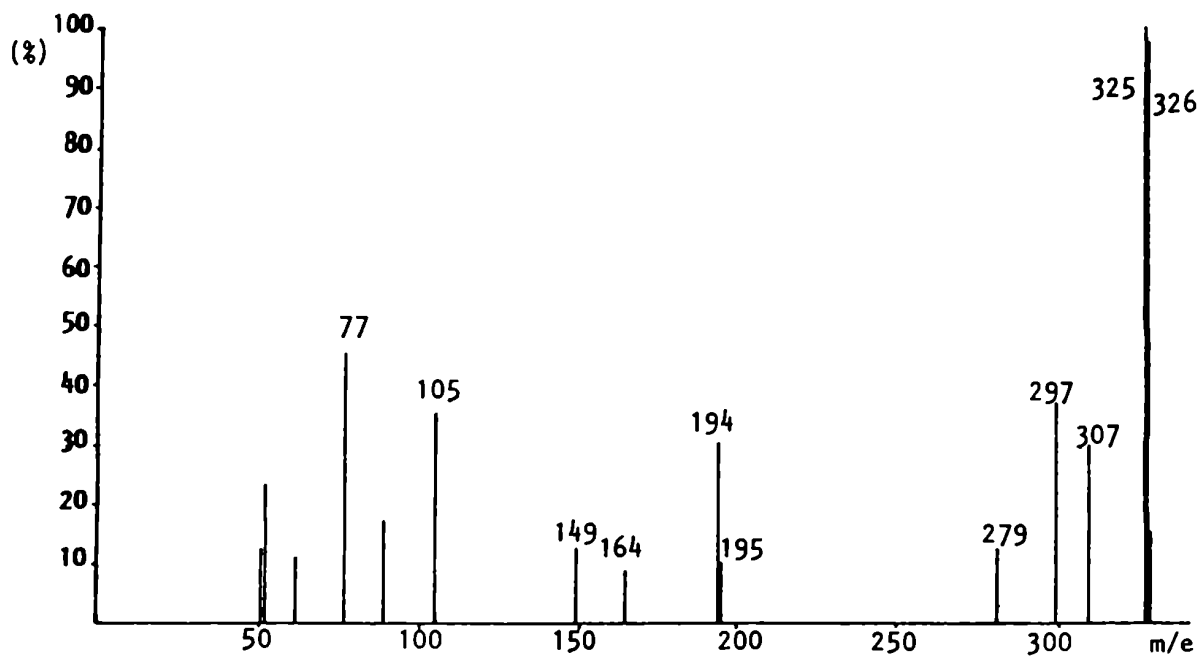
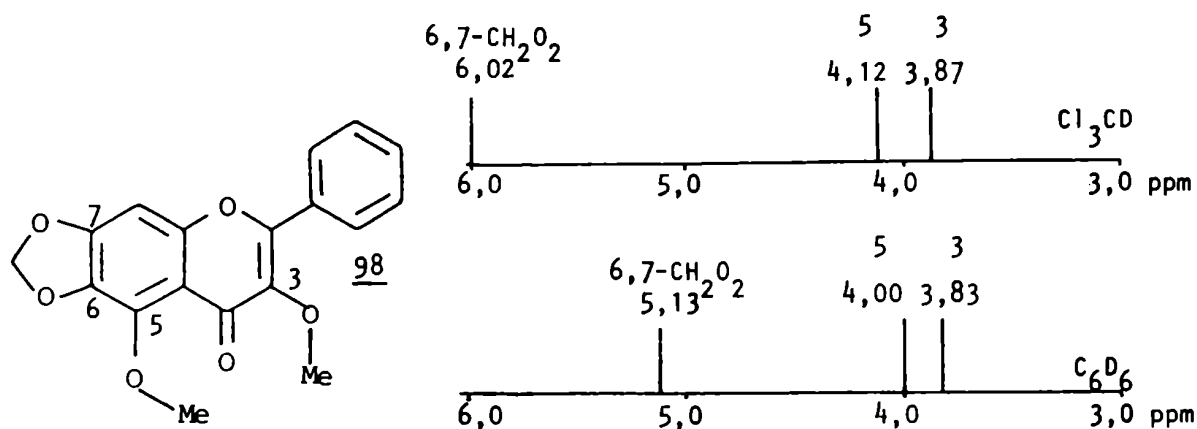


Figura 43: Espectro de masas y fragmentos principales de 3,5-dimetoxi-6,7-metilenodioxi $\underline{flavona}$  98.



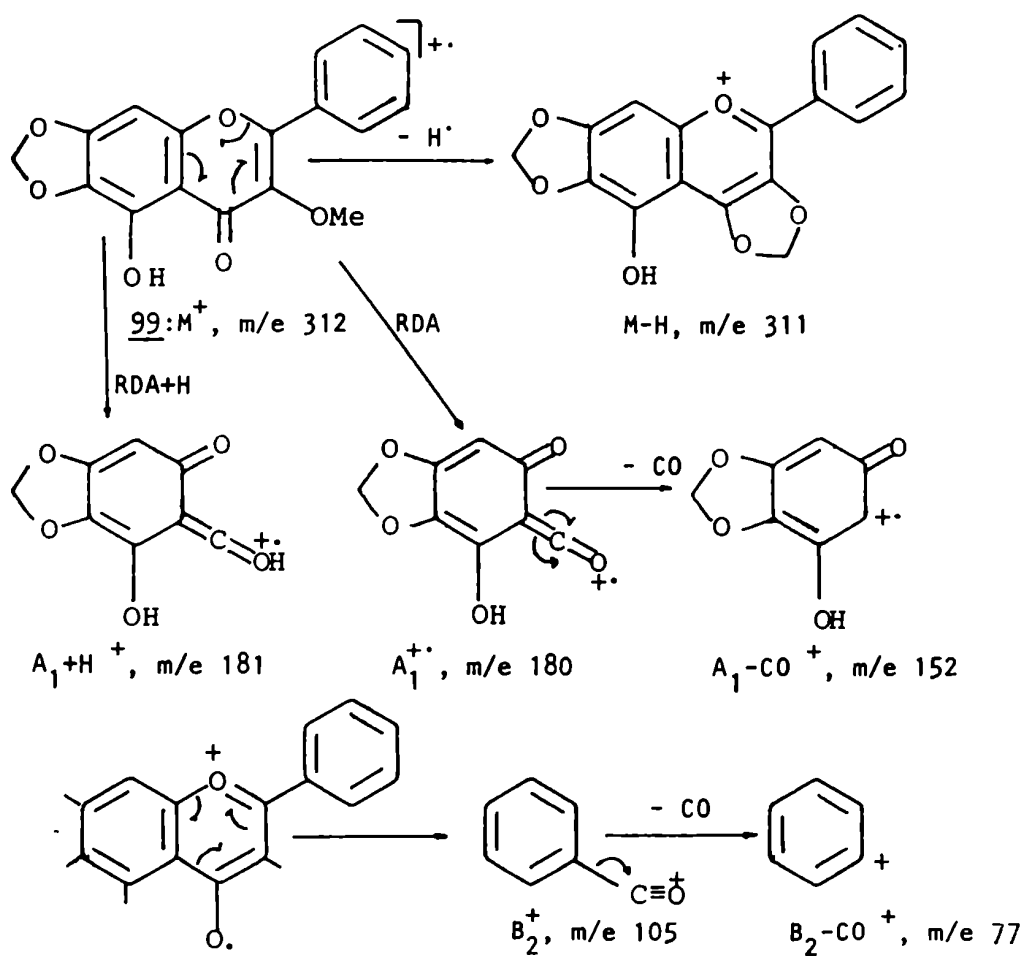
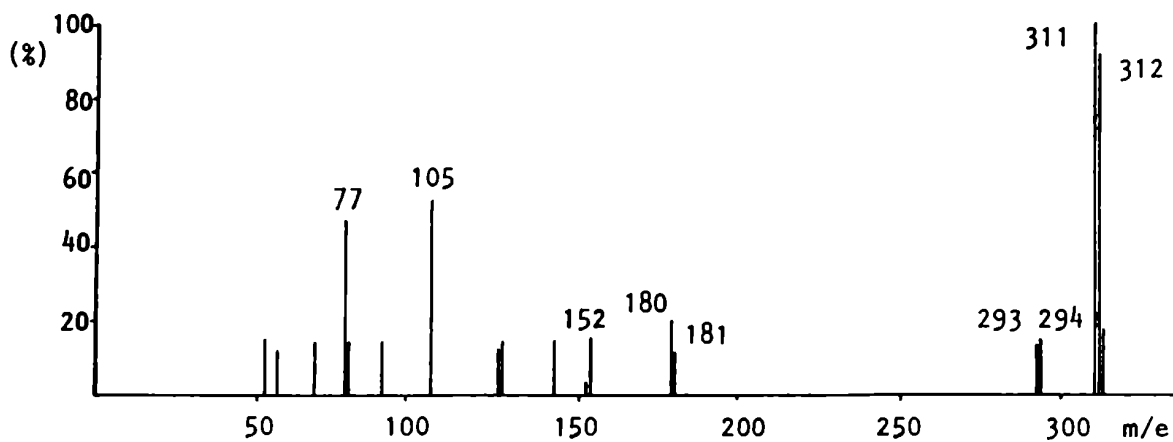
**Figura 44:** Comportamiento de los grupos metoxilo y metilendioxi en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de 3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxi-flavona 98 en Cl<sub>3</sub>CD y C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.

El espectro U.V. de 99 presentó dos máximos a 323 ( banda I ) y 273 ( banda II ) nm mostrando un desplazamiento batocrómico de la banda I al efectuar el espectro en presencia de AlCl<sub>3</sub> (  $\Delta\lambda_1 = 27,5$  nm ) que es indicativo de hidroxilo unido a C-5 y C-6 sustituido, debido a la escasa magnitud del desplazamiento observado <sup>250</sup> .

El espectro de masas de 99 mostraba el ión molecular a m/e 312 ( C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> ), el fragmento A<sub>1</sub><sup>+</sup> ( m/e 180 ) correspondía a un anillo A sustituido por hidroxilo y un metilendioxi, así como fragmentos a m/e 105 y 77 provenientes del anillo B no sustituido ( Fig. 45 ).

Su espectro de <sup>1</sup>H-RMN mostró singuletes a 3,87 ppm asignable a un grupo metoxilo unido a C-3, 6,08 ppm correspondiente al grupo metilendioxi, 6,53 ppm asignable a H-8 y 12,85 ppm correspondiente al protón de HO-5, y multipletes a 7,51 y 8,05 ppm correspondientes al anillo B no sustituido ( Fig 46 ). La metilación del compuesto 99 con ( CH<sub>3</sub> )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dio 98 comprobán-





RDA: retro-Diels-Alder

**Figura 45:** Espectro de masas y fragmentos principales de 5-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilendioxiflavona 99.

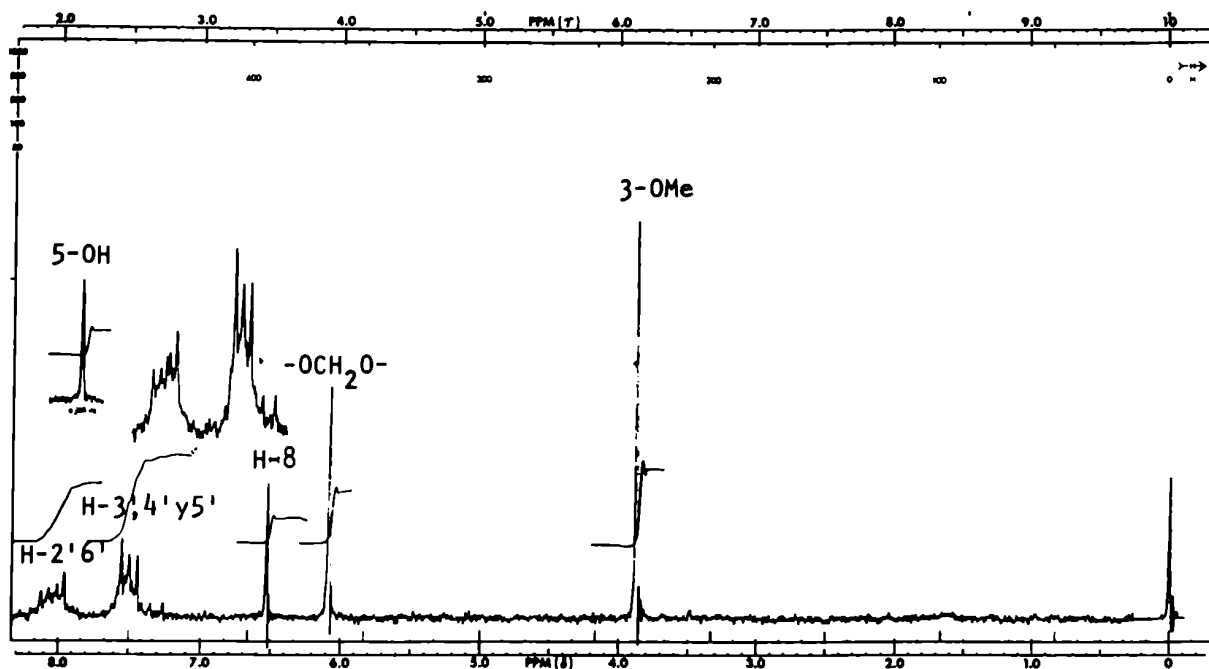


Figura 46: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 99, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ( 60 MHz ).

dose así, que en el proceso de demetilación no ocurrió isomerización.

Los resultados obtenidos indican claramente que ambos compuestos presentaban un esquema de sustitución 5,6,7-. Se identificó, por tanto, al compuesto 98 como 3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxiflavona. Este compuesto no fue hallado previamente en la naturaleza; sólo se conoce un informe sobre la síntesis del mismo <sup>251</sup>. Un testigo sintético, presentó las mismas características espectroscópicas que 98.

Por evaporación de las aguas madres de cristalización de 98 se obtuvo un residuo que fue purificado por métodos cromatográficos, como se detalla en la parte experimental (pág.211), obteniéndose los flavonoides 100, 101 y 104.

#### Análisis estructural del flavonoide 100

Después del fraccionamiento cromatográfico y recrista-

lización, se obtuvo un producto cristalino amarillo, que demostró ser fenólico ( reacción con  $\text{FeCl}_3$  positiva ).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 100 ( Fig 47 ) mostró dos singuletes a 3,87 y 4,05 ppm que integraban para 3 hidrógenos cada uno y correspondían a dos metoxilos; un singulete a 6,58 ppm asignado a H-8 y las señales correspondientes a un anillo B no sustituido ( multipletes centrados a 7,42 ( 3 H ) y 8,08 ( 2H ) ). Se observó también una señal ancha a 12,87 ppm atribuible a HO-5 .

El espectro U.V. presentó absorciones a 323 y 270,5 nm y al efectuar los espectros en presencia de  $\text{AlCl}_3$  o  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  se observó un desplazamiento batocrómico de la banda I en 19 nm evidenciando la presencia de un hidroxilo unido a C-5 y que la posición 6 estaba ocupada <sup>250</sup> . Al realizar el espectro en presencia de  $\text{NaAcO}$  se observó un pequeño desplazamiento batocrómico de la banda II de 1,5 nm sugiriendo que un hidroxilo estaba unido a C-7 <sup>169</sup> . Debido a la baja magnitud de este último desplazamiento y al hecho de observar desplazamientos de valor intermedio en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en benceno deuterado ( Fig. 48 ) fue necesario confirmar la naturaleza del sustituyente unido a

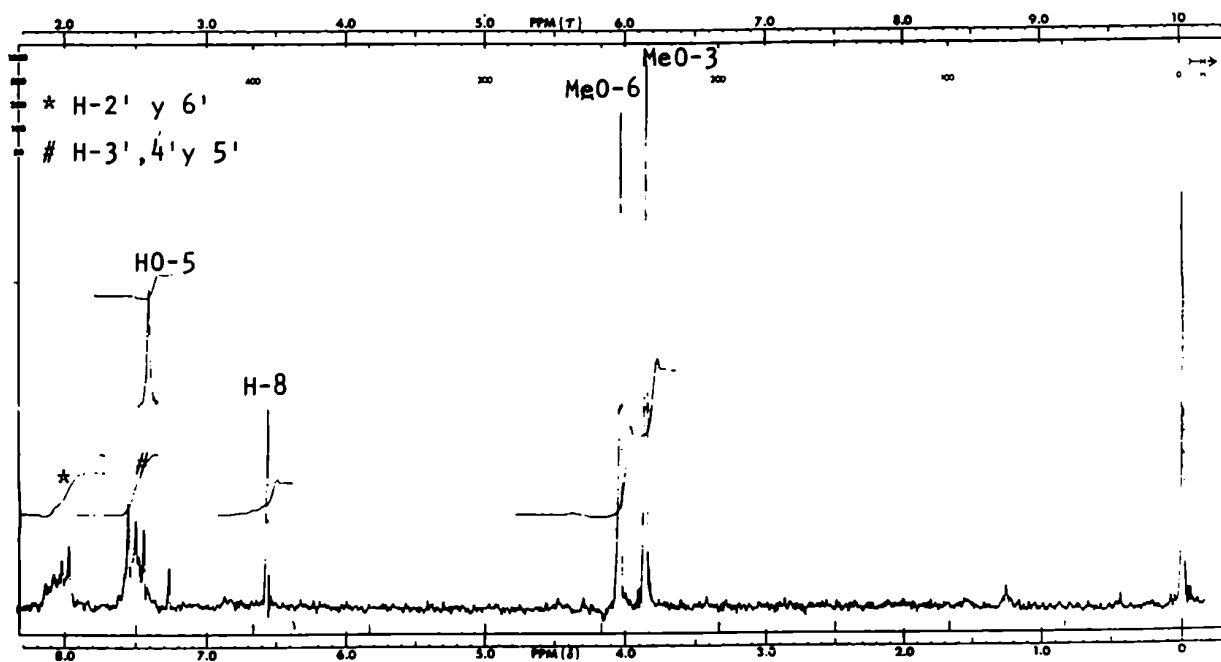


Figura 47: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 100, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ( 60 MHz ).

C-7. Para ello se procedió a metilar el compuesto 100 con sulfato de metilo obteniéndose el dimetilderivado 114.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 114 mostró cuatro metoxilos, uno de los cuales sufrió un fuerte desplazamiento a campos altos en el espectro realizado en benceno- $\text{d}_6$ , característico de un metoxilo unido a C-7 (pág. 67; Fig. 48). Este comportamiento no se observó en 100 confirmándose así la ubicación de un hidroxilo en C-7.

El espectro de masas de 100 (Fig. 49) presentó un ión molecular a  $m/e$  314 ( $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$ ). El ión  $m/e$  167 correspondiente a  $\text{A}_1 - \text{Me}^+$  indicó que este anillo tenía como sustituyentes dos hidroxilos y un metoxilo que debía estar ubicado en la posición 6, en base a los resultados mencionados. La relación de

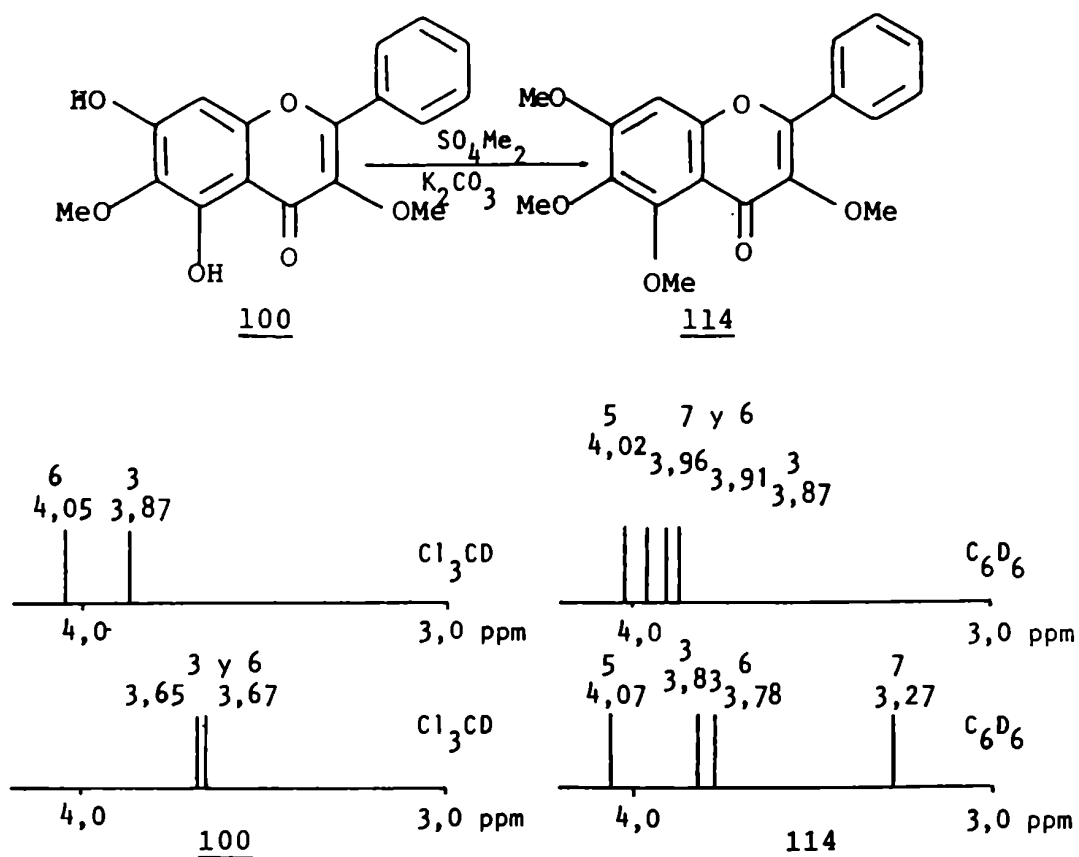


Figura 48: Comportamiento de los grupos metoxilo en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona 100 y 3,5,6,7-tetrametoxiflavona 114 en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  y  $\text{C}_6\text{D}_6$ .

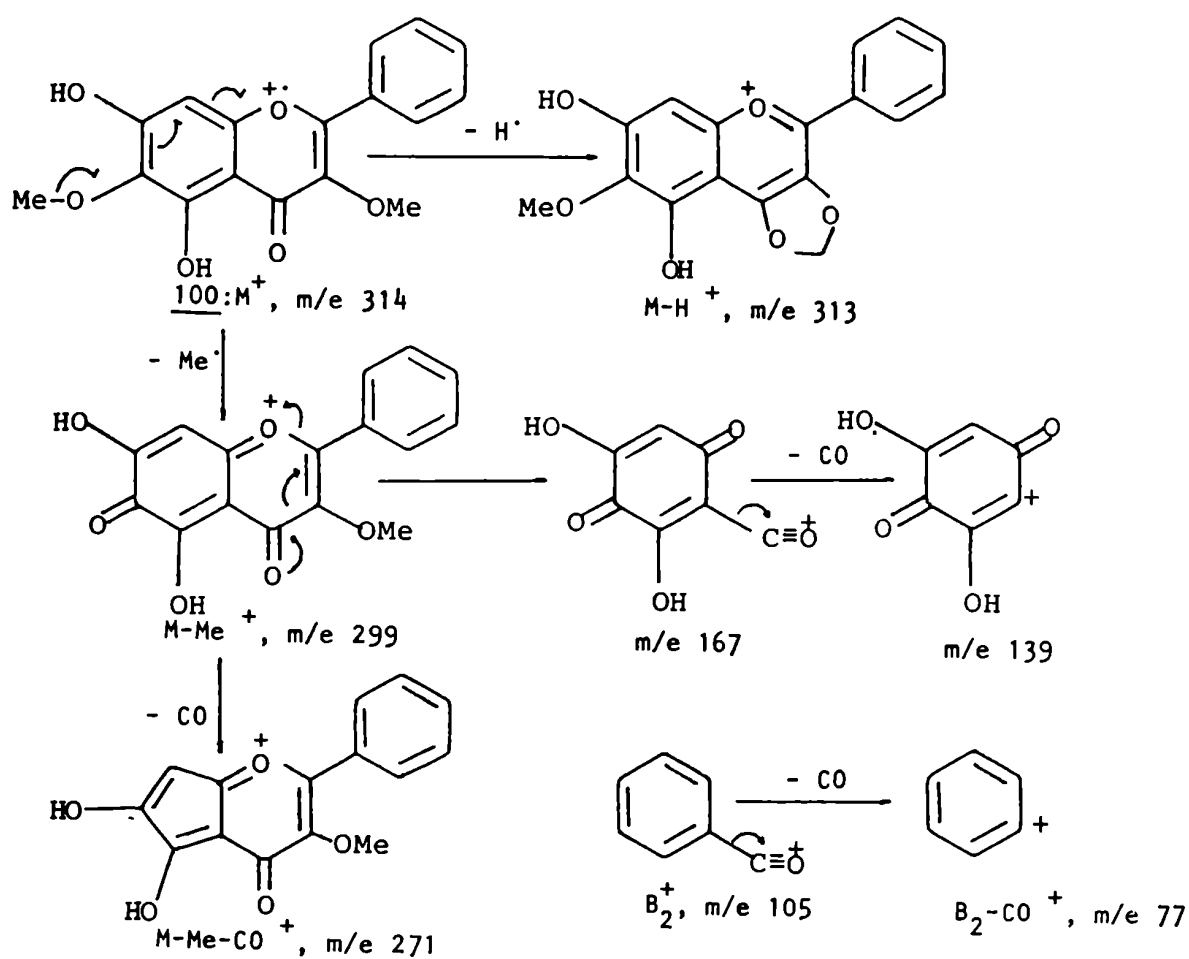
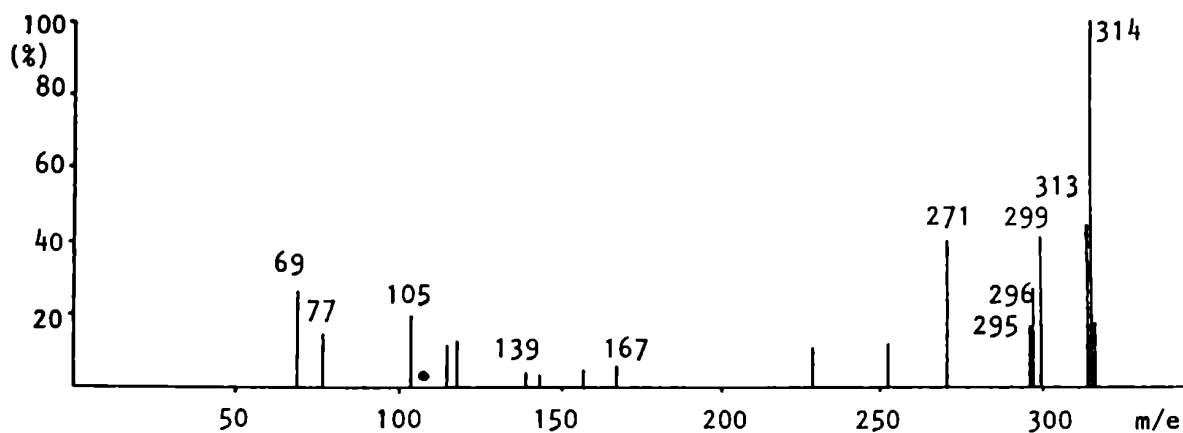


Figura 49: Espectro de masas y fragmentos principales de 5,7-dihidroxi-3,6-di metoxiflavona 100.

las abundancias relativas de los fragmentos correspondientes a M, M - Me y M - H<sub>2</sub>O confirmó una vez más que se trataba de una 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona <sup>159</sup> ( pág. 56 ). Los iones m/e 105 y 77 indicaron nuevamente que el anillo B no estaba sustituido. Por lo tanto, el metoxilo restante debía estar unido a C-3.

Se identificó a este compuesto como 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona 100, el cual no había sido aislado anteriormente de fuente natural, pero sí sintetizado <sup>252</sup>.

### Análisis estructural del flavonoide 101

Se aisló como un producto cristalino amarillo, que presentó reacción con FeCl<sub>3</sub> positiva, evidenciando su naturaleza fenólica.

Su espectro de <sup>1</sup>H-RMN ( Fig. 50 ) era muy similar al del compuesto 100 pero presentaba un solo metoxilo que se observaba como singulete a 4,05 ppm. Se observaron también dos singu

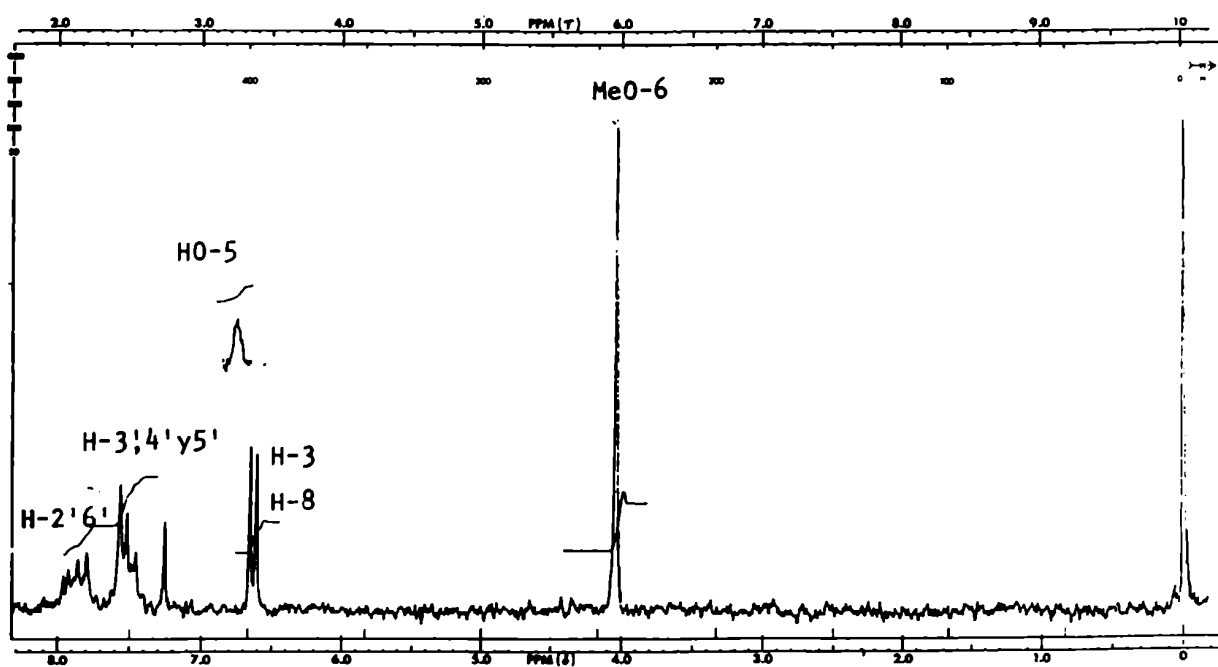


Figura 50: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de 101, en Cl<sub>3</sub>CD ( 60 MHz ).

letes a 6,62 y 6,67 ppm asignables a H-3 e H-8 respectivamente, así como señales correspondientes al anillo B sin sustituir ( multipletes centrados a 7,53 ( 3 H ) y 7,90 ( 2 H ) ppm ). La señal a 12,97 ppm se asignó al hidrógeno fenólico de C-5. Vale la pena destacar que la aparición de un nuevo singulete en la zona de H-6 o H-8 estaba de acuerdo con una estructura de tipo flavona ( C-3 no sustituido ), ya que siempre el H-3 no presenta partición.

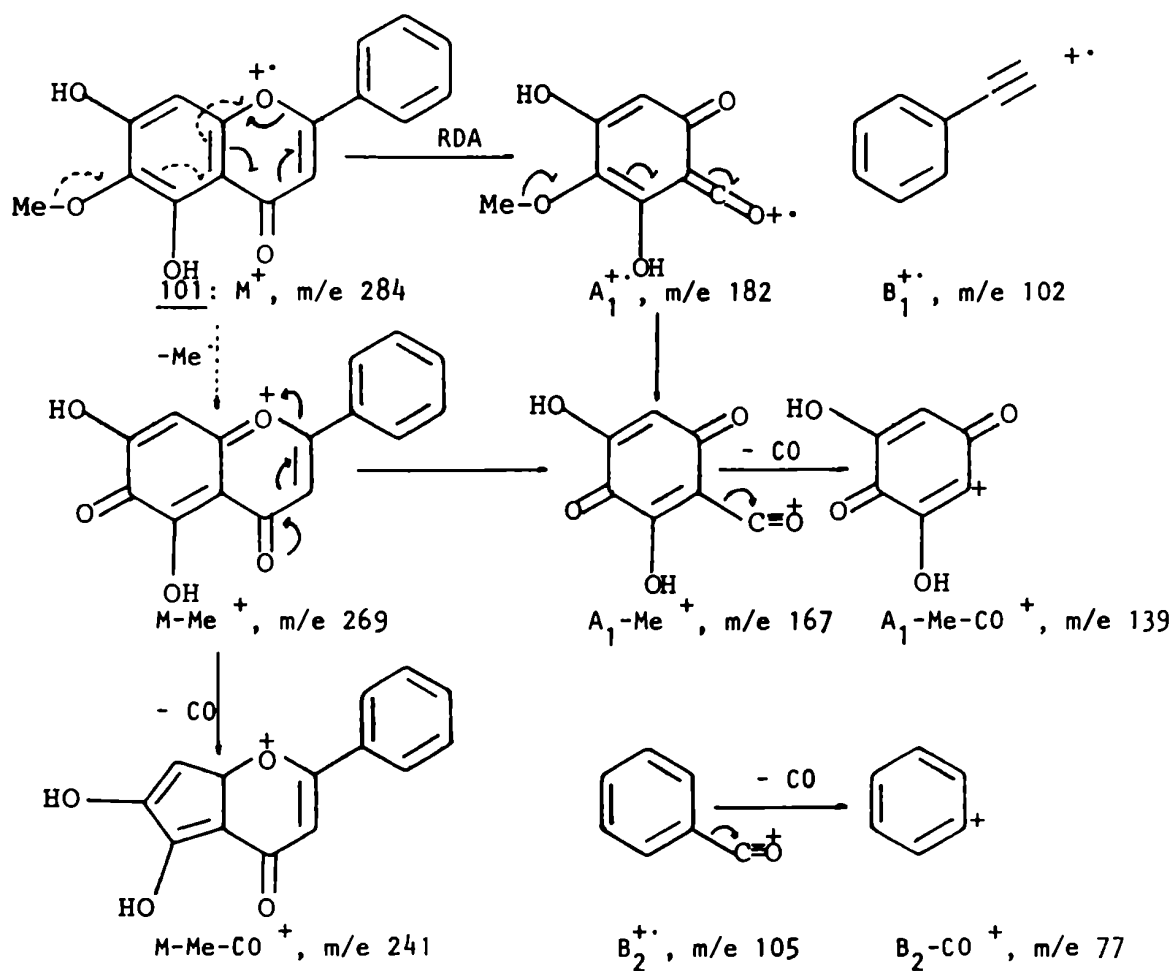
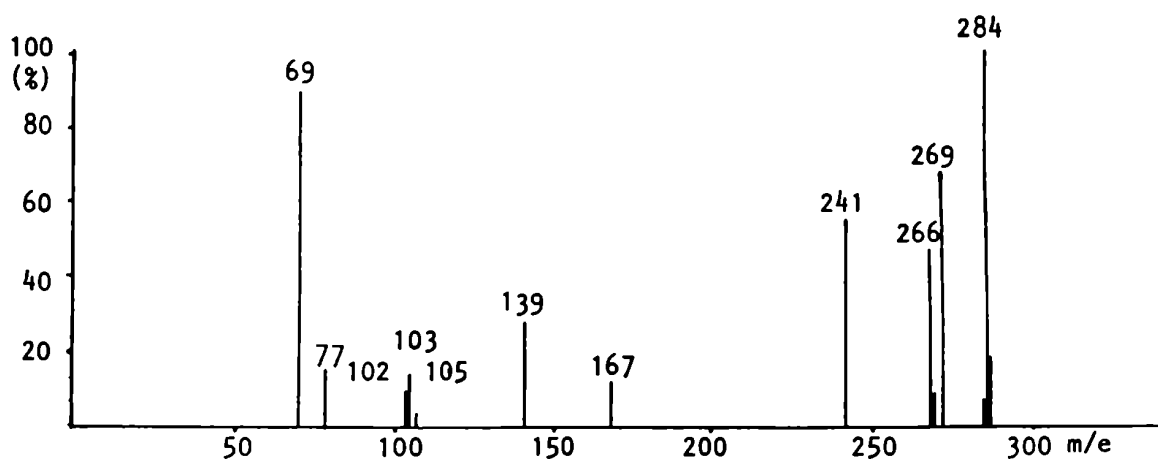
Su espectro de masas ( Fig. 51 ) presentó un ión molecular a m/e 284 de acuerdo con la fórmula  $C_{16}H_{12}O_5$ ; el ión m/e 167 indicó, como en el flavonoide 100, que el anillo A estaba sustituido por dos hidroxilos y un metoxilo. Nuevamente las abundancias relativas de los iones M, M - Me y M - H<sub>2</sub>O indicaban que se trataba de una 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona.

Su espectro U.V. presentó un desplazamiento batocrómico de la banda I al efectuar el espectro en presencia de AlCl<sub>3</sub> y AlCl<sub>3</sub>/HCl de 22 nm indicando la presencia de un hidroxilo en C-5 y C-6 ocupado <sup>250</sup>. En presencia de NaAcO se observó un desplazamiento batocrómico de 1 nm. Dada la baja magnitud de este último, era necesaria otra comprobación para justificar la presencia de un hidroxilo unido a C-7. Para este fin, se compararon los espectros de <sup>1</sup>H-RMN del derivado dimetilado 102 en Cl<sub>3</sub>CD y C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.

El compuesto 102 mostró dos singuletes correspondientes a tres grupos metoxilo. Sólo uno de ellos se vió fuertemente afectado al realizar el espectro en C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> ( Fig 52 ). Este hecho no ocurría con el compuesto 101, por tanto de esta manera se pudo confirmar la existencia de un hidroxilo en C-7. Así queda bien establecido que el esquema de sustitución presente en el flavonoide es 5,6,7- y no 5,7,8- ya que en este último caso, al efectuar el espectro de <sup>1</sup>H-RMN en C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> del derivado permetilado deberían ser dos los metoxilos fuertemente afectados.

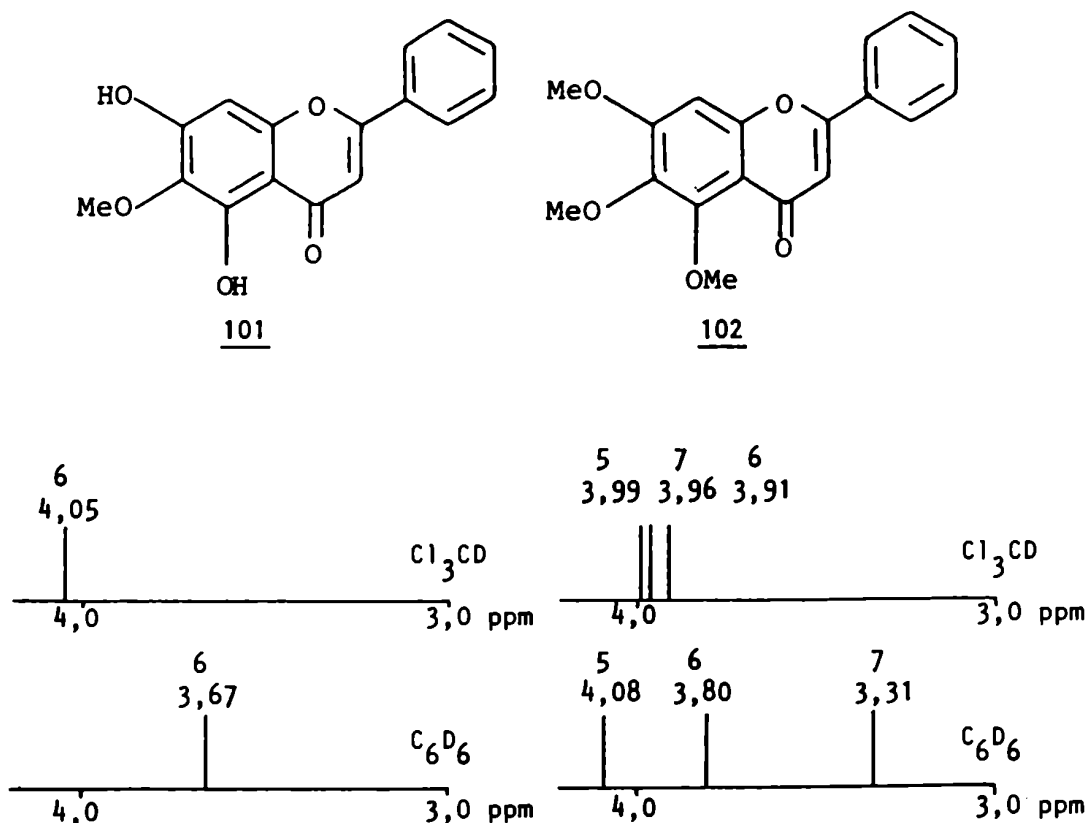
Se identificó a este compuesto como 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101, conocido como oroxilina, que fue hallado previamente en *Oroxylum indicum*<sup>253</sup> y especies de *Scutellaria*<sup>254-256</sup>.

Llamó la atención la discrepancia existente entre el



**Figura 51:** Espectro de masas y fragmentos principales de 5,7-dihidroxi-6-metoxi flavona 101.





**Figura 52:** Comportamiento de los grupos metoxilo en los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  de 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101 y 5,6,7-trimetoxiflavona 102 en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  y  $\text{C}_6\text{D}_6$ .

punto de fusión informado en la literatura y el obtenido para este compuesto. Los valores descriptos varían en un amplio rango: 231-232 °C <sup>253</sup> y 219 °C <sup>257</sup>; derivado diacetilado: 131-132 °C <sup>253</sup> y 143 °C <sup>257</sup>. Si bien la estructura del compuesto 101 no ofrecía dudas, se efectuó el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del mismo en acetona- $\text{d}_6$ , el cual resultó coincidente con el registrado en bibliografía <sup>257</sup>. Se preparó también el derivado diacetilado 103 ( pf: 142-144°C ). Su espectro de  $^1\text{H-RMN}$  ( Fig.53 ) mostró dos singuletes a 2,35 y 2,46 ppm que se asignaron a los metilos de dos acetatos aromáticos; un singulete a 3,84 correspondiente al MeO-6; dos singuletes a 6,55 y 7,20 ppm atribuibles a los H-3 e H-8 respectivamente, siendo este último el más afectado al acetilar; y

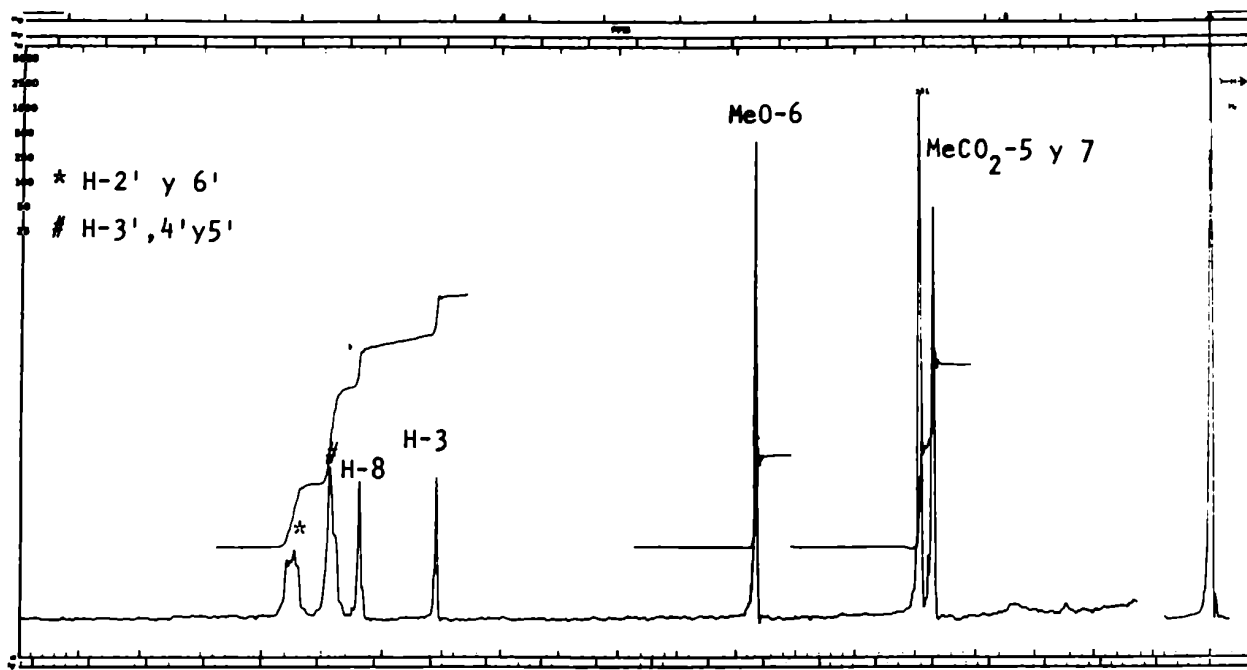
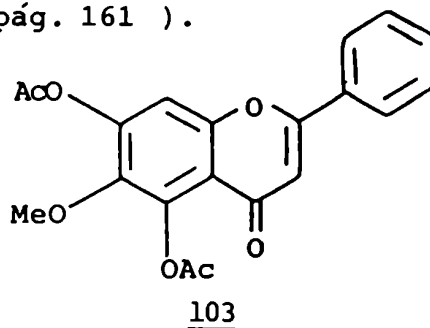


Figura 53: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 103, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ( 100 MHz ).

dos multipletes complejos a 7,44 y 7,75 ppm para los 5 hidrógenos del anillo B. Estos datos espectroscópicos, así como el punto de fusión del derivado diacetilado 103 concuerdan con los de literatura <sup>257</sup>. El espectro de masas de 103 ( Fig. 54 ) mostró el ión molecular a m/e 368 a partir del cual se observan dos pérdidas sucesivas de cetena ( 42 uma ) para dar los iones m/e 326 y 284, siendo el último el ión molecular de 100. A partir de este último ión se forman los mismos fragmentos que en el compuesto 101. Es de notar que en los espectros de masas de 101 y 103 se observa la aparición de un ión m/e 69 intenso cuya génesis se describe más adelante ( pág. 161 ).



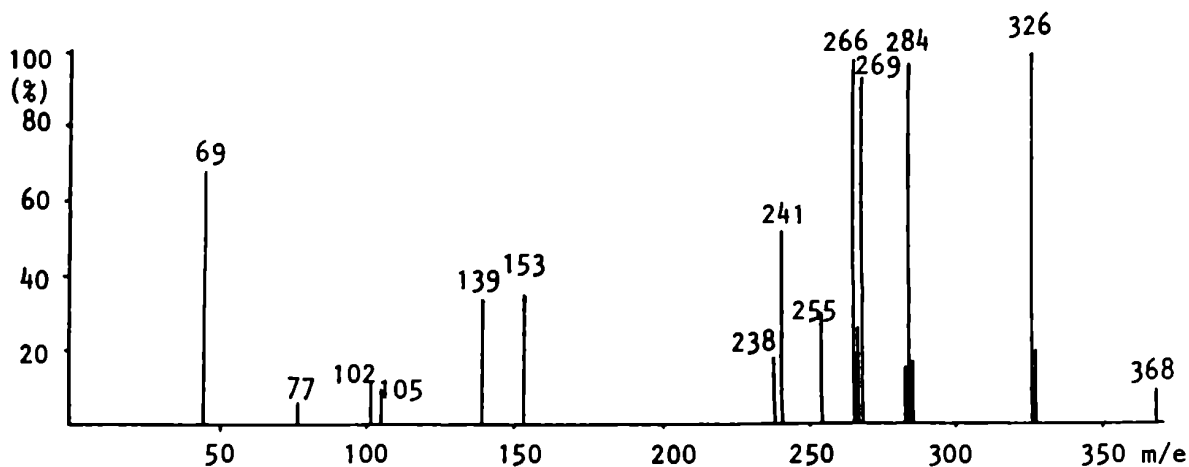


Figura 54: Espectro de masas de 5,7-diacetoxi-6-metoxiflavona 103 .

#### Análisis estructural del flavonoide 104

Este compuesto mostró en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  ( Fig.56 ), dos dobletes a 6,33 y 6,50 ppm que integraban cada uno para un protón y presentaban un acoplamiento *meta* (  $J = 2 \text{ Hz}$  ) característico de flavonoides con el anillo A sustituido en las posiciones 5 y 7 ( pág. 61 ); dos singuletes a 3,88 y 3,96 ppm que integraban para 6 y 3 hidrógenos respectivamente y que fueron atribuidos a 3 grupos metoxilo. Como el anillo B no estaba sustituido se observaron 2 multipletes centrados a 7,46 y 8,02 ppm que integraban para 3 y 2 hidrógenos respectivamente. De esto se dedujo que uno de los metoxilos debía estar unido a C-3.

El espectro de masas ( Fig.55 ) confirmó estas asignaciones y mostró un ión molecular a m/e 312 (  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$  ), el ión m/e 180 correspondiente al anillo A con dos metoxilos y, m/e 105 y 77 de los iones benzoilo y fenilo provenientes del anillo B no sustituido.

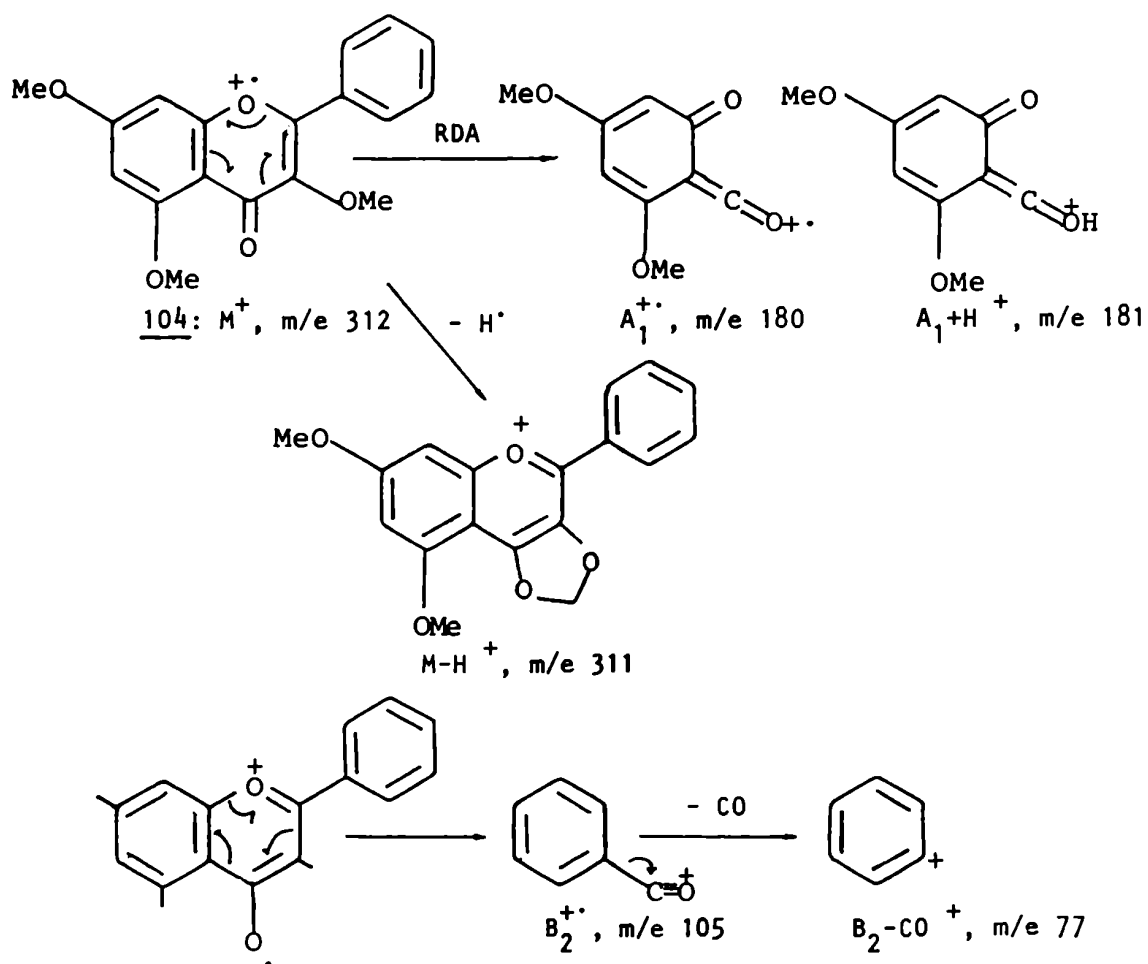
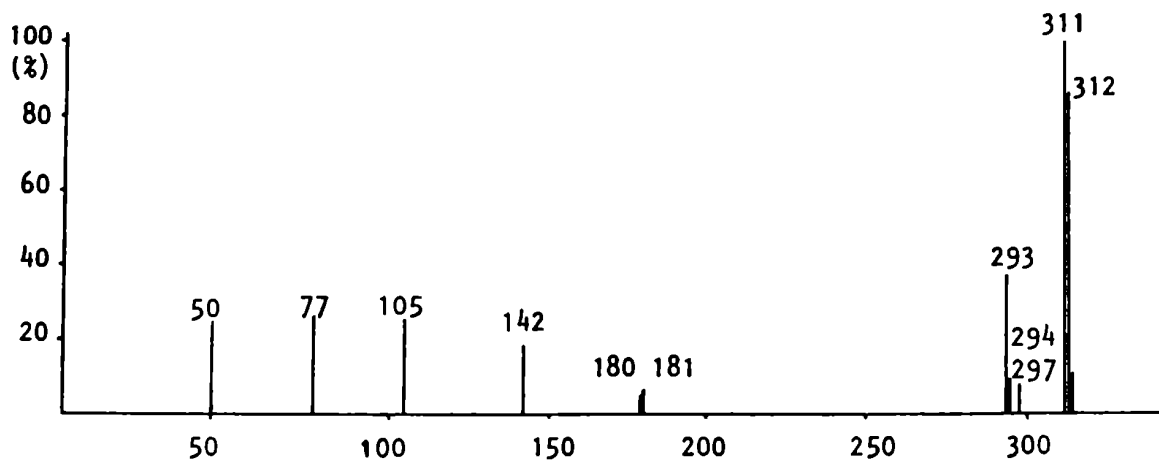


Figura 55: Espectro de masas y fragmentos principales de 3,5,7-trimetoxiflavona 104.

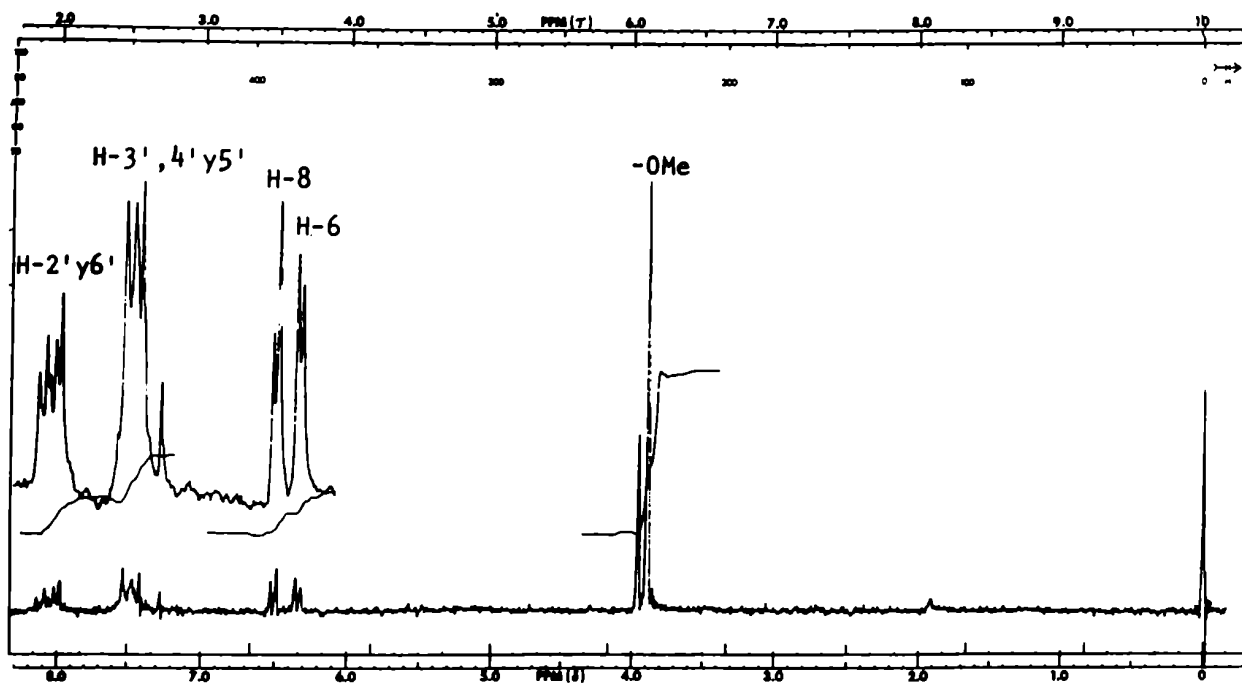
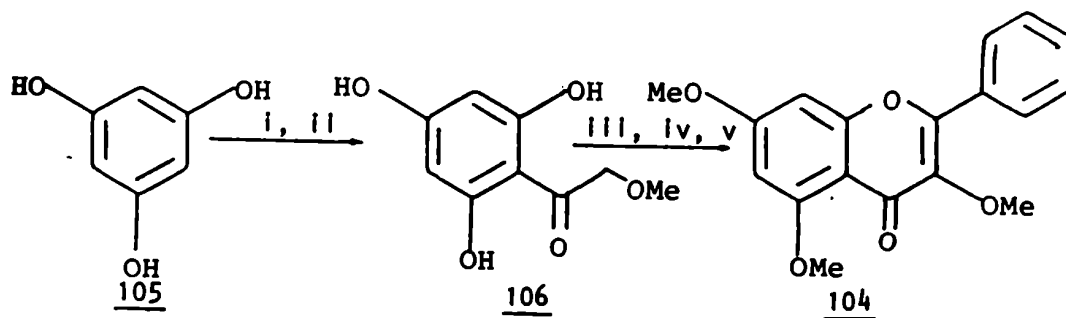


Figura 56: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 104, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ( 60 MHz ).

Por consiguiente, se identificó este compuesto como la 3,5,7-trimetoxiflavona 104, que fue aislada previamente de *Aniba riparia* <sup>258</sup>. Esta estructura se confirmó por comparación con el producto obtenido sintéticamente a partir de 2,4,6-trihidroxi-*w*-metoxiacetofenona 106 <sup>259</sup> y anhídrido benzoico/benzoato de sodio según el método de Robinson <sup>260</sup> y posterior metilación del compuesto obtenido ( Fig. 57 ).



i.-  $\text{MeCN}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{HCl}$  (g),  $0^\circ$ ; ii.-  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $100^\circ$ ; iii.- anhídrido benzoico, ácido benzoico,  $190^\circ$ ; iv.-  $\text{KOH}$  10%; v.-  $\text{SO}_4\text{Me}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

Figura 57: Síntesis de 3,5,7-trimetoxiflavona 104.

## 2.- ESTUDIO DEL RESIDUO 1

El fraccionamiento de este residuo dio lugar a 8 fracciones que se detallan a continuación:

Fracción	Componentes
1	Hidrocarburos
2	Ceras
3	Alcoholes lineales y Triterpenos
4	Esteroles
5	Flavonoides <u>100</u> y <u>101</u>
6	Flavonoides <u>98</u> y <u>114</u>
7	Flavonoides <u>104</u> y <u>115</u>
8	Aceite verde oscuro

Las fracciones 2 y 8 no fueron estudiadas.

### Hidrocarburos

La fracción 1 estaba constituida por hidrocarburos, que fueron analizados por cromatografía gas-líquido ( C.G.L. ) en condiciones isotérmicas, determinándose así que se trataba de una serie homóloga ( Fig. 58 ).

El análisis de los espectros de masas de los componentes más abundantes se efectuó por C.G.L.-E.M., en condiciones de temperatura programada, encontrándose que la planta contiene hidrocarburos lineales saturados de 29, 31, 32, 33, 34 y 35 átomos de carbono. Los componentes más importantes son los de número de carbono impar, ya que se forman por descarboxilación de ác. grasos pares <sup>261</sup>. Se observaron también dos hidrocarburos pertenecientes a la serie *iso* (  $C_{31}H_{64}$  y  $C_{33}H_{68}$  ). En esta planta llama la atención la abundancia del hidrocarburo *iso*  $C_{31}H_{64}$ .

Los espectros de masas de los hidrocarburos lineales

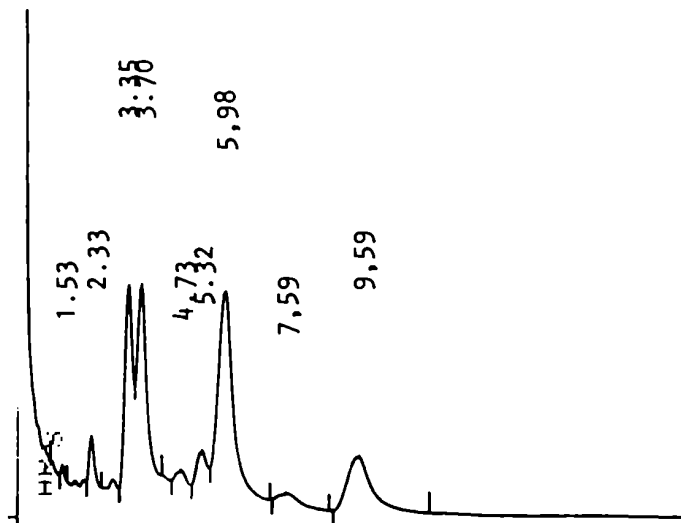


Figura 58: Cromatografía gas-líquido de los hidrocarburos de *Gomphrena martiana*.

presentaban una caída exponencial en la abundancia de los fragmentos, observándose en la zona de masas altas sólo el ión molecular de baja intensidad. En el caso de los hidrocarburos pertenecientes a la serie *iso* se observó el mismo comportamiento en la zona de masas bajas e intermedias, mientras que en la zona de masas altas se veían fragmentos correspondientes al ión molecular y a pérdidas de metilo e isopropilo a partir de aquel.

En la tabla 17 se consignan los logaritmos (  $\ln$  ) de los tiempos de retención (  $\ln Tr$  ) observados en el análisis isotérmico por C.G.L. y la abundancia relativa de los hidrocarburos,

Tabla 17: Hidrocarburos de *Gomphrena martiana*.

	$nC_{29}$	$iC_{31}$	$nC_{31}$	$nC_{32}$	$iC_{33}$	$nC_{33}$	$nC_{34}$	$nC_{35}$
$\ln Tr$	0,846	1,209	1,308	1,554	1,671	1,788	2,027	2,265
%	2,7	17,4	21,1	1,3	4,3	35,0	1,7	16,0
$M^+$ , m/e	408	436	436	450	464	464	478	492

Los parámetros calculados por cuadrados mínimos correspondientes a la recta resultante de representar gráficamente  $\ln Tr$  en función del número de átomos de carbono son los siguientes:

ordenada al origen: -6,03  
 pendiente: 0,237  
 coeficiente de correlación: 0,9999

### Alcoholes

Por sucesivas recristalizaciones de acetona de la fracción 3 se obtuvo un sólido blanco que mostró en su espectro I.R. una absorción ancha centrada a  $3.300\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión O-H y dos señales a  $740$  y  $730\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la deformación de una cadena de metilenos <sup>262</sup>.

Su espectro  $^1\text{H-RMN}$  presentó un triplete deformado a  $0,90\text{ ppm}$  correspondiente a metilo, un singulete a  $1,26\text{ ppm}$  de gran intensidad debido a metilenos de una cadena y un triplete a  $3,66\text{ ppm}$  correspondiente a un metileno unido oxígeno.

Su estudio por C.G.L. en condiciones isotérmicas dio una serie de picos que mostraban una variación logarítmica del tiempo de retención al aumentar el número de carbonos de los compuestos correspondientes, según se determinó por medio de sus espectros de masas. Estos fueron registrados para los tres componentes mayoritarios, llegando a la conclusión de que se trataba de una mezcla de alcoholes lineales <sup>158</sup> de  $C_{24}$  a  $C_{30}$ .

En la tabla 18 se dan los valores de  $\ln Tr$  observados para los distintos compuestos.

Tabla 18: Alcoholes de *Gomphrena martiana*.

	$nC_{24}$	$nC_{25}$	$nC_{26}$	$nC_{27}$	$nC_{28}$	$nC_{29}$	$nC_{30}$
$\ln Tr$	2,005	2,269	2,528	2,789	3,054	3,313	3,569
%	4,3	1,0	31,6	3,3	44,3	1,7	13,2
M - H <sub>2</sub> O	-	-	364	-	392	-	420



Por cálculo de cuadrados mínimos se obtuvieron los siguientes parámetros correspondientes a la recta resultante de representar gráficamente  $\ln Tr$  en función del número de átomos de carbono de los alcoholes mencionados:

ordenada al origen: -4,255

pendiente: 0,261

coeficiente de correlación: 0,9999

### Triterpenos

Se evaporaron las aguas madres de recristalización de los alcoholes. El residuo obtenido presentaba por cromatografía en capa delgada de sílicagel una mancha que revelaba violeta rojizo con  $H_2SO_4$ /anisaldehído a  $R_f = 0,5$  ( $Cl_3CH$ , 2 desarrollos) característico de triterpenos. Por cromatografía en columna se aisló la fracción que presentaba las características mencionadas previamente. Su análisis por C.G.L. demostró que se trataba de una mezcla de varios componentes ( Fig. 59 ), pudiéndose determinar por C.G.L.-E.M. que estaba constituida por alcoholes de cadena lineal de  $C_{24}$ ,  $C_{26}$  y  $C_{28}$  ( 19,2; 20,1 y 10,0 % respectivamente ) y cuatro componentes de mayor tiempo de retención: 5,42 min ( 4,4 % ); 5,99 min ( 20,2 % ); 6,85 min ( 22,2 % ) y 8,26 min ( 2,0 % ).

El compuesto con tiempo de retención 5,99 min mostró en su espectro de masas ( Fig.60 ) un ión molecular con  $m/e$  426 y pico base a  $m/e$  218. Estos datos correspondían a un alcohol triterpénico de tipo  $\Delta^{12}$ -urseno o  $\Delta^{12}$ -oleaneno <sup>263,264</sup>, es decir que el compuesto debía ser  $\alpha$ - o  $\beta$ -amirina. Su identidad se comprobó por C.G.L. contra testigos auténticos de los alcoholes triterpénicos libres y de sus correspondientes derivados acetilados, demostrando ser  $\beta$ -amirina 107.

El compuesto con tiempo de retención 6,85 min mostró en su E.M. ( Fig. 61 ) un ión molecular con  $m/e$  440. Esta masa correspondería a un alcohol triterpénico con un metilo más que la amirina. Sin embargo, se observó como ruptura característica

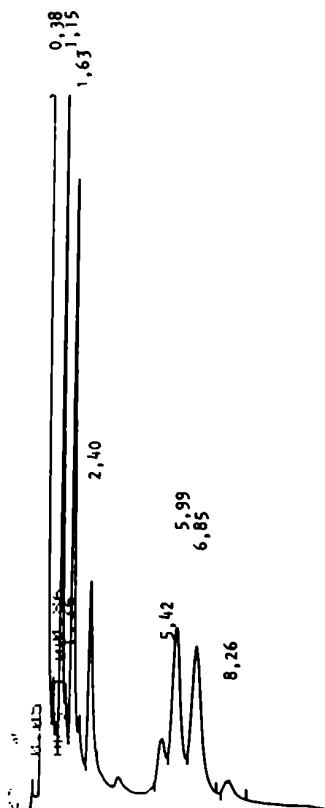


Figura 59: Cromatografía gas-líquido de los triterpenos de *G. martiana*.

la pérdida de 140 una desde el ión molecular para dar un fragmento con  $m/e$  300, lo cual es típico de 9:19-ciclopropanesteroides 245,246. A partir de este ión se observó la pérdida de 125 una correspondientes a una cadena lateral con un doble enlace y un metilo más que el colesterol.

Al poseer el compuesto una insaturación en la cadena lateral quedaba claro que el esqueleto básico debía corresponder al de un triterpeno tetracíclico, en particular un derivado alqu<sup>l</sup>lado del cicloartenol 84. Las fragmentaciones observadas y el ión molecular indicaban como estructuras posibles las de ciclolaudenol 83 o bien 24-metilencicloartanol 108. Como ambos compuestos presentaban espectros de masas muy similares, siendo por lo tanto dificultoso distinguirlos por este tipo de espectrometría, se recurrió a la comparación del producto natural con testigos. De esta manera, el compuesto se identificó como ciclolaudenol 83 ( Fig. 62 ).

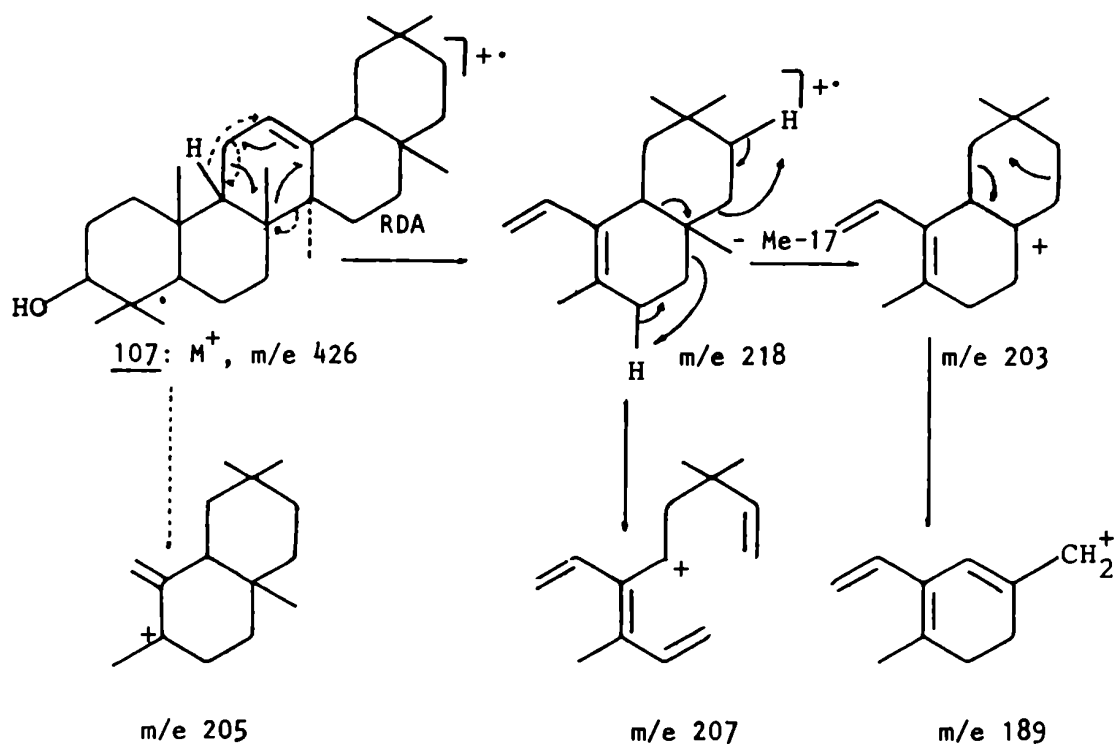
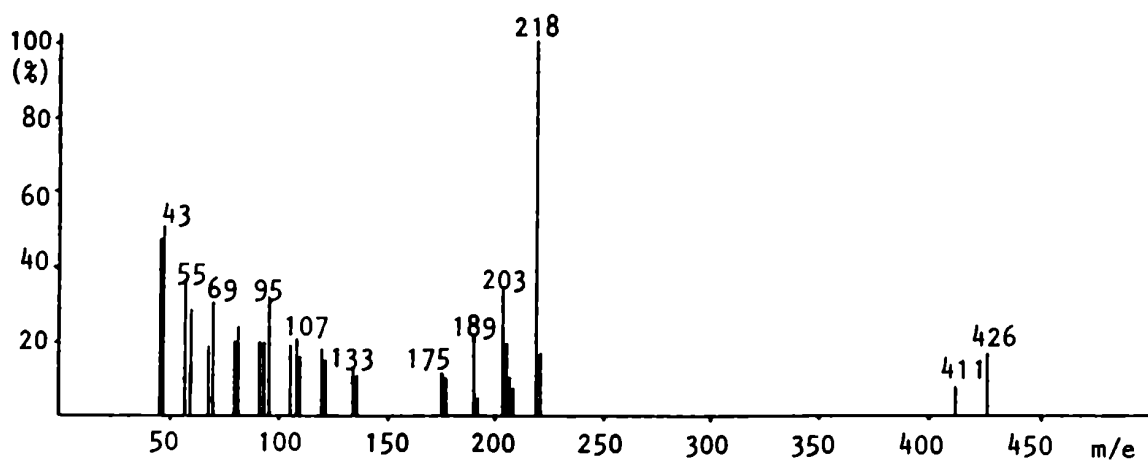
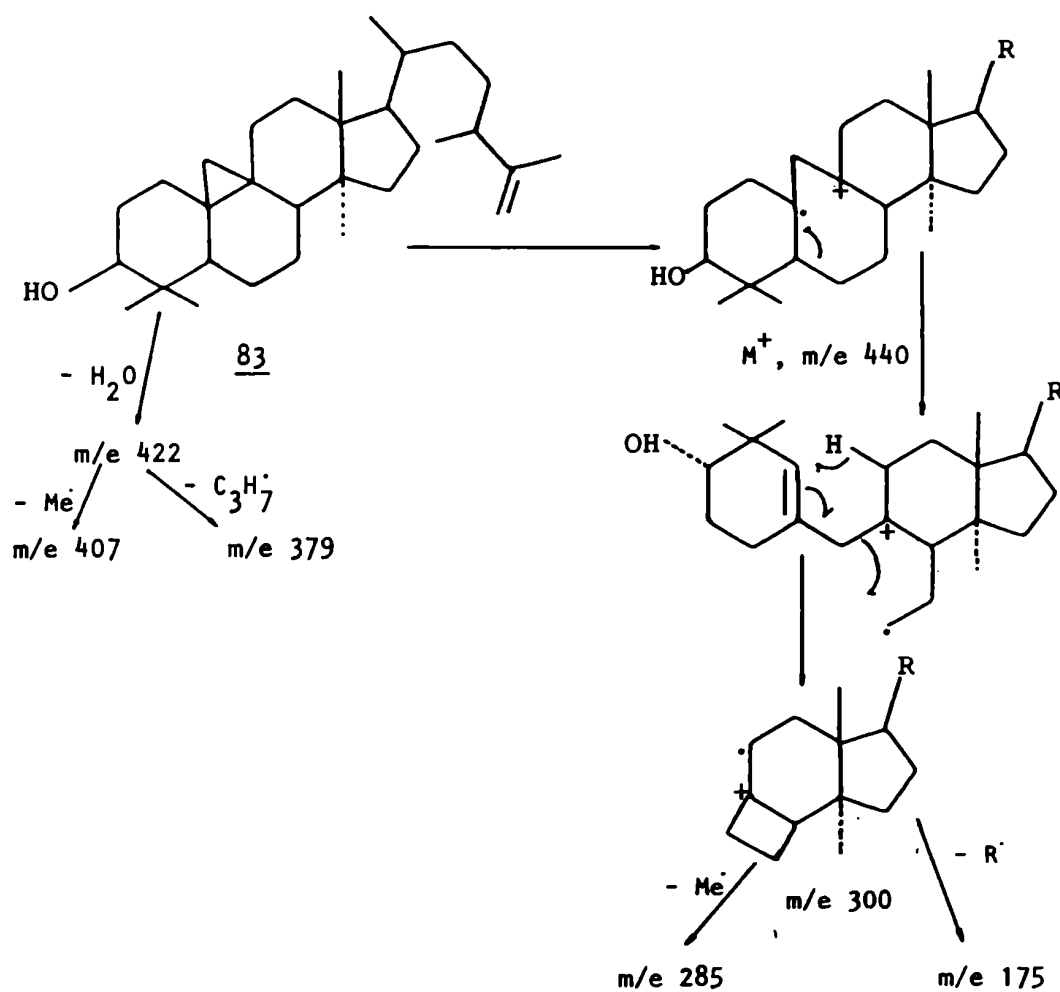
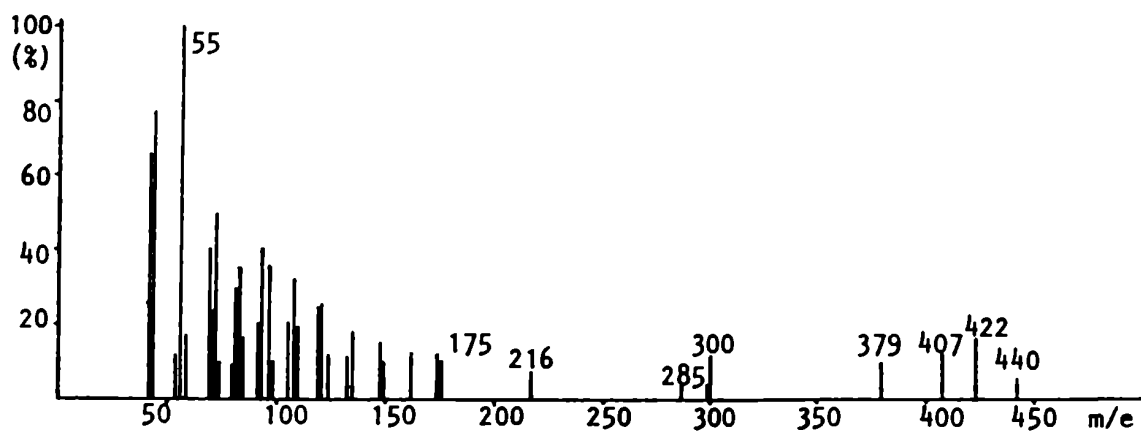


Figura 60: Espectro de masas y fragmentos principales de  $\beta$ -amirina 107.



**Figura 61:** Espectro de masas y fragmentos principales de ciclolaudenol **83**.

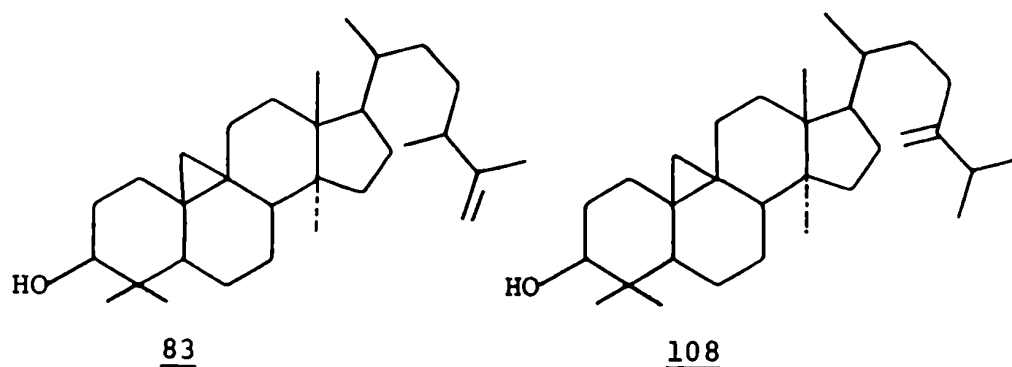


Figura 62

De los dos compuestos minoritarios restantes no se pudo determinar el espectro de masas del de menor tiempo de retención ( 5,42 min ). En cambio, el compuesto con Tr 8,26 min presentó en su espectro de masas ( Fig. 64 ) un ión molecular con  $m/e$  426 y  $M - H_2O$  indicando que se trataba de un alcohol triterpénico. Como el pico base era  $m/e$  189, el esqueleto básico podría ser el de lupano u hopano <sup>264</sup> ( Fig. 63 )

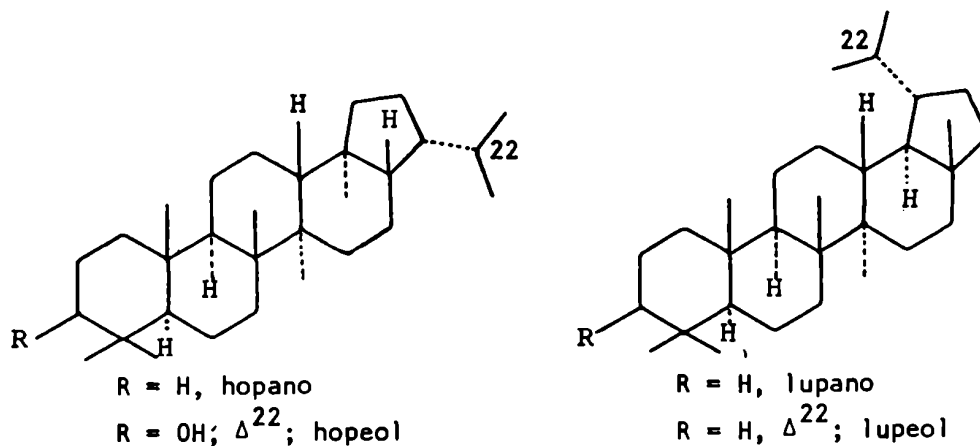


Figura 63 ( sigue )

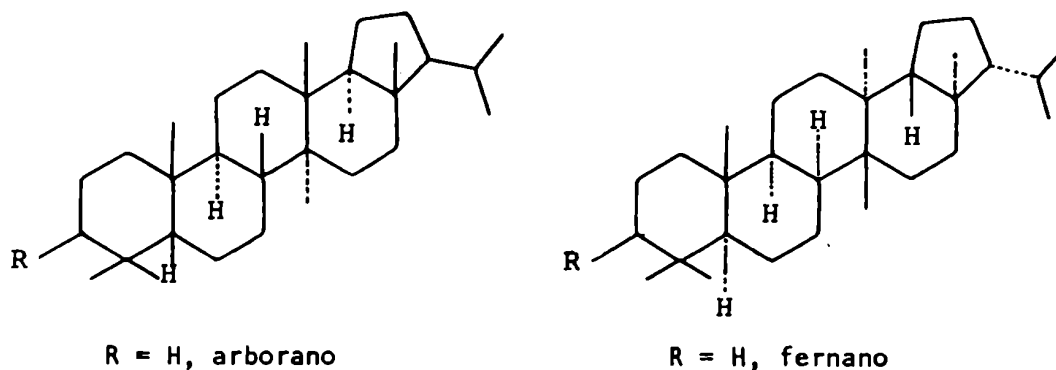


Figura 63: Triterpenos pentacíclicos: tipo hopano, lupano, arborano y fernano.

Los compuestos de las series mencionadas poseen grupos isopropilo o isopropenilo en el anillo E, sin embargo estas diferencias pueden esclarecerse por espectrometría de masas ya que el grupo isopropilo produce una pérdida de 43 uma desde el ión molecular y debería observarse como pico base el ión  $m/e$  191 en lugar de 189. En el caso del grupo isopropenilo la pérdida de 41 uma a partir del ión molecular no está favorecida por ser una ruptura vinílica y por consiguiente  $M - 41$  es de abundancia despreciable.

Los datos para el triterpeno en estudio coincidían con la existencia de un grupo isopropenilo en la molécula, y por lo tanto se trataba de lupeol u hopeol ( Fig. 63 ). La diferencia entre ambos sólo reside en la posición de los metilos angulares y en la posición del isopropenilo en el anillo E. Estas diferencias no pueden ser solucionadas por medio de espectrometría de masas. Por ello, se efectuó una comparación de los Tr de aceta-to de lupeol y del producto de acetilación de la mezcla de triterpenos, observándose que el compuesto incógnita era distinto al lupeol. Ya que no existe referencia alguna sobre la existencia de hopeol en la naturaleza, y por tanto no pudiendo contar con un

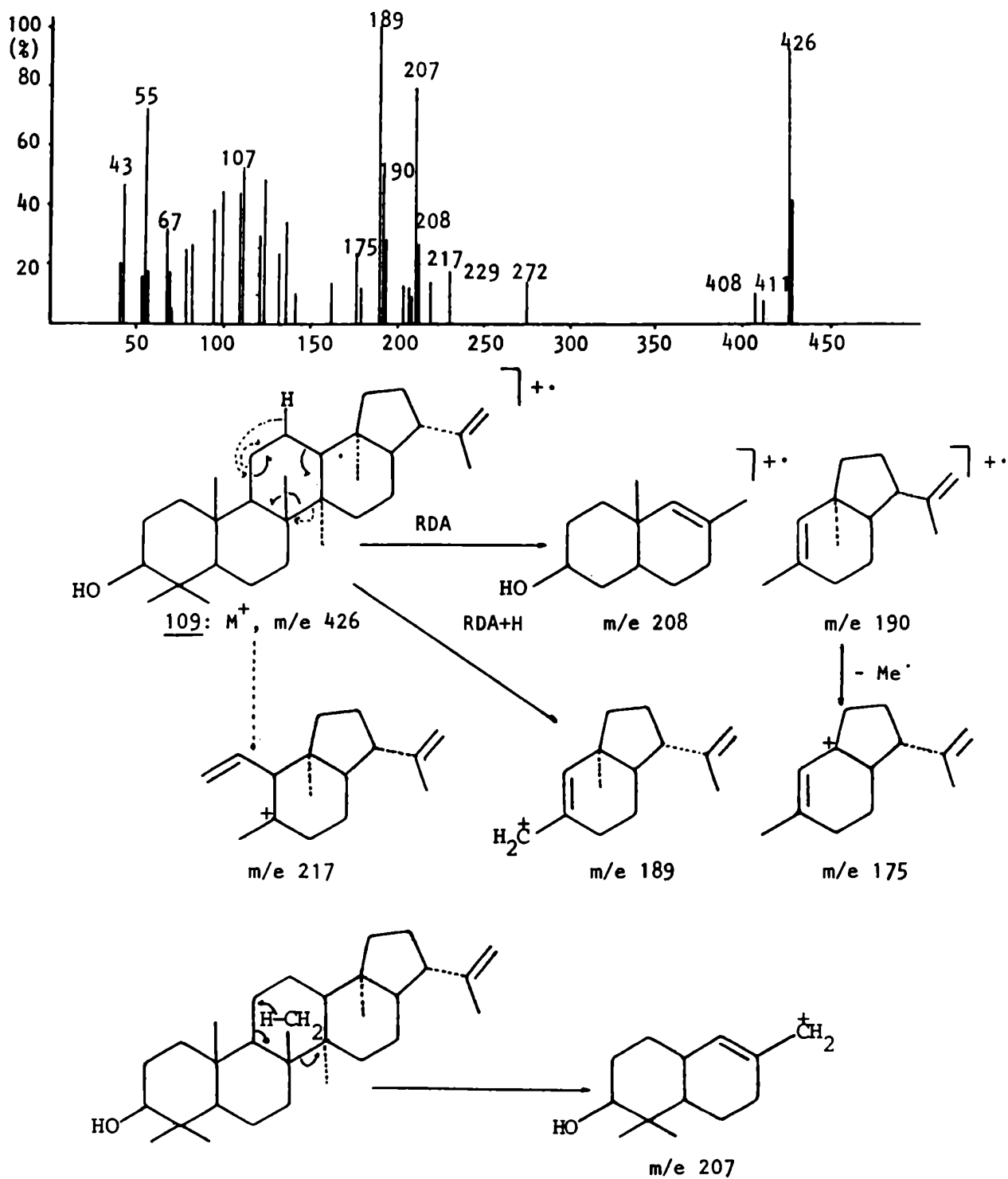


Figura 64: Espectro de masas y fragmentos principales de hopeol 109 .

testigo, se sugiere que la estructura del compuesto natural podría corresponder a la de hópeol 109, sujeta a confirmaciones posteriores.

Vale la pena mencionar que los arboranos y fernanos también poseen esqueletos similares a los mencionados, pero en estos no existe Me-8, lo cual cambia totalmente la masa del fragmento proveniente de los anillos A y B, y de esta manera varía el pico base que surge de la fragmentación tipo retro Diels-Alder en el anillo C ( Fig. 63 ).

### Esteroles

La fracción 4 dio por cristalizaciones sucesivas de metanol un compuesto homogéneo por cromatografía en capa delgada de sílicagel con  $R_f = 0,3$  ( $Cl_3CH$ , 2 desarrollos). Su estudio por C.G.L. ( Fig. 65 ) determinó que se trataba de una mezcla de varios componentes. El análisis de esta mezcla efectuado por C.G.L. - E.M. demostró que estaba compuesta por esteroides que

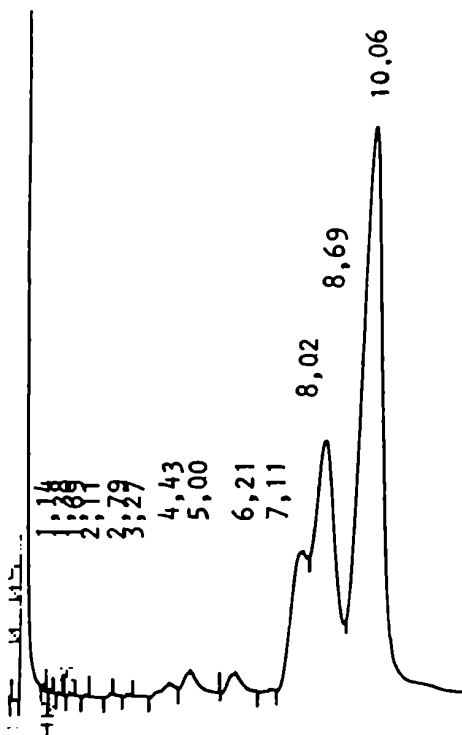


Figura 65: Cromatografía gas-líquido de los esteroides de *G. martiana*.  
OV-17 3%, 1,8 m a  $T = 260^{\circ}$ — $280^{\circ}C$ ,  $5^{\circ}C/min$  : 110: Tr 6,21; 111:  
Tr 8,02; 112: Tr 8,69 y 113:Tr 10,06 min.



presentaban iones moleculares a  $m/e$  386, 400, 412 y 414 ( Fig. 66-69 ).

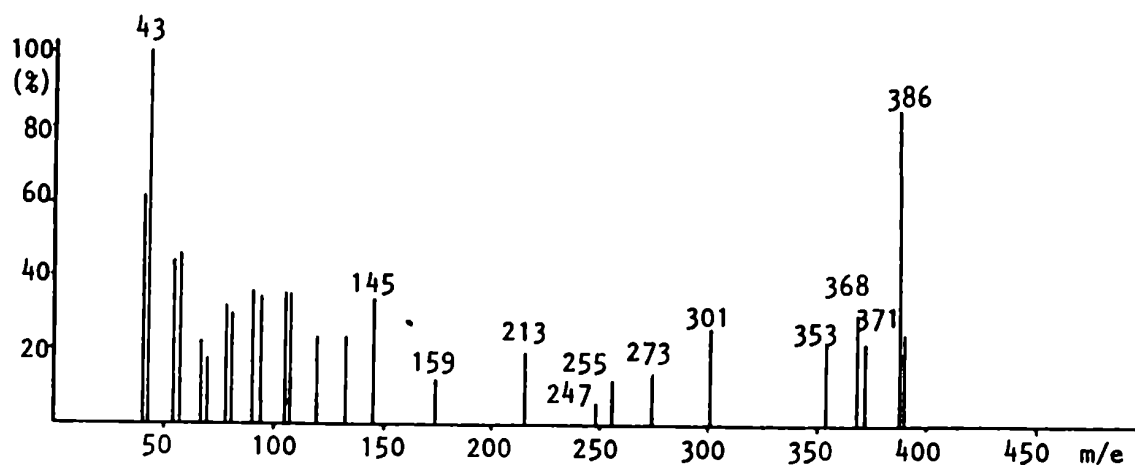


Figura 66: Espectro de masas de colesterol 110.

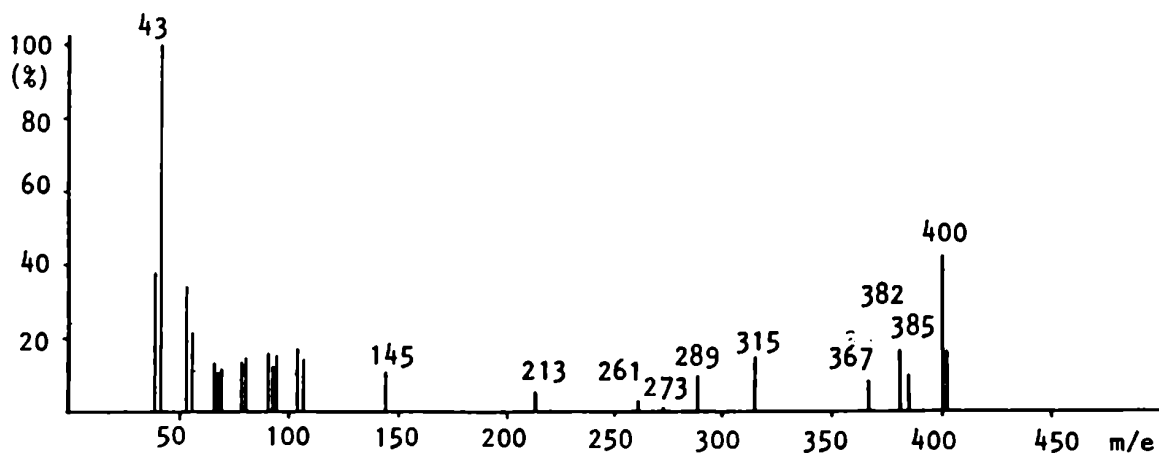


Figura 67: Espectro de masas de campesterol 111.

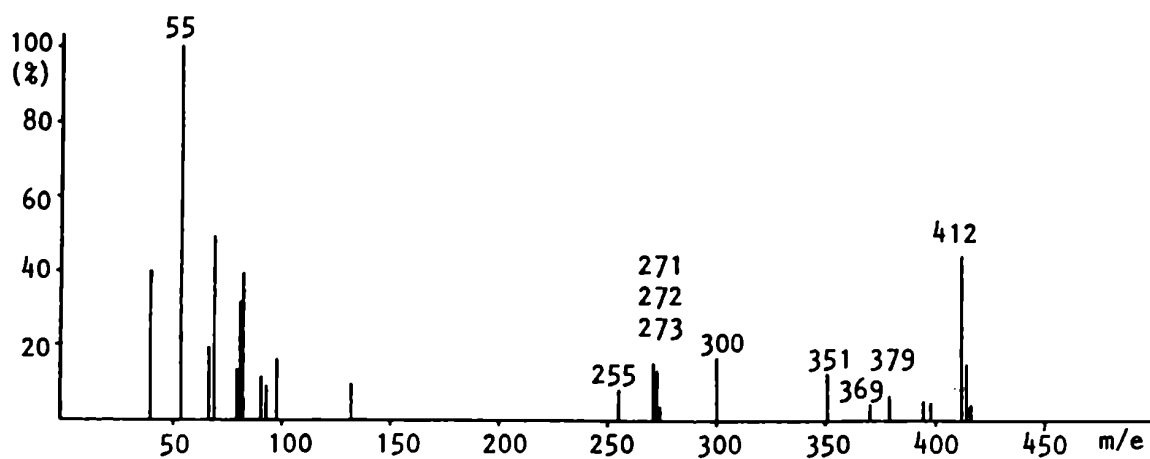


Figura 68: Espectro de masas de estigmasterol 112.

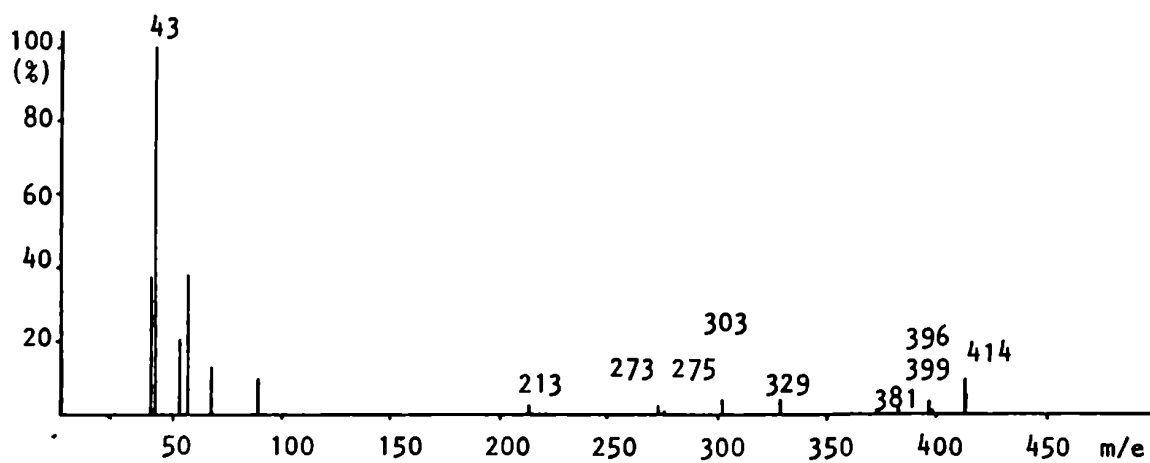


Figura 69: Espectro de masas de sitosterol 113.

En todos los casos se observaron las rupturas debidas a este tipo de sustancias, como pérdidas de  $H_2O$  y cadena lateral unida al C-17 del núcleo esteroidal <sup>238</sup>, así como los fragmentos M - 85 y M - 111 típicos de  $\Delta^5,3$ -hidroxiesteroides. La génesis de estos fragmentos fueron determinados por Budzikiewicz mediante experiencias con compuestos marcados con deuterio <sup>265</sup> ( Fig. 70 )

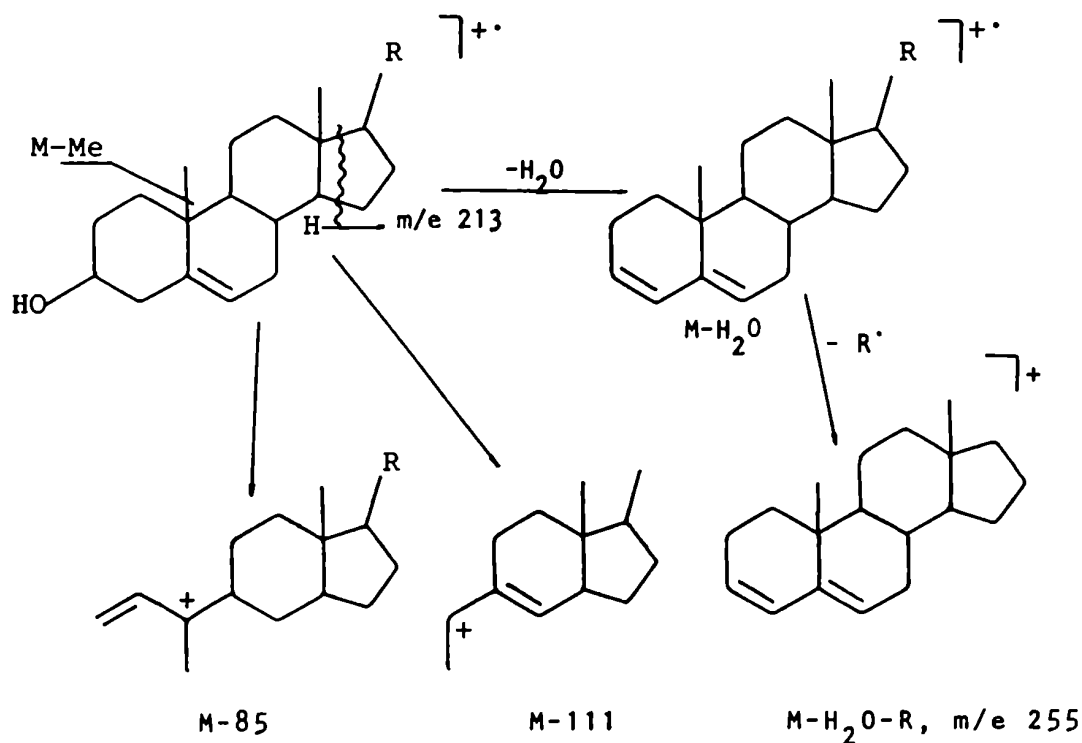
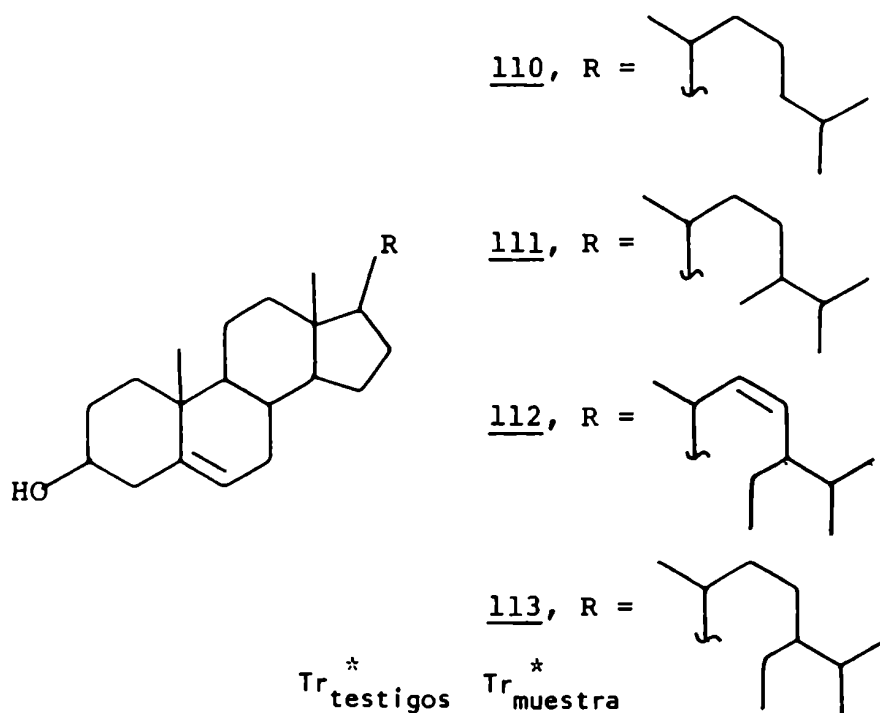


Figura 70: Asignación de los iones con valor diagnóstico en los espectros de masas de esteroides.

Finalmente, se comparó esta mezcla con una preparada artificialmente con testigos de esteroides ( Tabla 19 ) resultando los Tr coincidentes con los de colesterol 110, campesterol 111, estigmasterol 112 y sitosterol 113.

Tabla 19: Esteroles de *Gomphrena martiana*



	$Tr_{\text{testigos}}^*$	$Tr_{\text{muestra}}^*$
Colesterol <u>110</u>	1,00	1,00 ( 1,3 % )
Campesterol <u>111</u>	1,26	1,26 ( 10,3 % )
Estigmasterol <u>112</u>	1,34	1,34 ( 25,4 % )
Sitosterol <u>113</u>	1,52	1,51 ( 58,9 % )

\*  $Tr$  relativos al de colesterol : 8,90 min. SE-30 3 %, 270°C isotérmico.

### Flavonoides

#### Análisis estructural del flavonoide 114

El espectro U.V. de 114 mostraba absorciones a 312, 261 y 241 nm y no presentaba variaciones al agregar reactivos de desplazamiento, hecho que indicaba la ausencia de hidroxilos fenólicos. Su espectro de  $^1H$ -RMN ( Fig. 71 ) mostró cuatro singuletes a 3,87; 3,92; 3,97 y 4,02 ppm que integraban cada uno para 3 hidrógenos, manifestando la presencia de 4 metoxilos; un singulete a 6,77 ppm asignado a H-8 y dos multipletes centrados

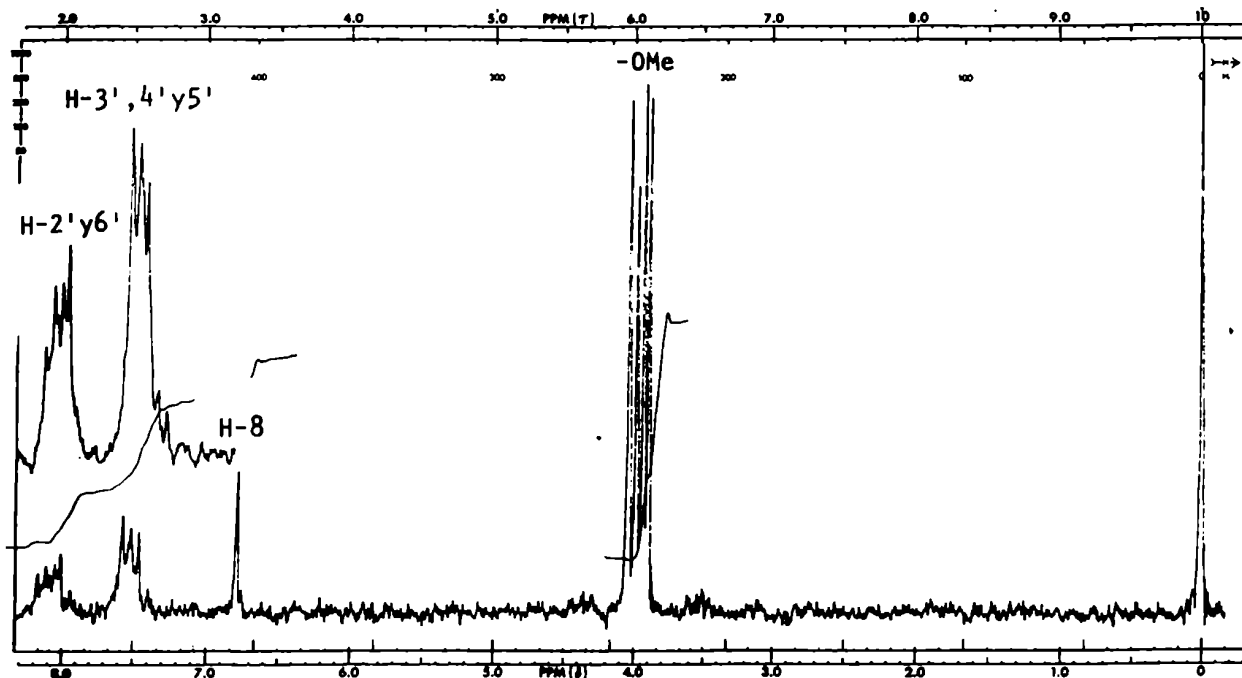


Figura 71: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 114, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ( 60 MHz ).

a 7,50 y 8,08 ppm que integraban para 3 y 2 hidrógenos respectivamente, que correspondían al anillo B sin sustituir. Al realizar el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{C}_6\text{D}_6$  ( Fig. 48 ) se observaron los metoxilos a 3,27; 3,78; 3,83 y 4,07 ppm. Comparando estos resultados con los del espectro obtenido en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  se puso de manifiesto que sólo uno de los metoxilos estaba fuertemente desplazado, es decir que sólo uno de ellos presentaba una posición *orto* libre. Por lo tanto, 3 de los metoxilos debían presentar un agrupamiento vecinal en el anillo A; el cuarto metoxilo debía estar unido al C-3.

Esto último se confirmó en el espectro de masas ( Fig. 72 ), que presentó un ión  $m/e$  210 correspondiente al anillo A sustituido por 3 metoxilos. Aparecía además, el ión molecular a  $m/e$  342 coincidente con una fórmula de  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$  y iones  $m/e$  105 y 77 provenientes del anillo B sin sustituir.

El compuesto 114 es idéntico al que se obtiene por metilación de 100. De esta manera se identificó como 3,5,6,7-tetrametoxiflavona, no aislada previamente.

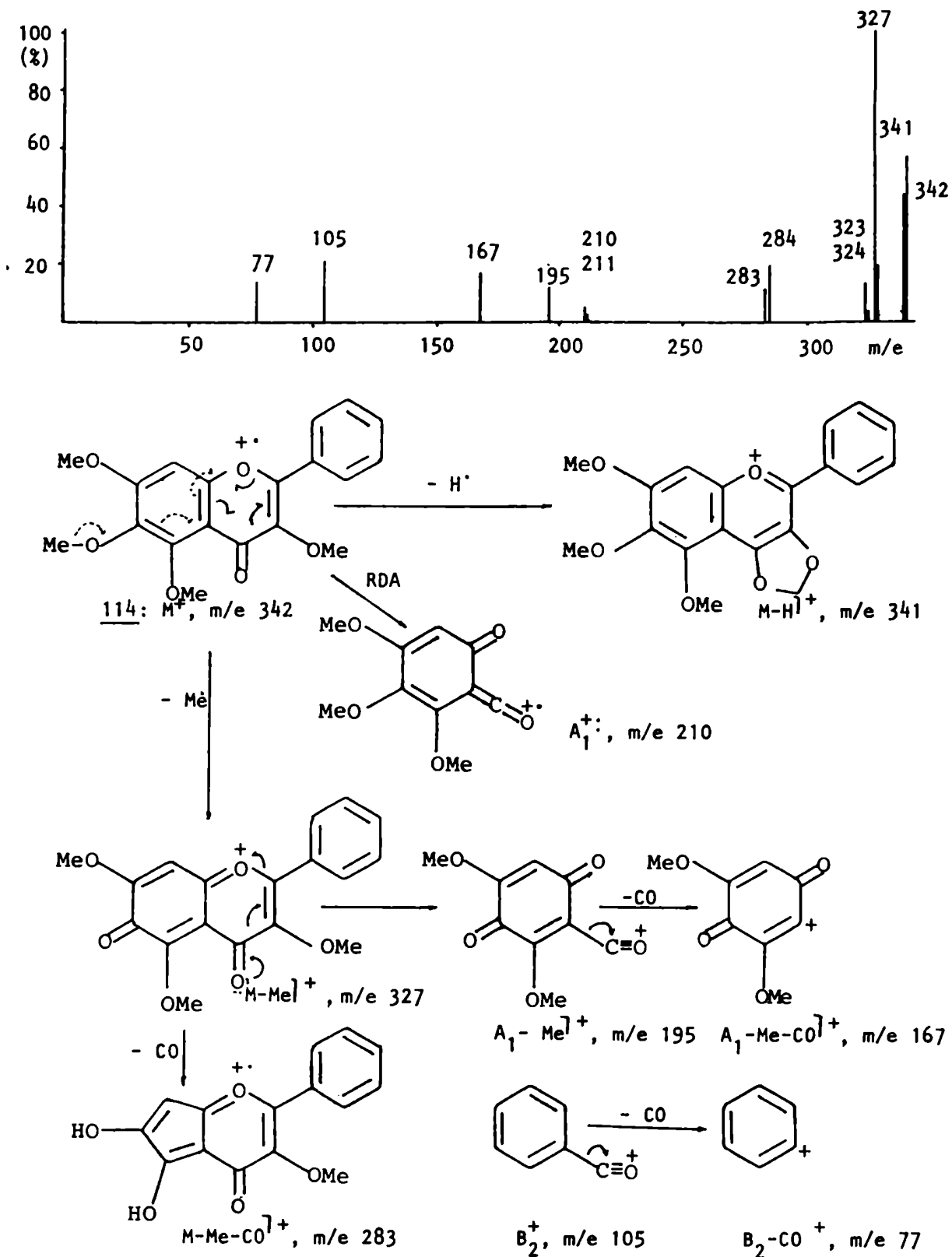


Figura 72: Espectro de masas y fragmentos principales de 3,5,6,7-tetrametoxiflavona 114.

### Análisis estructural del flavonoide 115

La fracción 7 estaba constituida por el flavonoide 104 que fue analizado previamente ( pág. 121 ) y el flavonoide mayoritario 115, que se obtuvo por recristalización directa de metanol de dicha fracción.

Este compuesto demostró ser fenólico y presentó en el espectro U.V. las siguientes bandas: 310, 264 y 242 ( h ) nm; no se observó desplazamiento con  $\text{AlCl}_3$  y sí un corrimiento batocrómico de 5 nm en la banda II al usar  $\text{NaAcO}$  como reactivo de desplazamiento, indicando la presencia de un hidroxilo en C-7 <sup>169</sup>.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( Fig. 73 ) en  $\text{Cl}_3\text{CH}$  evidenció la existencia de dos metoxilos ( singletes a 4,00 y 4,03 ppm ); 2 protones aromáticos con singletes a 6,67 y 6,93 ppm asignados a H-3 e H-8 respectivamente y señales del anillo B sin sustituir ( multipletes centrados a 7,50 y 7,90 ppm que integraban para 3 y 2 hidrógenos respectivamente).

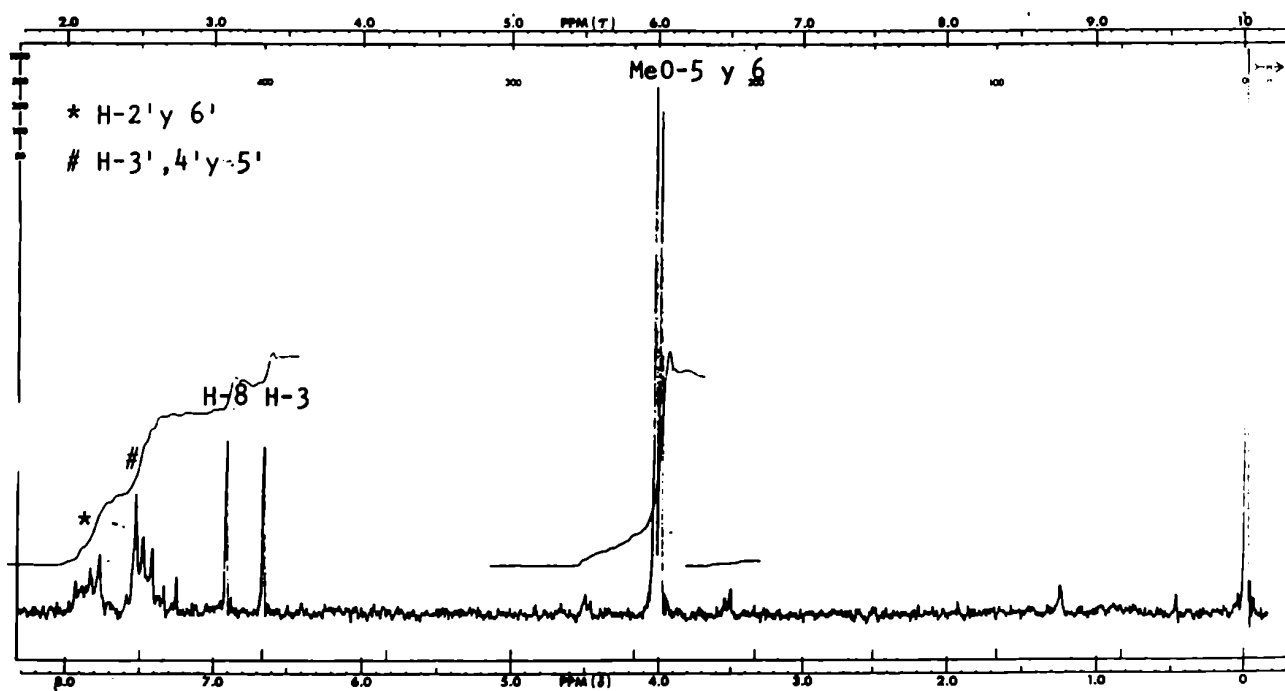


Figura 73: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 115, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ( 60 MHz ).

Su espectro de masas ( Fig. 74 ) mostró un ión molecular a  $m/e$  298 correspondiente a  $C_{17}H_{14}O_5$ , los iones a  $m/e$  181 y 153 correspondientes a A - Me y A - COMe respectivamente, que indicaban un anillo A con dos metoxilos y un hidroxilo. Los iones  $m/e$  105 y 77 confirmaban que el anillo B no estaba sustituido.

Para confirmar las asignaciones anteriores se registraron los espectros de  $^1H$ -RMN en presencia de  $Eu(fod)_3$ , que es un reactivo paramagnético que induce desplazamientos diferenciales para los distintos protones de un flavonoide ( pág. 72 ). Para ello se utilizaron diferentes relaciones molares de  $Eu(fod)_3$ /flavonoide y se graficaron los valores de desplazamiento observados en función de esas relaciones molares. De esta manera se obtuvieron rectas para cada señal y se calculó el valor de la pendiente " valor S " ( Fig. 75 ). Los valores obtenidos para los dos metoxilos estaban de acuerdo con su ubicación en las posiciones 5- y 6- (  $S = 14,0$  y  $8,8$  respectivamente ). Los hallados para H-3 (  $-1,1$  ) y H-8 (  $1,2$  ) confirmaron las asignaciones, ya que el  $Eu(fod)_3$  tiene la particularidad de proteger al H-3 y desproteger al H-8 <sup>179,182</sup>.

Del análisis de los espectros anteriores surgía como estructura probable para el flavonoide 115 la de 7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona. Debido a que la presencia de HO-7 y MeO-5 en una flavona 5,6,7-trisustituída resultaba fuera de lo común, se decidió confirmar la estructura por métodos químicos y espectroscópicos.

Así, al registrar el espectro de  $^1H$ -RMN en  $C_6D_6$  ( Fig. 76 ), uno de los metoxilos no resultó afectado mientras que el otro sólo lo fue parcialmente (  $\Delta\delta = 0,49$  ppm ). Este último valor es menor que el esperado para un metoxilo con una de las posiciones *orto* libre (  $\Delta\delta = 0,7$  ppm ) y es mayor que el correspondiente a un metoxilo flanqueado por dos metoxilos (  $\Delta\delta = 0,1$  ppm ). Por lo tanto, el metoxilo en cuestión debía ser adyacente a dos sustituyentes.

La presencia de un MeO-5 fue probada químicamente al demetilar 115 con  $AlCl_3$  en acetonitrilo <sup>249</sup> siendo el obtenido idéntico a 101. A su vez, el producto de permetilación es idéntico



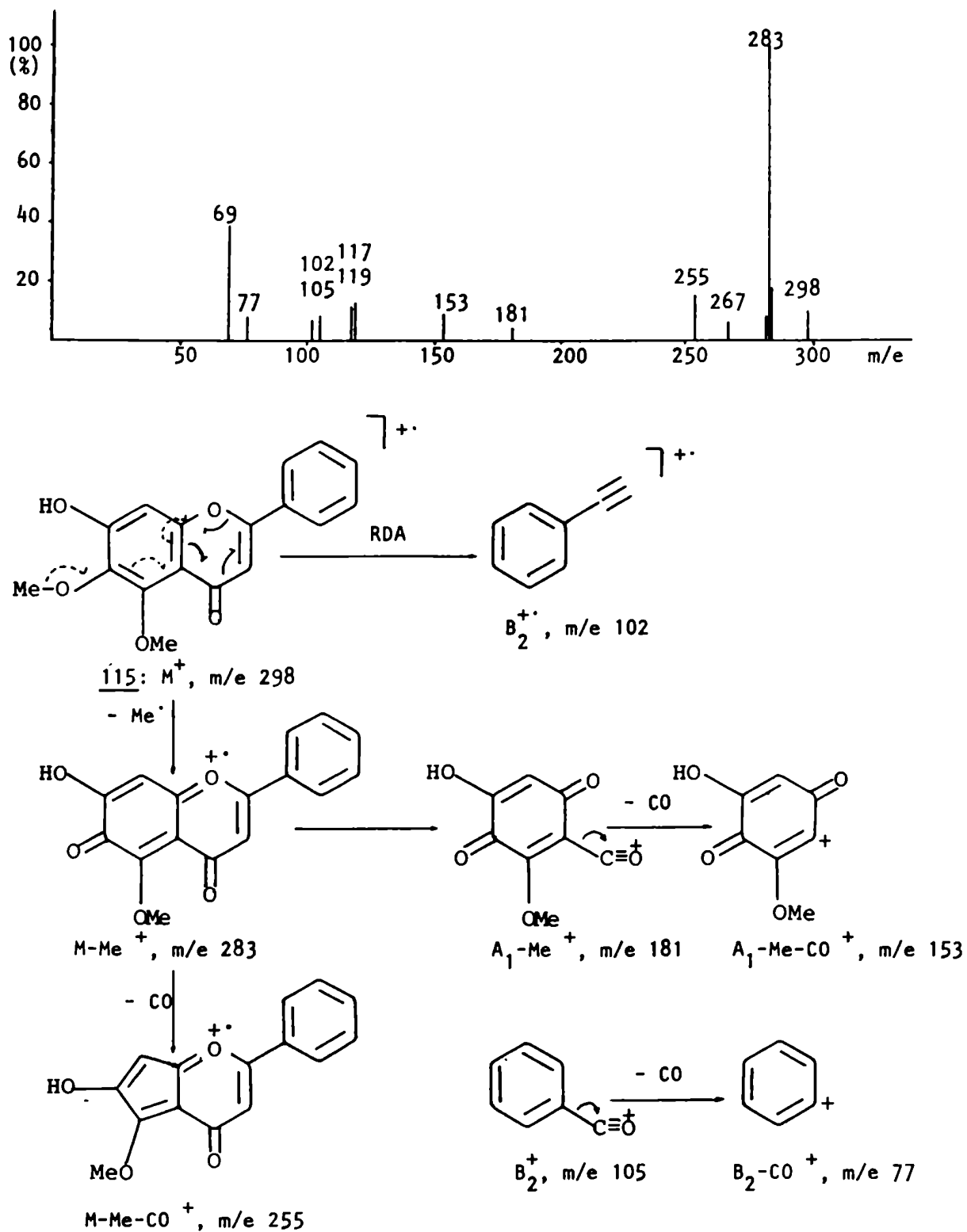
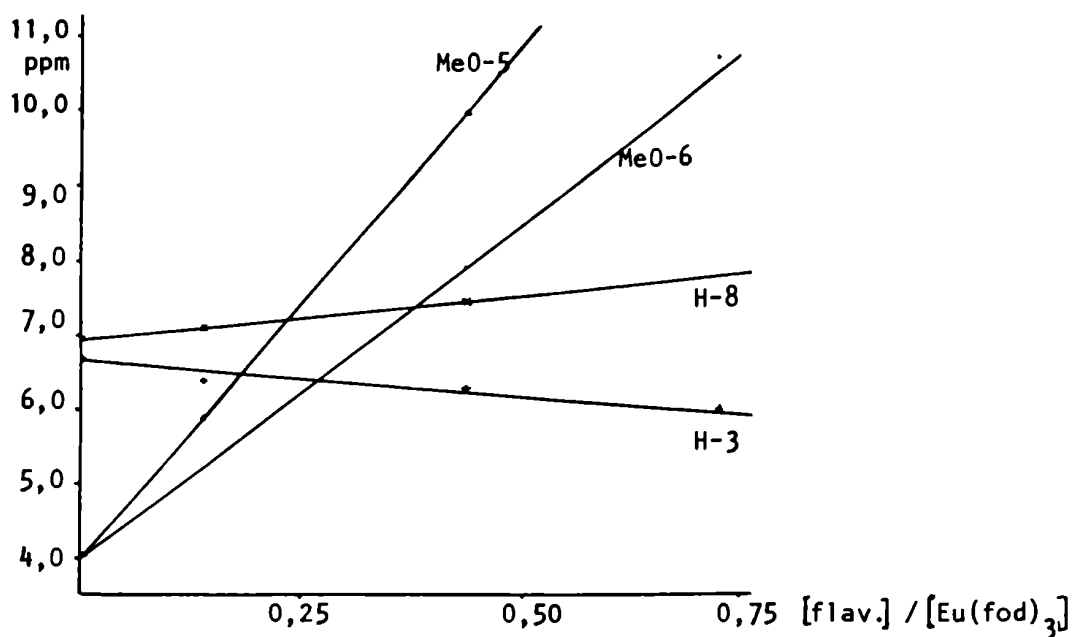
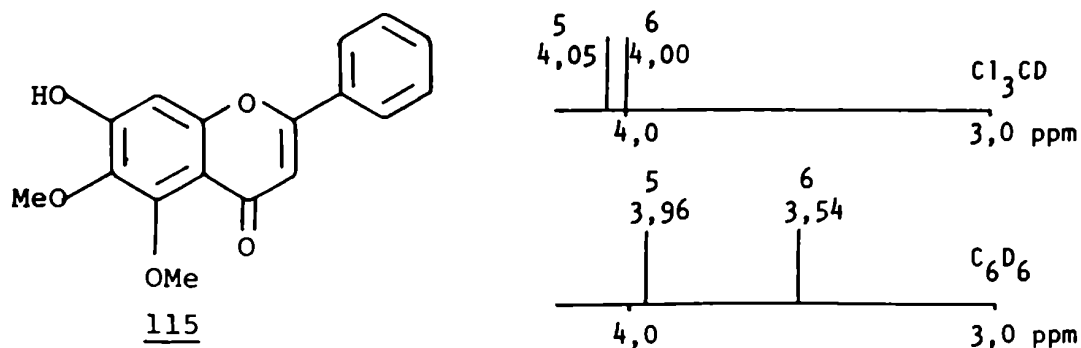


Figura 74: Espectro de masas y fragmentos principales de 7-hidroxi-5,6-dimetoxi flavona 115.



**Figura 75:** Gráfico de desplazamiento químico de los distintos hidrógenos de 7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona 115, en función de la relación de concentraciones molares de flavonoide a reactivo de desplazamiento paramagnético  $Eu(fod)_3$ .



**Figura 76:** Comportamiento de los grupos metoxilo en los espectros de  $^1H$ -RMN de 7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona 115 en  $Cl_3CD$  y  $C_6D_6$ .

al que se obtiene por permetilación de 101. El flavonoide 115 fue identificado como 7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona, que no fue aislado previamente de una fuente natural.

### 3.- ESTUDIO DEL RESIDUO 2

Una solución alcohólica del Residuo 2 se evaporó al vacío sobre poliamida y a continuación el sólido obtenido se percoló sucesivamente con cloroformo, agua y metanol.

#### Estudio estructural de los protoalcaloides 9 y 11

Como era conocido que las plantas pertenecientes a la familia *Amarantaceae* acumulaban protoalcaloides ( pág. 5 ) con nitrógeno cuaternario, se encaró la búsqueda de este tipo de compuestos. Para ello, el percolado acuoso se llevó a pH = 12 y se agregó una solución saturada de sal de Reinecke:  $(Cr(SCN)_4(NH_3)_2)NH_4$ . Esta sal compleja tiene la propiedad de formar sales insolubles con alcaloides en función de la basicidad de los mismos <sup>266</sup>. El precipitado obtenido por este tratamiento se filtró, disolvió en acetona y la solución resultante se pasó por una columna de intercambio, Amberlite IRA 400(HO<sup>-</sup>), obteniéndose el compuesto 11 en la forma de acetato luego de un fraccionamiento cromatográfico posterior.

Su espectro de <sup>1</sup>H-RMN ( Fig.77 ) mostró singuletes a 1,88 ppm para el metilo del acetato y a 3,18 ppm, 9 hidrógenos, correspondientes a tres metilos unidos a un nitrógeno cuaternario y también multipletes a 3,48 ppm, correspondiente a un metileno unido a un nitrógeno cuaternizado, y a 4,03 ppm para dos hidrógenos asignados a un metileno unido a oxígeno <sup>267</sup>. Se identificó a este compuesto como colina 11, confirmándose por comparación cromatográfica con una muestra auténtica. Se prepararon los picratos de 11 y de un testigo, y no se observó depresión en el punto de fusión mezcla.

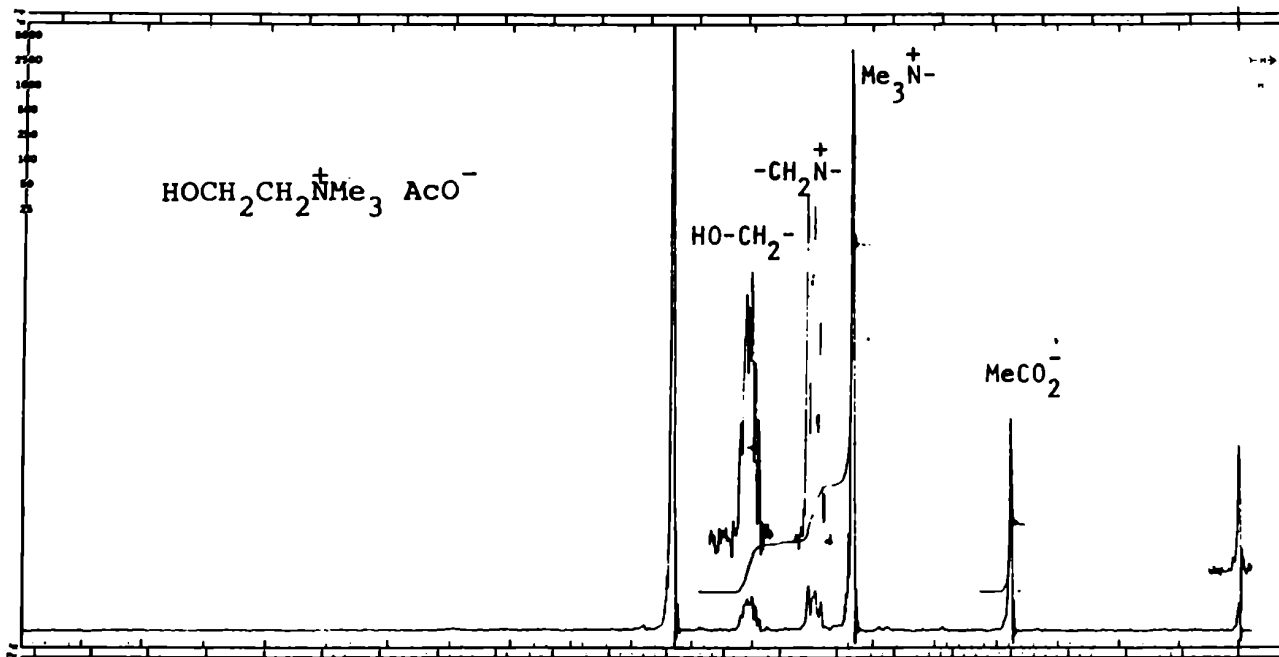


Figura 77: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 11, en  $\text{D}_2\text{O}$  ( 100 MHz ).

El filtrado a  $\text{pH} = 12$  se acidificó con  $\text{HCl}$  ( c ) hasta  $\text{pH} = 1$  y se repitió el tratamiento antes descrito aislándose 9.

Su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( Fig. 78 ) presentó dos singuletes para 9 y 2 hidrógenos a 3,24 y 3,85 ppm, correspondientes a 3 metilos y un metileno respectivamente, unidos a nitrógeno <sup>268</sup>

Su espectro de masas ( Fig. 79 ) mostró el ión molecular a  $m/e$  117 y pico base proveniente posiblemente del siguiente reordenamiento:



Este espectro y el comportamiento cromatográfico resultaron idénticos a los de una muestra auténtica de betaína 9.

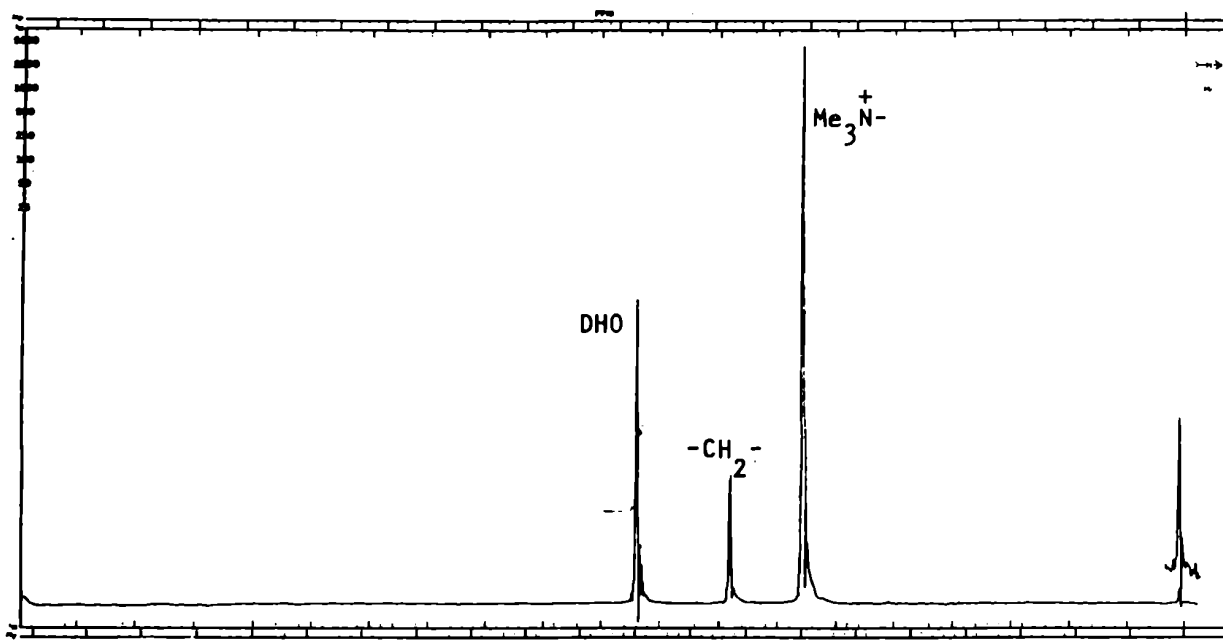


Figura 78: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 9, en  $\text{D}_2\text{O}$  ( 100 MHz ).

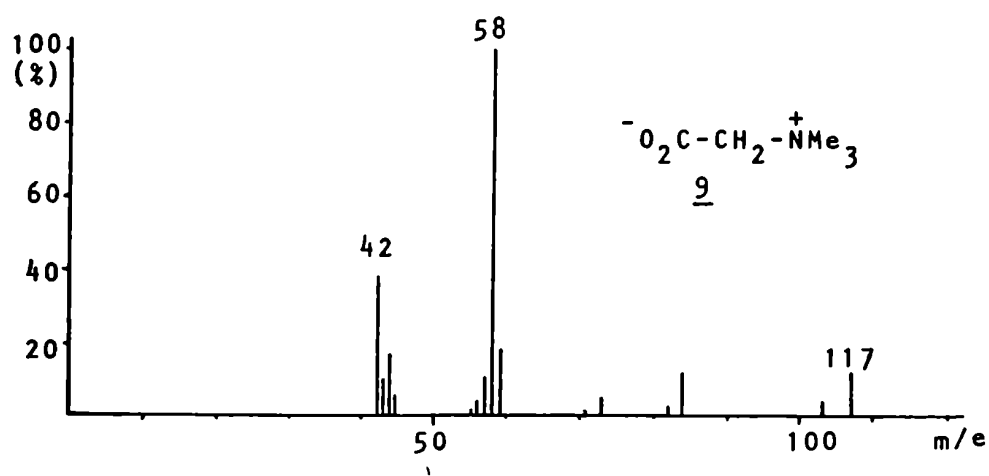


Figura 79: Espectro de masas de betaïne 9.

Análisis estructural del glicósido de flavonoide 116

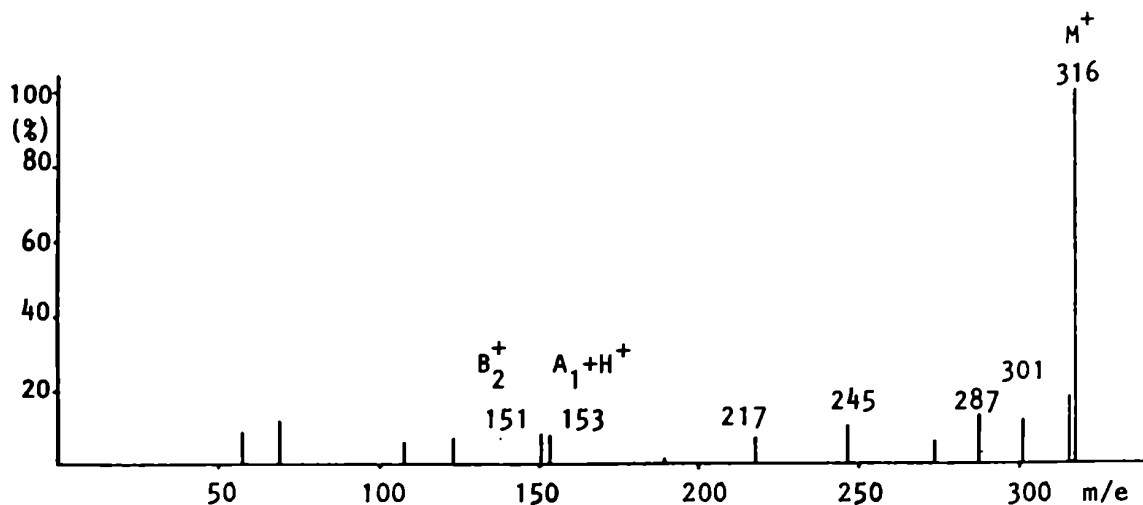
Por sucesivas cromatografías del percolado metanólico. ( parte experimental, pág. 214 ) se aisló el compuesto fenólico 116. Su espectro U.V. mostró absorciones a 356; 267,5 y 255 nm característicos de un flavonoide. La posición de la banda I indicó que se trataba de un flavonol sustituido en C-3. La presencia de 2 máximos en la banda II ( 267,5 y 255 nm ) estaba de acuerdo con un flavonoide sustituido en C-3' y C-4' <sup>169</sup>. Para comprobar si los sustituyentes de esas posiciones eran hidroxilos se efectuó el espectro U.V. en presencia de  $AlCl_3$  observándose un desplazamiento batocrómico de la banda I ( $\Delta\lambda_1 = 44$  nm ) que en presencia de HCl no se alteró. Este comportamiento demostró que no existía en la molécula un agrupamiento *o*-dihroxilo y que el responsable del desplazamiento debía ser una 5-hidroxi-flavona-3-O-sustituida <sup>169</sup> ( Tabla 20 ).

Tabla 20: Efecto de  $AlCl_3/HCl$  sobre la banda I en espectros U.V. de flavonoides.

Compuestos	$\Delta\lambda_1$
3,5-dihidroxi flavonas	50-60 nm
3-hidroxi flavonas	55-65 nm
5-hidroxi flavonas y 5-hidroxi flavonas-3-O- sustituidas	35-55 nm

En el espectro U.V. en presencia de NaMeO se observó un corrimiento batocrómico de 56 nm en la banda I sin disminuir su intensidad. Este valor era el esperado para un flavonoide con un hidroxilo unido a C-4'. En presencia de NaAcO se produjo un desplazamiento batocrómico de la banda II de 7 nm indicando la presencia de un hidroxilo unido a C-7.

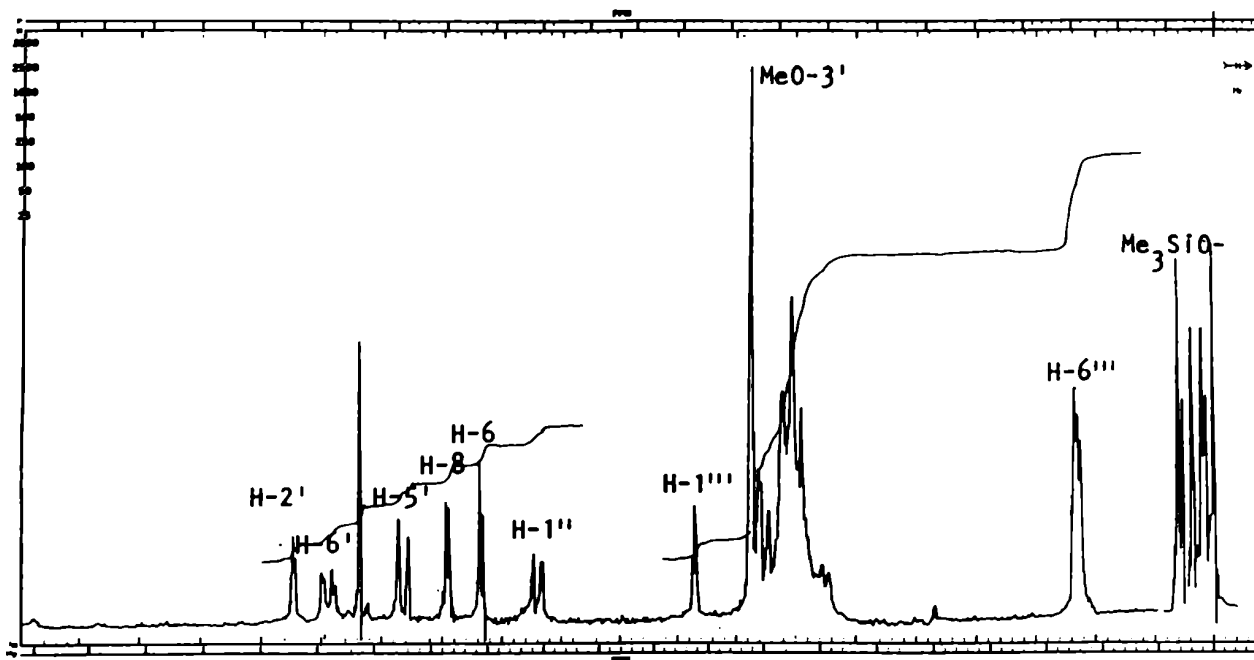
Por hidrólisis ácida se obtuvo isoramnetina 61 ( 3,5,7, 4'-tetrahidroxi-3'-metoxiflavona ), galactosa y ramnosa. La aglicona fue identificada en base a comparación cromatográfica y espectroscópica ( espectro de masas, Fig. 80 )



**Figura 80:** Espectro de masas de isoramnetina ( 3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxiflavona ).

El espectro de <sup>1</sup>H-RMN del derivado trimetilsililado de 116 ( Fig. 81 ) mostró en la zona aromática un sistema AMX correspondiente a los protones del anillo B del flavonoide con una sustitución 3',4'- que constaba de un doblete con  $J_{orto} = 8$  Hz a 6,76 ppm correspondiente a H-5', un doblete a 7,36 ppm con  $J_{meta} = 2$  Hz y  $J_{orto} = 8$  Hz correspondiente al H-6' y un doblete con  $J_{meta} = 2$  Hz a 7,83 ppm atribuible al H-2'. Se observaron también dos dobletes que integraban para un hidrógeno cada uno a 6,19 y 6,48 ppm con acoplamiento *meta* (  $J = 2$  Hz ) asignables a los H-6 e H-8 respectivamente, presentes en un anillo A 5,7-disustituido y un singulete a 3,88 ppm correspondiente a un metoxilo aromático. Con los resultados del análisis espectroscópico se pudo confirmar que la aglicona era isoramnetina.

Los azúcares del flavonoide 116 presentaban un multiplete a 1,18 ppm y un singulete ancho a 4,37 ppm correspondientes al metilo y al protón anomérico de ramnosa ( H<sub>1</sub>' ), así como



**Figura 81:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del derivado trimetilsililado de 116, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ( 100 MHz ).

un doblete a 5,71 ppm debido al hidrógeno anomérico de galactosa (  $\text{H}-1''$  ) con  $J = 7 \text{ Hz}$  .

Considerando que la señal correspondiente al  $\text{H}_1$  de la ramnosa mostraba una partición muy pequeña, esta sólo podía deberse a un acoplamiento *ecuatorial-ecuatorial*,  $J \sim 2 \text{ Hz}$ , lo cual era indicio de configuración  $\alpha$  en el C-1 de la ramnosa. En cambio, la partición presentada (  $J = 7 \text{ Hz}$  ) por el protón anomérico de la galactosa evidenciaba un acoplamiento *axial-axial* entre  $\text{H}_1'$  y  $\text{H}_2'$ , que sólo es posible para una configuración  $\beta$  .

Es factible distinguir la posición de unión del azúcar a la aglicona en base al valor de desplazamiento químico del protón anomérico. Así, en glucósidos de flavonoides se pudo determinar si el azúcar estaba unido a HO-3 o a HO-4', HO-5 e HO-7, ya que sólo en el primer caso se observó que la señal de  $\text{H}-1''$  aparecía a  $\delta > 5,8$  que en los restantes (  $\delta 5,0$  ). El valor obtenido en el espectro (  $\delta 5,71$  ) del compuesto 116 re



velaba que en el mismo la unión del azúcar con el flavonoide se efectuaba en HO-3.

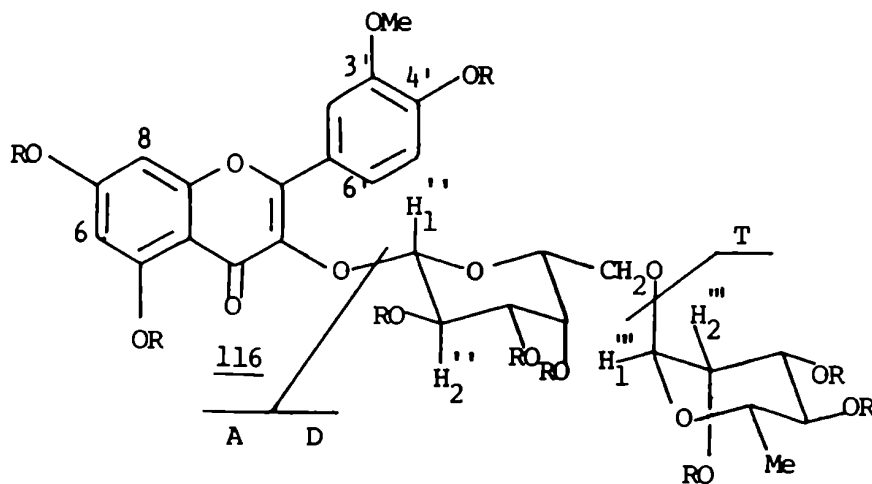
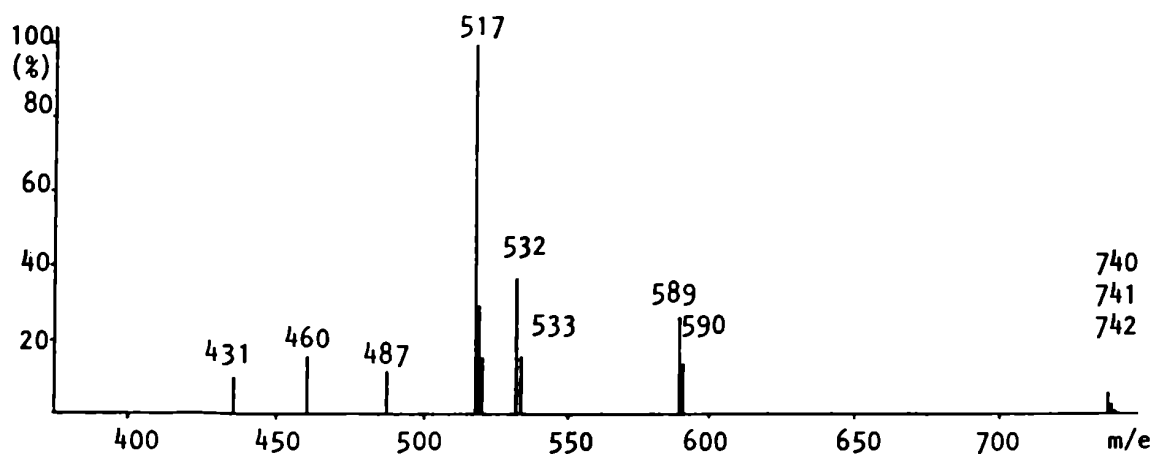
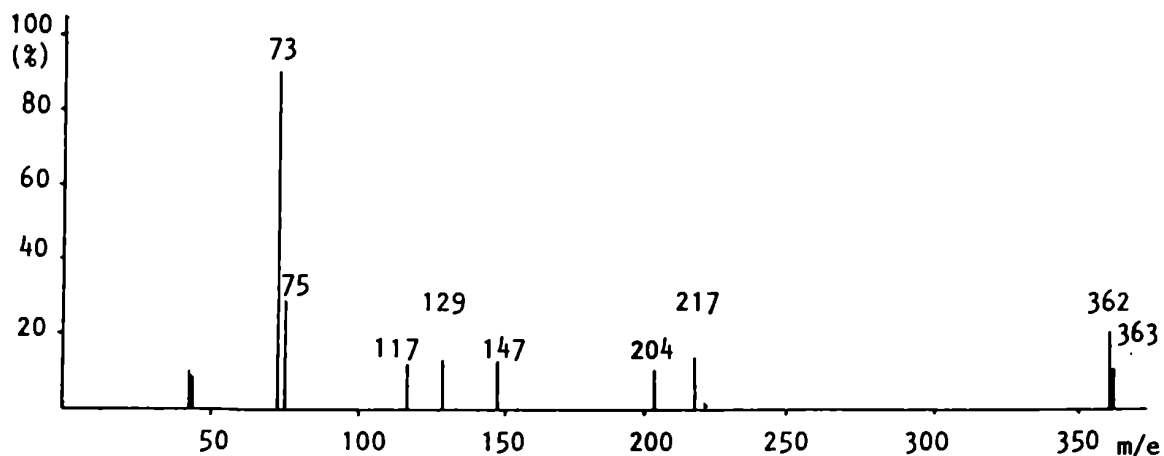
Las evidencias de los espectros U.V. ( existencia de HO-5,7 y 4' ) y  $^1\text{H}$ -RMN permitieron llegar a la conclusión de que ambos azúcares debían formar parte de un disacárido ( ramno galactósido ) unido al HO-3 del flavonoide.

Como el valor de desplazamiento químico del H-1 de ramnosa unida directamente a la aglicona estaba registrado como 5 ppm y no coincidía con el observado (4,37 ppm) era de esperar que este azúcar constituyera la unidad terminal del disacárido. Por otra parte, el hidrógeno anomérico de ramnosa de una rutinosa ( $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosido) se observa normalmente entre 4,2 y 4,4 ppm, en concordancia con el valor observado para el compuesto 116.

Para confirmar la presencia del ramnogalactósido y que la ramnosa era la unidad terminal del mismo, se analizó el espectro de masas del derivado trimetilsililado, pues en estos casos los compuestos se fragmentan en las unidades constituyentes del glicósido. En el caso de biósidos de flavonoles es posible deducir la secuencia de unión porque el azúcar terminal produce un fragmento T - H intenso acompañado de T - ROH ( R =  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$  ). En este caso se observó en el espectro de masas ( Fig.82 ) un fragmento a m/e 362 ( 21 % ) correspondiente a ramnosa terminal y también otro fragmento de menor intensidad a m/e 740 ( 4,6 % ) debido al disacárido ( D - H ). En la figura 82 se pueden observar también las rupturas que sufre el derivado trimetilsililado del glicósido del flavonol en estudio.

Los iones A + H y A + H - Me provenientes de la aglicona se observaron a m/e 532 ( 47,2 % ) y 517 ( 100 % ) .

Se confirmó así que se trataba de un 3-O-ramnogalactósido de isoramnetina. Para establecer la naturaleza de la unión interglicosídica se analizó el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN ( Fig. 83 ). Para ello, se comparó la zona de las señales de los carbonos de los azúcares con los correspondientes de glicósidos conocidos ( Tabla 21 ). Se observó así, que las señales correspondientes a ramnosa coincidían con las de este azúcar en rutinosa. Por compara-



T-H, m/e 362

T, m/e 363

A+H-TMS+H, m/e 460

A+H-Me, m/e 517

A+H, m/e 532

A+TMS-Me, m/e 589

D-H, m/e 740

D, m/e 741

R = TMS

Figura. 82: Espectro de masas y fragmentos principales de isoramnetina-3-O-robiniósido 116 ( derivado trimetilsililado ).

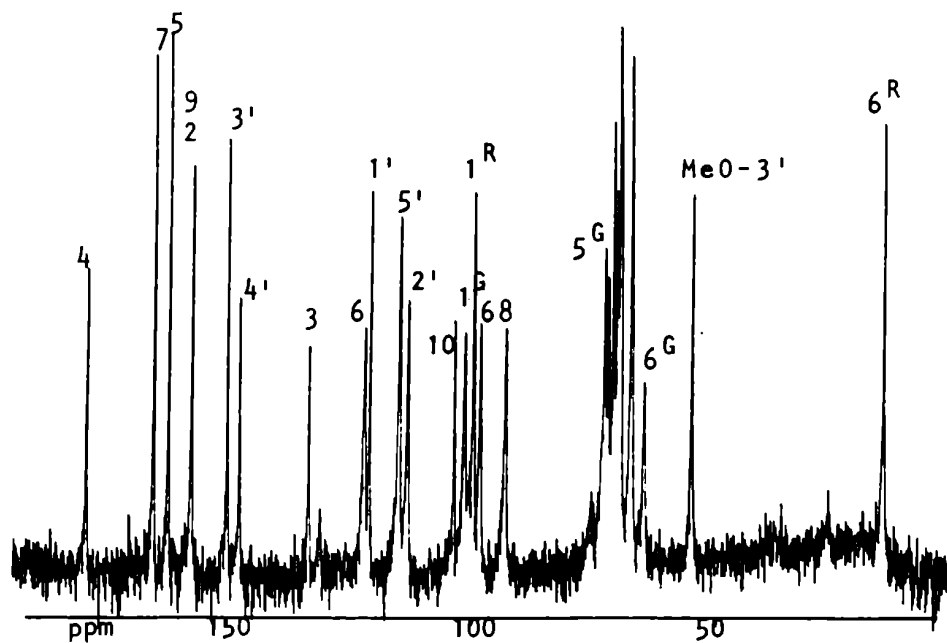


Figura 83: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 116, en  $\text{DMSO-d}_6$  ( 20,0 MHz ).

Tabla 21: Desplazamiento químico (  $\delta$  ) de los carbonos de azúcares en glicósidos de flavonoides  $^{269,191}\text{C}$ .

	C-1 <sup>G</sup>	C-2 <sup>G</sup>	C-3 <sup>G</sup>	C-4 <sup>G</sup>	C-5 <sup>G</sup>	C-6 <sup>G</sup>	C-1 <sup>R</sup>	C-2 <sup>R</sup>	C-3 <sup>R</sup>	C-4 <sup>R</sup>	C-5 <sup>R</sup>	C-6 <sup>R</sup>
Isoramnetina-3-0-rutinósido							100,8	70,4	70,8	72,1	68,2	17,6
Isoramnetina-3-0-galactósido	102,0	71,5	73,4	68,1	75,9	60,4						
Robinina *	102,0	71,3	73,2 <sup>#</sup>	68,4	73,8 <sup>#</sup>	65,6	100,1	70,5 <sup>#</sup>	70,7 <sup>#</sup>	72,1	68,4	18,1
Flavonoide <u>116</u>	101,9	71,2	73,1 <sup>#</sup>	68,3	73,7 <sup>#</sup>	65,6	100,2	70,4 <sup>#</sup>	70,7 <sup>#</sup>	72,0	68,3	17,8

\* Canferol-3-0-robinobiósido-7-0-ramnósido ( se dan los valores correspondientes a la unidad 3-0-robinobiósido ).

<sup>#</sup> Los valores pueden intercambiarse.

G galactosa.

R ramnosa.

ción de las señales correspondientes a galactosa en 116 con las de esa unidad en isoramnetina-3-O-galactósido, se verificó que existe un comportamiento diferente en los C-6 y C-5 que son fácilmente distinguibles por aparecer a mayor y menor campo respectivamente dentro de la zona de los carbonos de los azúcares, excluidos los anoméricos.

Era conocido que la glicosidación de hidroxilos de azúcar producía un desplazamiento a campos menores en la resonancia del carbono portador del hidroxilo <sup>270</sup>. Por ejemplo, en rutinósidos ( ramñósil-(1→6)-glucósidos ) se encontró que la señal correspondiente al C-6 aparecía a 4,5 - 5,2 ppm a campos más bajos con respecto al de glucosa y que el C-5 sufría un desplazamiento a campos altos en aproximadamente 1,4 ppm. En nuestro caso, el C-6'' presentaba un importante desplazamiento a campos bajos en 5,2 ppm y el C-5'' se desplazaba a campos más altos en 2,2 ppm. Esto indicaba claramente que la ramnosa glicosidaba al hidroxilo de C-6 de galactosa ( C-6'' ) o sea que el disacárido era robinobiosa. Efectivamente, las señales coincidían con las de un robinobiósido natural ( Tabla 21 ).

En cuanto al tamaño del anillo y la configuración del C-1 de los azúcares, se había determinado anteriormente que los metil glicofuranósidos y los metil glicopiranosidos eran fácilmente distinguibles por medio de sus espectros de <sup>13</sup>C-RMN <sup>271,272</sup>. La comparación de los datos de la tabla 21 con los de la tabla 22 permitió establecer que ambos azúcares se encontraban como piranosas. Teniendo en cuenta que los carbonos anoméricos de los aril glicósidos estaban aproximadamente 2 ppm más protegidos que los de metil glicósidos <sup>273</sup> y que los valores de desplazamiento químico del compuesto 116 coincidían con los de literatura, se pudo afirmar que ambos azúcares estaban en la forma piranósica y que la configuración de ambos era la natural, es decir β para galactosa y α para ramnosa, hecho confirmado previamente por medio de espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN. Una confirmación adicional de estas configuraciones se obtuvo por la aplicación de la regla de Klyne <sup>274</sup> a este glicósido. Esta regla consiste en considerar que la rotación molecular de un compuesto es la sumatoria de las

Tabla 22: Desplazamiento químico ( $\delta_C$ ) de los carbonos de azúcares de metil glicósidos <sup>271,272</sup>.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
metil- $\beta$ -D-glucopiranosido	104,3	74,2	76,9	70,8	76,9	61,9
metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido	100,3	72,5	74,2	70,6	72,7	61,7
metil- $\alpha$ -D-galactopiranosido	100,5	69,4	70,6	70,4	71,8	62,3
metil- $\beta$ -D-galactopiranosido	104,9	71,8	73,9	69,8	76,2	62,1
metil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido	101,9	71,0	71,3	73,1	69,4	17,7
metil- $\alpha$ -D-galactofuranosido	103,1	77,4	75,5	82,3	75,7	63,4
metil- $\beta$ -D-galactofuranosido	109,2	81,9	77,8	84,0	72,0	63,9

rotaciones moleculares de cada uno de los constituyentes del mismo. Teniendo en cuenta que las rotaciones moleculares de los metil glicósidos de  $\alpha$ - y  $\beta$ -L-ramnopiranososa, así como los de  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-galactopiranososa son las indicadas en la tabla 23 y que el glicósido 116 posee una rotación molecular de  $-150 \pm 9^\circ$ , al aplicar la regla mencionada a las distintas combinaciones ( tabla 24 surge que el valor experimental se aproxima al obtenido para una unidad  $\alpha$ -L-ramnopiranososa combinada con una unidad de  $\beta$ -D-galactopiranososa.

Tabla 23: Rotaciones moleculares de metil glicósidos ( $M_D$ ).

metil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido	-111 °
metil- $\beta$ -L-ramnopiranosido	+170 °
metil- $\alpha$ -D-galactopiranosido	+374 °
metil- $\beta$ -D-galactopiranosido	-0,8 °

$$M_D = \frac{\alpha_D \cdot PM}{100}$$

Tabla 24: Cálculo de rotaciones moleculares para distintas configuraciones de robinobiosidos.

$$\begin{aligned} \text{metil-}\alpha\text{-L-ramnopiranosido} + \text{metil-}\alpha\text{-D-galactopiranosido} &= 263^\circ \\ \text{metil-}\alpha\text{-L-ramnopiranosido} + \text{metil-}\beta\text{-D-galactopiranosido} &= -111,8^\circ \\ \text{metil-}\beta\text{-L-ramnopiranosido} + \text{metil-}\alpha\text{-D-galactopiranosido} &= 544^\circ \\ \text{metil-}\beta\text{-L-ramnopiranosido} + \text{metil-}\beta\text{-D-galactopiranosido} &= 169^\circ \\ \text{isoramnetina} &= 0 \end{aligned}$$

El desplazamiento químico de los carbonos del núcleo flavonoide se asignaron según datos de literatura ( Tabla 25 ).

En base a lo discutido, se identificó al flavonoide 116 como isoramnetina-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido ( Fig. 82 ).

Debe acotarse que se habían descripto anteriormente ramnogalactósidos de isoramnetina <sup>275-279</sup>, pero sin establecer con certeza la naturaleza del biosido.

**Tabla 25:** Desplazamiento químico ( $\delta_c$ ) de los carbonos de Flavonoides, comparación con los datos obtenidos para el flavonoide 116.

	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
Quercetina	146,9	135,5	175,8	160,7	98,2	163,9	93,3	156,2	103,1	122,1	115,3 <sup>a</sup>	145,0	147,6	115,6 <sup>a</sup>	120,0
Quercetina-3-0-galactósido	156,3	133,8	177,5	161,2	98,6	164,0	93,4	156,3	104,0	121,3	115,2 <sup>a</sup>	144,7	148,3	116,2 <sup>a</sup>	121,8
Isoramnetina-3-0-galactósido	156,2 <sup>a</sup>	133,4	177,5	161,3	98,8	164,2	93,7	156,4 <sup>a</sup>	104,2	121,2 <sup>b</sup>	113,9 <sup>c</sup>	149,5	147,1	115,3 <sup>c</sup>	122,1 <sup>b</sup>
Isoramnetina-3-0-rutinósido	156,2 <sup>a</sup>	133,3	177,3	161,2	98,7	164,0	93,7	156,4 <sup>a</sup>	104,1	121,2 <sup>b</sup>	113,9 <sup>c</sup>	149,5	147,0	115,3 <sup>c</sup>	122,4 <sup>b</sup>
Flavonoide <u>116</u>	156,5 <sup>a</sup>	133,2	177,4	161,2	98,8	164,1	93,8	156,5 <sup>a</sup>	104,1	121,1 <sup>b</sup>	113,6 <sup>c</sup>	149,4	147,0	115,2 <sup>c</sup>	122,1 <sup>b</sup>

$a, b$  y  $c$  Los valores pueden intercambiarse.

Los valores se expresan en ppm respecto de TMS.

COMPARACION Y CORRELACION DE LOS DATOS ESPECTROSCOPICOS DE  
FLAVONAS 5,6,7-TRISUSTITUIDAS

Debido a que la planta *Gomphrena martiana* resultaba una fuente importante de flavonas 5,6,7-trisustituidas, cuya distribución en la naturaleza es poco frecuente, resultaba sumamente interesante efectuar un estudio comparativo de los resultados aquí obtenidos por espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ ) que permitiera fijar pautas de correlación en este tipo de compuestos y facilitara su rápida identificación estructural en otros casos.

Análisis comparativo de los espectros de masas de flavonas 5,6,7-trisustituidas

De acuerdo a lo discutido en el Capítulo 3 (pág. 46) las flavonas y los flavonoles presentan espectros de masas caracterizados por fragmentaciones provenientes de una reacción tipo retro Diels-Alder (RDA) en el anillo C, dando lugar a los iones  $\text{A}_1^+$  y  $\text{B}_1^+$ ; observándose también el ión  $\text{B}_2^+$  indicativo de la sustitución del anillo B.

Las flavonas o 3-metoxiflavonas se fragmentan en forma análoga a la mencionada, dando lugar a espectros de masas con los iones indicados, pero observándose ahora una pérdida adicional debida al sustituyente unido a C-6. Así, si este es un MeO-, se observan M - Me, A - Me, M - CO - Me, A - CO - Me y si es un HO-6 se observan las correspondientes pérdidas de hidrógeno.

Los datos de los espectros de masas de las flavonas estudiadas se consignan en la tabla 26. Puede observarse que el pico base en estos compuestos varía según características estructurales definidas. Así, por ejemplo, en los compuestos 100 y 101 el pico base coincide con el  $\text{M}^+$ . Considerando que 5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavonas  $^{160}$  tienen ese mismo comportamiento y que los compuestos 100 y 101 poseen HO-5 y MeO-6 pero HO-7, el requerimiento estructural para que el ión molecular sea pico base es que



Tabla 26: Espectros de masas de flavonas y 3-metoxiflavonas 5,6,7-trisustituidas

	M	M-1	M-15	M-18	M-19	A <sub>1</sub> +H	A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> -Me	A <sub>1</sub> -COMe	B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> -CO	B <sub>1</sub>	m/e
3,5-dimetoxi-6,7-metilen- dioxiflavona <u>98</u>	96,3	100,0	7,6	8,6	29,3	8,4	30,4	8,2	4,8	35,6	45,7		69
5-hidroxi-3-metoxi-6,7- metilendioxflavona <u>99</u>	92,3	100,0	2,8	15,3	14,1	12,2	19,3			54,1	46,8		14,2
5,7-dihidroxi-3,6-dime- toxi- <u>100</u>	100,0	43,1	41,7	28,1	17,1	3,0		6,1	5,7	20,9	13,4		27,2
3,5,6,7-tetrametoxi- flavona <u>114</u>	56,7	46,1	100,0	3,5	14,8	3,3	4,7	11,9	18,6	20,9	12,8		8,1
3,5,7-trimetoxifla- vona <u>104</u>	85,3	100,0	6,7	8,3	37,0	7,7	5,1	2,3	6,9	26,1	26,9		3,0
5,7-dihidroxi-6-me- toxi- <u>101</u>	100,0	7,0	68,0	47,0	3,0			12,1	27,0	4,2	15,1	9,4	91,0
7-hidroxi-5,6-dime- toxi- <u>115</u>	9,2		100,0					4,1	8,4	8,8	8,1	5,8	38,6
5,6,7-trimetoxifla- vona <u>102</u>	24,9	2,4	100,0					2,3	11,9	2,9	3,4	2,4	8,9

Los valores indicados en la tabla son relativos al pico base.

en la molécula exista HO-5 y MeO-6.

Por otra parte, se observa que el pico base es M-1 en los compuestos 98, 99 y 104, los cuales poseen MeO-3 y el sustituyente de C-6 puede estar ausente o su pérdida no estar favorecida, como en el caso del metilendioxi. Aparentemente la naturaleza del sustituyente de C-5 no influye.

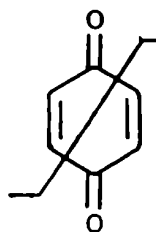
Los compuestos 114, 115 y 102 tienen como pico base el ión M-Me proveniente de la pérdida de Me del MeO-6; estos compuestos tienen dos metoxilos unidos a los C-5 y C-6 que favorecen esta ruptura. Evidentemente la presencia del MeO-5 no permite la formación de puente de hidrógeno que normalmente existe entre HO-5 y el oxígeno carbonílico, y por ende, estabiliza la estructura de resonancia tipo quinona a ( pág. 50 ).

Vale la pena analizar los fragmentos M-H<sub>2</sub>O y M-H<sub>3</sub>O. Si bien la génesis del fragmento M-H<sub>2</sub>O es desconocida y este se observa en moléculas que no poseen hidroxilos fenólicos, como por ejemplo el compuesto 104, se nota en la tabla 26 que dicho ión es de relativa importancia ( 15 - 50 % ) en flavonoides con HO-5, el cual parece ser el requerimiento estructural más importante. Como se mencionó en el capítulo 3 ( pág. 52 ), M-H<sub>3</sub>O puede ser útil como diagnóstico en el caso de 3,5-dimetoxiflavonas, y de hecho, en la tabla 26 se manifiesta que los compuestos que poseen esos sustituyentes presentan M-H<sub>3</sub>O con mayor abundancia que los restantes ( 30-40 % ). Sin embargo, también aquellos con MeO-3 e HO-5 presentan M-H<sub>3</sub>O, aproximadamente 15 %, con cierta abundancia.

De todos los restantes datos de la tabla 26, es particularmente llamativa la abundancia relativa destacada ( 91 % ) del ión m/e 69 en el compuesto 101. Debido a que no es común observar picos intensos en la zona de masas bajas en un espectro de masas de un flavonoide y a que no se conocían datos de literatura sobre su génesis, aunque se había informado su aparición en determinados compuestos <sup>280</sup> similares, resultó interesante estudiar el origen del mismo.

En principio, se supuso que este ión podía provenir de

una ruptura posterior del ión tipo quinona formado a partir del anillo A luego de la reacción retro Diels-Alder y subsiguientes pérdidas de metilo y monóxido de carbono. Es sabido que las quinonas presentan como fragmentación característica, la ruptura entre los C-1/C-2 y C-4/C-5 <sup>158</sup>.



En el caso de flavonoides, este tipo de fragmentación daría lugar a los fragmentos indicados en la figura 84.

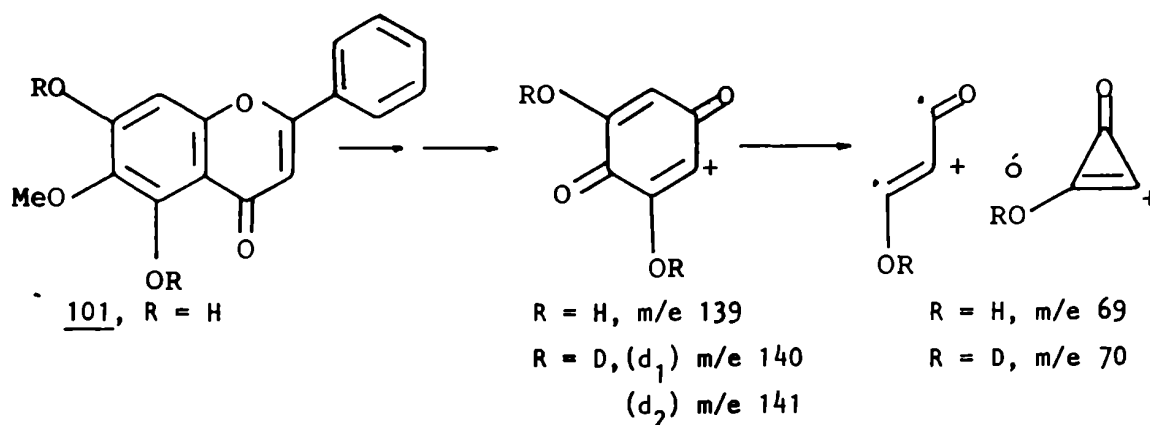


Figura 84: Posible origen del ión m/e 69.

Una manera de probar si esta fragmentación era responsable de la génesis del ión m/e 69 era intercambiar los hidrógenos fenólicos por deuterio. De esta manera, si se transformaba HO-5 en DO-5 debería observarse en el espectro de masas la aparición de un ión con m/e 70. En la tabla 27 se ven las abundancias de los iones del compuesto 101 y del enriquecido con deute-

rio y en la tabla 28 la composición isotópica de cada fragmento.

Tabla 27: Abundancias relativas de los iones presentes en el espectro de masas del compuesto 101 y de su análogo deuterado.

m/e	<u>101</u> %	<u>101</u> deuterado %
69	70,0	83,7
70	2,5	34,5
77	15,0	25,4
78	2,5	5,0
139	28,0	12,4
140	2,5	20,5
141	-	10,1
241	65,0	30,5
242	11,5	71,1
243	-	45,7
266	49,0	40,6
267	10,0	55,8
268	-	19,3
269	67,5	34,5
270	12,5	68,5
271	-	46,2
272	-	9,1
284	100,0	40,6
285	20,0	100,0
286	-	76,1
287	-	15,2

Tabla 28: Composición isotópica de los fragmentos presentes en el espectro de masas de 101 deuterado.

	d <sub>0</sub>	d <sub>1</sub> <sup>*</sup>	d <sub>2</sub> <sup>*</sup>
M	21,3	48,3	30,3
M - Me	25,1	48,2	26,7
M - H <sub>2</sub> O	41,6	48,6	9,8
M - COMe	23,5	50,6	25,9
A - COMe	30,8	48,2	20,9
m/e 69	72,6	27,4	-

\* Las abundancias están corregidas por las contribuciones de <sup>13</sup>C 281 d<sub>0</sub> sin deuterio, d<sub>1</sub> ión con un deuterio, d<sub>2</sub> ión con dos deuterios.

Como puede verse en la tabla 28, en la composición isotópica del ión molecular, 48,3 % de las moléculas tienen un deuterio y 30,3 % de ellas dos. Esta relación se cumple también para los otros fragmentos de la tabla 28, excepto para  $M - H_2O$ .

Para conocer la distribución de deuterio en la molécula, era necesario analizar qué hidroxilo sufría mayor enriquecimiento al efectuar el intercambio de 101 con agua deuterada. Considerando que HO-7 y HO-5 son ácidos por efecto de conjugación de los mismos con el carbonilo presente en la molécula, y que HO-5 se encuentra involucrado en una unión puente de hidrógeno con el carbonilo ( C-4 ), es de esperar por tanto, que el primer protón que se intercambie sea el de HO-7 y el segundo el de HO-5.

De acuerdo a lo discutido, la relación entre los iones  $m/e$  69 y 70 (  $69-d_1$  ) debía ser la misma que la existente entre  $M-d_0 + M-d_1$  y  $M-d_2$ . Efectivamente, la relación entre esos dos iones es 72,6 / 27,4 ( tabla 28 ) coincidente con  $M-d_0 + M-d_1 / M-d_2$ , (  $21,3 + 48,3 / 30,3$  ) = 69,6 / 30,3. Los datos obtenidos, avalan por tanto la ruptura propuesta en la figura 83.

En el caso del ión  $M - H_2O$ , la proporción de  $( M-H_2O )-d_0$  aumenta a expensas de  $( M-H_2O )-d_2$  permaneciendo aproximadamente invariable  $( M-H_2O )-d_1$ , esto indicaría que el HO-5 está involucrado en la pérdida de agua a partir del ión molecular y no el HO-7, lo cual corrobora la observación hecha al respecto en base a los datos de la tabla 26 ( pág 160 ).

Análisis comparativo de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de flavonas 5,6,7-trisustituidas

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de las flavonas 5,6,7-trisustituidas presentan pocas señales cuyas posiciones no difieren apreciablemente de las características en flavonas 5,7-disustituidas; excepto en la desaparición de la señal correspondiente a H-6 que normalmente se encuentra a campos más altos que la de H-8.

Sin embargo, observando la tabla 29, se puede apreciar que este tipo de espectros permite distinguir fácilmente flavonas de 3-metoxiflavonas, primeramente por la aparición del H-3 ( 6,66 ppm ) y además por la desprotección que sufren los H-2' y H-6' ( 0,1 - 0,2 ppm ) en presencia del grupo MeO-3, independientemente de la sustitución existente en el anillo A.

Por otra parte, la metilación de HO-5, análogamente a lo que ocurre en la trimetilsililación, provoca una desprotección ( 0,10 - 0,25 ppm ) del H-8, lo cual es concordante con lo predecible por efecto de sustitución en anillos aromáticos.

Vale la pena insistir en la utilidad de los desplazamientos inducidos por benceno sobre la resonancia de metoxilos unidos a flavonoides 5,6,7-trisustituidos ( tabla 30 ), ya que sólo se desplazan apreciablemente los grupos MeO- con una posición *orto* libre (  $\Delta\delta = 0,65$  ppm ). Si en cambio, un grupo MeO- se encuentra entre un MeO- y un HO-, el desplazamiento que sufre es de 0,46 ppm aproximadamente; entre dos hidroxilos se desplaza 0,38 ppm y finalmente, si un grupo MeO- se encuentra ubicado entre dos de esos mismos grupos, sólo se desplaza en 0,20 ppm, siempre a campos más altos.

Poca información es la que se puede obtener de este tipo de espectroscopía frente a pequeñas variaciones estructurales comparando con la obtenida por medio de espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN para este tipo de compuestos.

**Tabla 29:** Espectros de  $^1\text{H-RMN}$  de flavonoides aislados de *Gomphrena martiana*, derivados y ejemplos seleccionados.

	H-6	H-8	H-3	H-2'y6'	H-3',4'y5'	Metoxilos Cl <sub>3</sub> CD C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	Hidroxiolos
<u>3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxiflavona 98</u>	6,63	8,00	7,43	3,87 4,12# 6,02#	3,83 4,00# 5,13#		
<u>5-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilendioxiflavona 99</u>	6,53	8,05	7,51	3,87# 6,08	-	12,85	
<u>5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona 100</u>	6,58	8,08	7,52	3,87 4,05	3,65 3,67	12,87	
<u>3,5,6,7-tetrametoxiflavona 114</u>	6,77	8,08	7,50	3,87 3,92 3,97 4,02	3,27 3,78 3,83 4,07		
<u>3,5,7-trimetoxiflavona 104</u>	6,33	6,50	7,46	3,88* 3,96	-		
<u>5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101</u>	6,62 <sup>a</sup>	6,67 <sup>a</sup>	7,53	4,05	3,67	12,97	
<u>7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona 115</u>	6,93	6,67	7,50	4,00 4,05	3,54 3,96		
<u>5,6,7-trimetoxiflavona 102</u>	6,84	6,65	7,49	3,91 3,96 3,99	3,31 3,80 4,08		

Tabla 29: Continuación

	H-6	H-8	H-3	H-2'y6'	H-3',4'y5'	Metoxilos C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	Hidroxiolos
5-hidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona <sup>282</sup>		6,54		8,10	7,56	3,89 - 3,94 - 3,97 -	12,58
5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona <sup>283</sup>	-	6,59 <sup>a</sup>	6,68 <sup>a</sup>	7,90	7,63	3,94 - 3,98 -	12,77
5-hidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona <sup>284</sup>	6,40			8,20	7,50	3,90* - 4,00 -	12,40
5,7-dihidroxi-3,8-dimetoxiflavona <sup>252</sup>	6,48						

Los valores se expresan en ppm respecto de TMS.

# Valor de desplazamiento químico del grupo 6,7-metilendioxiolo.

\* Señal correspondiente a dos grupos metoxilo.

<sup>a</sup> Los valores pueden intercambiarse.



**Tabla 30:** Valores de desplazamiento químico ( ppm ) de metoxilos unidos a flavonoides en  $Cl_3CD$  y  $C_6D_6$ .

	MeO-3		MeO-5		MeO-6		MeO-7	
	$Cl_3CD$	$C_6D_6$	$Cl_3CD$	$C_6D_6$	$Cl_3CD$	$C_6D_6$	$Cl_3CD$	$C_6D_6$
3,5-dimetoxi-6,7-metilen dioxiflavona <u>98</u>	3,87	3,83	4,12	4,00	-			
5-hidroxi-3-metoxi-6,7- metilendioxiflavona <u>99</u>	3,87	-						
5,7-dihidroxi-3,6-dime toxiflavona <u>100</u>	3,87	3,65 <sup>a</sup>	-		4,05	3,67 <sup>a</sup>		
3,5,6,7-tetrametoxifla vona <u>114</u>	3,87	3,83	4,02	4,07	3,91 <sup>a</sup>	3,78	3,96 <sup>a</sup>	3,27
3,5,7-trimetoxiflavona <u>104</u>	3,88	-	3,96 <sup>a</sup>	-			3,88 <sup>a</sup>	-
5,7-dihidroxi-6-metoxi- flavona <u>101</u>					4,05	3,67	-	
7-hidroxi-5,6-dimetoxi- flavona <u>115</u>			4,05	3,96	4,00	3,54	-	
5,6,7-trimetoxiflavona <u>102</u>			3,99	4,08	3,91 <sup>a</sup>	3,80	3,96 <sup>a</sup>	3,31

<sup>a</sup>Los valores pueden intercambiarse.

Análisis comparativo de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de flavonas 5,6,7-trisustituidas

La elucidación estructural de las flavonas 5,6,7-trisustituidas presentadas en este trabajo, pudo efectuarse por medio de otros métodos espectroscópicos ( UV, EM y  $^1\text{H}$ -RNM ), sirviendo la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN para confirmar las estructuras propuestas. Una vez establecidas inequívocamente las estructuras de los flavonoides estudiados, era interesante establecer pautas que permitieran un aprovechamiento de este método espectroscópico en el estudio de esta clase de compuestos.

Para ello, se realizó primeramente la asignación de cada uno de los carbonos en base a datos de literatura <sup>191,283</sup>, a estudios comparativos y a cálculos de los valores de desplazamiento químico. En la tabla 31, se consignan los desplazamientos químicos de los carbonos de los compuestos estudiados, y de compuestos similares obtenidos de literatura.

Se observó que los compuestos 100, 101, 114 y 115 presentaban desplazamientos químicos concordantes con los descriptos en literatura <sup>191,283</sup> respecto a los carbonos pertenecientes al anillo A, mientras que en los compuestos 98 y 99 existía un comportamiento anómalo para los carbonos de ese anillo.

Al comparar los espectros de los compuestos 98 y 114 ( Fig. 85 y 86 ) así como 99 y 100, se verificó que en los espectros de los compuestos mencionados en segundo término, existían 4 señales alrededor de 155 ppm ( C-2, C-5, C-7 y C-9 ) mientras que en los nombrados en primer lugar ( 98 y 99 ) sólo se observaron 3 señales en esa zona ( Fig. 87 ). Resultaba por lo tanto importante, determinar exactamente qué carbono se desplazaba de esa zona debido a la presencia de un grupo metilendioxilo en el anillo A.

Una manera de resolver lo planteado era calcular los valores de resonancia de los carbonos de ese anillo teniendo en cuenta las reglas de aditividad de sustituyentes en sistemas aromáticos aplicadas a flavonoides más sencillos que los tratados.

Tabla 31: Desplazamiento químico ( $\delta_c$ ) de flavonas 5,6,7-trisustituidas.

	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxiflavona <u>98</u> #	152,8 <sup><math>\alpha</math></sup>	140,9	173,8	141,2	134,6	153,6	92,9	152,6 <sup><math>\alpha</math></sup>	113,1	130,6	127,9	128,3	130,2	128,3	127,9
5-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilendioxi-6,7-flavona <u>99</u> #	155,8	139,4	179,2	141,7	129,6	154,1	89,0	152,4	108,1	130,3	128,2	128,5	130,8	128,5	128,2
3,5,6,7-tetrametoxiflavona <u>114</u> #	153,0 <sup><math>\alpha</math></sup>	141,2	173,5	152,2 <sup><math>\alpha</math></sup>	140,0	157,5	95,9	153,4 <sup><math>\alpha</math></sup>	113,0	130,7	128,0	128,3	130,2	128,3	128,0
5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona <u>100</u> ##	156,2	140,2	179,4	152,8 <sup><math>\alpha</math></sup>	131,1	158,7	95,1	153,4 <sup><math>\alpha</math></sup>	105,9	132,3	129,2	129,7	132,0	129,7	129,2
5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona <u>101</u> ##	164,4	105,8	183,4	153,7 <sup><math>\alpha</math></sup>	131,9	158,7	95,6	153,9 <sup><math>\alpha</math></sup>	105,5	132,7	127,5	130,3	133,1	130,3	127,5
7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona <u>115</u> ##	161,1	108,4	176,8	153,2 <sup><math>\alpha</math></sup>	140,5	157,3	101,0	154,9 <sup><math>\alpha</math></sup>	112,3	132,1	127,0	130,1	132,4	130,1	127,0
5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona <u>283</u>	163,9	105,4	182,6	152,9	132,6	158,7	90,6	153,2	106,2	131,1	126,1	129,0	131,8	129,0	126,1
5,6,7-trimetoxiflavona <u>102</u> , <u>283</u>	161,0	108,3	177,0	152,5	140,4	157,7	96,3	154,5	112,9	131,5	125,9	128,9	131,2	128,9	125,9

# Espectro registrado en  $Cl_3CD$ .

## Espectro registrado en  $DMSO-d_6$ .

Los valores se expresan en ppm respecto de TMS.

<sup>$\alpha$</sup>  Los valores pueden estar intercambiados.

Tabla 31: Continuación

	MeO-3	MeO-5	MeO-6	MeO-7	MeO-3'	MeO-4'	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxi-flavona <u>98</u> <sup>*</sup>	60,0	61,1					102,0
5-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilendioxi-flavona <u>99</u> <sup>*</sup>	60,1						102,6
3,5,6,7-tetrametoxi-flavona <u>114</u> <sup>*</sup>	60,0	61,4 <sup>α</sup>	62,1 <sup>α</sup>	56,2			
5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxi-flavona <u>100</u> <sup>#</sup>	61,0		61,0				
5,7-dihidroxi-6-metoxi-flavona <u>101</u> <sup>#</sup>			61,1				
7-hidroxi-5,6-dimetoxi-flavona <u>115</u> <sup>#</sup>		61,9 <sup>α</sup>	62,8 <sup>α</sup>				
5-hidroxi-6,7-dimetoxi-flavona <u>283</u> <sup>*</sup>			60,8	56,3			
5,6,7-trimetoxi-flavona <u>102</u> <u>283</u> <sup>*</sup>		61,5 <sup>α</sup>	62,1 <sup>α</sup>	56,3			
5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxi-flavona <u>191</u> <sup>*</sup>	59,4		60,1	55,7 <sup>α</sup>	55,4 <sup>α</sup>	55,5 <sup>α</sup>	

Los valores se expresan en ppm respecto de TMS.

<sup>\*</sup>Espectro registrado en Cl<sub>3</sub>CD.

<sup>#</sup>Espectro registrado en DMSO-d<sub>6</sub>.

<sup>α</sup>Los valores pueden intercambiarse.

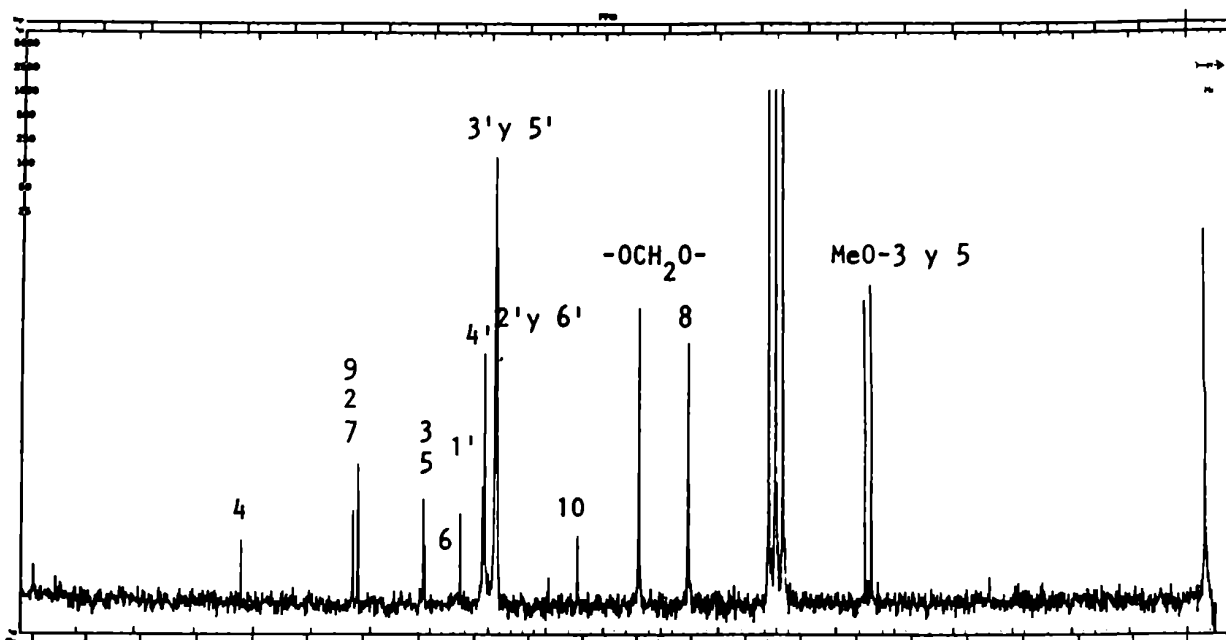


Figura 85: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 98, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ( 25,2 MHz ).

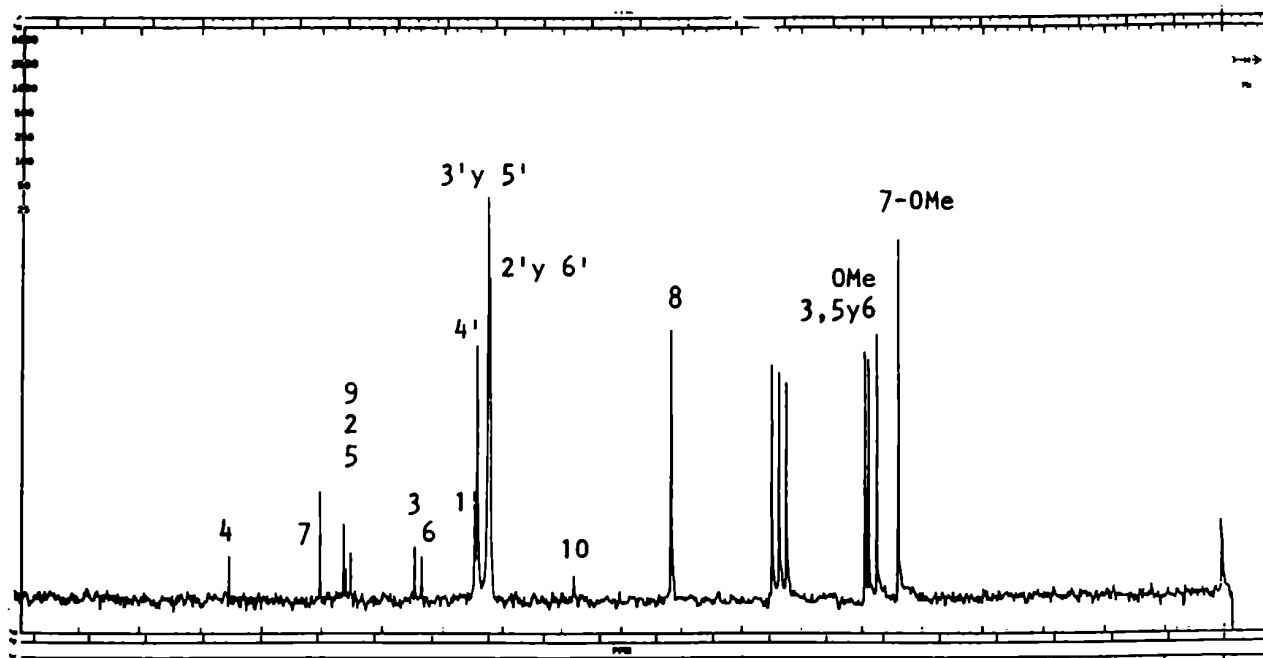
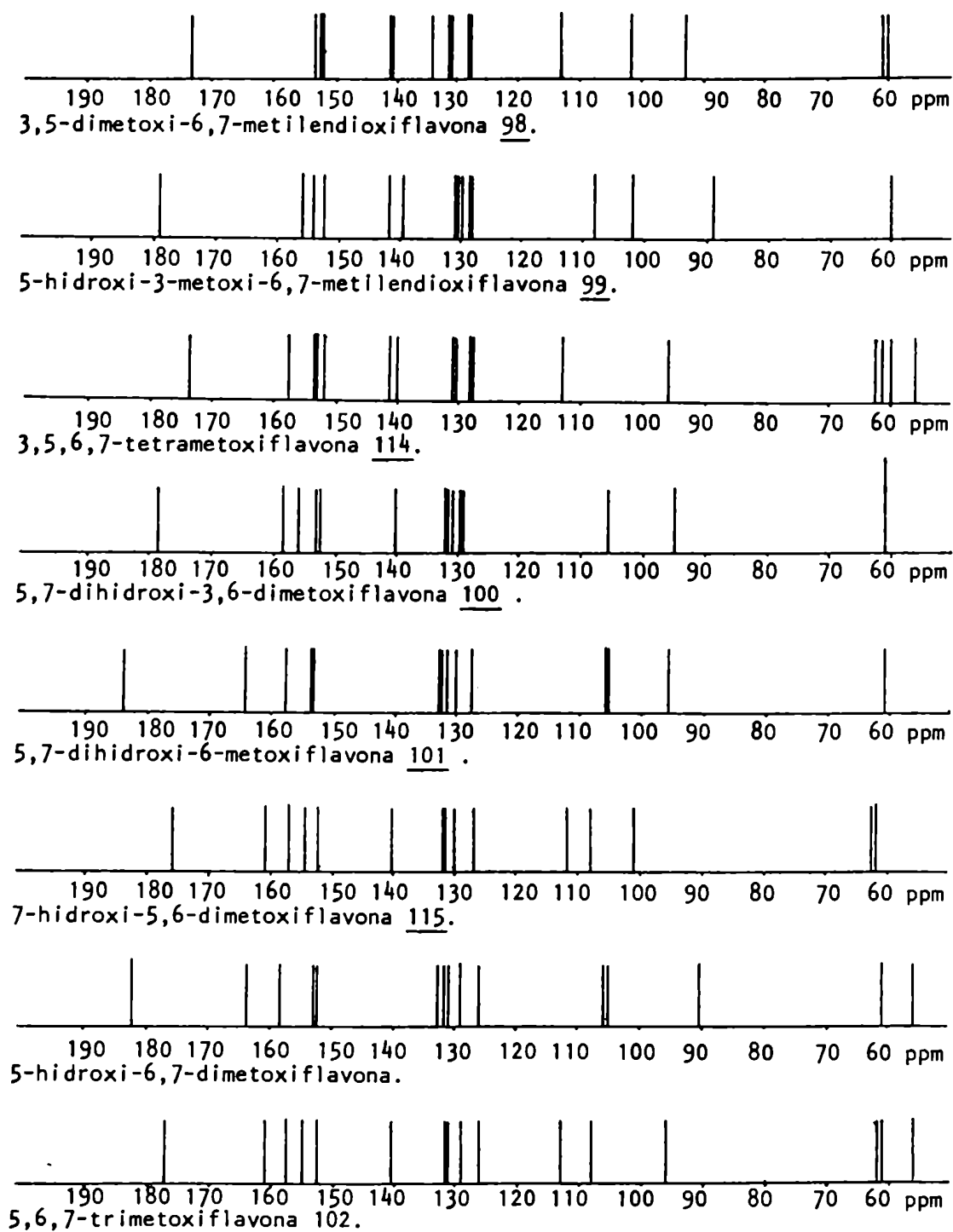


Figura 86: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 114, en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ( 25,2 MHz ).



**Figura 87:** Esquema comparativo de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de flavonoides 5,6,7-trisustituídos.

Sin embargo, los efectos de los sustituyentes individuales no son siempre aditivos, en particular en el caso de compuestos *o*-sustituidos. Así, por ejemplo, en los compuestos con dos grupos metoxilo en posiciones adyacentes se produce una disminución en la conjugación de los sustituyentes debido a efectos estéricos<sup>189,190</sup>, dando lugar a una menor protección de esos grupos sobre las posiciones *o*- y *p*- a los mismos.

Este tipo de desviación se vería aumentado por la presencia de 3 sustituyentes adyacentes en el anillo A, como se evidencia al comparar los valores experimentales con los obtenidos por cálculo en base a compuestos modelo.

#### Cálculo del desplazamiento químico de 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavonoides

Se tomaron como base los datos correspondientes a la 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona<sup>285,198</sup>. La influencia de un MeO-6 en las posiciones adyacentes se calculó en base a los datos presentados en la tabla 15, pág. 85, por comparación de los valores correspondientes a la 6-metoxiflavona y la flavona, tabla 32.

Tabla 32: Cálculo del desplazamiento químico de los carbonos del anillo A de 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavonoides.

	5,7-dihidroxi- flavona	Efecto de MeO-6	5,7-dihidroxi- 6-metoxiflavonoides	<u>100</u>	<u>99</u>
C-5	161,6	-20,2	141,4	152,8	141,7
C-6	99,1	+31,6	130,7	131,1	129,6
C-7	164,5	-10,9	153,6	158,7	154,1
C-8	94,2	+ 1,6	95,8	95,1	89,0 <sup>*</sup>
C-9	157,5	- 5,9	151,6	153,4	152,4
C-10	104,1	+ 0,1	104,2	105,9	108,1

\* Debe considerarse en este caso el efecto de metilación de H0-7, por el cual deben sumarse aproximadamente 5 ppm.

Al comparar los valores calculados para 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavonoides con los experimentales ( compuesto 100 ) se ob

servó que los correspondientes a C-5 y C-7 diferían apreciablemente de los esperados, debido a los efectos estéricos mencionados anteriormente. En cambio, en el espectro correspondiente a 99 ( Tabla 32 ) se observó que las resonancias de los C-5 y C-7 eran prácticamente coincidentes con las calculadas para 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavonoides. Considerando que la única diferencia estructural entre ambos compuestos ( 100 y 99 ) residía en la presencia del grupo metilendioxilo en el anillo A resultaba probable que este sustituyente cíclico evitara interferencias estéricas que normalmente existían entre los sustituyentes unidos a C-5 y C-6, comportándose por tanto de la manera esperada, considerando aditividad de los efectos debidos a sustituyentes en un anillo aromático, ya que no debería afectarse la conjugación de los grupos unidos a esas posiciones, debido a la rigidez del sistema formado.

#### Cálculo del desplazamiento químico de 5,6,7-trimetoxiflavonoides

En la tabla 33 se registran los valores calculados para 5,6,7-trimetoxiflavonoides tomando como base los datos correspondientes a 3,5,7-trimetoxiflavona <sup>191</sup>.

Tabla 33: Cálculo del desplazamiento químico de los carbonos del anillo A de 5,6,7-trimetoxiflavonoides.

	3,5,7-trimetoxiflavona	Efecto de MeO-6	3,5,6,7-tetrametoxiflavona ( calc. )	<u>114</u>	<u>98</u>
C-5	160,5	-20,2	140,3	152,2	141,2
C-6	95,5	+31,6	127,1	139,9	134,6
C-7	163,5	-10,9	152,6	157,5	153,6
C-8	92,1	+ 1,6	93,7	95,9	92,9
C-9	158,4	- 5,9	152,5	153,4	152,6
C-10	109,1	+ 0,1	109,2	113,0	113,1

Se observó nuevamente que los datos calculados coincidían mejor con el compuesto portador del grupo metilendioxilo 98 excepto para C-6 y C-10. Esto podía explicarse teniendo en cuenta que



el mayor volumen de un grupo metoxilo unido a C-5, comparado con un hidroxilo 99, perturbaría la conjugación del MeO-5 con el anillo aromático por impedimento estérico con el sustituyente unido a C-6 ( metoxilo o metilendioxi) provocando una menor protección sobre las posiciones *orto*- ( C-6 y C-10 ).

Los resultados anteriores indicaron que la señal que faltaba en la zona de 155 ppm en los compuestos 98 y 99 correspondía a C-5. Para confirmar dicha asignación se efectuaron espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 99 ( 5-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilendioxi flavona ) irradiando a la frecuencia de resonancia del protón fenólico de HO-5 ( 12,85 ppm ). En este caso sólo permanecía inalterada la señal observada a 141,7 ppm. Al irradiar los protones correspondientes a MeO-3 ( 3,87 ppm ) sólo se esperaba observar la señal correspondiente a C-3 debido a la desaparición de la partición de este con los hidrógenos del metilo; sin embargo se observaron dos señales a 141,7 y 139,4 ppm. La última debía corresponder a C-3 ( que se observa usualmente en esta zona, en el caso de 3-metoxiflavonas ) y la primera a C-5. Contrariamente a lo esperado, no se observó partición del C-5 con el protón de HO-5, probablemente debido a que el intercambio estuviese favorecido. Quedaba claro entonces, que la señal que presentaba desplazamiento en los compuestos con el grupo metilendioxi 98 y 99 era el C-5. A su vez estos compuestos constituyen una evidencia de la importancia de los efectos estéricos en espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN de flavonoides.

El análisis de la tabla 31, comparando pares de compuestos, permite apreciar los efectos de las siguientes transformaciones hipotéticas sobre las resonancias de los carbonos del núcleo flavonoídico:

- 1.- Introducción de un metoxilo en C-3.
- 2.- Metilación de HO-5.
- 3.- Metilación de HO-7.
- 4.- Formación del anillo metilendioxi.
- 5.- Comportamiento de los metoxilos en función de su posición; importancia de su entorno.

1.- Introducción de un metoxilo en C-3: los efectos más importantes ocurren sobre las resonancias de los carbonos 2,3,4, 2',6' y 4' ( tabla 34 ).

Tabla 34: Efecto resultante de la introducción de un metoxilo en C-3 sobre el desplazamiento químico de los carbonos de un flavonoide.

	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
<u>100</u> - <u>101</u>	-8,2	+34,4	-4,0	-1,1	-0,8	0,0	-0,4	-0,5	+0,4
<u>114</u> - <u>102</u>	-8,0	+32,9	-3,5	-0,3	-0,4	-0,2	-0,4	-1,1	+0,1
	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'			
<u>100</u> - <u>101</u>		-0,3	+1,7	-0,6	-1,1	-0,6	+1,7		
<u>114</u> - <u>102</u>		+0,2	+2,1	-0,6	-1,0	-0,6	+2,1		

Al introducir un MeO- en C-3 de una flavona ( 101 y 102 ), el C-2 se protege en 8 ppm mientras que el C-3 se desprotege en aproximadamente 33,6 ppm. Estos valores resultaron parecidos a los esperados para un metoxilo aromático, lo cual puede atribuirse a la aromaticidad parcial del anillo C, como fue postulado previamente<sup>191,193</sup>. Al mismo tiempo el C-4 sufre una protección ( aprox. 3,7 ppm ) debido probablemente a efectos estéricos.

En el anillo B la introducción de MeO- en C-3, produjo variaciones en las resonancias de los C-2' y 6' ( aprox. +1,9 ppm ), efecto similar al observado para H-2' y 6' en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN que sufren desplazamientos a campos bajos. Puede considerarse que esta variación se debe a la presencia del MeO-3 voluminoso que afectaría principalmente a los C-2' y 6'. Por otra parte, este efecto se superpondría al de disminución de conjugación del anillo B con el anillo C a causa del cambio de orientación espacial del fenilo por molestias estéricas. Esta disminución de la conjugación permite explicar la protección observada para C-4'. Los carbonos pertenecientes al anillo A no se ven afectados.

2.- Metilación de HO-5: este proceso afecta principalmente a los carbonos de los anillos A y C ( tabla 35 ).

Efecto sobre el anillo A: el HO-5 se encuentra normalmente formando un puente de hidrógeno con el oxígeno carbonílico ( C-4 ).

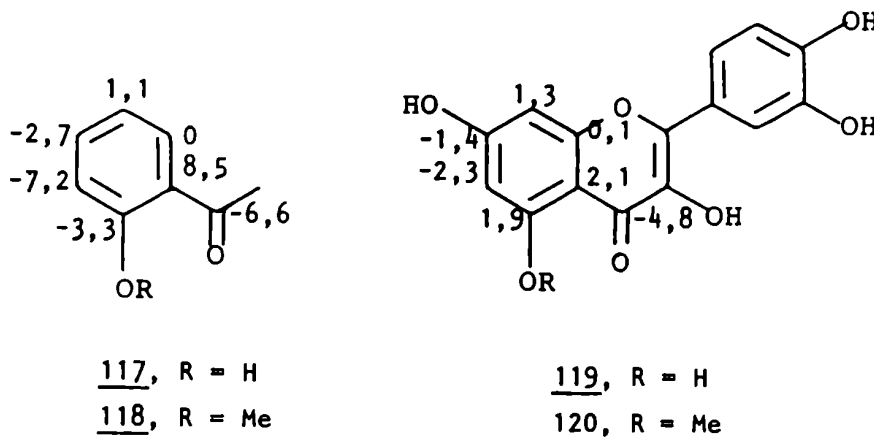
Al metilar este grupo se rompe dicho puente observándose en todos los casos desprotección de los C-6, C-8 y C-10.

Tabla 35: Efecto resultante de la metilación de HO-5 en flavonoides.

	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
<u>98</u> - <u>99</u>	-3,0	+1,5	-5,3	-0,5	+5,0	-0,5	+3,9	+0,3	+5,0
<u>115</u> - <u>101</u>	-3,3	+2,6	-6,6	-0,7	+8,6	-1,4	+5,4	+1,0	+6,8
<u>102</u> - <u>a</u>	-2,9	+2,9	-5,6	-0,4	+7,8	-1,0	+5,7	+1,3	+6,7

a 5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona

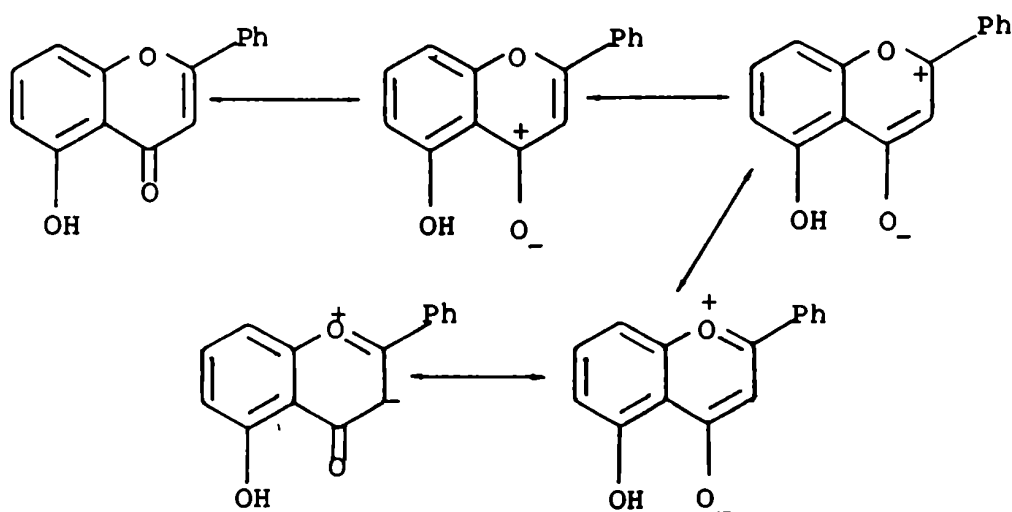
El efecto observado, no es el esperado si se tiene en cuenta el comportamiento de compuestos más simples como 117 y 119:



Al metilar el HO-5 de estos compuestos ( 117 y 119 ) se observaron los desplazamientos que se indican sobre cada carbono. Por ejemplo, el C-6 se protege y los desplazamientos de C-8 y

C-10 son menores a los presentados en la tabla 35. Esto indica a las claras que en el caso en estudio se produce, al metilar, un aumento de la interferencia estérica entre los sustituyentes de C-5 y C-6, hecho que evita la conjugación efectiva del MeO-5 con el anillo aromático y disminuye la protección que ese grupo debería desempeñar sobre las posiciones *orto* ( C-6 y C-10 ) y *para* ( C-8 ). El hecho de que los corrimientos observados al metilar se deban, en el caso del anillo A a efectos estéricos, se confirma al verificarse un desplazamiento menor de C-6 en el caso de los compuestos 98 y 99 comparándolos con los otros pares de compuestos de la tabla 35, ya que el MeO-5 tiene menor impedimento con el grupo metilendioxi que con un metoxilo en posición adyacente.

Efecto sobre el anillo C: al metilar HO-5 se produce un corrimiento a campos altos de C-2 ( aprox. -3,1 ppm ) y C-4 ( aprox. -5,8 ppm ) mientras que el C-3 sufre desprotección ( aprox.+2,3 ppm ). Estos efectos pueden explicarse asumiendo una mayor polarización del sistema enónico del anillo C por formación de puente de hidrógeno entre HO-5 y el oxígeno carbonílico, tal como se muestra en las siguientes estructuras de resonancia <sup>286</sup>:



3.- Metilación de HO-7: se puede observar en la tabla 36 que el único efecto importante que se observa al metilar el HO-7 es la protección de C-8 en aproximadamente -4,8 ppm, mientras que los restantes carbonos no se desplazan en forma apreciable.

Tabla 36: Efecto resultante de la metilación de HO-7 en flavonoides.

		C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
<u>a</u>	- <u>101</u>	-0,5	-0,4	-0,8	-1,0	+0,7	0,0	-5,0	-0,7	+0,7
	<u>102</u> - <u>115</u>	-0,1	-0,1	+0,2	-0,7	-0,1	+0,4	-4,7	-0,4	+0,6

a 5-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona

Este comportamiento resulta llamativo pues en flavonas 5,7-disustituidas, al metilar HO-7 no presentan variaciones destacables ninguno de los carbonos del anillo A <sup>285</sup>. Por tanto, lo observado en este estudio indica que el comportamiento anómalo se debe a la presencia del MeO-6 o en realidad al sistema estéricamente perturbado de las flavonas 5,6,7-trisustituidas.

4.- Formación del anillo metilendioxilo: en todos los casos, independientemente de que el sustituyente de C-5 sea HO- o MeO-, la formación del metilendioxilo en C-6 y C-7 produce una aparente protección del C-5 de aproximadamente 11,5 ppm con respecto a los compuestos con MeO- u HO- en C-5, C-6 y C-7. Estos últimos compuestos presentaban un comportamiento anómalo manifestado en una marcada desprotección del C-5 respecto del valor calculado debido a la congestión estérica existente. La presencia del metilendioxilo en los compuestos 98 y 99 provoca una evidente disminución de dicha congestión entre los sustituyentes unidos a C-5, C-6 y C-7 permitiendo así obtener desplazamientos concordantes con los calculados ( pág. 173 y 174 ). La diferencia entre los valores observados (  $\Delta\delta = -11,4$  ppm ), tabla 37, para C-5 en los pares de compuestos indicados, constituye un factor de corrección para obtener el desplazamiento químico de C-5 en flavonoides 5,6,7-trisustituidos con MeO-6.

Tabla 37: Efecto resultante de la formación del grupo metilendioxilo sobre la resonancia de los carbonos de flavonoides 5,6,7-trisustituidos.

	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
<u>99</u> - <u>100</u>	-11,1	-1,5	-4,5	-6,1	-1,1	+2,1
<u>98</u> - <u>115</u>	-12,0	-5,9	-3,7	-8,1	-2,2	+0,8
<u>98</u> - <u>114</u>	-11,0	-5,4	-3,9	-3,0	-0,8	+0,1

En los compuestos 99 y 100, que poseen HO-5, con y sin metilendioxilo respectivamente, existe sólo una pequeña variación ( -1,5 ppm ) en el desplazamiento químico de C-6, mientras que al comparar los compuestos 98 y 115 o 98 y 114, con MeO-5, se observa que al "producirse" la formación del metilendioxilo la variación observada para C-6 es de aprox. -5,6 ppm. Este último valor es una medida de la descongestión estérica que ocurre, pero el desplazamiento químico de C-6 aun sigue alejado del obtenido por cálculo ( 140,3 ppm, pág.174 ), debido a la permanencia de factores estéricos entre el MeO-5 y 6,7-metilendioxilo.

Como se mencionó previamente ( pág. 177 ) la magnitud del desplazamiento de C-6 al metilar el HO-5 en el compuesto 99 ( +5,0 ppm ) es menor que el que se produce al metilar el HO-5 de flavonoides sin metilendioxilo ( aproximadamente +8,2 ppm ). Esta diferencia sólo puede deberse a una disminución de la perturbación estérica existente entre los sustituyentes de C-5 y C-6 en los compuestos metilados ( Fig. 88 ).

El hecho de que el valor calculado coincida con el esperado para la transformación indicada en la figura 88 indicaría que sólo están en juego los factores estéricos mencionados.

Con respecto al C-7, al formarse el metilendioxilo, se observó una protección de dicho carbono ( aproximadamente -4 ppm ). Para el C-8, si se considera el efecto proveniente de la metilación de HO-7 ( -4,8 ppm ) en el caso de los compuestos 99 y 100, se verifica una protección del mismo en un valor prácticamente constante ( 2,5 ppm ).

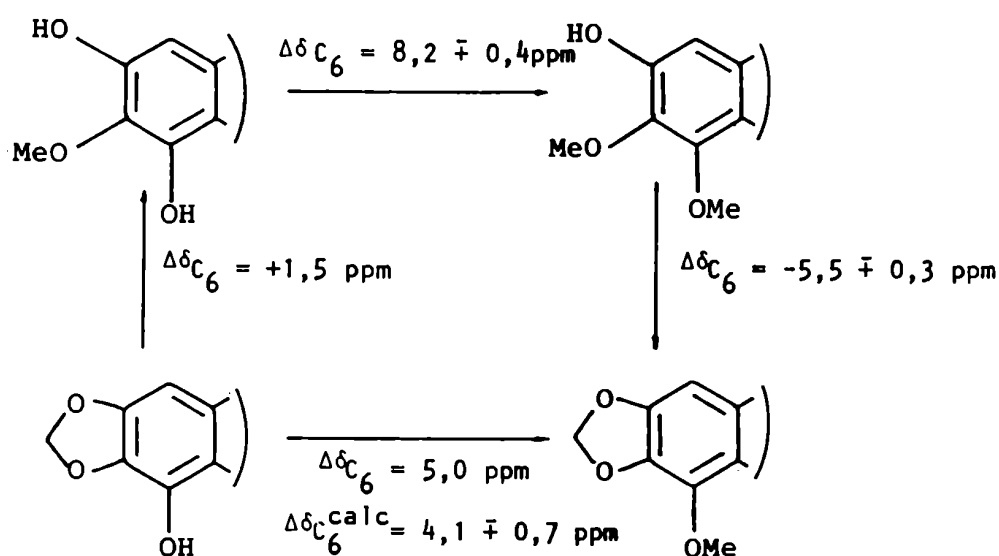


Figura 88

5.- Metoxilos: es fácil conocer el entorno de un metoxilo, en base al valor de desplazamiento químico que presente.

El desplazamiento químico de metoxilos se encuentra usualmente entre 55,0 y 56,5 ppm, pero en algunos casos se observan a campos bajos ( 60 - 63 ppm ). Esta desprotección se evidencia sólo cuando existen metoxilos *diorto* sustituidos por sustituyentes voluminosos como HO- o MeO- o una unión de anillos. Dhami y Stothers<sup>189</sup> sugirieron que el efecto antes mencionado se debía a inhibición estérica de la resonancia entre el oxígeno del MeO- considerado y el anillo aromático. Esto está de acuerdo con Hofer<sup>287</sup> que indicó que un metoxilo de un anillo aromático se encuentra en el plano del anillo, permitiendo así un máximo solapamiento entre los orbitales del par de electrones libres del oxígeno y los orbitales pi del núcleo aromático, evidenciado por una protección del carbono del metoxilo. Mientras que si el oxígeno del metoxilo no se encuentra completamente conjugado con el

anillo aromático, se desprotege relativamente.

Los flavonoides 5,6,7-trisustituidos presentan dos metoxilos con posiciones *o*-disustituidas y sólo uno con la posición *o*-libre ( MeO-7 ). Por las razones mencionadas, se observan por lo tanto dos metoxilos entre 61 y 63 ppm y el restante a aproximadamente 56 ppm. En cambio, en el caso de flavonoides 5,7,8-trisustituidos debe esperarse que dos metoxilos se encuentren protegidos y sólo uno desprotegido ( Fig. 89 )

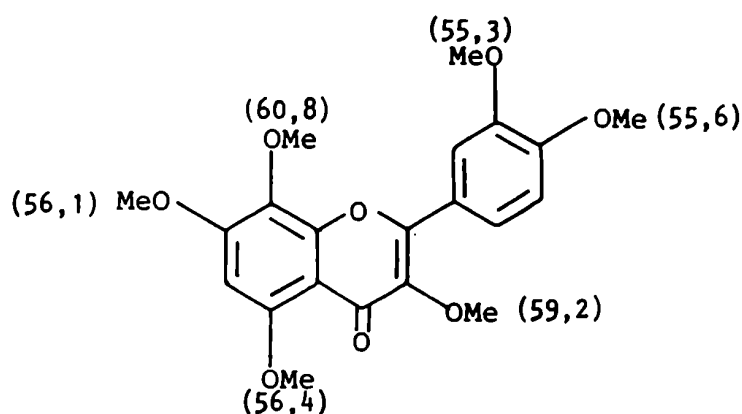


Figura 89: Desplazamiento químico de los carbonos de los metoxilos de una 5,7,8-trimetoxiflavona <sup>200</sup> .

Los flavonoides aislados de *Gomphrena martiana* ( tabla 31, pág.170) cumplen lo previamente expuesto confirmando el comportamiento de flavonoides 5,6,7-trisustituidos.



COMPARACION DE GOMPHRENA MARTIANA CON OTRAS ESPECIES DEL MISMO  
GENERO

La carencia de estudios químicos de este género, indujo a realizar una comparación cromatográfica de los componentes flavonoidicos y terpenoidales de *Gomphrena martiana* con los presentes en otras especies del género *Gomphrena*.

Por esta razón se analizaron *G. boliviana*, *G. haenkeana*, *G. perrenis* y *G. meyeniana*.

*Gomphrena martiana*, *G. boliviana* y *G. meyeniana*

Se compararon los componentes de los extractos de éter de petróleo de *G. martiana*, *G. boliviana* y *G. meyeniana*. Para ello se efectuó en cada caso un fraccionamiento cromatográfico de los correspondientes extractos comparándose la composición de hidrocarburos, alcoholes lineales, triterpenos tetra y pentacíclicos, esteroides y flavonoides.

Hidrocarburos: las fracciones menos polares provenientes del fraccionamiento mencionado se analizaron por cromatografía gas-líquido ( C.G.L. ), observándose la presencia de hidrocarburos lineales de C<sub>29</sub> a C<sub>35</sub> e hidrocarburos pertenecientes a la serie *iso* de C<sub>31</sub> y C<sub>33</sub> en las especies botánicas estudiadas ( tabla 38 ).

Tabla 38: Porcentajes de los hidrocarburos presentes en *G. martiana*, *G. boliviana* y *G. meyeniana*.

	nC <sub>29</sub>	nC <sub>30</sub>	iC <sub>31</sub>	nC <sub>31</sub>	nC <sub>32</sub>	iC <sub>33</sub>	nC <sub>33</sub>	nC <sub>34</sub>	nC <sub>35</sub>
<i>G. martiana</i>	2,7	tr	17,4	21,1	1,3	4,3	35,0	1,7	16,0
<i>G. boliviana</i>	4,5	tr	7,6	34,5	tr	1,5	31,4	tr	18,0
<i>G. meyeniana</i>	16,5	1,3	3,9	44,5	tr	0,6	22,1	tr	2,0

tr: trazas

Al comparar los resultados obtenidos se observó una mayor similitud entre *G. martiana* y *G. boliviana*, excepto en la abundancia del hidrocarburo *iso*  $C_{31}H_{64}$  que es llamativamente más importante en *G. martiana*. Con respecto a *G. meyeniana*, esta contiene  $nC_{29}H_{60}$  en mayor proporción que en las otras dos especies; se encuentra en cambio que  $nC_{35}H_{72}$  está en abundancia menor. Es de notar que  $nC_{31}H_{64}$  y  $nC_{33}H_{68}$  se mantienen en conjunto relativamente constantes en las tres especies.

Triterpenos: la fracción 3 resultante de la separación cromatográfica del extracto de éter de petróleo de *G. boliviana* fue analizada por CGL y CGL acoplada a espectrometría de masas ( C.G.L. - E.M. ) siendo sus componentes alcoholes lineales y triterpenos pentacíclicos.

Como puede verse en la tabla 39, el compuesto con Tr 2,12 min resultó ser un alcohol con una insaturación mientras que los de

Tabla 39: Análisis de la fracción de triterpenos de *G. boliviana*.

Tr ( min )	M <sup>+</sup>	Pico base	Porcentaje	Componentes
2,12	296	71	21,2	$C_{20}H_{40}O$
7,26	364 <sup>*</sup>	57	6,9	$C_{26}H_{54}O$
8,60	392 <sup>*</sup>	43	6,3	$C_{28}H_{58}O$
9,98	420 <sup>*</sup>	57	4,6	$C_{30}H_{62}O$
11,70	426	218	21,8	$\beta$ -amirina
12,12	426	218	23,8	$\alpha$ -amirina

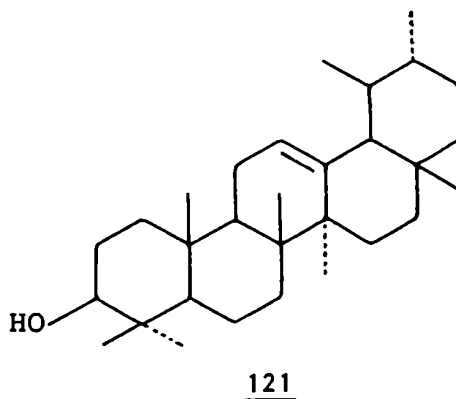
\* Estos fragmentos corresponden a los iones M - H<sub>2</sub>O.

Condiciones C.G.L.-E.M.: Columna OV-17, 3%, 1,8 m.  
Temperatura: 200° 288°, 10°/ min.

Tr 7,26; 8,60 y 9,98 min eran alcoholes saturados lineales de 26, 28 y 30 átomos de carbono respectivamente.

Los compuestos con Tr 11,70 y 12,12 min, tenían espectros de masas muy similares difiriendo solamente en la intensidad de algunos picos. Como el primero era igual a  $\beta$ -amirina 107 identifi

cada en *G. martiana* (pág. 127), el segundo compuesto debía ser su isómero  $\alpha$ -amirina 121. Como la diferencia entre ambos compuestos reside en la ubicación de los metilos en el anillo E, presentaban iguales espectros de masas. Esta suposición se confirmó al comparar los acetatos de la mezcla en estudio con una mezcla de acetatos de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina. La relación entre las dos amirinas era aproximadamente 1 : 1.



La fracción de triterpenos aislada de *G. meyeniana* presentó por C.G.L. el comportamiento indicado en la tabla 40.

Tabla 40: Análisis de la fracción de triterpenos de *G. meyeniana*.

Tr ( min )	Porcentaje	Componentes
0,74	12,7	$C_{22}H_{46}O$
1,01	12,1	$C_{24}H_{50}O$
1,45	5,5	$C_{26}H_{54}O$
2,14	7,3	$C_{28}H_{58}O$
3,26	1,5	$C_{30}H_{62}O$
5,33	46,0	$\beta$ -amirina <u>107</u>
6,13	11,3	ciclolaudenol <u>83</u>
8,95	3,2	-

Condiciones C.G.L.: Columna OV-17, 3%, 1,8 m.  
Temperatura: 280° isotérmico.

Los primeros 5 picos constituyen una serie homóloga correspondiente a alcoholes saturados lineales de 22, 24, 26, 28 y 30 átomos de carbono.

El análisis del E.M. del compuesto con Tr 5,33 min mostró que se trataba de una amirina (  $M^+$  m/e 426 y 218 ( 100% ) ); por su comportamiento cromatográfico ( C.G.L. ) se determinó que se trataba de  $\beta$ -amirina 107. El compuesto con Tr 6,13 demostró ser igual al triterpeno tetracíclico ciclolaudenol 83 por comparación de los E.M. ( pág. 130 ) y comportamiento cromatográfico ( C.G.L. ).

En *G. boliviana* no se detectó triterpeno tetracíclico alguno a diferencia de las otras 2 especies.

En la tabla 41 se ven las intensidades relativas con que se presentan los distintos triterpenos identificados en las 3 especies analizadas.

Tabla 41: Relación entre los triterpenos identificados en las distintas especies de *Gomphrena*.

	$\beta$ -amirina	ciclolaudenol	$\alpha$ -amirina
<i>G. martiana</i>	47,6	52,4	-
<i>G. boliviana</i>	47,8	-	52,2
<i>G. meyeniana</i>	80,0	20,0	-

De la comparación de los datos tabulados surge la tendencia de *G. martiana* y *G. meyeniana* a acumular ciclolaudenol, mientras que en *G. boliviana* se encuentra ausente y en cambio se destaca la presencia de  $\alpha$ -amirina. Es de suponer que en *G. boliviana* está favorecida la transposición 1,2 de uno de los metilos de C-20 a C-19 en el anillo E del triterpeno pentacíclico, dando así lugar a la formación de  $\alpha$ -amirina.

Esteroles: Los esteroides presentes en *G. boliviana* se analizaron por C.G.L. ( fig. 90 ) resultando ser colesterol 110 ( Tr 6,19 min ), campesterol 111 ( Tr 8,03 min ), estigmasterol 112

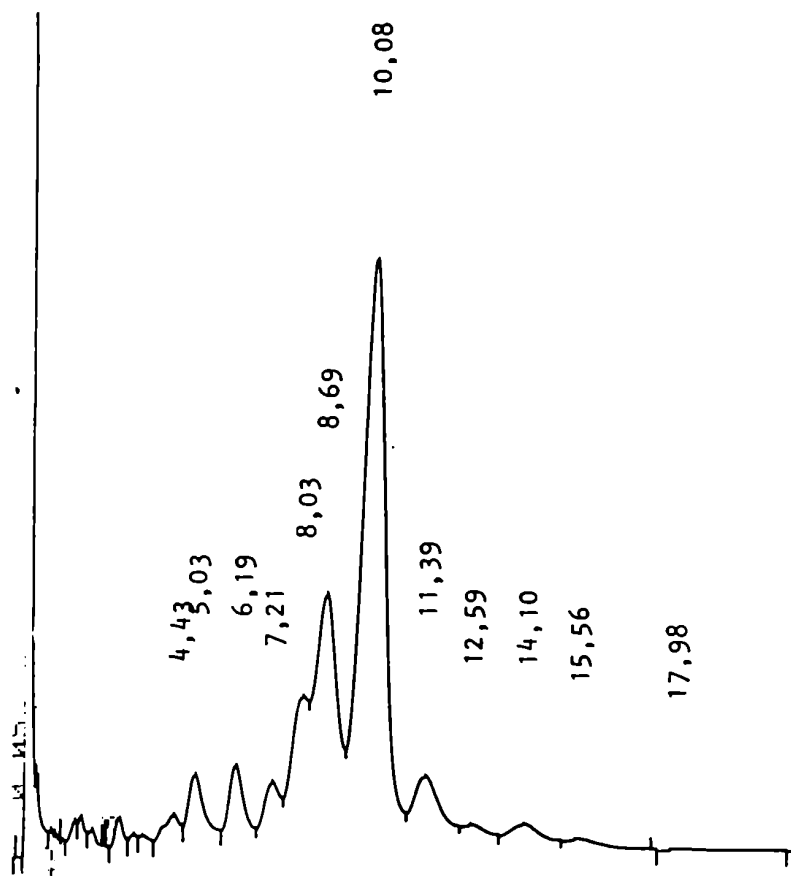


Figura 90: Cromatografía gas-líquido de los esteroides de *G. boliviana*.

( Tr 8,69 min ) y sitosterol 113 ( Tr 10,08 min ) por comparación con testigos. Al realizar C.G.L.-E.M. de los esteroides de esta planta se encontró que los espectros de masas de los compuestos 122 y 123 con Tr 7,21 y 11,39 min respectivamente ( tabla 42 ), presentaban el mismo ión molecular que colesterol y sitosterol respectivamente, pero variaba la abundancia de algunos fragmentos y faltaban otros.

Así por ejemplo en estos compuestos no se observaban los iones  $M - 85$ ,  $M - 111$  y  $M - 139$ , en cambio presentaban el ion  $m/e$  255 intenso y a su vez el ión molecular era el pico base ( Fig. 91 y 92 ). Estas características espectroscópicas <sup>238</sup> junto con el hecho de que ambos compuestos mostraban Tr mayor que el de los  $\Delta^5$ -esteroides, indujeron a pensar que se trataban de

Tabla 42: Análisis de la fracción de esteroides de *G. boliviana*.

Tr ( min )	M <sup>+</sup>	Pico base	Porcentaje	Componentes
5,03	-	-	4,1	-
6,14	386	43	4,4	Coolesterol <u>110</u>
7,21	386	386	3,5	$\Delta^7$ -Coolesterol <u>122</u>
8,03	400	43	7,9	Campesterol <u>111</u>
8,69	412	55	18,4	Estigmasterol <u>112</u>
10,08	414	43	43,7	Sitosterol <u>113</u>
11,39	414	414	6,4	$\Delta^7$ -Sitosterol <u>123</u>
12,59	-	-	2,8	-
14,10	412	124	1,1	Sitosterona <u>124</u>

Condiciones C.G.L.-E.M.: Columna OV-17, 3%, 1,8 m.

Temperatura: 200°→290°, 10°/ min.

$\Delta^7$ -esteroides <sup>288</sup>. Para confirmar esto se realizaron los E.M. de los correspondientes derivados trimetilsililados ( Fig. 93, 94, 95 y 96 ), ya que de esta manera se pueden distinguir los  $\Delta^5$ -esteroides de los  $\Delta^7$ -esteroides <sup>239</sup>. Como puede verse, los  $\Delta^5$ -esteroides ( coolesterol y sitosterol, Fig. 93 y 95 ) presentaban los iones M - 129 y m/e 129, no observándose el fragmento m/e 255 con intensidad importante. En cambio, los compuestos 122 y 123 ( Fig. 94 y 95 ) originaban un fragmento m/e 255 muy intenso y presentaban el ión m/e 213 ( tabla 43 ).

Tabla 43: Principales fragmentos en los espectros de masas de esteroides trimetilsililados.

	M <sup>+</sup>	M-TMSiOH	M-129	255 <sup>*</sup>	213 <sup>#</sup>	129
$\Delta^5$ -coolesterol	458 (39)	368 (81)	329 (100)	(18)	(9)	(56)
$\Delta^7$ -coolesterol	458 (100)	-	-	(95)	(36)	-
Campesterol	472 (55)	382 (100)	343 (92)	(12)	-	(68)
Estigmasterol	484 (74)	394 (86)	355 (36)	(77)	(21)	(62)
Sitosterol	486 (59)	396 (100)	357 (77)	-	-	(39)
$\Delta^7$ -sitosterol	486 (100)	396 (25)	357 (18)	(91)	(27)	-

\* M - TMSiOH - cadena lateral.

# M - TMSiOH - cadena lateral - anillo D.

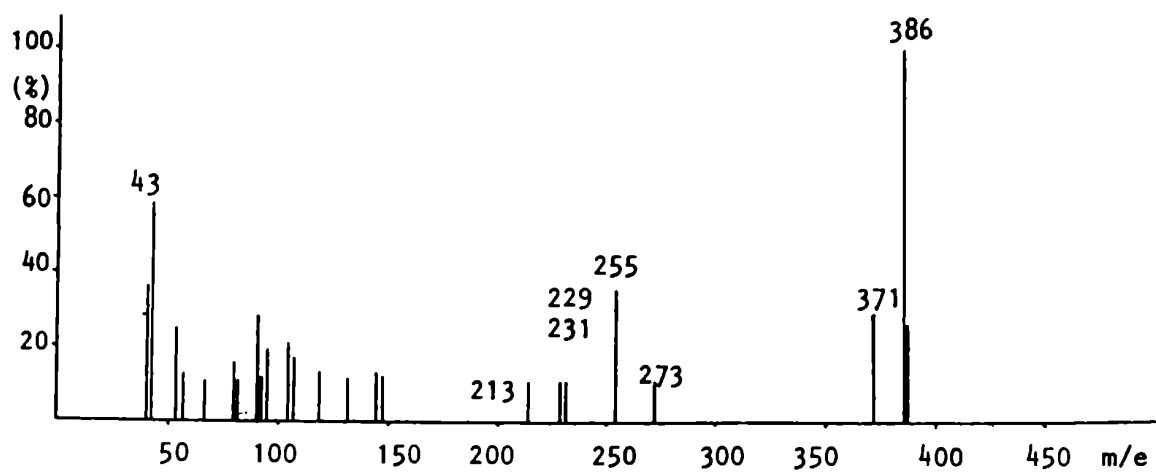


Figura 91: Espectro de masas de  $\Delta^2$ -colesterol 122 .

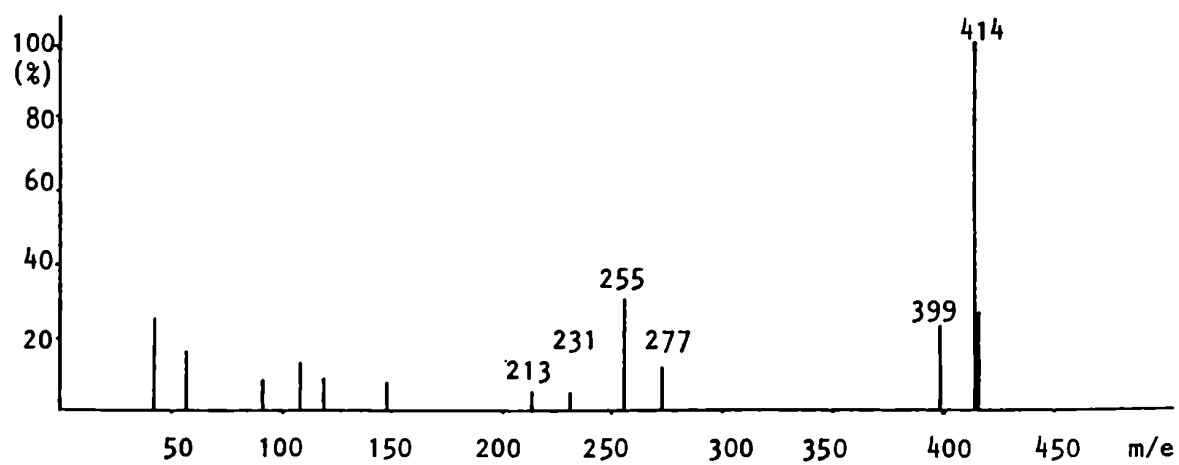


Figura 92: Espectro de masas de  $\Delta^7$ -sitosterol 123.

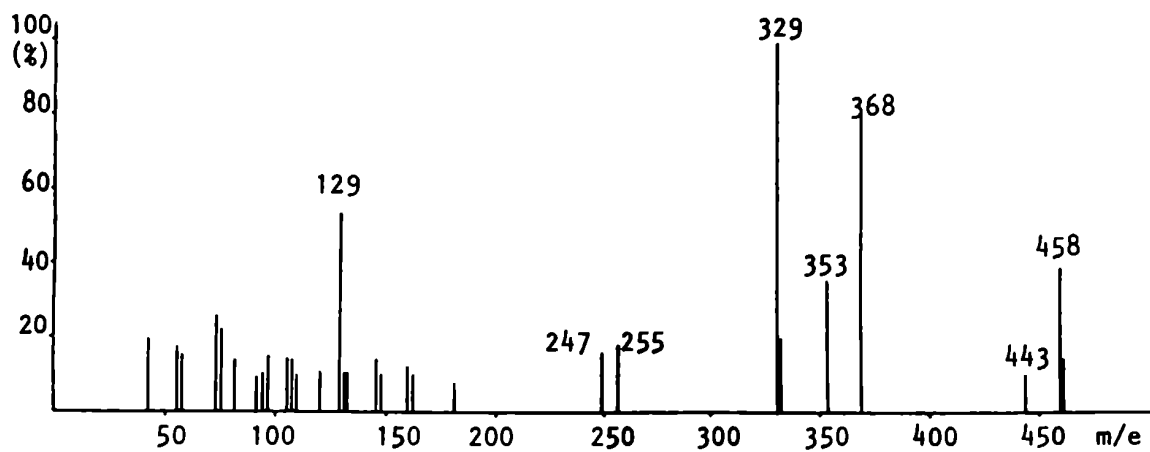


Figura 93: Espectro de masas de colesterol trimetilsililado.

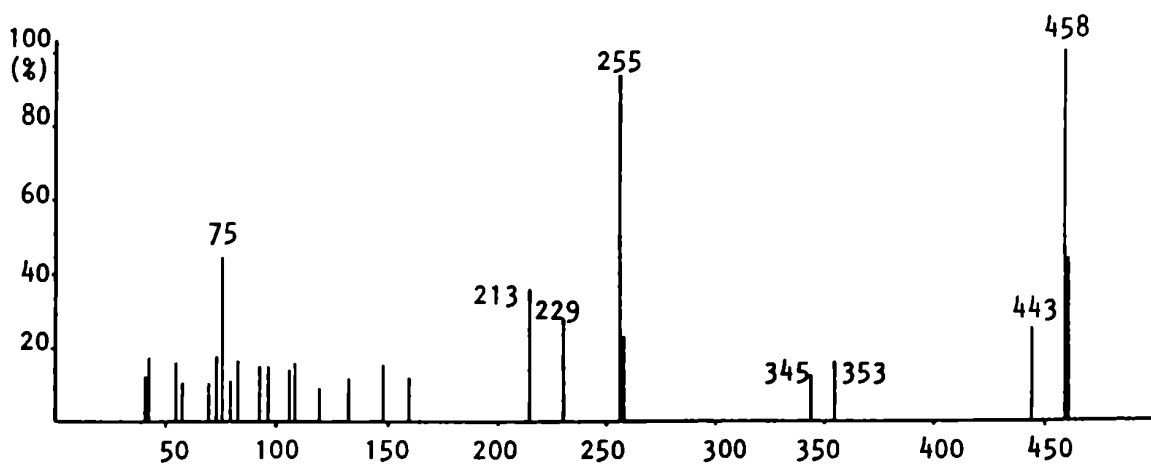


Figura 94: Espectro de masas de  $\Delta^7$ -colesterol trimetilsililado.



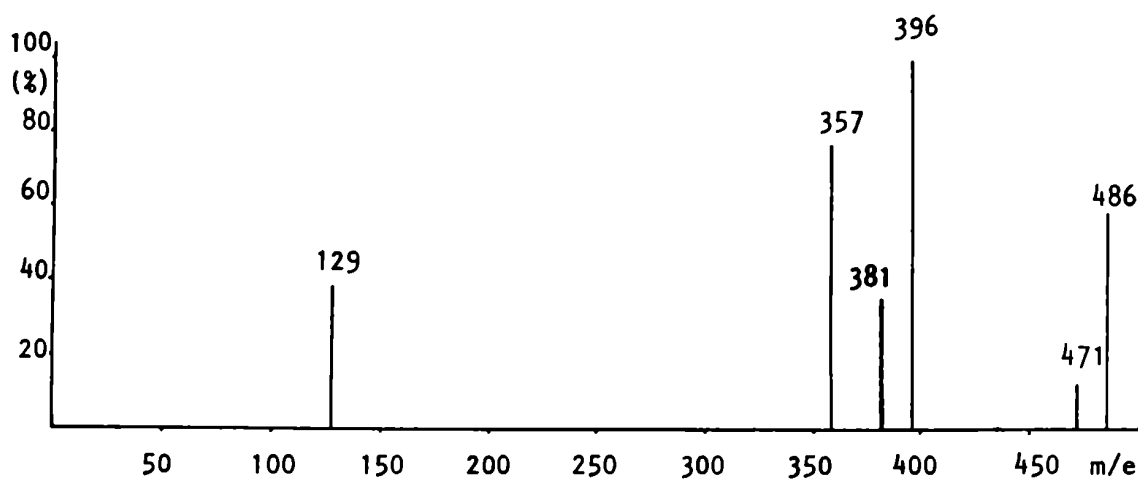


Figura 95: Espectro de masas de sitosterol trimetilsililado.

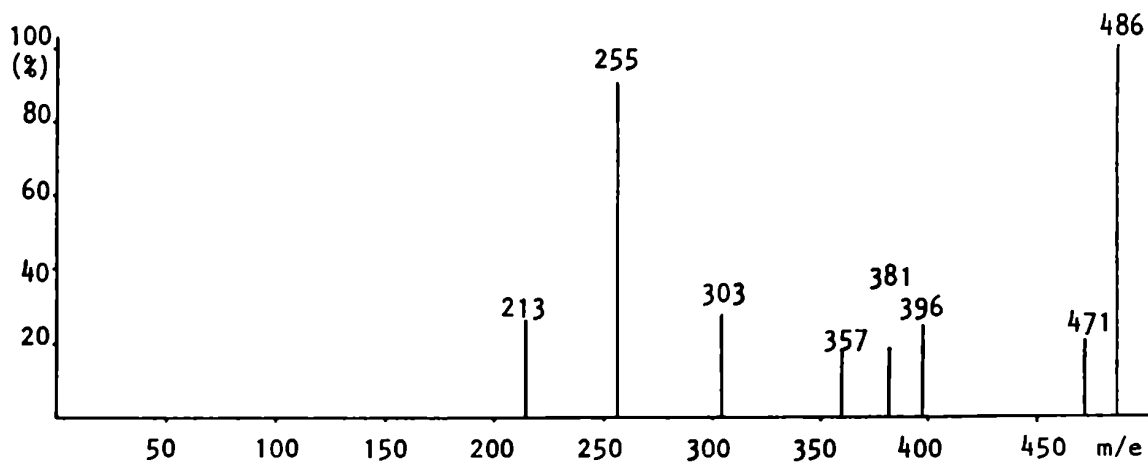


Figura 96: Espectro de masas de  $\Delta^7$ -sitosterol trimetilsililado.

Con los datos obtenidos se identificaron los compuestos 122 y 123 como  $\Delta^7$ -colesterol y  $\Delta^7$ -sitosterol respectivamente. Los espectros de masas obtenidos para los derivados trimetilsililados de dichos componentes fueron coincidentes con los registrados en literatura <sup>235,237,239</sup>.

La mezcla de esteroides sin trimetilsililar mostraba además un pico con Tr 14,1 min correspondiente a un compuesto que permanecía inalterado al trimetilsililar, pues su espectro de masas era el mismo en ambos casos, evidenciándose por tanto la ausencia de hidroxilo en la molécula. Este compuesto 124 presentaba un ión molecular a m/e 412 y el fragmento M - 42 debido a la pérdida de cetena; así como el pico base a m/e 124 característico de 3-ceto-4-en-esteroides <sup>289</sup>. Los fragmentos mencionados permitieron identificar a este compuesto como estigmast-4-en-3-ona ( sitosterona ) 124 ( Fig. 97 ).

Los esteroides de *G. meyeniana* fueron también estudiados por C.G.L.-E.M. de los mismos y de sus derivados trimetilsililados ( tabla 44 ) encontrándose que eran idénticos a los encontrados en *G. boliviana*.

Tabla 44: Esteroides de *Gomphrena meyeniana*.

Tr ( min )	M <sup>+</sup>	Porcentaje	Componentes
4,93	-	3,5	-
6,10	386	3,9	Colesterol <u>110</u>
7,10	386	1,6	$\Delta^7$ -Colesterol <u>122</u>
7,85	400	6,2	Campesterol <u>111</u>
8,47	412	6,4	Estigmasterol <u>112</u>
9,91	414	65,6	Sitosterol <u>113</u>
11,16	414	5,3	$\Delta^7$ -Sitosterol <u>123</u>
13,93	412	4,6	Sitosterona <u>124</u>

Condiciones C.G.L.-E.M.: Columna OV-17, 3%, 1,8 m.  
Temperatura: 200° 290°, 10°/ min.

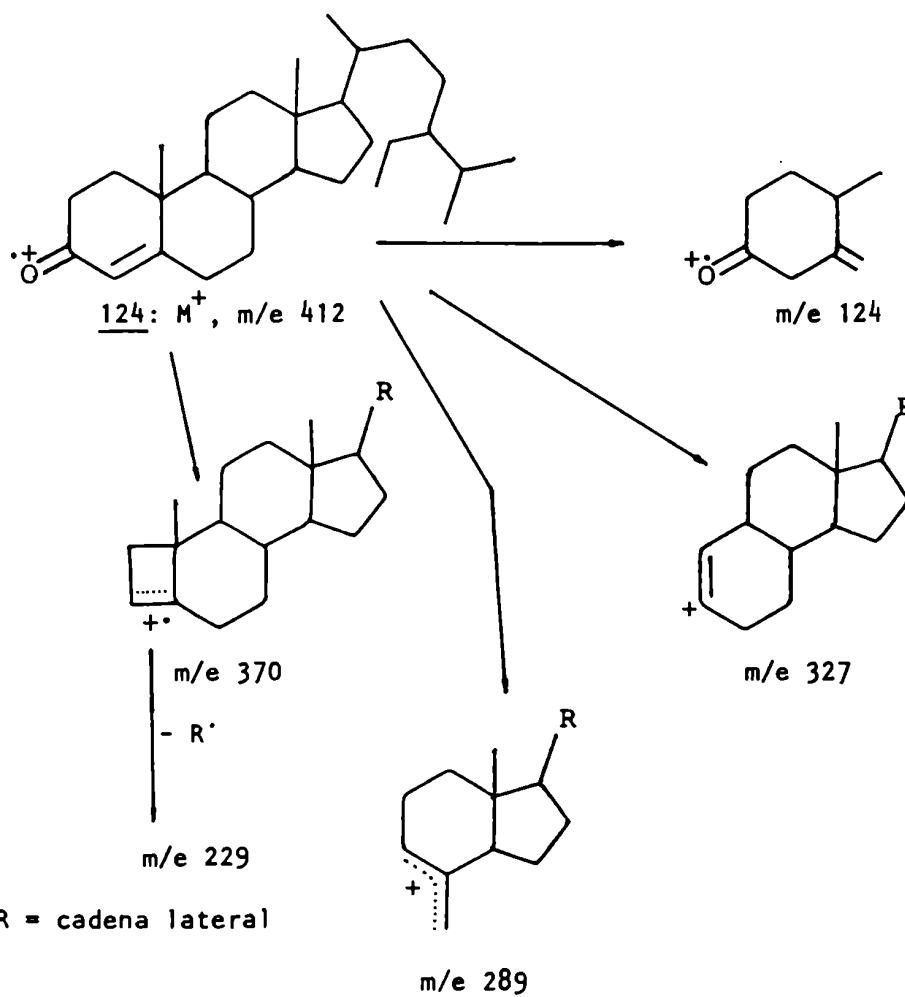
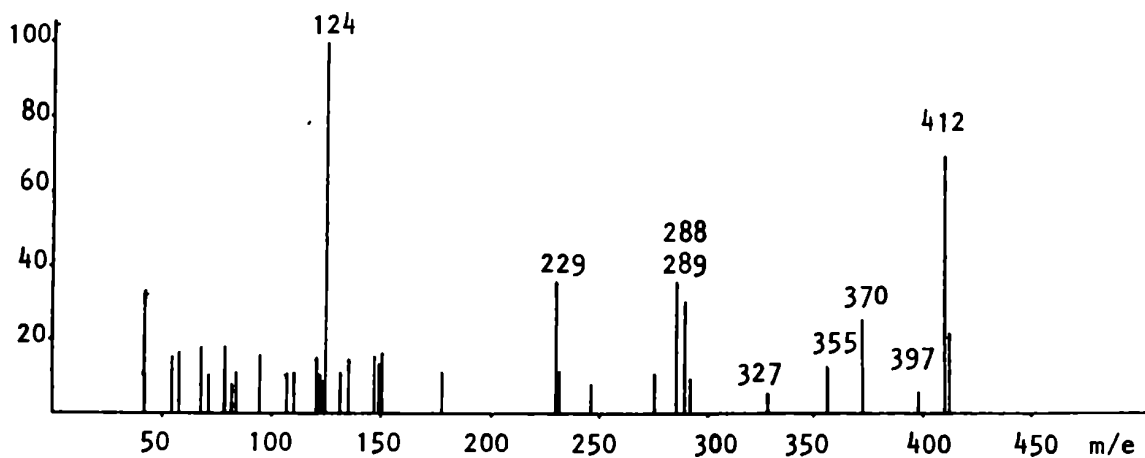


Figura 97: Espectro de masas y fragmentos principales de sitosterona 124.

Al comparar los esteroides de las tres especies estudiadas ( tabla 45 ) se observa la similitud existente entre *G. boliviana* y *G. meyeniana* en cuanto a la composición de la mezcla, con alto contenido de sitosterol en la última. En cambio *G. martiana* no posee  $\Delta^7$ -sitosterol y sitosterona en cantidades detectables, pero la proporción relativa de campesterol: estigmasterol: sitosterol ( 0,17: 0,43: 1,00 ) es igual a la de *G. boliviana*, siendo este último hecho destacable.

Tabla 45: Esteroides de *G. martiana*, *G. boliviana* y *G. meyeniana*.

	<i>G. martiana</i>	<i>G. boliviana</i>	<i>G. meyeniana</i>
Colesterol <u>110</u>	1,3	4,4	3,9
$\Delta^7$ -Colesterol <u>122</u>	tr <sup>#</sup>	3,5	1,6
Campesterol <u>111</u>	10,3	7,9	6,2
Estigmasterol <u>112</u>	25,4	18,4	6,4
Sitosterol <u>113</u>	58,9	43,7	65,6
$\Delta^7$ -sitosterol <u>123</u>	-	6,4	5,3
Sitosterona <u>124</u>		1,1	4,6

<sup>#</sup> Determinado por C.G.L.

*Gomphrena haenkeana*, *G. perennis*, *G. martiana*, *G. boliviana* y *G. meyeniana*

Ecdisterona: conociendo que ciertos géneros de la familia *Amarantaceae* (*Cyathula*, *Alternanthera* y una especie de *Gomphrena*) contenían ecdisteroides, se orientó el estudio de *G. haenkeana* hacia la búsqueda de esta familia de compuestos.

La planta entera se extrajo sucesivamente con éter de petróleo y etanol. Por evaporación del extracto etanólico se obtuvo un residuo, del cual se aisló un compuesto 23 de  $R_f=0,32$  ( acetato de etilo: metanol, 9:1; sílicagel ) que revelaba con  $H_2SO_4$  - anisaldehído de color violeta y viraba con el tiempo a verde, reacción característica de ecdisteroides <sup>290</sup>.

Su espectro U.V. mostraba una absorción a 243 nm indicando la presencia de una cetona  $\alpha, \beta$ -insaturada. Al calentar este compuesto en HCl 1 N en metanol durante 15' a 70° y observar nuevamente su espectro U.V., se comprobó la aparición de dos absorciones a 245 y 297 nm, evidenciando una vez más la presencia de un ecdisteroide, ya que en ese proceso se produce la pérdida de agua con intervención de HO-14 y la migración del doble enlace de C-7 a C-8 <sup>290,291</sup> (Fig. 98).

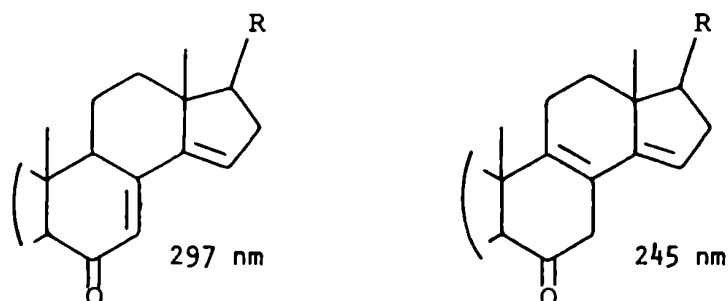


Figura 98

El espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (Fig. 99) de 23 en deuteropiridina mostraba 4 singuletes a 1,07 ppm (3 H), 1,20 ppm (3 H), 1,36 ppm (6 H) y 1,56 ppm (3 H) correspondientes a metilos de un ecdisteroide con HO-20 que provocaría desprotección de Me-18 (1,20 ppm) y Me-21 (1,56 ppm) con respecto a los valores correspondientes en el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de ecdisona <sup>290</sup> (Fig. 100). La señal a 1,07 ppm se atribuyó al Me-19 y la de 1,56 ppm a los metilos 26 y 27 que son equivalentes. Se observó también un singulete ancho a 6,12 ppm correspondiente al H-7 del sistema enónico.

Para verificar las características estructurales de la cadena lateral de este compuesto se realizó su espectro de masas. No se observó el ión molecular, que debería aparecer a m/e 480,

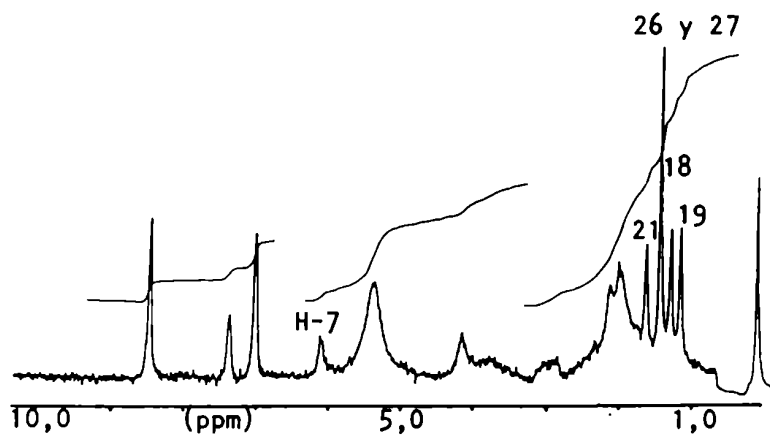


Figura 99: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 23, en piridina- $\text{d}_5$  ( 60 MHz ).

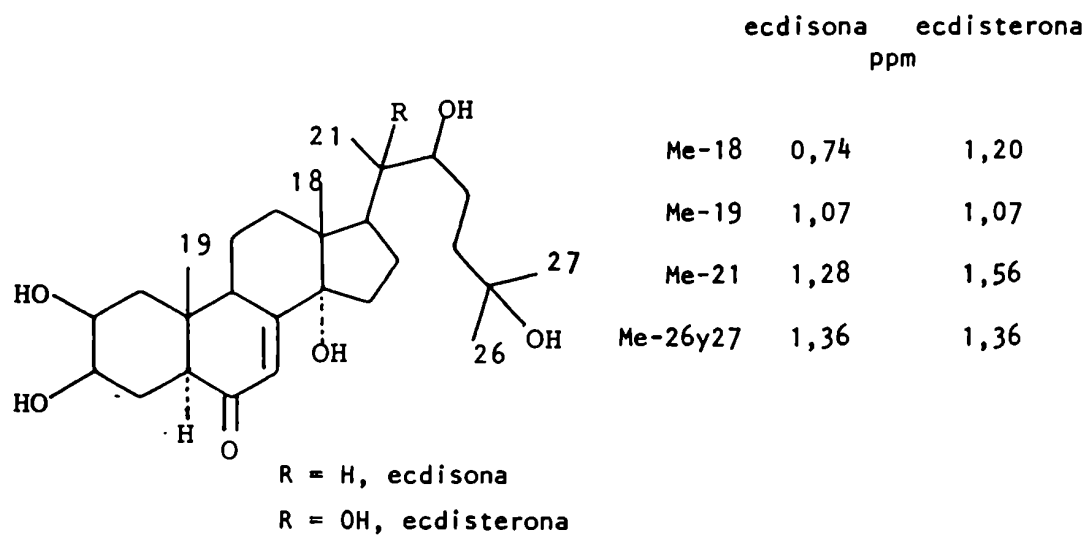


Figura 100: Desplazamiento químico de los metilos de ecdisona y ecdisterona en sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en deutero piridina.

pero sí 4 pérdidas sucesivas de agua a partir del mismo a m/e 462, 444, 426 y 408. El fragmento m/e 161 sugería una cadena lateral con 3 hidroxilos, dos de los cuales debían ser terciarios ya que se observaban dos pérdidas de agua a partir de ese ión ( m/e 143 y 125 ). La presencia de los iones M - 117 ( m/e 363 ), M - 117 - H<sub>2</sub>O ( m/e 345 ) y M - 117 - 2H<sub>2</sub>O ( m/e 327 ) era un indicio de que debían existir dos hidroxilos vecinales en la cadena lateral y que estos debían estar ubicados en C-20 y C-22, como sugería el espectro de <sup>1</sup>H-RMN, ya que de esa manera estaba favorecida la ruptura entre esos dos carbonos, ruptura que se produce sin transferencia de hidrógeno como ocurre en los dioles vecinales <sup>292</sup>. Esto se confirma además por la presencia de la secuencia m/e 117, 99 y 81 provenientes de la cadena lateral luego de la ruptura entre los carbonos 20 - 21 ( Fig. 101 ).

Todos los datos permitieron caracterizar al compuesto 23 como ecdisterona cuyo pf. y espectro I.R resultaron coincidentes con los de un testigo.

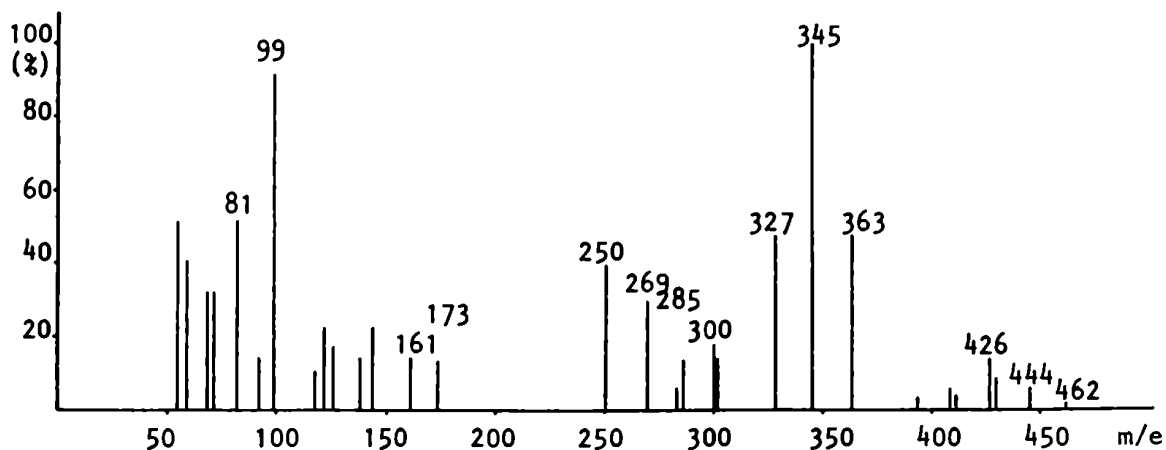
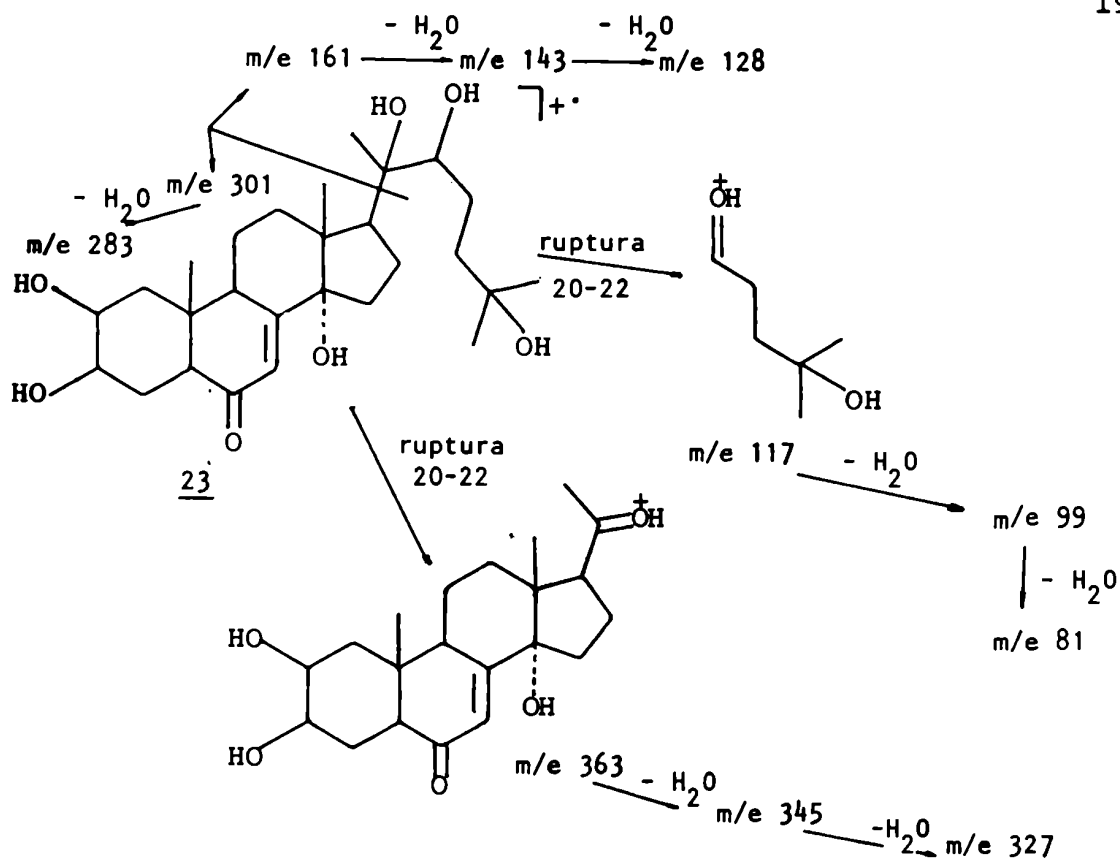


Figura 101: Espectro de masas y fragmentos principales de ecdisterona 23 ( continúa ).



**Figura 101:** Espectro de masas y fragmentos principales de ecdisterona 23 ( continuación ).

Con el objeto de comprobar la presencia de ecdisterona en las restantes especies de *Gomphrena* en estudio, se compararon cromatográficamente los extractos alcohólicos de *G. martiana*, *G. boliviana*, *G. haenkeana*, *G. meyeniana* y *G. perennis* detectándose este compuesto sólo en las últimas tres especies ( sílicagel, AcOEt-MeOH<sub>4</sub>, 9:1; revelador: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / anisaldehido, violeta vira lentamente a verde ).

**Flavonoides:** la comparación cromatográfica de los extractos de éter de petróleo de las especies en estudio, determinó que sólo *G. martiana* y *G. boliviana* poseían las mismas agliconas de flavonoides cuyas estructuras ya se han discutido: 3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxiflavona 98, 3,5,6,7-tetrametoxiflavona 114, 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona 100, 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101, 7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona 115 y 3,5,7-trimetoxiflavona 104.

Las restantes especies parecían no poseer flavonoides. Esto último se confirmó al realizar los espectros de <sup>1</sup>H-RMN



de los extractos crudos pues no se observaron señales correspondientes a hidrógenos aromáticos.

Protoalcaloides: todas las especies nombradas mostraron por cromatografía en capa delgada ( C.C.D. ) de los extractos alcohólicos la presencia de colina 11 ( sílicagel, Rf 0,47; EtOH-HONH<sub>4</sub> (c), 10:0,5; revelador: Dragendorff color rojo ) y betaína 9 ( celulosa, Rf 0,30; AcOBu-nBuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O, 85:15:40:22 / celulosa, Rf 0,45; EtOH-HONH<sub>4</sub> (c), 4:1; revelador: Dragendorff color naranja ), encontrándose la primera en mayor proporción. La acumulación de este tipo de compuestos es una característica de la familia *Amarantaceae*.

#### CONCLUSIONES DEL ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DISTINTAS ESPECIES

En la tabla 46 se detallan las características generales del estudio realizado sobre las distintas especies del género *Gomphrena*.

Tabla 46: Estudio comparativo de las distintas especies de *Gomphrena* estudiadas.

	<i>G.martiana</i>	<i>G.boliviana</i>	<i>G.haenkeana</i>	<i>G.meyeniana</i>	<i>G.perennis</i>
Agliconas de flavonoides	+	+	-		
Betaína	+	+	+	+	+
Colina	+	+	+	+	+
Ecdisterona	-	-	+	+	+

Como puede apreciarse, junto a lo expuesto previamente, *G. martiana* y *G. boliviana* resultan similares desde el punto de vista químico pues poseen las mismas agliconas de flavonoides, composición semejante de hidrocarburos y esteroides, y carecen de ecdisterona residiendo la diferencia entre ellas en la composición de los triterpenos ( pág. 186 ). Resulta interesante tener en cuen

ta que esta similitud química entre ambas especies coincide con el hecho de que durante mucho tiempo se las confundiera botánicamente. Sin embargo, la sutil diferencia química en el contenido de triterpenos existente entre ambas es concordante con la establecida botánicamente y que determina que son especies distintas <sup>293</sup>.

Otra interesante observación, es que en las especies que contenían agliconas de flavonoides no se pudo detectar la presencia de ecdisterona y viceversa. Así, se plantea la posibilidad de poder obtener conclusiones de estos hechos estudiando un mayor número de especies, de tal manera que sirvan para establecer correlaciones quimiotaxonómicas.

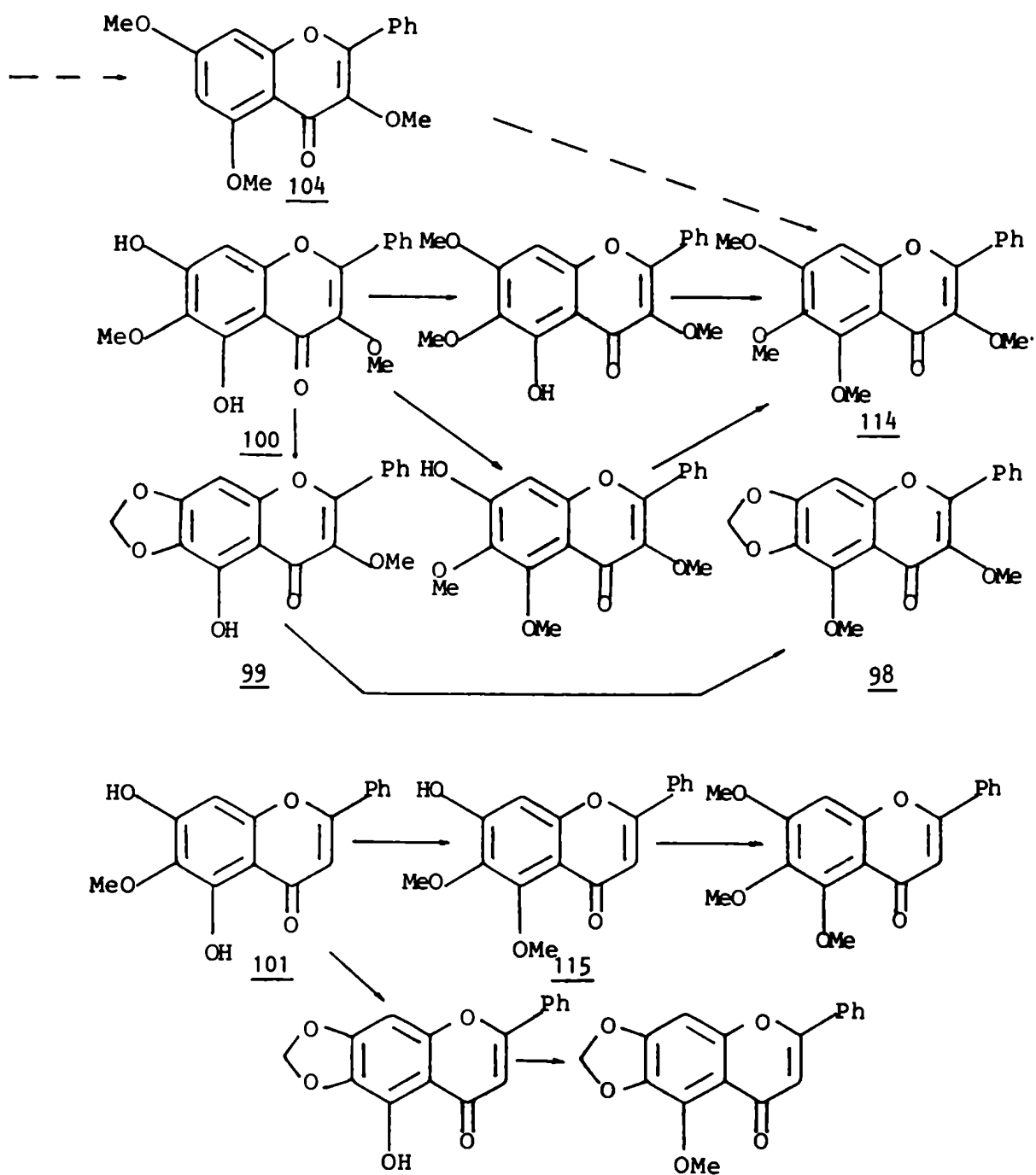
#### POSIBLE INTERRELACION BIOSINTETICA DE LOS FLAVONOIDES DE G. MARTIANA

El hecho de haber encontrado en *Gomphrena martiana* estructuras de flavonoides muy relacionadas entre sí, permite proponer posibles caminos biosintéticos ( Fig. 102 ) que expliquen su presencia en la planta y postular ciertos intermediarios que no fueron aislados quizás por encontrarse en baja proporción.

Así, la 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona 100 podría ocupar un papel central en la biosíntesis de las otras 3-metoxiflavonas ya que por metilación exhaustiva conduciría a 3,5,6,7-tetrametoxiflavona 114 lo cual podría ocurrir por dos caminos según se metile primero HO-5 o HO-7. No se detectaron derivados monometilados de 100.

La formación de 3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxiflavona 98 podría ocurrir por dos caminos: ciclación oxidativa y metilación posterior del compuesto 99 o viceversa. Como no se detectó el compuesto 99, es probable que el camino sea metilación del HO-5 de 100 y posterior ciclación oxidativa pues se encontró en el caso de flavonas su análogo 115 proveniente este compuesto por metilación de HO-5 selectiva en el compuesto 101.

Si las enzimas ciclantes y metilantes que actúan en la biosíntesis de las 3-metoxiflavonas son iguales a las que intervie-



**Figura 102:** Posible interrelación biosintética entre los flavonoides de *Gomphrena martiana*.

nen en la biosíntesis de flavonas, deberían haberse encontrado en la planta 5,6,7-trimetoxiflavona 102 y 5-metoxi-6,7-metilen-dioxiflavona ( análogo a 98 ).

Como la introducción de sustituyentes en C-6 parece ser uno de los últimos pasos en la biosíntesis de flavonoides<sup>96</sup>, el compuesto 104 o un análogo demetilado podría ser el precursor de las 3-metoxiflavonas discutidas.

ACCION CITOTOXICA Y ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO Y FLAVONOIDES DE *GOMPHRENA MARTIANA*

Acción citotóxica

Se ensayó el efecto que producía el extracto de éter de petróleo y una mezcla de flavonoides del mismo sobre el crecimiento de Sarcoma 180 ( 500.000 células, *i.p.*) en ratones BALB / c endocriados.

Una suspensión en Tween 80 del extracto de éter de petróleo y mezcla de flavonoides se inyectaron durante los primeros cinco días posteriores a la inoculación del tumor. Se observó que hasta 30 días aproximadamente, se producía inhibición de las células tumorales, las cuales a partir de ese momento y durante 30 - 60 días comenzaban a crecer y producían muerte en los animales.

En una experiencia se obtuvo un promedio de sobrevida del 71,4 % en animales inoculados ( tabla 47 ) mientras que en un lote testigo ( sin aplicar extracto de éter de petróleo ) inoculado simultáneamente, la sobrevida a los 22 días fue nula.

Tabla 47: Efecto del extracto de éter de petróleo sobre ratones inoculados con Sarcoma 180 *i.p.* .

	S-180 + EP	S-180
$x_1$	17,3	19,8
$x_5$	17,7	22,0
$x_{10}$	17,3	22,0
$x_{15}$	17,4	26,0
$x_{20}$	18,0	33,5
$x_{38}$	18,6	-

S-180: Sarcoma 180.

EP: extracto de éter de petróleo de *G. martiana* ( suspensión en Tween 80 ).

$x_i$ : peso promedio del lote de animales a los *i* días de inoculados.

Se observa en la tabla 47, que el peso de los ratones del lote testigo aumenta rápidamente debido al crecimiento del tumor,

mientras que el peso en el lote de ratones tratados con el extracto de éter de petróleo permanecía relativamente constante. Se observó también una discreta leucopenia ( $\bar{X}=4.800 / \text{mm}^3$ ) en los tratados comparados con los testigos ( $\bar{X}=6.200 / \text{mm}^3$ ).

El hecho, que después de un mes recomience el crecimiento tumoral, indica que los componentes de dicho extracto actúan inhibitoriamente sobre el tipo de tumor estudiado.

Se realizaron experiencias con una mezcla de las agliconas aisladas de *G. martiana* observándose resultados similares a los obtenidos con el extracto de éter de petróleo.

La concentración del extracto y de las agliconas de flavonoides en las suspensiones inoculadas fue de 7 y 0,7 mg/ml respectivamente, con lo cual se pone de manifiesto que aún utilizando la décima parte de la concentración activa del extracto, sigue manteniéndose acción citotóxica, hecho que indicaría que los componentes del extracto responsables de la actividad mencionada son los flavonoides.

Este trabajo ha sido realizado por la Lic. Marta S. García bajo la dirección de la Dra. Lía S. Rumi en el Instituto de Biología y Medicina Experimental ( CONICET ).

#### Acción antimicrobiana

Se ensayó la actividad antibacteriana de los extractos de éter de petróleo y etanólico de *G. martiana* frente a distintas bacterias Gram + y Gram -, aerobias o anaerobias y algunas levaduras y hongos, mediante métodos usuales con medio sólido.

En la tabla 48 se resumen los resultados obtenidos, expresando las actividades como concentraciones inhibitorias mínimas ( $\mu\text{g/ml}$ ). Se pone de manifiesto la actividad del extracto de éter de petróleo frente a *Mycobacterium phlei* y las bacterias anaerobias *Clostridium tetani* y *Clostridium sporogenes*. También se ensayaron las mezclas A, constituida principalmente por el flavonoide 98, y B constituida por una mezcla de 100 y 101 ( tabla 49 ). Estas agliconas de flavonoides resultaron muy activas contra *Mycobacterium phlei* con una concentración mínima inhibitoria de 15-30  $\mu\text{g/ml}$  en ambos casos, que corresponde a una actividad normal pa-

ra un bactericida. Con referencia a la actividad presentada frente a *Aspergillus niger* debe mencionarse que se observó crecimiento de este hongo, pero con inhibición de la formación de conidios que participan en la reproducción asexual del mismo.

Este trabajo fue realizado por la Lic. Alicia S. Lorenti bajo la dirección del Dr. Alberto Viale en la Cátedra de Microbiología e Inmunología del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales ( U.B.A. ).

Tabla 48: Actividad antimicrobiana de extractos de *Gomphrena martiana*.

Microorganismo	EP <sup>#</sup>	EtOH <sup>#</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	2000
<i>Streptococcus faecalis</i>	1000	2000
<i>Salmonella newport</i>	-	-
<i>Salmonella oranienburg</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Mycobacterium phlei</i>	250	250
<i>Clostridium tetanii</i>	250	1000
<i>Clostridium sporogenes</i>	250	4000
<i>Clostridium butyricum</i>	1000	4000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1000	250
<i>Candida albicans</i>	2000	250
<i>Aspergillus niger</i>	2000	2000

EP: extracto de éter de petróleo.

EtOH: extracto etanólico.

<sup>#</sup> Las actividades se expresan como concentración inhibitoria mínima (µg/ml).

- no tiene actividad.

Tabla 49: Actividad antimicrobiana de flavonoides de *Gomphrena martiana*.

Microorganismo	A <sup>#</sup>	B <sup>#</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	2000	500
<i>Streptococcus faecalis</i>	2000	2000
<i>Mycobacterium phlei</i>	30	15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1000	250
<i>Candida albicans</i>	500	500
<i>Aspergillus niger</i>	500	1000

A: constituido principalmente por 98.

B: mezcla de 100 y 101.

<sup>#</sup> Las concentraciones se expresan en µg/ml ( Concentración inhibitoria mínima ).



**CAPITULO VI**

**PARTE EXPERIMENTAL**

## PARTE EXPERIMENTAL

### Métodos empleados

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

El poder rotatorio del compuesto 116 fue medido en un polarímetro digital Perkin Elmer, modelo 141, en tubo de  $\frac{1}{4}$  dm utilizando metanol como solvente.

Los espectros de absorción infrarroja ( I.R. ) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer 137-B Infracord. Las determinaciones se hicieron en suspensiones de nujol o pastillas de bromuro de potasio.

Los espectros de absorción ultravioleta ( U.V. ) fueron determinados en soluciones de metanol en un espectrofotómetro Beckman DK-2A. En los U.V. de flavonoides se utilizaron como reactivos de desplazamiento: metóxido de sodio ( NaMeO ), 2,5 g de sodio en 100 ml de metanol; cloruro de aluminio ( AlCl<sub>3</sub> ), 5 % en metanol; ácido clorhídrico ( HCl ), 1 : 1; acetato de sodio ( NaAcO ), sólido y ácido bórico ( H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ), sólido.

Los espectros de resonancia magnética protónica ( <sup>1</sup>H-RMN ) se efectuaron a 60 MHz con un espectrómetro Varian A-60 y a 100,1 MHz en un espectrómetro Varian XL-100, según se indica en cada caso. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono-13 ( <sup>13</sup>C-RMN ) se efectuaron a 25,2 MHz en un espectrómetro Varian XL-100 y a 20,0 MHz en un espectrómetro Varian FT-80. El solvente en que se hicieron los espectros se indica en cada caso; en todas las determinaciones se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( J ) en Hz. Las abreviaturas usadas en la descripción de estos espectros son s: singlete, d: doblete, t: triplete, c: cuarteto y m: multiplete.

Los espectros de masas ( E.M. ) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masas Varian Mat CH-7A con inserción directa. Las cromatografías gas-líquido combinadas con espectrometría de masas ( C.G.L.-E.M.) se realizaron en un cromatógrafo

Varian 1400 acoplado a un espectrómetro de masas Varian-Mat-CH-7A con procesador de datos ( computadora Varian Mat Spectro System 166 con teletipo Tektronix 4010-1 e impresor Tektronix 4631 ) o en un equipo Hewlett-Packard 5995 A.

Todos los solventes empleados fueron purificados por destilación y evaporados a presión reducida a menos de 50°. Todas las mezclas están expresadas en relaciones de volumen (v / v).

### Métodos cromatográficos

1.- Cromatografía en capa delgada ( C.C.D. ): se utilizó siempre la técnica ascendente. Se utilizaron placas preparadas con sílicagel G ( Merck ), espesor 250 micrones, así como cromatoplasmas de sílicagel G ( Merck ), Celulosa F ( Merck ) y Alúmina F-254 ( Merck ).

Se usaron como reveladores  $H_2SO_4$ : ácido sulfúrico en ácido acético, 1 : 1;  $FeCl_3$  2% en etanol; anisaldehído: 5 % en isopropanol y reactivo de Dragendorff según Thies, Reuther, modificación de Vágújfalvi <sup>294</sup>.

2.- Cromatografía en columna: se utilizaron los siguientes rellenos para las cromatografías en columna: sílicagel grado 923, malla 200-300 ( Davidson Chemical ); sílicagel H ( Merck ); alúmina neutra ( Woelm ); Sephadex LH-20 ( Sigma ); poliamida para columna ( Woelm ) y resina de intercambio Amberlite IRA-400 (  $HO^-$  ) ( Sigma ). Las cromatografías líquidas a mediana presión se llevaron a cabo en columnas Lobar de sílicagel 60, tamaños B y C ( Merck ) y con sílicagel H ; el solvente de desarrollo era impulsado por una bomba Prominent-Electronic 1001 SCJ provista de un amortiguador de pulsos o con aire comprimido. El solvente de desarrollo se indica en cada caso, mediante sus fórmulas usuales.

3.- Cromatografía gas-líquido ( C.G.L. ): se realizaron en un cromatógrafo gaseoso dual Hewlett-Packard 5830 A con detector de ionización de llama ( FID ). Las condiciones de temperatura y columnas empleadas se indican en cada caso.

Las fases de las columnas tenían como soporte Chromosorb W-AW-DMCS, malla 60 - 80.

Los microanálisis fueron realizados por la Dra. Blanca Deferrari y la Lic. Marta Marcote ( UMYMFOR, CONICET-FCEN ).

### Reacciones generales

1.- Acetilación: todas las acetilaciones se efectuaron utilizando anhídrido acético y piridina ( 1 : 0,9 ) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 12 - 24 hs en la oscuridad y los compuestos se aislaron por evaporación de la mezcla acetilante.

2.- Trimetilsililación: se disolvió la muestra en piridina y se agregaron cantidades iguales de trimetilclorosilano y hexametildisilazano. Se agitó la mezcla y luego de 5 min en reposo fue evaporada a sequedad. El residuo se tomó con cloroformo anhidro, quedando sales en suspensión. En caso de utilizar la muestra trimetilsililada para efectuar  $^1\text{H}$ -RMN se filtraron las sales a través de una placa filtrante; el filtrado se evaporó y disolvió en una cantidad adecuada de cloroformo deuterado. Si el compuesto o mezcla de compuestos trimetilsililados se utilizaba en un análisis por C.G.L., se centrifugó la mezcla y el sobrenadante se inyectó en el cromatógrafo.

### Material vegetal

Se utilizaron plantas enteras de las siguientes especies del género *Gomphrena*.

1.- *Gomphrena martiana* Moq.: ejemplar de herbario CP 457. Recolectada en la provincia de Salta, Dpto. Gral. Güemes a 1 km al norte del cruce del puente del río Juramento, sobre ruta nacional 34. Forma matorrales abundantes en la banquina del camino. Marzo de 1978. Leg.: Arenas, Boelcke y Giberti. Identificó: Ing. O. Boelcke.

Ejemplar de herbario SI 31444. Recolectada en la provincia de Jujuy, Dpto. Palma Sola. Marzo de 1979. Recolectó e iden-

tificó Ing. Angel L. Cabrera.

2.- *Gomphrena boliviana* Moq.: ejemplar de herbario BAFC 1294. Recolectada en la provincia de Córdoba, Dpto. Capital: Ciudad de Córdoba, en un baldío cercano al edificio de la Universidad Nacional de Córdoba. Marzo de 1981. Recolectó e identificó Ing. A.T. Hunziker.

3.- *Gomphrena haenkeana* Mart.: ejemplar de herbario BAFC 1292. Recolectada en la provincia de Córdoba, Dpto. Capital: Ciudad de Córdoba, en los alrededores de la Ciudad Universitaria. Leg: Dr. Juan C. Oberti. Identificó Ing. A.T. Hunziker. Marzo de 1981.

4.- *Gomphrena meyeniana* Walpers: ejemplar de herbario BAFC 1293. Recolectada en la provincia de Salta, Dpto. Chicoana: Valle encantado, 3000 m.s.m. Leg: A.T. Hunziker y R. Subilis. Identificó Ing. A.T. Hunziker. Mayo de 1981.

5.- *Gomphrena perennis* L.: ejemplar de herbario BAFC 1291. Recolectada en la provincia de Córdoba, Dpto. Colón: Sierra Chica (falda oriental), entre La Granja y Agua de Oro. Marzo de 1981. Recolectó e identificó Ing. A. T. Hunziker.

#### Tratamiento del material vegetal

Método de extracción: la planta entera se secó a 45°C en una estufa con circulación de aire y se molió posteriormente empleando una malla de 2 mm en un molino Wiley, modelo ED-5.

El polvo obtenido fue extraído en forma continua en un extractor S.G.A. Scientific Inc. modelo JE 5550. En caso de tener poco material vegetal las extracciones se efectuaron en Soxhlet. Se extrajo exhaustivamente primero con éter de petróleo (60°- 80°), obteniéndose por evaporación del solvente un residuo oscuro que se denominó extracto de éter de petróleo. A continuación, luego de secar el resto vegetal, se extrajo con etanol. Por concentración del extracto etanólico, en todos los casos se produjo la precipitación de sales que fueron eliminadas por filtración. Los rendimientos se indican en cada caso.

ESTUDIO QUIMICO DE GOMPHRENA MARTIANA

La planta entera ( 2.240 g ) fue extraída con éter de petróleo según se indica en la parte general. Se concentró el extracto a un volumen de aproximadamente 300 ml y se dejó una noche en heladera. Se obtuvo un precipitado que se filtró y lavó con éter de petróleo frío, Precipitado 1 ( 1,4 g; 0,06 % ). Por evaporación de las aguas madres se obtuvo un residuo oscuro, Residuo 1 ( 37 g; 1,7 % ).

A continuación, se secó el residuo vegetal y se extrajo con etanol. Al enfriar el extracto, se separó por filtración un abundante precipitado constituido por  $\text{KNO}_3$  ( 89 g; 4,0 % ). Por evaporación del filtrado se obtuvo un residuo verde oscuro, Residuo 2 ( 159,7 g; 7,1 % ).

Fraccionamiento del Precipitado 1

Se recrystalizó el Precipitado 1 reiteradas veces de etanol hasta observar homogeneidad por cromatografía sobre capa delgada ( C.C.D. ) de sílicagel usando como solvente benceno-acetona, 7 : 3. Se obtuvo así el compuesto 98 puro, que fue identificado como 3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxiflavona (100 mg).

Se cromatografió el residuo obtenido al evaporar las aguas madres de cristalización de 98 ( 500 mg ), en una columna de sílicagel Davidson ( 50 g ) usando como solvente de elución  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  y un gradiente de  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ -AcOEt hasta 5 %. Se obtuvieron tres fracciones ( fracción 1: 320 mg; fracción 2: 101 mg y fracción 3: 32 mg ).

Se sometió la fracción 1 a cromatografía líquida de media presión usando como solvente benceno-acetona, 98 : 2, obteniéndose dos subfracciones puras correspondientes a los compuestos 100 ( 90 mg ) y 101 ( 17 mg ) respectivamente ( C.C.D. sílicagel: benceno-acetona, 98 : 2; Rf: 0,29 ( 100 ) y 0,22 ( 101 ); con  $\text{FeCl}_3$  revelan color verde oscuro y negro respectivamente ). Los compues

tos 100 y 101 fueron caracterizados como 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona y 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona respectivamente.

De la fracción 2 se obtuvo el compuesto 98 impuro. El análisis de la fracción 3 por C.C.D. de sílicagel con benceno-acetona, 4 : 1, mostró la presencia de una mancha fluorescente celeste a 366 nm ( Rf: 0,5 ). La purificación de la misma se efectuó por cromatografía en placa preparativa de sílicagel utilizando el solvente anterior, eluyendo la banda principal con Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-acetona, 1 : 1 . El eluido ( 12 mg ) fue recromatografiado en una columna seca de sílicagel Davidson ( 2 g ) y se aislaron 10 mg de 104, identificado por métodos espectroscópicos como 3,5,7-trimetoxiflavona.

#### Fraccionamiento del extracto de éter de petróleo ( Residuo 1 )

20 g del Residuo 1 se sembraron en una columna de sílicagel Davidson ( 1500 g ). La elución se llevó a cabo con un gradiente de benceno-acetona que varió de 5 % a 50 % , concluyendo con metanol. Se obtuvieron 8 fracciones principales:

Fracción	Masa ( mg )	Componentes
1	216	Hidrocarburos
2	3920	Ceras
3	2700	Alcoholes lineales y Triterpenos
4	1100	Esteroles
5	1500	Flavonoides <u>100</u> y <u>101</u>
6	1700	Flavonoides <u>98</u> y <u>114</u>
7	2100	Flavonoides <u>104</u> y <u>115</u>
8	3100	Aceite oscuro

De la fracción 1 se obtuvieron hidrocarburos que fueron analizados contra testigos por C.G.L. y C.G.L.-E.M.

La fracción 2 estaba constituida por ceras que no fueron estudiadas.

Por sucesivas recristalizaciones de acetona de la fracción 3 se obtuvo una mezcla de alcoholes lineales de  $C_{24}$  a  $C_{30}$ . Por evaporación de las aguas madres se obtuvo un residuo ( 50 mg ) que fue cromatografiado en una columna de sílicagel usando cloroformo como eluyente. La fracción principal fue analizada por C.G.L.-E.M. determinándose la presencia de  $\beta$ -amirina 107, ciclo-laudenol 83 y hopeol 109.

La fracción 4 se trató con metanol, se filtró en caliente y se dejó cristalizar. El precipitado obtenido se analizó por C.G.L. contra testigos determinándose la presencia de colesterol 110, campesterol 111, estigmasterol 112 y sitosterol 113 confir-mándose las estructuras por C.G.L.-E.M. ( 215 mg ).

La fracción 5 mostró ser una mezcla de las flavonas 100 y 101.

El fraccionamiento de la fracción 6 se efectuó en una columna Lobar tamaño A usando como solvente de elución benceno-acetona, 96 : 4 y 95 : 5 . Se aislaron 170 mg del compuesto 114 identificado como 3,5,6,7-tetrametoxiflavona.

Por cristalizaciones sucesivas de la fracción 7 de meta-nol se obtuvo el compuesto 115 que fue caracterizado como 7-hi-droxi-5,6-dimetoxiflavona ( 22 mg ).

#### Fraccionamiento del extracto etanólico ( Residuo 2 )

Se disolvieron 27 g del Residuo 2 en 250 ml de etanol y se evaporaron junto con 70 g de poliamida para columna. Se colo có la pastilla así formada en un embudo con placa filtrante y se percoló sucesivamente con 1 litro de cloroformo, 700 ml de agua destilada ( hasta reacción de Dragendorff negativa ) y 1 litro de metanol. Se obtuvieron así luego de eliminar los correspondien-tes solventes: 9,9 g de residuo clorofórmico, 13,8 g de residuo acuoso y 1,1 g de residuo metanólico.

Estudio del percolado acuoso: 7 g de este residuo se disolvieron en agua y se llevaron a pH = 12 con  $K_2CO_3$ . Se agregó solución sa-



turada de sal de Reinecke,  $(Cr(SCN)_4(NH_3)_2)NH_4$ , hasta que no se formara más precipitado en el sobrenadante. Se filtró y el precipitado así obtenido se disolvió en acetona, desechándose el in soluble. Por evaporación de la solución se obtuvieron 313 mg de reineckato.

La eliminación del anión de la sal compleja se efectuó pasando el reineckato disuelto en acetona por una columna de intercambio aniónica Amberlite IRA-400 ( $HO^-$ ), armada en metanol. Por evaporación del solvente se obtuvieron 60 mg de base libre que fueron purificados por cromatografía en columna de alúmina neutra (6 g) usando como solvente de elución  $Cl_3CH-MeOH-AcOH$ , 100 : 10 : 1. Se aislaron 26 mg del compuesto 11 caracterizado como colina.

El filtrado resultante de la precipitación del reineckato de 11 se acidificó con HCl (c) hasta pH = 1. Se efectuó la precipitación de protoalcaloides agregando solución saturada de sal de Reinecke, como se describe previamente. Se filtró y el precipitado resultante se disolvió en acetona. Por evaporación de la solución acetónica se obtuvo un residuo (1,2 g) que se liberó del anión complejo cromatografiándolo en una columna de sílicagel H usando  $MeOH-NH_4OH$ , 10 : 0,5, como eluyente. Se obtuvieron 180 mg del compuesto 9 caracterizado como betaína.

En el resto acuoso se detectaron aminoácidos.

Estudio del percolado metanólico: 517 mg de este residuo se cromatografiaron en una columna de Sephadex LH-20 (33 g, 20x400 mm) usando metanol como eluyente. Se obtuvieron cuatro fracciones principales:

La fracción 1 (159,8 mg) fue la única que dio reacción de Shinoda negativa y no fue estudiada.

La fracción 2 (207,4 mg) fue purificada por cromatografía en columna de sílicagel H (21 g, 20x180 mm) con  $AcOEt-MeOH-H_2O$ , 15 : 1,5 : 1. La fracción principal dio por evaporación un residuo amarillo (67 mg) homogéneo por C.C.D., caracterizado como isoramnetina-3-O-robinobiósido 116.

Las fracciones 3 y 4 (71 y 59 mg respectivamente) resulta

ron ser mezclas complejas de flavonoides ( glicósidos ) en baja proporción de fácil descomposición, que no fueron analizadas.

El percolado clorofórmico no fue estudiado por ser similar al extracto de éter de petróleo.

Datos de los compuestos aislados de *Gomphrena martiana*

Compuestos obtenidos del fraccionamiento del Precipitado 1

3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxi-flavona 98:

pf: 198-200° ( EtOH ) ( Lit: 192,5-193,5° ( EtOH ), sintético <sup>251</sup>).

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ : 313,0; 269 nm. No se observaron cambios en presencia de AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl, NaMeO, NaAcO y NaAcO/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

I.R. (cm<sup>-1</sup>): 1620 ( tens. CO ), 1025 (tens. =C-O-), 815 y 780 ( def. =C-H ).

E.M. m/e ( % ): 328 ( M<sup>+</sup>+ 2; 2,6 ), 327 ( M<sup>+</sup>+ 1; 18,0 ), 326 ( M<sup>+</sup>; 96,3 ), 325 ( M<sup>+</sup>- 1; 100 ), 307 ( M<sup>+</sup>- 1 - 18; 29,4 ), 297 ( M<sup>+</sup>- 1 - 28; 37,0 ), 279 ( 297 - 18; 12,9 ), 195 ( A + H; 8,4 ), 194 ( A<sup>+</sup>; 30,4 ), 164 ( 194 - 30; 10,2 ), 149 ( M - CO<sup>+2</sup>; 12,7 ), 105 ( PhCO<sup>+</sup>; 35,6 ), 77 ( Ph<sup>+</sup>; 45,7 ), 63 ( 11,1 ), 53 ( 23,6 ), 51 ( 12,6 ).

<sup>1</sup>H-RMN ( 60 MHz; Cl<sub>3</sub>CD ) ppm : 3,87 ( 3H, s, MeO-3 ); 4,12 ( 3H, s, MeO-5 ); 6,02 ( 2H, s, -OCH<sub>2</sub>O- ); 6,63 ( 1H, s, H-8 ), 7,43 ( 3H, m, H-3',4'y 5' ); 8,00 ( 2H, m, H-2'y 6' ).  
( 60 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> ) ppm : 3,83 ( 3H, s, MeO-3 ), 4,00 ( 3H, s, MeO-5 ); 5,13 ( 2H, s, -OCH<sub>2</sub>O- ).

<sup>13</sup>C-RMN ( 25,2 MHz; Cl<sub>3</sub>CD ) ppm: 60,0 ( MeO-3 ); 61,1 ( MeO-5 ); 92,9 ( C-8 ); 102,0 ( -OCH<sub>2</sub>O- ); 113,1 ( C-10 ); 127,9 ( C-2' y C-6' ); 128,3 ( C-3' y C-5' ); 130,2 ( C-4' ); 130,6 ( C-1' ); 134,6 ( C-6 ); 140,9 ( C-3 )<sup>a</sup>; 141,2 ( C-5 )<sup>a</sup>; 152,6 ( C-9 )<sup>b</sup>; 152,8 ( C-2 )<sup>b</sup>; 153,6 ( C-7 );

173,8 ( C-4 ).

a, b Los valores pueden intercambiarse.

Microanálisis: C = 66,21 %; H = 4,5 %.  $C_{18}H_{14}O_6$  requiere  
C = 66,26 % ; H = 4,30 %.

*Demetilación de 3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxiflavona 98*: obtención de  
5-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilendioxiflavona 99.

La demetilación selectiva de MeO-5 se efectuó de acuerdo al método de Briggs y Locker <sup>248</sup>.

47,8 mg de 98 (  $1,5 \cdot 10^{-4}$  moles ) fueron disueltos en 10 ml de una solución de 3,1 g de  $AlCl_3$  anhidro en 15 ml de éter etílico anhidro. La solución obtenida fue reflujaada durante 9 hs y al cabo de ese tiempo volcada sobre 50 ml de agua. Se filtró el sólido amarillo formado y se procedió a hidrolizar el complejo flavonoide-Al con una solución de 10 ml de ácido acético glacial y 5 ml de HCl ( c ), a reflujo durante 30 minutos. Se volcó la solución resultante sobre 75 ml de agua, se filtró y se secó el producto crudo ( 29,1 mg ). Luego de recrystalizar de metanol-benceno se obtuvieron 18,8 mg (  $0,6 \cdot 10^{-4}$  moles; R= 40 % ) de 99.

Se usó otro método que mejoró el rendimiento <sup>249</sup>. Para ello, 51,2 mg de 98 (  $1,6 \cdot 10^{-4}$  moles ) se disolvieron en 7 ml de acetonitrilo destilado y se agregaron 1,2 ml de una solución preparada con 243,5 mg de  $AlCl_3$  anhidro y 5 ml de acetonitrilo. Después de mantener la solución obtenida 6 hs a reflujo, se evaporó el solvente y se agregaron 15 ml de HCl ( 1 : 1 ). La suspensión formada fue agitada durante 30 minutos, observando cambios de color de anaranjado a amarillo. Se filtró y se lavó hasta neutralidad. El producto crudo fue purificado por cromatografía en columna de sílicagel H usando como solvente de elución benceno-acetona, 96 : 4 . Se obtuvieron 35,7 mg (  $1,1 \cdot 10^{-4}$  moles; R= 69 % ) de 5-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilendioxiflavona 99.

pf: 186 - 188° ( MeOH-benceno )

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ : 323,0; 273,0; 251,0 ( h ) nm, NaMeO: 288 nm,  $AlCl_3$ :

350,0; 285,0 nm, NaAcO: 286 nm, NaAcO/BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub>: 322,0; 273,0; 251,0 ( h ) nm.

I.R. ( cm<sup>-1</sup> ): 1630 ( tens. CO ), 1010 ( tens. =C-O- ), 810 y 775 ( def. =C-H ).

E.M. m/e ( % ): 314 ( M<sup>+</sup>+ 2; 2,7 ), 313 ( M<sup>+</sup>+ 1; 18,2 ), 312 ( M<sup>+</sup>, 92,3 ), 311 ( M<sup>+</sup>- 1; 100 ), 294 ( M<sup>+</sup>- 18, 15,3 ), 293 ( M<sup>+</sup>- 1 - 18; 14,1 ), 181 ( A + H<sup>+</sup>; 12,2 ), 180 ( A<sup>+</sup>; 19,3 ), 142 ( M - CO<sup>+2</sup>; 14,3 ), 105 ( PhCO<sup>+</sup>; 54,1 ), 77 ( Ph<sup>+</sup>; 46,8 ).

<sup>1</sup>H-RMN ( 60 MHz, Cl<sub>3</sub>CD ) ppm: 3,87 ( 3H, s, MeO-3 ); 6,08 ( 2H, s, -OCH<sub>2</sub>O- ); 6,53 ( 1H, s, H-8 ); 7,51 ( 3H, m, H-3',4' y 5' ); 8,05 ( 2H, m, H-2' y 6' ); 12,85 ( 1H, s, HO-5 ).

<sup>13</sup>C-RMN ( 20,0 MHz, Cl<sub>3</sub>CD ): 60,1 ( MeO-3 ); 89,0 ( C-8 ); 102,0 ( -OCH<sub>2</sub>O- ); 108,1 ( C-10 ); 128,2 ( C-2' y C-6' ); 128,5 ( C-3' y C-5' ); 129,6 ( C-6 ); 130,3 ( C-1' ); 130,8 ( C-4' ); 139,4 ( C-3 ); 141,7 ( C-5 ); 152,4 ( C-9 ); 154,1 ( C-7 ); 155,8 ( C-2 ); 179,2 ( C-4 ).

Microanálisis: C = 65,46 %; H = 4,00 %. C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> requiere C = 65,38 %; H = 3,85 %.

*5,7-dihidróxi-3,6-dimetoxiflavona* 100:

pf: 175 - 176° ( EtOH ) (Lit.: 168 - 169°sintético <sup>252</sup>).

U.V. λ<sub>máx</sub><sup>MeOH</sup>: 323,0; 270,5 nm, NaMeO: 360,0; 272,0 nm, AlCl<sub>3</sub>: 342,0; 281,5 nm, AlCl<sub>3</sub>/HCl: 342,0; 281,5 nm, NaAcO: 360,0; 272,0 nm, NaAcO/BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub>: 323,0; 270,5 nm.

I.R. ( cm<sup>-1</sup> ) : 3300 ( tens. O-H ), 1645 ( tens. CO ), 1180 ( tens. =C-O- ), 820 y 770 ( def. =C-H ).

E.M. m/e ( % ) : 316 ( M<sup>+</sup>+ 2; 2,5 ), 315 ( M<sup>+</sup>+ 1; 18,8 ), 314 314 ( M<sup>+</sup>; 100 ), 313 ( M<sup>+</sup>- 1; 43,5 ), 299 ( M - 15; 41,7 ), 296 ( M<sup>+</sup>- 18; 28,1 ), 295 ( M - 1 - 18; 17,1 ), 271 ( M - 43; 40,9 ), 253 ( 271 - 18; 12,3 ), 228 ( 11,2 ); 167 ( A<sub>1</sub> - 15<sup>+</sup>; 6,1 ), 118 ( 12,1 ), 115 ( 11,7 ), 105

(  $\text{PhCO}^+$ ; 20,9 ), 77 (  $\text{Ph}^+$ ; 13,4 ), 69 (  $\text{C}_3\text{HO}_2^+$ ; 27,1 ).

$^1\text{H-RMN}$  ( 60 MHz,  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ) ppm: 3,87 ( 3H, s, MeO-3 ); 4,05 ( 3H, s, MeO-6 ); 6,58 ( 1H, s, H-8 ); 7,52 ( 3H, m, H-3', 4' y 5' ); 8,08 ( 2H, m, H-2' y 6' ); 12,87 ( 1H, s, HO-5 ).  
( 60 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$  ) ppm: 3,65 y 3,67 ( 6H, 2. singuletes, MeO-3 y MeO-6 ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( 20,0 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$  ) ppm: 61,0 ( MeO-3 y MeO-6 ); 95,1 ( C-8 ); 105,9 ( C-10 ); 129,2 ( C-2' y C-6' ); 129,7 ( C-3' y C-5' ); 131,1 ( C-6 ); 132,0 ( C-4' ); 132,3 ( C-1' ); 140,2 ( C-3 ); 152,8<sup>a</sup> ( C-5 ); 153,4<sup>a</sup> ( C-9 ); 156,2<sup>b</sup> ( C-2 ); 158,7<sup>b</sup> ( C-7 ); 179,4 ( C-4 ).

<sup>a, b</sup> Las señales pueden intercambiarse.

*Metilación de 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona: obtención de 3,5,6,7-tetrametoxiflavona 114.*

Se disolvieron 33,4 mg de 100 (  $1,1 \cdot 10^{-4}$  moles ) en 6 ml de acetona y se agregaron 0,15 ml de sulfato de metilo y 370 mg de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Luego de 6 hs de reflujo, no se observaron compuestos fenólicos por C.C.D. . Se filtró y evaporó la mezcla de reacción. El residuo obtenido se cromatografió en una columna de alúmina neutra con benceno-acetona, 95 : 5, como solvente de elución. Se obtuvieron 23 mg (  $0,7 \cdot 10^{-4}$  moles; R = 64% ) de 114 como aceite incoloro que cristalizó luego de un día.

*5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101:*

pf: 200 - 201° ( MeOH ) ( Lit.: 231-2°<sup>253</sup>; 219°<sup>257</sup> ).

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$  : 317,0; 270,0; 247(h) nm , NaMeO: 365,0; 270,0; 241,0 nm,  $\text{AlCl}_3$ : 339,0; 281,5; 253,0 nm,  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ : 339,0; 281,5; 253,0 nm, NaAcO: 365,0; 271,0 nm, NaAcO/ $\text{BO}_3\text{H}_3$ : 365,0; 271,0 nm.

I.R. (  $\text{cm}^{-1}$  ) : 3300-2500 ( banda ancha, tens. O-H ), 1650 ( tens. CO ), 1100 ( tens. =C-O- ), 800 y 755 ( def. =C-H ).

E.M. m/e ( % ): 285 (  $M^+ + 1$ ; 18,2 ), 284 (  $M^+$ , 100 ), 283 (  $M^+ - 1$ ; 7 ), 269 (  $M^+ - 15$ ; 68 ), 267 (  $M^+ - 17$ ; 9 ), 266 (  $M^+ - 18$ ; 47 ), 241 (  $M^+ - 15 - 28$ ; 55 ), 167 (  $A_1^{+ \cdot} - 15$ ; 12 ), 139 (  $A_1^{+ \cdot} - 15 - 28$ ; 27 ), 105 (  $PhCO^+$ , 4 ), 103 ( 15 ), 102 (  $B_1^{+ \cdot}$ ; 9 ), 77 (  $Ph^+$ , 15 ), 69 (  $C_3HO_2$ ; 89 ).

*Deuteración de 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101:*

Se disolvieron 4 mg de 101 en 3 ml de éter etílico anhidro, y se agregaron 3 gotas de agua deuterada. Luego de agitar durante 5 min., se evaporó el solvente. El mismo proceso se repitió 3 veces. La composición isotópica del compuesto obtenido fue: 21,3 %  $d_0$ ; 48,3 %  $d_1$  y 30,3 % de  $d_2$  ( los valores de desplazamiento isotópico están corregidos por las contribuciones de  $^{13}C$ , pág. 162 ).

$^1H$ -RMN ( 60 MHz,  $Cl_3CD$  ) ppm: 4,05 ( 3H, s, MeO-6 ); 6,62 ( 1H, s, H-3 ó H-8 ); 6,67 ( 1H, s, H-3 ó H-8 ); 7,53 ( 3H, m, H-3', 4' y 5' ); 7,90 ( 2H, m, H-2' y 6' ); 12,97 ( 1H, s, HO-5 ). ( 60 MHz,  $C_6D_6$  ) ppm: 3,67 ( 3H, s, MeO-6 ). ( 100 MHz, acetona- $d_6$  ) ppm: 3,97 ( 3H, s, MeO-6 ); 6,78 ( 1H, s, H-8 ); 6,90 ( 1H, s, H-3 ); 7,73 ( 3H, m, H-3', H-4' y H-5' ); 8,23 ( 2H, m, H-2' y 6' ); 9,48 ( 1H, s ancho, HO-7 ); 13,45 ( 1H, s ancho, HO-5 ).

$^{13}C$ -RMN ( 20,0 MHz,  $DMSO-d_6$  ) ppm: 61,1 ( MeO-6 ); 95,6 ( C-8 ); 105,5 ( C-10 ); 105,8 ( C-3 ); 127,5 ( C-2' y C-6' ); 130,3 ( C-3' y C-5' ); 131,9 ( C-6 ); 132,7 ( C-1' ); 133,1 ( C-4' ); 153,7<sup>a</sup> ( C-5 ); 153,9<sup>a</sup> ( C-9 ); 158,7 ( C-7 ); 164,4 ( C-2 ), 183,4 ( C-4 ).

<sup>a</sup> Los valores pueden intercambiarse.

*Acetilación de 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101: obtención de 5,7-diacetoxi-6-metoxiflavona 103.*

10,3 mg de 101 se acetilaron por el método descrito en la parte general, obteniéndose 13,6 mg de 103 p.f: 142 - 144 ° ( MeOH ) ( Lit.: 143 ° <sup>257</sup> ).

E.M. m/e ( % ): 368 (  $M^+$ ; 9,6 ), 326 (  $M^+ - 42$ , 100 ), 284 (  $M^+ - 42 - 42$ ; 97 ), 283 (  $M^+ - 1$ , 15,8 ), 269 ( 284 - 15; 92,9 ), 267 ( 284 - 17; 26,3 ), 266 ( 284 - 18; 98 ), 255 ( 284 - 1 - 28; 29,8 ), 241 ( 284 - 15 - 28; 51,9 ), 238 ( 284 - 18 - 28; 17,3 ); 153 ( 34,6 ), 139 (  $A_1^+$  - 42 - 42 - 15 - 28; 34,6 ), 105 (  $PhCO^+$ , 11,8 ), 102 (  $B_1^+$ ; 11,0 ), 77 (  $Ph^+$ ; 6,3 ), 69 (  $C_3HO_2$ ; 67,7 ).

$^1H$ -RMN ( 100 MHz,  $Cl_3CD$  ) ppm: 2,35 ( 3H, s,  $MeCO_2-5$  ó  $MeCO_2-7$  ); 2,46 ( 3H, s,  $MeCO_2-5$  ó  $MeCO_2-7$  ); 3,84 ( 3H, s, MeO-6 ); 6,55 ( 1H, s, H-3 ); 7,20 ( 1H, s, H-8 ); 7,44 ( 3H, m, H-3',4' y 5' ); 7,75 ( 2H, m, H-2' y 6' ).

Metilación de 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101: obtención de 5,6,7-trimetoxiflavona 102.

Se disolvieron 30 mg de 101 en 10 ml de acetona y se agregaron 0,1 ml de sulfato de metilo y 60 mg de  $K_2CO_3$  anhidro. Luego de 3 hs de reflujo se filtró y evaporó la solución. El residuo resultante se cromatografió en una columna de alúmina neutra con benceno-acetona, 95 : 5, obteniéndose 20,5 mg de 102 crudo ( R = 66 % ).

p.f.: 166 - 167 ° ( EtOH )

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}^{MeOH}$  : 304,0; 263,0 nm. No se observaron cambios al agregar  $AlCl_3$ ,  $AlCl_3/HCl$ ,  $NaMeO$ ,  $NaAcO$  y  $NaMeO/BO_3H_3$ .

I.R. (  $cm^{-1}$  ): 1630 ( tens. CO ), 1100 ( tens. =C-O- ), 850 y 770 ( def. =C-H ).

E.M. m/e ( % ): 313 (  $M^+ + 1$ ; 5,1 ), 312 (  $M^+$ ; 24,9 ), 311 (  $M^+ - 1$ , 2,5 ), 297 (  $M^+ - 15$ , 100 ), 269 (  $M^+ - 15 - 28$ ; 6,7 ), 254 (  $M^+ - 15 - 15 - 28$ ; 12,0 ), 195 (  $A_1^+$  - 15; 2,3 ), 167 (  $A_1^+$  15 - 28; 11,9 ), 105 (  $PhCO^+$ ; 23,0 ), 102 (  $B_1^+$ ; 2,4 ), 77 (  $Ph^+$ ; 3,4 ), 69 (  $C_3HO_2$ ; 9,0 ).

$^1H$ -RMN ( 60 MHz,  $Cl_3CD$  ) ppm: 3,91 ( 3H, s, MeO-6 ); 3,96 ( 3H, s, MeO-7 ); 3,99 ( 3H, s, MeO-5 ); 6,65 ( 1H, s, H-3 ); 6,84 ( 1H, s, H-8 ); 7,49 ( 3H, m, H-3',4' y 5' ); 7,83 ( 3H, s, H-2' y 6' ). ( 60 MHz,  $C_6D_6$  ) ppm: 4,08 ( 3H,

s, MeO-5 ); 3,80 ( 3H, s, MeO-6 ); 3,31 ( 3H, s, MeO-7 ).

*3,5,7-trimetoxiflavona 104:*

p.f.: 201 - 203 ° ( MeOH ) ( Lit.: 199 - 200 ° <sup>258</sup> ).

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ : 323,5; 297,5; 262,0; 241,0 nm. No se observaron cambios al agregar  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ ,  $\text{NaAcO}$ ,  $\text{NaAcO}/\text{BO}_3\text{H}_3$  y  $\text{NaMeO}$ .

I.R. (  $\text{cm}^{-1}$  ): 1625 ( tens. CO ), 875, 825 y 790 ( def. =C-H ).

E.M. m/e ( % ): 314 (  $\text{M}^+ + 2$ ; 1,2 ), 313 (  $\text{M}^+ + 1$ ; 10,9 ), 312 (  $\text{M}^+$ ; 85,3 ), 311 (  $\text{M}^+ - 1$ ; 100 ), 297 (  $\text{M}^+ - 15$ ; 6,7 ), 294 (  $\text{M}^+ - 18$ ; 8,3 ), 293 (  $\text{M}^+ - 1 - 18$ ; 37,0 ), 181 (  $\text{A}_1^+ + \text{H}^+$ ; 7,7 ), 180 (  $\text{A}_1^+$ ; 5,1 ), 142 (  $\text{M} - \text{CO}^{+2}$ ; 22,3 ), 105 (  $\text{PhCO}^+$ ; 26,1 ), 77 (  $\text{Ph}^+$ ; 26,9 ).

$^1\text{H-RMN}$  ( 60 MHz,  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ) ppm: 3,88 ( 6H, s, MeO-3 y MeO-7 ); 3,96 ( 3H, s, MeO-5 ); 6,33 ( 1H, d,  $J = 2$  Hz, H-6 ); 6,50 ( 1H, d,  $J = 2$  Hz, H-8 ); 7,46 ( 3H, m, H-3', 4' y 5' ); 8,04 ( 2H, m, H-2' y 6' ).

*Síntesis de 3,5,7-trimetoxiflavona 104:*

Síntesis de *w*-metoxi-2,4,6-trihidroxiacetofenona 106 <sup>259</sup>: 20 g ( 0,159 moles ) de floroglucina ( 2,4,6-trihidroxibenceno ), previamente secada a 120 ° durante 12 hs, se disolvieron en 100 ml de éter etílico anhidro. A la solución anterior se agregaron sucesivamente 11,5 g ( 0,162 moles ) de acetonitrilo <sup>295</sup> y 4 g de  $\text{ZnCl}_2$  recién fundido. Se llevó a 0°C y se burbujeó  $\text{HCl}$  seco durante 3 hs. Al finalizar el burbujeo se observó una gran cantidad de precipitado. Luego de dejar en la heladera durante 48 hs, se decantó el éter y se lavó el precipitado con éter seco. Se recristalizó el sólido de metanol obteniéndose 13,9 g de clorhidrato de 2,4,6-trihidroxi-*w*-metoxicetiminofenona ( 0,06 moles;  $R = 38$  % ), que se suspendieron en 150 ml de agua destilada; la mezcla se calentó a reflujo durante una hora. Luego de tratar con carbón activado se obtuvieron 9,9 g ( 0,05 moles,  $R =$



83 % ) de 106.

Obtención de 5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona <sup>260</sup>: se molieron en un mortero 2,0 g (  $1,0 \cdot 10^{-2}$  moles ) de 106; 7,3 g (  $5,0 \cdot 10^{-2}$  moles ) de benzoato de sodio y 11,4 g (  $5,0 \cdot 10^{-2}$  moles ) de anhídrido benzoico. Se colocó la mezcla de sólidos en un balón conectado a una bomba de agua y se calentó a 190°C en baño de aceite durante 4 hs, homogeneizando el contenido del balón cada hora con una varilla de vidrio. La mezcla de reacción se llevó a ebullición con 30 ml de una solución de KOH 10 % en MeOH-H<sub>2</sub>O, 9 : 1. Se evaporó el solvente y se disolvió el residuo en agua. A continuación, se hizo burbujear CO<sub>2</sub> hasta pH = 7. Se dejó en reposo una noche y se produjo una abundante precipitación que se recristalizó de MeOH-H<sub>2</sub>O, obteniéndose 1,3 g de 5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona (  $0,46 \cdot 10^{-2}$ , R = 46 % ).

Síntesis de 3,5,7-trihidroxiflavona 104: se metilaron 150 mg (  $5,3 \cdot 10^{-4}$  moles ) de 5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona según el método indicado en la pág. 218, obteniéndose 115,4 mg (  $3,7 \cdot 10^{-4}$  moles; R = 70 % ) de 104.

### Compuestos obtenidos del fraccionamiento del Residuo 1

#### *Hidrocarburos:*

Se analizaron por C.G.L. utilizando una columna OV-17 3 %, de 1,8 m de longitud a T = 260 °C ( isotérmica ), obteniéndose los siguientes resultados:

Tr ( fórmula, % ) min: 2,33 ( nC<sub>29</sub>H<sub>60</sub>; 2,7 ); 3,35 ( isoC<sub>31</sub>H<sub>64</sub>; 17,4 ); 3,70 ( nC<sub>31</sub>H<sub>64</sub>; 21,1 ); 4,73 ( nC<sub>32</sub>H<sub>66</sub>; 1,3 ); 5,32 ( isoC<sub>33</sub>H<sub>68</sub>; 4,3 ); 5,98 ( nC<sub>33</sub>H<sub>68</sub>; 35,0 ); 7,59 ( nC<sub>34</sub>H<sub>70</sub>; 1,3 ); 9,59 ( nC<sub>35</sub>H<sub>72</sub>; 16,0 ).

El análisis por C.G.L.-E.M. se efectuó utilizando una columna OV-17 3 %, 1,8 m a T = 200°—290°C, 10°C/min.

isoC<sub>31</sub>H<sub>64</sub>, E.M. m/e ( % ): 436 ( M<sup>+</sup>; 1,6 ), 421 ( M<sup>+</sup>- 15; 1,6 ), 394 ( 2,4 ), 393 ( M<sup>+</sup>- 43; 7,3 ), 392 ( 2,1 ), 281 ( 1,0 )

267 ( 1,7 ); 253 ( 2,8 ), 239 ( 3,5 ), 225 ( 4,7 ); 211 ( 6,3 ); 197 ( 6,8 ); 183 ( 8,6 ); 169 ( 10,3 ); 155 ( 11,3 ); 141 ( 13,1 ); 127 ( 17,7 ); 113 ( 22,5 ); 99 ( 22,1 ); 85 ( 47,5 ); 71 ( 66,7 ); 57 ( 92,9 ); 43 ( 100 ).

*iso* C<sub>33</sub>H<sub>68</sub>, E.M. m/e ( % ): 464 ( M<sup>+</sup>; 1,7 ), 449 ( M<sup>+</sup>- 15; 1,8 ), 422 ( 2,3 ), 421 ( M<sup>+</sup>- 43; 6,1 ), 420 ( 1,9 ), 281 ( 1,5 ), 267 ( 2,0 ), 253 ( 2,4 ), 239 ( 2,8 ), 225 ( 3,1 ), 211 ( 5,9 ), 197 ( 6,5 ), 183 ( 7,9 ), 169 ( 9,5 ), 155 ( 10,1 ), 141 ( 12,7 ), 127 ( 15,6 ), 113 ( 19,8 ), 99 ( 20,3 ), 85 ( 45,1 ), 71 ( 63,0 ), 57 ( 85,0 ), 43 ( 100 ).

#### *Alcoholes lineales:*

p.f.: 81-82 °C ( acetona )

I.R. ( cm<sup>-1</sup> ): 3300 ( banda ancha, tens. O-H ), 740 y 730 ( def. -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- ).

<sup>1</sup>H-RMN ( 60 MHz, Cl<sub>3</sub>CD ) ppm: 0,9 ( d deformado, Me- ); 1,26 ( s, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- ); 3,66 ( t, -CH<sub>2</sub>-OH ).

El análisis de esta fracción por C.G.L. se realizó utilizando una columna SE-30 3%, 1,8 m a T = 250°C ( isotérmica ), obteniéndose los siguientes resultados:

Tr ( fórmula, % ) min: 7,43 ( C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>O; 4,3 ); 9,67 ( C<sub>25</sub>H<sub>52</sub>O; 1,0 ); 12,53 ( C<sub>26</sub>H<sub>54</sub>O; 31,6 ); 16,27 ( C<sub>27</sub>H<sub>56</sub>O; 3,3 ); 21,21 ( C<sub>28</sub>H<sub>58</sub>O; 44,3 ); 27,47 ( C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>O; 1,7 ); 35,49 ( C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>O; 13,2 ).

El análisis por C.G.L.-E.M. se efectuó utilizando una columna OV-17 3 %, 1,8 m a T = 200° → 286°C, 10°C/min.

#### *Triterpenos:*

El análisis por C.G.L.-E.M. ( OV-17 3 %, 1,8 m, T = 280° ( isotérmica ) ) permitió obtener los espectros de masas de los compuestos β-amirina 107, ciclolaudenol 83 y hopeol 109.

β-amirina 107, E.M. m/e ( % ): 427 ( M<sup>+</sup>+ 1; 5,1 ), 426 ( M<sup>+</sup>; 16,3 ), 411 ( M<sup>+</sup>- 15; 7,1 ), 393 ( M<sup>+</sup>- 15 - 18; 1,6 ), 218 ( RDA, anillos D y E; 100 ), 207 ( anillos A y B; 8,2 ), 205 ( a-

nillos D y E; 11,0 ), 204 ( 19,0 ), 203 ( 218 - 15; 33,6 ), 189 ( 207 - 18 y/o anillos D y E - 29; 22,2 ), 177 ( 11,3 ), 175 ( 12,1 ), 135 ( 12,3 ), 133 ( 218 - 15 - 70; 13,7 ), 121 ( 17,2 ), 119 ( 17,5 ), 117 ( 5,1 ), 109 ( 17,3 ), 107 ( 20,8 ), 105 ( 18,9 ), 95 ( 20,0 ), 93 ( 12,8 ), 81 ( 13,8 ), 69 ( 22,8 ), 55 ( 14,1 ), 43 ( 12,5 ).

Ciclolaudenol 83, E.M. m/e ( % ): 441 (  $M^+$  + 1; 1,3 ), 440 (  $M^+$ ; 4,8 ), 425 (  $M^+$  - 15; 1,2 ), 422 (  $M^+$  - 18; 16,4 ), 407 (  $M^+$  - 15 - 18; 11,6 ), 397 (  $M^+$  - 43, 4,3 ), 379 (  $M^+$  - 18 - 43; 10,1 ), 353 (  $M^+$  - 18 - 69; 3,1 ), 315 (  $M^+$  - cadena lateral; 3,5 ), 313 ( 7,3 ), 301 ( 3,6 ), 300 (  $M^+$  - anillo A - C-6 - C-19; 11,0 ), 297 ( 315 - 18; 4,1 ), 285 ( 300 - 15; 3,7 ), 216 ( 7,1 ), 175 (  $M^+$  - cadena lateral - 140; 8,5 ), 173 ( 13,1 ), 161 ( 12,4 ), 149 ( 10,5 ), 147 ( 14,9 ), 135 ( 18,4 ), 133 ( 12,0 ), 123 ( 11,9 ), 121 ( 24,1 ), 119 ( 25,2 ), 109 ( 20,5 ), 107 ( 31,9 ), 105 ( 22,8 ), 55 ( 100 ), 43 ( 77 ), 41 ( 65,1 ).

Hopeol 109, E.M. m/e ( % ): 427 (  $M^+$  + 1; 40,5 ), 426 (  $M^+$ ; 95,0 ), 411 (  $M^+$  - 15; 7,5 ), 409 (  $M^+$  - 17; 12,1 ), 408 (  $M^+$  - 18; 9,2 ), 272 ( 14,5 ), 257 ( 6,9 ), 229 ( 18,5 ), 217 ( anillos D y E + C-11 + C-12; 15,0 ), 208 ( RDA, anillos A y B; 26,6 ), 207 ( anillos A y B - H; 79,2 ), 206 ( 15,6 ), 204 ( 14,5 ), 203 ( 11,0 ), 201 ( 13,3 ), 189 ( RDA, anillos D y E - H; 100 ), 179 ( 11,0 ), 176 ( 13,3 ), 175 ( RDA, anillos D y E - 15 y/o 208 - 18 - 15; 24,3 ), 162 ( 14,5 ), 139 ( 10,4 ), 136 ( 28,3 ), 135 ( 34,7 ), 134 ( 19,1 ), 133 ( 23,1 ), 124 ( 11,0 ), 123 ( 26,0 ), 122 ( 28,3 ), 121 ( 48,0 ), 120 ( 15,0 ), 119 ( 29,5 ), 109 ( 53,2 ), 108 ( 22,0 ), 107 ( 43,9 ), 105 ( 24,9 ), 95 ( 43,9 ), 94 ( 23,7 ), 93 ( 37,6 ), 81 ( 24,9 ), 79 ( 25,4 ), 67 ( 32,9 ), 55 ( 61,8 ), 43 ( 45,7 ).

Las comparaciones cromatográficas ( C.G.L. ) con testigos se efectuaron en las siguientes condiciones:

$\beta$ -amirina ( Tr = 7,2 min ) OV-101, 2 %, 1,2 m a T = 200°—270°C , 10°C / min. acetato de  $\beta$ -amirina ( Tr = 8,2 min )

OV-17, 3 %, 1,8 m a T = 200°—280°C, 20°C / min.

Ciclolaudenol ( Tr = 8,30 min ) OV-17, 3 %, 1,8 m a T = 280°C ( isotérmica ). ( Tr = 8,48 min ) OV-101, 2 %, 1,2 m a T = 220°—270°C / min.

*Esteroles:*

El análisis de la mezcla y su comparación con testigos se efectuó por C.G.L.:

SE-30, 3 % a T = 270°C ( isotérmica ): colesterol 110 ( Tr = 8,91 min ); campesterol 111 ( Tr = 11,17 min ); estigmasterol 112 ( Tr = 11,97 min ) y sitosterol 113 ( Tr = 13,65 min ).

Los espectros de masas de estos compuestos se determinaron por C.G.L.-E.M. utilizando una columna OV-17, 3 %, 1,8 m a T = 200°—288°C, 10°C / min; obteniéndose los siguientes datos:

Colesterol 110, E.M. m/e ( % ): 387 ( M<sup>+</sup>+ 1; 23,6 ), 386 ( M<sup>+</sup>; 86,5 ), 371 ( M<sup>+</sup>- 15; 22,0 ), 368 ( M<sup>+</sup>- 18; 30,1 ), 353 ( M<sup>+</sup>- 15 - 18; 21,6 ), 301 ( M<sup>+</sup> - 85 ; 27,2 ), 275 ( M - 111 ; 23,4 ), 273 ( M - cadena lateral; 14,1 ), 255 ( 273 - 18; 13,5 ), 247 ( M<sup>+</sup> - 139 ; 5,8 ), 231 ( 273 - 42; 11,2 ), 213 ( 255 - 42; 19,6 ), 173 ( 11,4 ), 163 ( 13,6 ), 161 ( 18,3 ), 160 ( 13,8 ), 159 ( 21,8 ), 149 ( 10,7 ), 145 ( 33,8 ), 143 ( 11,2 ), 135 ( 11,1 ), 133 ( 24,5 ), 131 ( 17,6 ), 129 ( 10,6 ), 121 ( 18,1 ), 120 ( 15,9 ), 119 ( 24,8 ), 117 ( 14,6 ), 109 ( 15,4 ), 107 ( 37,3 ), 106 ( 19,7 ), 105 ( 35,3 ), 95 ( 34,8 ), 93 ( 34,8 ), 91 ( 35,6 ), 83 ( 11,9 ), 81 ( 29,6 ), 79 ( 32,2 ), 77 ( 11,9 ), 71 ( 14,0 ), 69 ( 18,9 ), 67(22,4), 57 ( 44,1 ), 55 ( 43,6 ), 43 ( 100 ), 41 ( 100 ).

Campesterol 111, E.M. m/e ( % ): 401 ( M<sup>+</sup>+ 1; 17,4 ), 400 ( M<sup>+</sup>, 17,4 ), 385 ( M<sup>+</sup>- 15; 9,3 ), 382 ( M<sup>+</sup>- 18; 17,4 ), 367 ( M<sup>+</sup>- 15 - 18; 8,1 ), 315 ( M<sup>+</sup>- 85; 14,8 ), 289 ( M<sup>+</sup>- 111, 9,5 ), 273 ( M - cadena lateral; 1,2 ), 261 ( M - 139; 3,1 ), 213 ( 273 - 18 - 42; 4,7 ), 145 ( 11,2 ), 107 ( 13,8 ), 105 ( 17,2 ), 95 ( 15,7 ), 93 ( 12,3 ), 91 ( 15,7 ), 81 ( 15,4 ), 79 ( 15,1 ), 71 ( 12,3 ), 69 ( 11,2 ),

67 ( 13,5 ), 57 ( 21,2 ), 55 ( 34,6 ), 43 ( 100 ), 41 ( 38,8 ).

Estigmasterol 112, E.M. m/e ( % ): 413 (  $M^+ + 1$ ; 14,8 ), 412 (  $M^+$ , 43,3 ), 397 (  $M^+ - 15$ ; 4,3 ), 394 (  $M^+ - 18$ ; 5,2 ), 379 (  $M^+ - 18 - 15$ ; 5,7 ), 369 (  $M^+ - 43$ ; 4,1 ), 351 ( 369 - 18; 11,6 ), 300 (  $M^+ - 112$ ; 17,2 ), 273 (  $M^+$ -cadena lateral; 2,3 ), 272 ( 10,6 ), 271 (  $M^+$ - cadena lateral - 2H; 16,2 ), 255 ( 273 - 18; 8,2 ), 133 ( 10,2 ), 97 ( 16,5 ), 91 ( 12,9 ), 83 ( 39,1 ), 81 ( 32,0 ), 79 ( 15,5 ), 69 ( 50,2 ), 67 ( 19,1 ), 55 ( 100 ), 41 ( 39,7 ).

Sitosterol 113, E.M. m/e ( % ): 415 (  $M^+ + 1$ ; 3,9 ), 414 (  $M^+$ ; 10,6 ), 399 (  $M^+ - 15$ ; 1,3 ), 396 (  $M^+ - 18$ ; 4,1 ), 381 (  $M^+ - 15 - 18$ ; 2,1 ), 329 (  $M^+ - 85$ ; 4,3 ), 303 (  $M^+ - 111$ ; 3,9 ), 275 (  $M^+ - 139$ ; 1,1 ), 273 (  $M^+$ - cadena lateral; 2,1 ), 213 ( 273 - 42 - 18; 2,1 ), 69 ( 12,7 ), 57 ( 37,7 ), 55 ( 20,1 ), 43 ( 100 ), 41 ( 38,6 ).

*3,5,6,7-tetrametoxiflavona* 114:

p.f.: 113-114°C ( MeOH - H<sub>2</sub>O ) ( Lit.: 112-112,5°C <sup>282</sup> ).

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$  : 312,0; 261,0; 241,0 nm. No se observaron corrimientos con AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> / HCl, NaMeO, NaAcO y NaAcO/BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub>.

I.R. ( cm<sup>-1</sup> ): 1620 ( tens. CO ), 1100 ( tens. =C-O- ), 800 y 770 ( def. =C-H ).

E.M. m/e ( % ): 344 (  $M^+ + 2$ ; 1,8 ), 343 (  $M^+ + 1$ ; 56,7 ), 342 (  $M^+$ , 56,7 ), 341 (  $M^+ - 1$ ; 46,1 ), 327 (  $M^+ - 15$ ; 100 ), 324 (  $M^+ - 18$ ; 3,5 ), 323 (  $M^+ - 1 - 18$ ; 14,8 ), 284 (  $M^+ - 42$ , 19,3 ), 283 ( M - 43; 12,2 ), 211 ( A<sub>1</sub><sup>+</sup> H<sup>+</sup>; 3,3 ), 210 ( A<sub>1</sub><sup>+</sup>; 4,7 ), 195 ( A<sub>1</sub><sup>+</sup> - 15; 11,9 ), 167 ( A<sub>1</sub><sup>+</sup> - 15 - 28; 18,6 ), 105 ( PhCO<sup>+</sup>; 21,0 ), 77 ( Ph<sup>+</sup>; 12,8 ).

<sup>1</sup>H-RMN ( 60 MHz, Cl<sub>3</sub>CD ) ppm: 3,87 ( 3H, s, MeO-3 ); 3,91 ( 3H, s, MeO-6 ó MeO-7 ); 3,96 ( 3H, s, MeO-7 ó MeO-6 ); 4,02 ( 3H, s, MeO-5 ); 6,77 ( 1H, s, H-8 ); 7,50 ( 3H, m, H-3', H-4' y H-5' ); 8,08 ( 2H, m, H-2' y 6' ). ( 60 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> ) ppm: 3,27 ( 3H, s, MeO-7 ); 3,78 ( 3H, s, MeO-6 ); 3,83

( 3H, s, MeO-3 ); 4,07 ( 3H, s, MeO-5 ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( 25,2 MHz,  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ) ppm: 56,2 ( MeO-7 ); 60,0 ( MeO-3 ); 61,4<sup>a</sup> ( MeO-5 ); 62,1<sup>a</sup> ( MeO-6 ); 95,9 ( C-8 ); 113,0 ( C-10 ); 128,0 ( C-2' y C-6' ); 128,3 ( C-3' y C-5' ); 130,2 ( C-4' ); 130,7 ( C-1' ); 140,0 ( C-6 ); 141,2 ( C-3 ); 152,2<sup>b</sup> ( C-5 ); 153,0<sup>b</sup> ( C-2 ); 153,4<sup>b</sup> ( C-9 ); 157,5 ( C-7 ); 173,5 ( C-4 ).

<sup>a, b</sup> Los valores pueden intercambiarse.

*7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona* 115:

p.f.: 207 - 209 °C ( MeOH )

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$ : 310,0; 264,0; 242 ( h ) nm, NaMeO: 356,0; 268,0; 238 nm, NaAcO: 356,0; 269,0 nm, NaAcO /  $\text{BO}_3\text{H}_3$ : 310,0; 264,0; 242 ( h ) nm.

I.R. (  $\text{cm}^{-1}$  ): 3100 ( tens. O-H ), 1630 ( tens. CO ), 1100 ( tens. =C-H ), 850 y 770 ( def. =C-H ).

E.M. m/e ( % ): 298 (  $\text{M}^+$ ; 9,2 ), 283 (  $\text{M}^+ - 15$ ; 100 ), 281 (  $\text{M}^+ - 17$ ; 7,8 ), 267 (  $\text{M}^+ - 31$ ; 5,4 ), 255 (  $\text{M}^+ - 15 - 28$ ; 15,5 ), 181 (  $\text{A}_1^+ - 15$ ; 4,1 ), 153 (  $\text{A}_1^+ - 15 - 28$ ; 8,4 ), 119 ( 10,9 ); 117 ( 10,6 ), 105 (  $\text{PhCO}^+$ ; 8,8 ), 102 (  $\text{B}_1^+$ ; 5,8 ), 77 (  $\text{Ph}^+$ ; 8,1 ), 69 (  $\text{C}_3\text{HO}_2$ ; 38,6 ).

$^1\text{H}$ -RMN ( 60 MHz,  $\text{Cl}_3\text{CD}$  ) ppm: 4,00 ( 3H, s, MeO-5 ); 4,05 ( 3H, s, MeO-6 ); 6,67 ( 1H, s, H-3 ); 6,93 ( 1H, s, H-8 ); 7,50 ( 3H, m, H-3', 4' y 5' ); 7,9 ( 2H, m, H-2' y 6' ).  
( 60 MHz,  $\text{Cl}_3\text{CD} + \text{Eu}(\text{fod})_3$  ), relación molar  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  / flavonoide: 0,136; 0,433 y 0,722. Valores de S: -1,1 ( H-3 ); 1,2 ( H-8 ); 8,8 ( MeO-6 ); 14,0 ( MeO-5 ).  
( 60 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$  ) ppm: 3,54 ( 3H, s, MeO-6 ); 3,96 ( 3H, s, MeO-5 ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( 20,0 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$  ) ppm: 61,9 ( MeO-5 ); 62,8 ( MeO-6 ); 101,0 ( C-8 ); 108,4 ( C-3 ); 112,3 ( C-10 ); 127,0 ( C-2' y C-6' ); 130,1 ( C-3' y C-5' ); 132,1 ( C-1' ); 132,4 ( C-4' ); 140,5 ( C-6 ); 153,2<sup>a</sup> ( C-5 ); 154,9<sup>a</sup> ( C-9 );

157,3 ( C-7 ); 161,1 ( C-2 ); 176,8 ( C-4 ).

<sup>a</sup>Los valores pueden intercambiarse.

*Demetilación de 7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona 115*: obtención de 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101.

Se disolvieron 62,2 mg (  $2,1 \cdot 10^{-4}$  moles ) de 115 en 7 ml de acetonitrilo anhidro y se agregaron 3 ml de una solución preparada con 212,3 mg de  $AlCl_3$  anhidro en 10 ml de acetonitrilo anhidro. La solución se volvió amarilla inmediatamente y al cabo de 5 hs y media de reflujo, se evaporó el solvente obteniéndose un residuo color anaranjado. Se agregaron 15 ml de HCl acuoso, 1 : 7, y se agitó durante media hora. La suspensión resultante, que viró al color amarillo, se filtró y se lavó hasta neutralidad. Como no se pudo purificar por recristalización, se efectuó una purificación cromatográfica en una columna de sílicagel H utilizando benceno-acetona, 9 : 1, como solvente de elución. Se obtuvieron 37,6 mg (  $1,3 \cdot 10^{-4}$  moles, R = 62 % ) de 101.

*Metilación de 7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona 115*: obtención de 5,6,7-trimetoxiflavona 102.

Por metilación de 30 mg (  $1,0 \cdot 10^{-4}$  moles ) de 115, según el método descrito en la pág. 218, se obtuvieron 28,3 mg (  $0,9 \cdot 10^{-4}$  moles; R = 90 % ) de 102.

### Compuestos obtenidos del fraccionamiento del Residuo 2

*Colina 11*:

p.f.: picrato, 250 - 252 °C ( EtOH ); picrato testigo, 250 - 252°C.

<sup>1</sup>H-RMN ( 100 MHz, D<sub>2</sub>O ) ppm: acetato de colina; 1,88 ( 3H, s, MeCO<sub>2</sub><sup>-</sup> ); 3,18 ( 9H, s, -NMe<sub>3</sub><sup>+</sup> ); 3,48 ( 2H, m, -CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup> ); 4,03 ( 2H, m, HOCH<sub>2</sub>- ).

*Betaína 9:*

E.M. m/e ( % ): 117 ( M<sup>+</sup>, 11 ), 103 ( 4 ), 84 ( 13 ), 58  
 ( Me<sub>2</sub>N=CH<sub>2</sub><sup>+</sup>, 100 ), 42 ( 38 ).

<sup>1</sup>H-RMN ( 100 MHz, D<sub>2</sub>O ) ppm: 3,24 ( 9H, s, -NMe<sub>3</sub><sup>+</sup> ); 3,85 ( 2H, s, -CH<sub>2</sub>- ).

*Isoramnetina-3-O-robinobiósido 116:*

p.f.: 178 - 181 ° C ( MeOH-benceno )  $[\alpha]_D^{25} = -24,1^\circ ( c = 0,32; \text{MeOH} )$

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$  : 356,0; 267,5, 255 nm, AlCl<sub>3</sub>: 400,0; 360,0 ( h ); 304,0; 269,0 nm, AlCl<sub>3</sub>/HCl: 400,0; 360,0 ( h ); 304,0; 269,0 nm, NaMeO: 412,0; 327,0 ( h ); 273,0 nm; NaAcO: 375,0; 317,0; 274,5 nm; NaAcO/BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub>: 356,0; 267,5; 255,0 nm.

I.R. ( cm<sup>-1</sup> ): 3300 ( tens. O-H ), 1745 ( tens. CO ).

E.M. ( derivado trimetilsililado ) m/e ( % ): 742 ( TMS robinobiosa + H ( D + H ); 1,9 ), 741 ( TMS robinobiosa ( D ); 3,2 ), 740 ( TMS robinobiosa - H ( D - H ); 4,6 ), 590 ( TMS isoramnetina + TMS - Me + H ( A + TMS - Me + H ); 14,0 ), 589 ( TMS isoramnetina + TMS - Me ( A + TMS - Me ); 26,1 ), 532 ( TMS isoramnetina + H ( A + H ); 47,2 ), 517 ( TMS isoramnetina + H - Me ( A + H - Me ); 100 ), 460 ( 532 - TMS + H; 16,5 ), 362 ( TMS ramnosa - H ( T - H ); 20,9 ), 273 ( 362 - TMSiOH; 5,9 ), 217 ( 15,2 ), 204 ( 10,9 ), 147 ( 13,2 ), 73 ( TMS; 90,7 ).

<sup>1</sup>H-RMN ( 60 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> ) ppm: 1,05 ( 3H, m, H-6<sup>Ram</sup> ); 3,42 ( m, HCOH + HDO ); 3,82 ( 3H, s, MeO-3' ); 4,35 ( 1H, s ancho, H-1<sup>Ram</sup> ); 5,34 ( 1H, d, J = 7 Hz, H-1<sup>Gal</sup> ); 6,08 ( 1H, d, J = 2 Hz, H-6 ); 6,32 ( 1H, d, J = 2 Hz, H-8 ); 6,76 ( 1H, d, J = 8 Hz, H-5' ); 7,36 ( 1H, dd, J = 2 Hz y 8 Hz, H-6' ); 7,83 ( 1H, d, J = 2 Hz, H-2' ); 12,33 ( 1H, s, HO-5 ). ( 100 MHz, Cl<sub>3</sub>CD ; derivado trimetilsililado ) ppm: 1,18 ( 3H, m, H-6<sup>Ram</sup> ); 3,54 ( 10H, m, HCOH ); 3,88 ( 3H, s, MeO-3' ); 4,37 ( 1H, s ancho, H-1<sup>Ram</sup> );



5,71 ( 1H, d, J = 7 Hz, H-1<sup>Gal</sup> ); 6,19 ( 1H, d, J = 2 Hz, H-6 ); 6,48 ( 1H, d, J = 2 Hz, H-8 ); 6,84 ( 1H, d, J = 8 Hz, H-5' ); 7,47 ( 1H, dd, J = 2 Hz y 8 Hz, H-6' ); 7,76 ( 1H, d, J = 2 Hz, H-2' ).

Ram = ramnosa

Gal = galactosa

<sup>13</sup>C-RMN ( 20,0 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> ) ppm: 17,8 ( C-6<sup>Ram</sup> ); 56,0 ( MeO-3' ); 65,6 ( C-6<sup>Gal</sup> ); 68,3 ( C-4<sup>Gal</sup> + C-5<sup>Ram</sup> ); 70,4 ( C-2<sup>Ram</sup> ); 70,7 ( C-3<sup>Ram</sup> ); 71,2 ( C-2<sup>Gal</sup> ); 72,0 ( C-4<sup>Ram</sup> ); 73,1 ( C-3<sup>Gal</sup> ); 73,7 ( C-5<sup>Gal</sup> ); 93,8 ( C-8 ); 98,8 ( C-6 ); 100,2 ( C-1<sup>Ram</sup> ); 101,9 ( C-1<sup>Gal</sup> ); 104,1 ( C-10 ); 113,6 ( C-2' ); 115,2 ( C-5' ); 121,1 ( C-1' ); 122,1 ( C-6' ); 133,2 ( C-3 ); 147,0 ( C-4' ); 149,4 ( C-3' ); 156,5 ( C-2 y C-9 ); 161,2 ( C-5 ); 164,1 ( C-7 ); 177,4 ( C-4 ).

*Hidrólisis de isoramnetina-3-O-robinobiosido 116:*

La suspensión de 9 mg de 116 en un 1 ml de HCl acuoso, 1 : 10, se calentó 1 h a 100°C en un tubo cerrado. Al cabo de este tiempo se filtró el sólido amarillo, que se identificó como isoramnetina 81, y las aguas madres se evaporaron repetidas veces para eliminar el ácido.

Isoramnetina: Se comparó su comportamiento cromatográfico contra un testigo auténtico por C.C.D. de sílicagel: R<sub>f</sub> = 0,41, benceno-acetona, 4 : 1, revelador: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> desarrolla intenso color amarillo.

E.M. m/e ( % ): 316 ( M<sup>+</sup>; 100,0 ), 315 ( M<sup>+</sup>- 1; 18,0 ), 301 ( M<sup>+</sup>-15; 11,0 ), 287 ( M<sup>+</sup>- 1 - 28; 13,0 ), 273 ( M<sup>+</sup>- 15 - 28; 6,0 ), 245 ( 273 - 28; 10,5 ), 217 ( 245 - 28; 7,0 ), 189 ( 217 - 28; 2,0 ); 153 ( A<sub>1</sub> + H<sup>+</sup>; 8,2 ), 151 ( B<sub>2</sub><sup>+</sup>; 7,5 ), 123 ( B<sub>2</sub> - 28<sup>+</sup>; 7,0 ), 108 ( 123 - 28; 6,0 ), 69 ( 12,0 ), 57 ( 9,0 ).

<sup>1</sup>H-RMN ( 60 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> ) ppm: 3,90 ( 3H, s, MeO-3' ); 6,25 ( 1H, d, J = 2 Hz, H-6 ); 6,52 ( 1H, d, J = 2 Hz, H-8 ); 7,00 ( 1H, d, J = 8 Hz, H-5' ); 7,75 ( 2H, m, H-2' y 6' ); 12,81 ( 1H, s, HO-5 ).

p.f.: 305 - 306 °C ( desc. ) ( Lit.: 305 - 307 °C <sup>296</sup> ).

Identificación de los azúcares: el residuo de azúcares se cromatografió en placa de celulosa utilizando como solvente BuOH-piridina-H<sub>2</sub>O, 6 : 4 : 3; se realizaron dos desarrollos sucesivos y se utilizó como revelador *p*-anisidina.HCl. En el sistema empleado, los Rf fueron los siguientes: ramnosa Rf = 0,78; galactosa Rf = 0,57; glucosa Rf = 0,52. Se identificaron en el hidrolizado ramnosa y galactosa.

ESTUDIO QUIMICO DE GOMPHRENA BOLIVIANA

El material vegetal ( 75 g ) se extrajo con éter de petróleo obteniéndose, luego de evaporar el solvente, 1,7 g de residuo ( R = 2,3 % ). El resto vegetal seco se extrajo posteriormente con etanol obteniéndose 8,8 g de residuo ( R = 11,7 g ).

Fraccionamiento del extracto de éter de petróleo

Se efectuó la separación cromatográfica de este extracto en una columna de sílicagel H ( 50 g, 30. x 200 mm ) eluyendo con éter de petróleo, éter de petróleo-cloroforno y cloroforno-metanol; según se indica en la tabla 50.

Tabla 50: Fraccionamiento del extracto de éter de petróleo

Solvente	Fracción	Masa ( mg )	Compuestos
EP	1	152,8	Hidrocarburos
EP-MeOH 1 : 1	2	129,6	Ceras
Cl <sub>3</sub> CH	3	258,0	Triterpenos y alcoholes
Cl <sub>3</sub> CH-MeOH 9 : 1	4	66,2	Esteroles
Cl <sub>3</sub> CH-MeOH 8 : 2	5	839,7	Flavonoides
MeOH	6	227,3	Aceite oscuro

EP: éter de petróleo

*Hidrocarburos:*

Se analizaron por C.G.L. utilizando una columna OV-17 3 %, para compararlos con los hidrocarburos de *Gomphrena martiana* ( pág. 222 ), obteniéndose los siguientes resultados:

Tr ( fórmula, % ) min: 2,32 (  $n\text{-C}_{29}\text{H}_{60}$ ; 4,5 ); 3,31 (  $iso\text{-C}_{31}\text{H}_{64}$ ; 7,6 ); 3,67 (  $n\text{-C}_{31}\text{H}_{64}$ ; 34,5 ); 5,27 (  $iso\text{-C}_{33}\text{H}_{68}$ ; 4,3 ); 5,88 (  $n\text{-C}_{33}\text{H}_{68}$ ; 31,4 ); 9,51 (  $n\text{-C}_{35}\text{H}_{72}$ ; 18,1 ).

Los parámetros calculados por cuadrados mínimos correspondientes a la recta resultante de representar gráficamente  $\ln Tr$  en fun-

ción del número de átomos de carbono son los siguientes:

ordenada al origen: -5,98

pendiente: 0,235

coeficiente de correlación: 0,9999

*Triterpenos y alcoholes lineales:*

La fracción 3 se purificó en una columna de sílicagel H ( 20 g, 20 x 200 mm ) utilizando benceno como solvente de elución. La fracción principal, presentaba por C.C.D. de sílicagel una mancha a  $R_f = 0,48$  (  $Cl_3CH$ , 2 desarrollos ) que revelaba violeta rojizo con  $H_2SO_4$  / anisaldehído. Se efectuó el análisis de esta fracción ( 34 mg ) por C.G.L.-E.M. ( OV-17, 3 %, 1,8 m a  $T = 200^\circ \rightarrow 288^\circ C$ ,  $10^\circ C / min$  ) obteniéndose los siguientes resultados:  
Tr (  $M^+$ , fórmula; % ) min: 2,12 ( 296,  $C_{20}H_{40}O$ ; 21,2 ); 7,26 ( 344\*,  $C_{26}H_{54}O$ ; 6,9 ); 8,60 ( 392\*,  $C_{28}H_{58}O$ ; 6,3 ); 9,98 ( 420\*,  $C_{30}H_{62}O$ ; 4,6 ); 11,70 ( 426,  $C_{30}H_{50}O$ :  $\beta$ -amirina; 21,8 ); 12,12 ( 426,  $C_{30}H_{50}O$ :  $\alpha$ -amirina; 23,8 ).  
\*  $M-H_2O$

El espectro de masas de  $\beta$ -amirina se consigna en la pág.223.

$\alpha$ -amirina 121, E.M. m/e ( % ): 427 (  $M^+ + 1$ ; 21,7 ), 426 (  $M^+$ ; 62,0 ), 411 (  $M^+ - 15$ ; 11,8 ), 257 ( 10,2 ), 218 ( RDA, anillos D y E; 100 ), 207 ( anillos A y B; 39,5 ), 206 ( 12,3 ), 205 ( anillos D y E; 8,4 ), 204 ( 18,0 ), 203 ( 218 - 15; 21,5 ), 201 ( 12,0 ), 189 ( 207 - 18 y / o anillos D y E - 29; 50,3 ), 187 ( 16,5 ), 161 ( 29,1 ), 149 ( 22,3 ), 148 ( 21,5 ), 147 ( 26,4 ), 136 ( 28,3 ), 135 ( 49,7 ), 134 ( 27,7 ), 133 ( 28,5 ), 123 ( 38,7 ), 122 ( 32,7 ), 121 ( 50,0 ), 119 ( 55,2 ), 109 ( 46,9 ), 108 ( 26,7 ), 107 ( 58,1 ), 105 ( 34,0 ), 95 ( 65,7 ), 93 ( 65,7 ), 93 ( 58,0 ), 91 ( 37,7 ), 81 ( 70,2 ), 79 ( 36,6 ), 69 ( 66,0 ), 68 ( 43,0 ), 67 ( 50,0 ), 57 ( 26,4 ), 55 ( 65,2 ), 43 ( 76,0 ), 41 ( 65,2 ).

*Esteroles:*

La fracción 4 estaba constituida por una mezcla de esteroides que fueron analizados por C.G.L ( OV-17, 3 %, 1,8 m a  $T =$

260°—280°C, 5°C / min ) y C.G.L.-E.M. ( OV-17, 3 %, 1,8 m a T = 200°—290°C, 10°C / min ) determinándose la presencia de colesterol 110 ( 4,4 % ),  $\Delta^7$ -colesterol 122 ( 3,5 % ), campesterol 111 ( 7,9 % ), estigmasterol 112 ( 18,4 % ), sitosterol 113 ( 43,7 % ),  $\Delta^7$ -sitosterol 123 ( 6,4 ) y estigmast-4-en-3-ona ( sitosterona, 1,1 % ) 124 .

Los espectros de masas de colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol se consignan en las pág. 225-226.

$\Delta^7$ -colesterol E.M. m/e ( % ): 387 (  $M^+$  + 1; 26,1 ), 386 (  $M^+$ ; 100 ), 371 (  $M^+$  - 15; 29,0 ), 273 (  $M^+$  - cadena lateral; 11,2 ), 255 ( 273 - 18; 35,4 ), 231 ( 273 - 43; 11,7 ), 229 ( 273 - 44; 11,0 ), 213 ( 255 - 42; 11,8 ), 147 ( 13,9 ), 145 ( 13,9 ), 133 ( 12,3 ), 119 ( 13,6 ), 107 ( 17,6 ), 105 ( 21,3 ), 95 ( 19,5 ), 93 ( 12,5 ), 91 ( 27,3 ), 81 ( 13,1 ), 79 ( 15,8 ), 67 ( 11,0 ), 57 ( 12,8 ), 55 ( 25,2 ), 43 ( 57,0 ), 41 ( 36,5 ).

$\Delta^7$ -sitosterol E.M. m/e ( % ): 415 (  $M^+$  + 1; 27,0 ), 414 (  $M^+$ ; 100 ), 399 (  $M^+$  - 15; 22,0 ), 273 (  $M^+$  - cadena lateral; 12,3 ), 255 ( 273 - 18; 31,0 ), 231 ( 273 - 43; 5,7 ), 213 ( 255 - 42; 5,7 ), 147 ( 7,4 ), 119 ( 8,1 ), 107 ( 13,0 ), 91 ( 8,0 ), 57 ( 16,3 ), 43 ( 60,2 ), 41 ( 24,2 ).

sitosterona E.M. m/e ( % ): 413 (  $M^+$  + 1; 22,4 ), 412 (  $M^+$ ; 70,3 ), 397 (  $M^+$  - 15; 6,8 ), 370 (  $M^+$  - 42; 26,9 ), 355 ( 370 - 15; 13,2 ), 327 (  $M^+$  - 85; 6,4 ), 289 (  $M^+$  - 123; 30,1 ), 288 (  $M^+$  - 124; 37,4 ), 275 ( 11,9 ), 245 ( 8,7 ), 230 ( 13,2 ), 229 (  $M^+$  - cadena lateral - 42; 35,2 ), 177 ( 11,4 ), 149 ( 16,4 ), 148 ( 13,7 ), 147 ( 16,4 ), 135 ( 15,1 ), 133 ( 11,9 ), 124 ( anillo A; 100 ), 123 ( 11,9 ), 122 ( 11,4 ), 121 ( 17,4 ), 110 ( 10,5 ), 109 ( 11,0 ), 107 ( 11,9 ), 95 ( 16,4 ), 83 ( 11,9 ), 79 ( 17,8 ), 71 ( 11,9 ), 67 ( 18,7 ), 57 ( 17,8 ), 55 ( 15,1 ), 43 ( 33 ).

*Trimetilsililación de la fracción 4:* se efectuó según el método que se indica en la pág. 209. El análisis de la mezcla derivatizada se efectuó por C.G.L.-E.M. utilizando una columna SE-30 3 %, 1,8 m a

T = 250°—286°C, 2°C / min.

colesterol TMS E.M. m/e ( % ): 458 ( M<sup>+</sup>; 39,2 ), 443 ( M<sup>+</sup>- 15; 10,3 ), 368 ( M<sup>+</sup>- TMSiOH; 80,6 ), 353 ( 368 - 15; 36,0 ), 329 ( M<sup>+</sup>- 129; 100 ), 255 ( 368 - cadena lateral; 18,4 ), 247 ( 17,8 ), 213 ( 255 - 42; 8,9 ), 129 ( C-1, C-2 y C-3; 55,6 ).

Δ<sup>7</sup>- colesterol TMS E.M. m/e ( % ): 458 ( M<sup>+</sup>; 100 ), 443 ( M<sup>+</sup>- 15; 25,0 ), 353 ( M<sup>+</sup>- TMSiOH - 15; 16,9 ), 345 ( 12,8 ), 255 ( M<sup>+</sup>- TMSiOH - cadena lateral; 95,3 ), 229 ( 29,0 ), 213 ( 255 - 42; 36,3 ), 75 ( 45,0 ).

campesterol TMS E.M. m/e ( % ): 472 ( M<sup>+</sup>; 55,0 ), 457 ( M<sup>+</sup>- 15; 11,9 ), 412 ( 38,5 ), 400 ( M<sup>+</sup>- 72; 24,8 ), 382 ( M<sup>+</sup>- TMSiOH; 100 ), 367 ( 382 - 15; 44,4 ), 355 ( M<sup>+</sup>- 129; 36,4 ), 343 ( M<sup>+</sup>- 129; 91,9 ), 255 ( 382 - cadena lateral; 11,8 ), 129 ( C-1, C-2 y C-3; 68,1 ).

estigmasterol TMS E.M. m/e ( % ): 484 ( M<sup>+</sup>; 74,3 ), 469 ( M<sup>+</sup>- 15; 10,2 ), 412 ( M<sup>+</sup>- 72; 25,4 ), 400 ( M<sup>+</sup>- 84; 11,3 ), 394 ( M<sup>+</sup>- 90; 86,3 ), 379 ( 394 - 15; 30,2 ), 345 ( 6,9 ), 343 ( 22,7 ), 255 ( 394 - cadena lateral; 77,2 ), 213 ( 255 - 42; 20,9 ), 129 ( C-1, C-2 y C-3; 62,2 ).

sitosterol TMS E.M. m/e ( % ): 486 ( M<sup>+</sup>; 59,4 ), 471 ( M<sup>+</sup>- 15; 12,0 ), 396 ( M<sup>+</sup>- TMSiOH; 100 ), 381 ( 396 - 15; 35,6 ), 357 ( M - 129; 77,5 ), 129 ( C-1, C-2 y C-3; 39,0 ).

Δ<sup>7</sup>- sitosterol TMS E.M. m/e ( % ): 486 ( M<sup>+</sup>; 100 ), 471 ( M<sup>+</sup>- 15; 21,0 ), 396 ( M<sup>+</sup>- TMSiOH; 25,3 ), 381 ( 396 - 15; 19,2 ), 357 ( M<sup>+</sup>- 129; 18,1 ), 303 ( 27,2 ), 255 ( 396 - cadena lateral; 91,0 ); 213 ( 255 - 42; 26,7 ).

#### *Agliconas de flavonoides:*

La fracción 5 resultó ser una mezcla de agliconas de flavonoides que se fraccionó en una columna de sílicagel H ( 40 g ) usando como eluyente Cl<sub>3</sub>CH-MeOH, 99 : 1, dando lugar a las fracciones que se detallan en la tabla 51.

Tabla 51: Análisis de la fracción 5 ( EP de *Gomphrena boliviana* ).

Fracción	masa ( mg )	Compuestos
5-1	51,9	Clorofilas
5-2	217,6	Flavonoides <u>100</u> , <u>101</u> y <u>114</u>
5-3	235,0	Flavonoides <u>100</u> , <u>114</u> , <u>98</u> y <u>104</u>
5-4	98,8	Flavonoides <u>115</u> y <u>104</u>
5-5	81,7	Flavonoide <u>115</u>
5-6	13,3	-

Se efectuó la purificación posterior de las fracciones 5-2 y 5-3 por cromatografía preparativa en placa y las fracciones así obtenidas se compararon por C.C.D. con los flavonoides aislados de *Gomphrena martiana*, obteniéndose los siguientes valores de Rf en los distintos sistemas de solventes utilizados:

	A	B	C
5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona <u>100</u>	0,49	0,76	
5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona <u>101</u>	0,37	0,72	-
3,5,6,7-tetrametoxiflavona <u>114</u>	-	0,66	0,31
3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxi flavona <u>98</u>		0,57	0,23
3,5,7-trimetoxiflavona <u>104</u>		0,42	0,17
7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona <u>115</u>		0,33	0,12

A: sílicagel, éter de petróleo-éter etílico, 2 : 1 ( 2 desarrollos ).

B: sílicagel, benceno-acetona, 3 : 1 .

C: sílicagel, benceno-acetona, 9 : 1 .

ESTUDIO QUIMICO DE GOMPHRENA MEYENIANA

40 g de material vegetal se extrajeron con éter de petróleo obteniéndose luego de evaporar el solvente, 790 mg ( R= 2 % ) de residuo oscuro. A continuación se extrajo con etanol obteniéndose 4,3 g ( R = 10,7 % ) de residuo.

Estudio del extracto de éter de petróleo

Este extracto se fraccionó en una columna de sílicagel H ( 30 g, 15 x 150 mm ) como se indica a continuación:

Solvente	Fracción	masa ( mg )	Compuestos
EP	1	126,2	Hidrocarburos
EP-Cl <sub>3</sub> CH, 1:1	2	280,0	Ceras
Cl <sub>3</sub> CH	3	96,0	Triterpenos y esteroides
Cl <sub>3</sub> CH	4	27,9	Esteroides
Cl <sub>3</sub> CH-MeOH, 9:1	5	231,3	-

EP: éter de petróleo

*Hidrocarburos:*

La fracción 1 estaba constituida por hidrocarburos que se analizaron por C.G.L., utilizando una columna OV-17 3 %, comparándolos con los hidrocarburos de *Gomphrena martiana* ( pág. 222 ), obteniéndose los siguientes resultados:

Tr ( fórmula, % ) min: 1,54 ( *n*-C<sub>27</sub>H<sub>58</sub>; 4,2 ); 2,37 ( *n*-C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>; 16,5 ); 2,93 ( *n*-C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>; 1,3 ); 3,38 ( *iso*-C<sub>31</sub>H<sub>64</sub>; 3,9 ); 3,84 ( *n*-C<sub>31</sub>H<sub>64</sub>; 44,5 ); 5,34 ( *iso*-C<sub>33</sub>H<sub>68</sub>; 0,6 ); 6,05 ( *n*-C<sub>33</sub>H<sub>68</sub>; 22,1 ); 9,57 ( *n*-C<sub>35</sub>H<sub>72</sub>; 2,0 ).

Los parámetros calculados por cuadrados mínimos correspondientes a la recta resultante de representar gráficamente ln Tr en función del número de átomos de carbono son los siguientes:

ordenada al origen: -5,80

pendiente: 0,23

coeficiente de correlación: 0,9997



*Triterpenos y esteroides:*

La fracción 3 se fraccionó en una columna de sílicagel utilizando  $\text{Cl}_3\text{CH}$  como solvente de elución obteniéndose una fracción de triterpenos ( 12 mg ), que fueron identificados por CGL y C.G.L.-E.M. como  $\beta$ -amirina 107 ( pág. 223 ) y ciclolaudenol 83 ( pág. 223 ), y otra de esteroides ( 21 mg ) que fueron caracterizados como colesterol 110 ( 3,9 % ),  $\Delta^7$ -colesterol 122 ( 1,6% ), campesterol 111 ( 6,2 % ), estigmasterol 112 ( 6,4 % ), sitosterol 113 ( 65,5 % ),  $\Delta^7$ -sitosterol 123 ( 5,3 % ) y sitosterona 124 ( 4,6 % ), de la misma manera que en *Gomphrena boliviana* ( pág. 233 ).

ESTUDIO QUIMICO DE GOMPHRENA HAENKEANA

La planta entera ( 69 g ) se extrajo con éter de petróleo, por evaporación del solvente se obtuvieron 1,4 g ( R = 2,0 % ) de residuo. El resto vegetal seco, se extrajo con etanol; al enfriar este último extracto se separaron sales y por evaporación hasta sequedad se obtuvieron 4,9 g de residuo ( R = 7,1 % ).

Estudio del extracto etanólico

3,5 g de extracto etanólico se disolvieron en etanol y se evaporaron sobre poliamida. La pastilla formada se percoló sucesivamente con cloroformo, agua y metanol, obteniéndose 0,45; 1,94; y 0,9 g respectivamente luego de eliminar los solventes. Al analizar estas tres fracciones por C.C.D. sobre sílicagel usando como solvente AcOEt-MeOH ( 10 : 1 ) y revelando la misma con  $H_2SO_4$  / anisaldehído se observó una mancha de  $R_f = 0,32$  color violeta que viraba a verde con el tiempo en el percolado acuoso.

El percolado acuoso se disolvió en agua y se extrajo con AcOEt ( 10 x 50 ml ). El residuo obtenido luego de secar la solución con  $NaSO_4$  anhidro y evaporarla ( 100 mg ) se purificó cromatográficamente en una columna de sílicagel H ( 300 mg ) usando como solvente de elución AcOEt-MeOH, 10 : 0,5. Se juntaron y evaporaron las fracciones que tuvieron igual comportamiento cromatográfico, obteniéndose un residuo que pesó 25,1 mg y que fue identificado como ecdisterona 23

Ecdisterona 23:

p.f.: 235°- 238°C ( MeOH-éter ) ( Lit.: 237 - 239°C ( MeOH-éter )<sup>35</sup>).

I.R. (  $cm^{-1}$  ): 3200 ( tens. O-H ), 1640 ( tens. C=O y C=C del sistema enónico ), 1050 ( tens. C-O ), 880 ( def. =C-H ).

E.M. m/e ( % ): 462 (  $M^+ - 18$ ; 1,1 ), 444 (  $M^+ - 2 \times 18$ ; 5,1 ), 429 (  $M^+ - 2 \times 18 - 15$ ; 6,6 ), 426 (  $M^+ - 3 \times 18$ ; 14,8 ), 411 (  $M^+ - 3 \times 18 - 15$ ; 4,4 ), 408 (  $M^+ - 4 \times 18$ ; 5,4 ), 393 (  $M^+ - 4 \times 18 - 15$ ; 2,7 ), 363 (  $M^+ - 117$ ; 46,7 ), 345

( 363 - 18 ); 100 ), 327 ( 345 - 18; 48,1 ), 301 ( 319 - 18, 14,1 ), 300 ( 319 - 18 - 1; 18,5 ), 285 ( 300 - 15; 15,2 ), 283 ( 301 - 18; 9,3 ), 269 ( 29,6 ), 250 ( 40,7 ) 173 ( cadena lateral, 14,0 ), 161 ( M<sup>+</sup>- 319; 14,8 ), 143 ( 161 - 18; 20,4 ), 137 (14,0), 125 ( 161 - 2 x 18; 17,4 ), 121 ( 22,9 ), 117 ( cadena lateral: C-22 a 27; 9,3 ), 99 ( 117 - 18; 92,6 ), 91 ( 28,0 ), 81 ( 99 - 18; 52,2 ), 71 ( 32,0 ), 69 ( 33,2 ), 59 ( 41,1 ), 55 ( 52,7)

<sup>1</sup>H-RMN ( 60 MHz, piridina -d<sub>5</sub> ) ppm: 1,07 ( 3H, s, Me-19 ); 1,20 ( 3H, s, Me-18 ); 1,36 ( 6H, s, Me-26 y Me-27 ); 1,56 ( 3H, s, Me-21 ); 1,70-2,10 ( 14H, m, -CH<sub>2</sub>- ); 2,80-3,10 ( 2H, m, C-H ); 3,50-4,20 ( 4H, m, HC-OH ); 6,20 ( 1H, s ancho, H-7 ).

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$  : 243,0 nm, +HCl 1N, 70°C, 15': 245 y 297 nm.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido aislar e identificar los componentes orgánicos de *Gomphrena martiana* ( Flia.: *Amarantaceae* ), planta argentina conocida en la medicina folklórica principalmente por su acción diurética.

En la presente tesis se desarrollaron los siguientes temas:

1.- Introducción a la familia *Amarantaceae* considerando los aspectos botánicos y fitoquímicos de la misma, y dando, en particular, una descripción del género *Gomphrena* .

2.- Características estructurales de los flavonoides, relaciones biosintéticas, localización y función de los mismos en el vegetal, así como acción farmacológica presentada por distintos tipos de estos compuestos.

3.- Análisis detallado de los espectros de masas,  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, utilizados en la elucidación estructural de flavonoides.

4.- Descripción de los espectros de masas de esteroides, 3-cetoesteroides  $\alpha,\beta$ -insaturados y triterpenos tetracíclicos con la unidad 9:19-ciclopropano, así como su distribución en los vegetales.

Los puntos 3.- y 4.- se desarrollan en detalle para facilitar la comprensión de la discusión de los resultados obtenidos en esta tesis.

5.- Discusión de los resultados obtenidos en esta tesis, correspondientes a la caracterización de los compuestos orgánicos presentes en el extracto de éter de petróleo y etanólico de la planta mencionada.

Se indicaron las técnicas separativas, especialmente cromatográficas, empleadas en las etapas de aislamiento y purificación, y se analizaron detalladamente los espectros ( U.V., I.R.,  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y E.M. ) y/o métodos químicos que condujeron a la identificación de:

- a) 3,5-dimetoxi-6,7-metilendioxi-flavona 98 .
- b) 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxi-flavona 100 .

- c) 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona 101 .
- d) 3,5,7-trimetoxiflavona 104 .
- e) Hidrocarburos lineales de  $C_{29}H_{60}$  a  $C_{35}H_{72}$  e hidrocarburos pertenecientes a la serie *iso* de  $C_{31}H_{64}$  y  $C_{33}H_{68}$  .
- f) Alcoholes lineales de  $C_{24}H_{50}O$  a  $C_{30}H_{62}O$ .
- g)  $\beta$ -amirina 107 .
- h) Ciclolaudenol 83 .
- i) Hopeol 109
- j) Colesterol 110.
- k) Campesterol 111 .
- l) Estigmasterol 112 .
- m) Sitosterol 113 .
- n) 3,5,6,7-tetrametoxiflavona 114 .
- ñ) 7-hidroxi-5,6-dimetoxiflavona 115 .
- o) Colina 11 .
- p) Betaina 9 .
- q) Isoramnetina-3-O-robinobiósido 116.

Los flavonoides 98, 100, 114 y 115 no habían sido descritos anteriormente como productos naturales, por lo que fueron comparados con testigos sintéticos o bien transformados químicamente, a fin de relacionar las distintas estructuras entre sí. Estas transformaciones permitieron obtener:

- r) 5-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilendioxiflavona 99, no descrito previamente.
- s) 5,6,7-trimetoxiflavona 102 .
- t) 5,7-diacetoxi-6-metoxiflavona 103 .

El flavonoide 104 que había sido descrito sólo una vez como producto natural, fue sintetizado a fin de confirmar su estructura. En el caso del glicósido de flavonoide 116 no existían descripciones sobre la naturaleza exacta del disacárido constituyente.

Así mismo, el hecho de tener datos espectroscópicos de flavonoides íntimamente relacionados, permitió realizar una comparación de los mismos para fijar pautas que facilitarían las asignaciones de señales en espectros de masas,  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN de otras agliconas de flavonoides con estructuras similares.

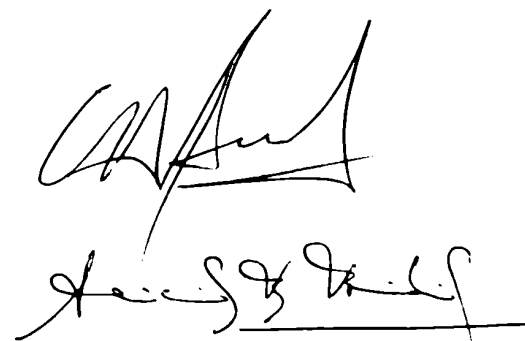
Se propuso una posible génesis del ión m/e 69 observado en los espectros de masas de algunos flavonoides descritos en esta tesis, en base al estudio del espectro de masas del derivado deuterado del compuesto 101, en el que dicho fragmento era particularmente intenso.

Por último, se realizó un estudio quimiotaxonómico preliminar de los extractos de éter de petróleo de *Gomphrena martiana*, *Gomphrena boliviana* y *Gomphrena meyeniana* y de los extractos etanólicos de *Gomphrena martiana*, *Gomphrena boliviana*, *Gomphrena haenkeana*, *Gomphrena meyeniana* y *Gomphrena perennis*, que permitió establecer, con los resultados obtenidos hasta el momento que las especies *Gomphrena martiana* y *Gomphrena boliviana* están íntimamente relacionadas entre sí, siendo diferentes a las restantes. Además de los compuestos mencionados anteriormente ( a—q ), por el estudio químico de estas especies se obtuvieron las siguientes sustancias:

- r)  $\alpha$ -amirina 121 .
- s)  $\Delta^7$ -colesterol 122 .
- t)  $\Delta^7$ -sitosterol 123 .
- u) Sitosterona 124 .
- v) Ecdisterona 23 .

Se incluye además la descripción de los estudios efectuados sobre acción antimicrobiana y antitumoral de los extractos de éter de petróleo, etanólico y mezclas enriquecidas en los flavonoides 98, 100 y 101 de *Gomphrena martiana*.

6.- Parte experimental de la labor realizada, que incluye los datos numéricos de los espectros de los distintos compuestos descritos en esta tesis.



Parte de este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones:

- A New Flavone from *Gomphrena martiana*.  
C.A.Buschi, A.B.Pomilio y E.G.Gros  
Phytochemistry, 18, 1249 ( 1979 ).
- New Methylated Flavones from *Gomphrena martiana*.  
C.A.Buschi, A.B.Pomilio y E.G.Gros  
Phytochemistry, 19, 903 ( 1980 ).
- 5,6,7-trisubstituted Flavones from *Gomphrena martiana*.  
C.A.Buschi, A.B.Pomilio y E.G.Gros  
Phytochemistry, 20, 1178 ( 1981 ).
- Antimicrobial Activity of Some Argentine Higher Plants  
A.S.Lorenti, A.A.Viale, C.A.Buschi, M.D.González, C.D.Schteingart,  
A.M.Iribarren y A.B.Pomilio.  
Fitoterapia ( Milán ), 52, 81 ( 1981 ).
- Isoramnetin-3-O-Robinoside from *Gomphrena martiana*.  
C.A.Buschi y A.B.Pomilio  
J. Nat. Prod., en prensa.

## **BIBLIOGRAFIA**



- 1 ) H. Schinz; *Amarantaceae* en Engler-Prantl. "Die natürl. Pflanzenfamilien", 2<sup>da</sup> edición, tomo 16c, 1934. Nachdruck 1960, Duncker - Humbolt - Berlin.
- 2 ) T. H. Pedersen; *Darwiniana*, 14, 430 ( 1967 ).
- 3 ) T. H. Pedersen; *Darwiniana*, 20, 269 ( 1976 ).
- 4 ) R. Hegnauer ; "Chemotaxonomie der Pflanzen", Vol. 3., Birkhäuser, Basel y Stuttgart, (1964).
- 5 ) M. Piatelli y L. Minale; *Phytochemistry*, 3, 547 ( 1964 ).
- 6 ) J. B. Harborne; "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", 107, Academic Press; London - New York, (1967) .
- 7 ) T. J. Mabry, H. Wyler, G. Sasson, M. Mercier, T. Perikh y A. S. Dreiding; *Helv. Chim. Acta.*, 45, 640 ( 1962 ).
- 8 ) L. Minale, M. Piatelli, S. De Stefano y R. A. Nicolaus; *Phytochemistry*, 5, 1037 ( 1966 ).
- 9 ) T. J. Mabry, A. Taylor y B. L. Turner; *Phytochemistry*, 2, 61 ( 1963 ).
- 10 ) L. Minale, M. Piatelli y S. De Stefano; *Phytochemistry*, 6, 703 ( 1967 ).
- 11 ) P. Seeligmann y R. Rancaglia; *Lilloa*, 33, 299 ( 1973 ).
- 12 ) P. J. Scheuer y T. R. Pattakhiraman; *Lloydia*, 28, 95 ( 1965 ).
- 13 ) J. Susplugas, F. Gal, P. Susplugas, G. Maestri; *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 30, 203 ( 1970 ); *Chem. Abstr.*, 74, 72820t ( 1971 ).
- 14 ) B. Borkowski, M. Ohzak y M. Kortus; *Prace Komisji Farm.*, 4, 15 ( 1966 ); *Chem. Abstr.*, 66, 564n ( 1967 ).
- 15 ) V. K. Kapoor y H. Singh; *Indian J. Chem.*, 4, 461 ( 1966 ); *Chem. Abstr.*, 66, 35389y ( 1967 ).
- 16 ) T. Takemoto, S. Ogawa y N. Nishimoto; *Yakugaku Zasshi*, 87, 1463 ( 1967 ); *Chem. Abstr.*, 68, 84977p ( 1968 ).
- 17 ) H. N. Khastgir y P. Sen Gupta; *J. Indian Chem. Soc.*, 35, 529 ( 1958 ); *Chem. Abstr.*, 53, 7513c ( 1959 ).

- 18 ) R. Gopalachari y M. L. Dhar; J. Sci. Ind. Res., 17B, 276 ( 1958 ); Chem. Abstr., 53, 9579f ( 1959 ).
- 19 ) V. Hariharan y S. Rangaswami; Phytochemistry 9, 409 ( 1970 ).
- 20 ) J. Gedeon y F. A. Kind; Arch. Pharm., 289, 162 ( 1956 ); Chem. Abstr., 51, 382b ( 1957 ).
- 21 ) N. Banerji; J. Indian Chem. Sec. B; 17B, 180 ( 1979 ); Chem. Abstr., 91, 171658d ( 1979 ).
- 22 ) J. U. V. Dogra y O. P. Ojha; Comp. Physiol. Ecol.; 3, 5 ( 1978 ); Chem. Abstr., 89, 102303f ( 1978 ).
- 23 ) N. Banerji; J. Indian Chem. Soc., 57, 417 ( 1980 ); Chem. Abstr., 93, 204973z ( 1980 ).
- 24 ) C. Djerassi, P. Sen Gupta, J. Herran y F. Walls; J. Am. Chem. Soc., 76, 2966 ( 1954 ).
- 25 ) P. Crabbé, S. Burstein y C. Djerassi; Bull. Soc. Chim. Belges, 67, 632 ( 1958 ); Chem. Abstr., 53, 11431b ( 1959 ).
- 26 ) P. Crabbé, E. A. Azpeitia y C. Djerassi; Bull. Soc. Chim. Belges, 70, 168 ( 1961 ); Chem. Abstr., 55, 23587b ( 1961 ).
- 27 ) Y. K. Agrawal y R. K. Jain; Pol. J. Chem., 52, 2495 ( 1978 ); Chem. Abstr., 91, 207443w ( 1979 ).
- 28 ) S. Lin y A. Chen; T'ai-wan Yao Hsueh Tsa Chih; 27, 103 ( 1975 ); Chem. Abstr., 85, 189263g ( 1976 ).
- 29 ) K. Nakanishi, M. Koruda, S. Sasaki, M. L. Unang y H. Y. Hsu; Chem. Commun., 915 ( 1966 ).
- 30 ) M. N. Galbraith y D. H. S. Horn; Chem. Commun. 905 ( 1966 ).
- 31 ) S. Imai, T. Tayosato, M. Sakai, Y. Sato, S. Fujioka, E. Murata y M. Goto; Chem. Pharm. Bull., 340 ( 1969 ).
- 32 ) M. N. Galbraith and D. H. S. Horn; Aust. J. Chem., 22, 1945 ( 1969 ).
- 33 ) S. Imai, T. Takemoto, Y. Sato, S. Fujioka, E. Murata y M. Goto; Chem. Pharm. Bull., 17, 335 ( 1969 ).

- 34 ) R. Ikan, U. Ravid, D. Trosset y E. Shulman; *Experientia*, 27, 504 ( 1971 ).
- 35 ) A. Banerji y M. S. Chadha; *Phytochemistry*, 9, 1671 ( 1970 ).
- 36 ) T. Takemoto, S. Ogawa, N. Nishimoto, H. Hirayuma y S. Taniguchi; *Yakugaku Zasshi*, 88, 1293 ( 1968 ); *Chem. Abstr.*, 70, 54878f ( 1969 ).
- 37 ) T. Takemoto, S. Ogawa, N. Nishimoto, K. Y. Yeng, K. Abe, T. Sato, K. Osawa y M. Takahashi; *Yakugaku Zasshi*, 87, 1521 ( 1967 ); *Chem. Abstr.*, 68, 84979v ( 1968 ).
- 38 ) T. Takemoto, Y. Hikino, S. Arihara, H. Hikino, S. Ogawa y N. Nishimoto; *Tetrahedron Letters*, 2475 ( 1968 ).
- 39 ) T. Takemoto, K. Nomoto, Y. Hikino y H. Hikino; *Tetrahedron Letters*, 4929 ( 1968 ).
- 40 ) H. Hikino, K. Nomoto y T. Takemoto; *Tetrahedron Letters*, 1417 ( 1969 ).
- 41 ) H. Hikino, K. Nomoto y T. Takemoto; *Tetrahedron*, 26, 887 ( 1970 ).
- 42 ) H. Hikino, K. Nomoto, R. Ino y T. Takemoto; *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1078 ( 1970 ).
- 43 ) H. Hikino, K. Nomoto y T. Takemoto; *Chem. Pharm. Bull.*, 19, 433 ( 1971 ).
- 44 ) H. Hikino, K. Nomoto y T. Takemoto; *Phytochemistry*, 10, 3173 ( 1971 ).
- 45 ) H. Hikino, K. Nomoto y T. Takemoto; *Tetrahedron Letters*, 4953 ( 1968 ).
- 46 ) H. Hikino, K. Nomoto y T. Takemoto; *Steroids*, 16, 393 ( 1970 ).
- 47 ) H. Hikino, S. Ogawa, N. Nishimoto, T. Takemoto; JAPAN 7127,472 ( cl. C07c, A61k, A01k ), 10 Aug. 1971, Appl. 18 Mar. 1968.
- 48 ) T. D. Bech; *Farm. Zh. ( Kiev )*, 21, 38 ( 1966 ); *Chem. Abstr.*, 66, 44248d ( 1967 ).

- 49 ) T. D. Bech y I. S. Orenchuk; Farm. Zh. ( Kiev ); 27, 85 ( 1972 ); Chem. Abstr., 77, 2816j ( 1972 ).
- 50 ) G. T. Zubritskaya, V. I. Artemenkoy M. M. Yuz'vishin; Farm. Zh. ( Kiev ), 32, 90 ( 1977 ); Chem. Abstr., 87, 197309h ( 1977 ).
- 51 ) P. Crabbé, P. R. Leeming y C. Djerassi; J. Am. Chem. Soc., 80, 5258 ( 1958 ).
- 52 ) A. G. Zielske, J. Simons y R. M. Silverstein; Phytochemistry, 11, 393 ( 1972 ).
- 53 ) S. P. Garg, R. Bhushan y R. C. Kapoor; Phytochemistry, 19, 1265 ( 1980 ).
- 54 ) M. L. Bouillant, P. Redolfi, A. Casantini y J. Chopin; Phytochemistry, 17, 2138 ( 1978 ).
- 55 ) A. L. Cabrera; " Flora de la Provincia de Buenos Aires "; parte 3, Colección Científica del Inta, Buenos Aires(1967).
- 56 ) G. Covas; Darwiniana, 5, 329 ( 1941 ).
- 57 ) A. Banerji, G. J. Chintalwar, N. K. Joshi y M. S. Chadha; Phytochemistry, 10, 2225 ( 1971 ).
- 58 ) Moquin; D. C. Prodomus, 13, 400 ( 1849 ).
- 59 ) J. Hieronimus; *Plantae diaphoricae florae Argentinae*, Bol. Acad. Nac. de Cienc. ( Cba. ), 4, 199 ( 1882 ); Plantas Diafóricas, Flora Argentina, Ed. Atlántida, Buenos Aires(1929) .
- 60 ) E. Wollenweber y V. H. Dietz; Phytochemistry, 20, 869 ( 1981 ).
- 61 ) M. Jay, J. Favre-Bonvin, B. Voirin, M. Viricel y E. Wollenweber; Phytochemistry, 20, 2307 ( 1981 ).
- 62 ) M. Iinuma, S. Matsuura, K. Kurogochi y T. Takana; Chem. Pharm. Bull., 28, 717 ( 1980 ).
- 63 ) E. Steinegger y R. Hänsel; " Lehrbuch der Pharmakognosie ", Springer, Berlin-Heidelberg-New York ( 1972 ).
- 64 ) M. Sakakibara, D. di Feo, N. Nakatani, B. Timmermann y T. J. Mabry; Phytochemistry, 15, 727 ( 1976 ).

- 65 ) J. B. Harborne; "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", Academic Press, London-New York, 174 ( 1973 ).
- 66 ) J. B. Harborne; "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", Academic Press, London-New York, 311 ( 1973 ).
- 67 ) J. B. Harborne y C. A. Willians; *Phytochemistry*, 10, 367 ( 1971 ).
- 68 ) H. Grisebach; " Biosynthetic Patterns in Microorganisms and Higher Plants ", John Wiley y Sons, Inc., New York-London-Sydney, 1 ( 1967 ).
- 69 ) E. Walton y V. S. Butt; *Phytochemistry*, 10, 295 ( 1971 ).
- 70 ) E. Wong y E. Moustafa; *Tetrahedron Letters*, 26, 3021 ( 1966 ).
- 71 ) E. Wong; *Chem. Commun.*, 395 ( 1968 ).
- 72 ) E. Wong; *Phytochemistry*, 7, 1751 ( 1968 ).
- 73 ) E. Wong y H. Grisebach; *Phytochemistry*, 8, 1419 ( 1969 ).
- 74 ) L. Patschke, W. Barz y H. Grisebach; *Z. Naturforsch*, 21b, 201 ( 1966 ).
- 75 ) E. Moustafa y E. Wong; *Phytochemistry*, 6, 625 ( 1967 ).
- 76 ) H. Grisebach y W. Bilhuber; *Z. Naturforsch* 22b, 747 ( 1967 ).
- 77 ) G. Forkman; *Phytochemistry*, 18, 1973 ( 1979 ).
- 78 ) R. J. Light y K. Hahlbrock; *Z. Naturforsch.*, C. Biosci., 35c, 717 ( 1980 ); *Chem. Abstr.*, 93, 235212e ( 1980 ).
- 79 ) L. Patschke y H. Grisebach; *Phytochemistry*, 7, 235 ( 1968 ).
- 80 ) R. J. Roberts y P. F. T. Vaughan; *Phytochemistry*, 10, 2649 ( 1971 ).
- 81 ) M. Fujita, T. Inoue; *Yakugaku Zasshi*, 99, 165 ( 1979 ); *Chem. Abstr.*, 90, 164809e ( 1979 ).
- 82 ) H. J. Grambow y H. Grisebach; *Phytochemistry*, 10, 789 (1971).
- 83 ) H. Grisebach y H. J. Grambow; *Phytochemistry*, 7, 51, ( 1968 ).
- 84 ) J. P. Van der Merwe, D. Ferreira, E. U. Brandt y D. G. Roux; *Chem. Commun.* 521 ( 1972 ).

- 85 ) F. du R. Volsteadt, G. J. H. Rall y D. G. Roux; *Tetrahedron Letters*, 1001 ( 1973 ).
- 86 ) E. Wong; *Chem. Ind.*, 1985 ( 1964 ).
- 87 ) D. G. Roux y D. Ferreira; *Phytochemistry*, 13, 2039 ( 1974 ).
- 88 ) M. K. Burns, J. M. Coffin, I. Kurobane y L. C. Vining; *Chem. Commun.*, 426 ( 1979 ).
- 89 ) K. Hahlbrock, A. Sutter, E. Wellmann, R. Ortman y H. Grisebach; *Phytochemistry* 10, 109 ( 1971 ).
- 90 ) J. Koukol y E. E. Conn; *J. Biol. Chem.*, 236, 2692 ( 1961 ).
- 91 ) S. E. Iredale y H. Smith; *Phytochemistry*, 13, 575 ( 1974 ).
- 92 ) K. Hahlbrock, E. Wong, L. Schill y H. Grisebach; *Phytochemistry*, 9, 949 ( 1970 ).
- 93 ) W. R. Raymond y V. P. Maier; *Phytochemistry*, 16, 1535 (1977).
- 94 ) H. Sandermann y H. Grisebach; *Biochim. Biophys. Acta*; 208, 173 ( 1970 ).
- 95 ) R. Ortman, H. Sandermann y H. Grisebach; *FEBS Letters*, 7, 164 ( 1970 ).
- 96 ) P. M. Dewick; *Phytochemistry*, 17, 249 ( 1978 ).
- 97 ) P. M. Dewick; *Phytochemistry*, 14, 979 ( 1975 ).
- 98 ) J. Ebel, K. Hahlbrock y H. Grisebach; *Biochim. Biophys. Acta.*, 268, 313 ( 1972 ).
- 99 ) G. Bunter y R. K. Ibrahim; *Phytochemistry*, 19, 741 ( 1980 ).
- 100 ) D. H. R. Barton, G. W. Kirby, J. B. Taylor y G. M. Thomas; *Proc. Chem. Soc.*, 179 ( 1962 ).
- 101 ) D. H. R. Barton, G. W. Kirby y J. B. Taylor; *Proc. Chem. Soc.*, 340 ( 1962 ).
- 102 ) L. Laonest; *Mater. Resp. Konf. Fiziol. Biokhim. Rast.*, 20 ( 1972 ); *Chem. Abstr.*, 82, 54282e ( 1975 ).
- 103 ) U. Margna; *Phytochemistry*, 16, 419 ( 1977 ).

- 104 ) U. Margna; Eesti NSV Tead. Akad. Toim. Biol., 20, 242 ( 1971); Chem. Abstr. 75, 85271k ( 1971 ).
- 105 ) U. Margna y L. Loanest; Sci. Rev. ( Belgrade ), 25, 141 ( 1974 ); Chem. Abstr., 82, 108793t ( 1975 ).
- 106 ) N. P. Das y L. A. Griffiths; Biochem. J., 110, 449 ( 1968 ).
- 107 ) L. J. Dietermann, S. H. Wender, W. Chorney y S. Skok; Phytochemistry, 8, 2321 ( 1969 ).
- 108 ) W. Hosel y W. Barz; Biochim. Biophys. Acta; 261, 294 ( 1972 ).
- 109 ) W. Hosel , P. Z. Shaw y W. Barz; Z. Naturforsch B, 27, 946 ( 1972 ); Chem. Abstr., 78, 2039d ( 1973 ).
- 110 ) S. R. Udupa y M. S. Chadha; Indian J. Biochem. Biophys., 15, 328 ( 1978 ); Chem. Abstr., 90, 51170w ( 1979 ).
- 111 ) S. R. Udupa y M. S. Chadha; Indian J. Biochem. Biophys., 15, 333 ( 1978 ); Chem. Abstr., 90, 85244p ( 1979 ).
- 112 ) O. N. Voskresenskii y V. N. Bokyrev; Farmakol. Toksikol. ( Moscow ), 42, 378 ( 1979 ); Chem. Abstr., 91: 122481g ( 1979 ).
- 113 ) L. I. Lisevitskaya, A. L. Shinkarenko, G. N. Zemtsova y V. A. Kampantsev; Aktuak. Vop. Farm., 178 ( 1968; Pub. 1970 ); Chem. Abstr., 76, 108080 ( 1972 ).
- 114 ) L. I. Lisevitskaya, A. L. Shinkarenko y V. A. Makarov; Aktual Vop. Farm., 176 ( 1968; Pub. 1970 ); Chem. Abstr., 76, 108079 ( 1972 ).
- 115 ) V. Petkov y P. Manilov; Comp. Med. East West, 6, 123 ( 1978 ); Chem. Abstr., 93, 106987 ( 1980 ).
- 116 ) M. Taskov; Tr. Nauchnoizsled Khim. Farm. Inst.; 10, 221 ( 1978 ); Chem. Abstr., 93, 161195c ( 1980 ).
- 117 ) N. S. Parman y M. N. Ghosh; Indian J. Pharmacol., 10, 277 ( 1978 ); Chem. Abstr., 91, 133948 ( 1979 ).
- 118 ) N. S. Parmar y M. Ghosh; Bull. Jawaharlal Grad. Med. Educ. Res.; 1, 6 ( 1976 ); Chem. Abstr., 90, 97620 ( 1979 ).

- 119 ) N. S. Parmar y M. N. Ghosh; Bull. Jawaharlal Inst. Post. Grad. Med. Educ. Res.; 2, 42 ( 1977 ); Chem. Abstr., 90, 115212w ( 1979 ).
- 120 ) V. Bartos, J. Kolc y P. Malek; Symphol., Proc. Int. Congr. 6<sup>th</sup> 1977 ( Pub. 1979 ) 231; Chem. Abstr., 91, 204383 ( 1979 ).
- 121 ) K. K. Anand, M. L. Sharma, B. Singh y B. J. R. Ghatak; Indian J. Exp. Biol., 16, 1216 ( 1978 ); Chem. Abstr., 90, 80927d ( 1979 ).
- 122 ) N. A. Kalashnikova y G. I. Gerashchenko; Aktual. Vopr. Farm., 2, 353 ( 1974 ); Chem. Abstr., 84, 90346m ( 1976 ).
- 123 ) I. Lamber, N. Nikolov, I. Krushkov, D. Zhelyazkov y P. Manolov; Farmatsiya ( Sofia ) 30, 33 ( 1980 ); Chem. Abstr., 93, 197805r ( 1980 ).
- 124 ) R. C. Robbins; U. S. 3,867,541 ( cl. 424-283; A01n, A61k ) 18 Feb 1975, Appl. 250, 035, 03 May 1972.
- 125 ) R. C. Robbins; U. S. 3,903,266 ( cl. 424-183 ), 14 Feb 1974.
- 126 ) R. C. Robbins; J. Atheroscler. Res., 7, 3 ( 1967 ); Chem. Abstr., 66, 64142t ( 1967 ).
- 127 ) A. Wasilewski; Wien Med. Wochenschr, 122, 106 ( 1972 ); Chem. Abstr., 77, 809 ( 1972 ).
- 128 ) D. Dobrescu, E. Custeaa, E. Tarpos y G. Georgescu; Farmacia ( Bucarest ), 18, 455 ( 1970 ); Chem. Abstr., 74, 2511 (1971).
- 129 ) Y. Khadzhai, G. U. Obolentseva y A. D. Serdyk; Farmakol. Toksikol ( Moscow ), 32, 451 ( 1969 ); Chem. Abstr., 71, 79508 ( 1969 ).
- 130 ) N. S. Parmar y M. N. Ghosh; Indian J. Exp. Biol., 15, 311 ( 1977 ); Chem. Abstr., 87, 626435 ( 1977 ).
- 131 ) O. P. Agarward y A. Nagaratnam; Toxicon , 19, 201 ( 1981 ); Chem. Abstr., 94, 167981y ( 1981 ).
- 132 ) Y. I. Khadzhai, G. V. Okolentseva, V. I. Litvinenko y N. P. Maksyutina; Fiziol. Aktiv. Vishchestva, 3 ( 1966 ); Chem. Abstr., 67, 9929 ( 1967 ).



- 133 ) T. T. Chan y T. J. Haley; J. Pharm. Sci., 58, 621 ( 1969 ); Chem. Abstr., 71, 47980a ( 1969 ).
- 134 ) A. R. Contessa, M. Ferrari, P. Da Re y P. Valenti; Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 181, 343 ( 1969 ); Chem. Abstr., 72, 98774q ( 1970 ).
- 135 ) I. Mucsi, I. Beladi, R. Pusztai, M. Bakay y M. Gabor; Orvos tud. Aktual. probl., 31, 51 ( 1978. ); Chem. Abstr., 90, 67141y ( 1979 ).
- 136 ) S. A. Vichkanova y L. V. Goryunova; Tr. Uses. Nauch., 14, 212 ( 1971 ); Chem. Abstr., 79, 728v ( 1973 ).
- 137 ) W. S. Burnham, R. W. Sidwell y M. G. Stout; J. Med. Chem., 15, 1075 ( 1972 ); Chem. Abstr., 78, 11468 ( 1973 ).
- 138 ) I. Mucsi, I. Beladi, R. Pusztai, M. Bakay y N. Gabor; Flavonoids Bioflavonoids, Proc. Hung. Bioflavonoid. Symp., 5<sup>th</sup>, 401 ( 1977 ); Chem. Abstr., 89, 71525y ( 1978 ).
- 139 ) A. Ben Aziz; Science, 155, 1026 ( 1967 ).
- 140 ) D. Alt y A. Schmidle; Angew. Bot., 54, 139 ( 1980 ); Chem. Abstr., 94, 12925j ( 1981 ).
- 141 ) Y. Honma, Y. Arimoto y T. Misato; JAPAN Kokai 75,111,230 ( cl. A01N ), 01 Sep. 1975, Appl. 74 19,822, 19 Feb. 1974.
- 142 ) K. K. Jain, D. V. Kohli y R. K. Uppadhyay; Indian Drugs Pharm. Ind., 11, 30 ( 1976 ); Chem. Abstr., 66, 51023t ( 1967 ).
- 143 ) C. D. Hufford y W. L. Lasswell; Lloydia 41, 156 ( 1978 ).
- 144 ) A. S. Ramaswamy, S. Jayaraman, M. Sirsi y K. H. Rao; Indian J. Exp. Biol., 10, 72 ( 1972 ); Chem. Abstr., 77, 43732x ( 1972 ).
- 145 ) E. A. Vasil'chenko y K. E. Sokolova; Farmakol. Toksikol ( Moscow ) 36, 97 ( 1973 ); Chem. Abstr., 78, 92691 ( 1973 ).
- 146 ) J. M. Edwards; Lloydia, 42, 85 ( 1979 ).
- 147 ) S. M. Kupchan, C. W. Sigel, R. J. Hemingway, J. R. Knox y M. S. Udayamusthy; Tetrahedron, 25, 1603 ( 1969 ).

- 148 ) T. G. Waddell, M. B. Ridley, K. D. Evans y M. E. Green; J. Tenn. Acad. Sci., 59, 103 ( 1979 ); Chem. Abstr., 91, 181329 ( 1979 ).
- 149 ) T. J. Mabry; Rev. Latinoamer. Quím., 6, 105 ( 1975 ).
- 150 ) E. D. Pellizari, C. M. Chuang, J. Kuc y E. B. Williams; J. Chromatog., 40, 285 ( 1969 ).
- 151 ) R. D. Schmid y J. B. Harborne; Phytochemistry, 12, 2269 (1973).
- 152 ) H. Schiels, H. D. Zinsmeister y K. Pflieger; Phytochemistry, 16, 1019 ( 1977 ).
- 153 ) H. Schiels, H. D. Zinsmeister y K. Pflieger; Phytochemistry, 17, 523 ( 1978 ).
- 154 ) D. G. I. Kingston; Tetrahedron, 27, 2691 ( 1971 ).
- 155 ) J. H. Bowie y D. W. Cameron; Aust. J. Chem., 19, 1627 ( 1966 ).
- 156 ) H. Audier; Bull. Soc. Chim. France, 9, 2892 ( 1966 ).
- 157 ) R. I. Reed y J. M. Wilson; J. Chem. Soc., 5949 ( 1963 ).
- 158 ) H. Budzikiewicz, C. Djerassi y D. H. Williams; " Mass Spectrometry of Organic Compounds ", Holden-Day, San Francisco(1967).
- 159 ) M. Goudard, J. Favre-Bonvin, P. Lebreton y J. Chopin; Phytochemistry, 17, 145 ( 1978 ).
- 160 ) M. Goudard, J. Favre-Bonvin, J. Strelisky, M. Nogari y J. Chopin; Phytochemistry, 18, 186 ( 1979 ).
- 161 ) R. D. Schmid; Tetrahedron, 28, 3259 ( 1972 ).
- 162 ) R. D. Schmid, P. Varenne y R. Paris; Tetrahedron, 28, 5037 ( 1972 ).
- 163 ) H. Wagner y O. Seligmann; Tetrahedron, 29, 3029 ( 1973 ).
- 164 ) H. Guinaudeau, O. Seligmann, H. Wagner y A. Neszmelyi; Phytochemistry, 20, 1113 ( 1981 ).
- 165 ) J. Massicot y P. Macthe; Bull. Soc. Chim., 1962 ( 1962 ).
- 166 ) T. J. Batterham y R. J. Highet; Aust. J. Chem., 17, 428 (1964).

- 167 ) T. J. Mabry, J. Kagan y H. Rosler; *Phytochemistry*, 4, 487 ( 1965 ).
- 168 ) A. C. Waiss, R. E. Wudin y D. J. Sterra; *Tetrahedron Letters*, 513 ( 1964 ).
- 169 ) T. J. Mabry, K. R. Markham y M. B. Thomas; " The Systematic Identification of Flavonoids ", Springer, New York-Heidelberg-Berlín, (1970) .
- 170 ) A Grouiller; *Bull. Soc. Chim.*, 2405 ( 1966 ).
- 171 ) H. Rosler, T. J. Mabry, M. F. Cranmer y J. Kagan; *J. Org. Chem.*, 30, 4346 ( 1965 ).
- 172 ) H. M. Fales y K. S. Wanen; *J. Org. Chem.*, 32, 501 ( 1967 ).
- 173 ) J. H. Bowie, J. Ronayne y D. H. Williams; *J. Chem. Soc. B*, 785 ( 1966 ).
- 174 ) R. Grigg, J. A. Knight y P. Roffey; *Tetrahedron*, 22, 3301 ( 1966 ).
- 175 ) R. G. Wilson, J. H. Bowie y H. Williams; *Tetrahedron*, 24, 1407 ( 1968 ).
- 176 ) D. H. Williams y N. S. Bhacca; *Tetrahedron*, 21, 2021 ( 1965 ) y J. C. Connolly y R. Mc Crindle; *Chem. Ind.*, 379 ( 1965 ).
- 177 ) J. H. Bowie y D. W. Cameron; *Austr. J. Chem.*, 19, 1627 ( 1966 ).
- 178 ) A. F. Cockerill y D. M. Rackham; *Tetrahedron Letters*, 5149 ( 1970 ).
- 179 ) M. Okikana, N. Kawano, W. Rahman y M. M. Dhas; *Tetrahedron Letters*, 4125 ( 1972 ).
- 180 ) H. M. Mc Connell y R. E. Robertson; *J. Chem. Phys.*, 29, 1361 ( 1958 ).
- 181 ) P. V. Delmarco, T. K. Elzey, R. B. Lewis y E. Wenkert; *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 5734 ( 1970 )'.
- 182 ) M. Okigawa y N. Kawano; *Chem. Ind.*, 850 ( 1973 ).

- 183 ) B. Ternai y K. R. Markham; *Tetrahedron* 32, 565 ( 1976 ).
- 184 ) G. C. Levy y G. L. Nelson; " Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  para Químicos Orgánicos ", Ediciones Bellaterra S.A.; Barcelona, (1976) .
- 185 ) P. Joseph-Nathan, J. Mares, Ma. C. Hernandez y J. N. Schoolery; *J. Magnetic Resonance*, 16, 447 ( 1974 ).
- 186 ) K. R. Markham y B. Ternay; *Tetrahedron*, 32, 2607 ( 1976 ).
- 187 ) J. Polonsky, Z. Baskevitch, H. E. Gottlieb y E. Wenekrt; *J. Org. Chem.*, 40, 2499 ( 1975 ).
- 188 ) J. B. Stothers; *Carbon-13-NMR Spectroscopy Vol. 24*, Academic Press, New York, (1972).
- 189 ) K. S. Dhami y J.B. Stothers; *Can. J. Chem.*, 44, 2855 ( 1966 ).
- 190 ) P. C. Lauterbur; *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 1846 ( 1961 ).
- 191 ) E. Wenkert y H. E. Gottlieb; *Phytochemistry*, 16, 1811 ( 1977 ).
- 192 ) J. Weigert y J. D. Roberts; *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 2967 (1967).
- 193 ) C. A. Kingsbury y J. H. Locker; *J. Org. Chem.*, 40, 1120 (1975).
- 194 ) F. W. Wehrli; *Chem. Commun.*, 663 ( 1975 ).
- 195 ) Ching-jer Chang; *J. Org. Chem.*, 41, 1882 ( 1976 ).
- 196 ) Ching-jer Chang; *Lloydia*, 41, 151 ( 1978 ).
- 197 ) J. L. Marshall, D. E. Miiller, S. A. Conn, R. Seiwel y A. M. Ihrig; *Acc. Chem. Res.*, 7, 333 ( 1974 ).
- 198 ) H. Wagner y V. M. Chari; *Tetrahedron Letters*, 1799 ( 1976 ).
- 199 ) M. Iinuna, S. Matsuura y K. Kusuda; *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 708 ( 1980 ).
- 200 ) D. J. Calvert, R. C. Cambie y B. R. Davies; *Org. Mag. Resonance*, 12, 583 ( 1979 ).
- 201 ) D. C. Wilton, M. Akhtar y K. A. Munday; *Biochem. J.*, 98, 29c ( 1966 ).
- 202 ) M. Akthar, D. C. Wilton y K. A. Munday; *Biochem. J.*, 101, 23c ( 1966 ).

- 203 ) M. Devys y M. Barbier; Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 865 (1967).
- 204 ) W. R. Nes, K. Krevitz, J. Joseph, W. D. Nes, B. Harris, G. F. Gibbons y G. W. Patterson; Lipids, 12, 511 ( 1977 ).
- 205 ) M. Devys, A. Alcaide y M. Barbier; Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1751 ( 1968 ).
- 206 ) W. Sucrow; Chem. Ber., 99, 2765 ( 1966 ).
- 207 ) W. Eichenberg y W. Menke; Z. Naturforschg., 21b, 859 ( 1966 ).
- 208 ) K. Stefanov y A. Popov; Dokl. Bolg. Akad. Nauk., 29, 1289 ( 1976 ); Chem. Abstr., 86, 52672 ( 1977 ).
- 209 ) B. A. Knights; Phytochemistry, 11, 1177 ( 1972 ).
- 210 ) P. K. Lee, D. P. Carewand y J. Rosazza; Lloydia 35, 150 (1972).
- 211 ) J. W. Rowe; Phytochemistry, 4, 1 ( 1965 ).
- 212 ) D. Lavie y I. A. Kaye; J. Chem. Soc., 5001 ( 1963 ).
- 213 ) N. Weber; Phytochemistry, 16, 1849 ( 1977 ).
- 214 ) R. J. Weston; Aust. J. Chem., 13, 522 ( 1974 ).
- 215 ) S. J. Stohs y H. Rosemberg; Lloydia, 38, 181 ( 1975 ).
- 216 ) T. Suga y S. Kondo; Phytochemistry, 13, 522 ( 1974 ).
- 217 ) D. J. Slatkin, J. E. Knapp, P. L. Schiff, C. E. Turner y L. Mole; Phytochemistry, 14, 580 ( 1975 ).
- 218 ) S. J. Stohs y M. M. El-Olemy; Phytochemistry, 10, 2987 ( 1971).
- 219 ) E. Heftmann y M. L. Weaver; Phytochemistry, 13, 1801 ( 1974 ).
- 220 ) R. Tschesche, H. Hulpke y R. Fritz; Phytochemistry, 7, 2021 ( 1968 ).
- 221 ) D. F. Johnson, J. A. Waters y R. D. Bennett; Arch. Biochem. Biophys., 108, 282 ( 1964 ).
- 222 ) S. J. Stohs y J. A. Haggerty; Phytochemistry, 12, 2869 ( 1973 ).
- 223 ) H. R. Bentley, J. A. Henry, D. S. Irvine, D. Mukerji y F. S. Spring; J. Chem. Soc., 596 ( 1955 ).
- 224 ) J. A. Henry, D. S. Irvine y F. S. Spring; J. Chem. Soc., 1607 ( 1955 ).

- 225 ) R. C. Cambie, J. C. Pasviell; N. Z. J. Sci., 13, 180 (1970); Chem. Abstr., 73, 22139m ( 1970 ).
- 226 ) W. W. Reid; Ann. Tab., Sect. 2, 151 ( 1974 ); Chem. Abstr., 85, 2685 ( 1976 ).
- 227 ) J. S. Agarwal y R. P. Rastogi; Phytochemistry, 15, 430 (1976).
- 228 ) L. W. Parks; J. Am. Chem. Soc., 80, 2023 ( 1958 ).
- 229 ) P. T. Russell, R. T. van Aller and W. R. Nes; J. Biol. Chem., 242, 5802 ( 1967 ).
- 230 ) K. H. Raab, N. J. de Souza y W. R. Nes; Biochim. Biophys. Acta. 152, 742 ( 1968 ).
- 231 ) M. Castle, G. Blondin y W. R. Nes; J. Am. Chem. Soc., 85, 3306 ( 1963 ).
- 232 ) R. B. Clayton; Quart. Rev., 19, 201 ( 1965 ).
- 233 ) E. L. Ghisalberti, N. J. de Souza, H. H. Rees, L. J. Goad y T. W. Goodwin; Chem. Commun., 1401 ( 1969 ).
- 234 ) Z. A. Wojciechowski, L. J. Goad y T. W. Goodwin; Biochem. J., 136, 405 ( 1973 ).
- 235 ) C. J. Brooks, E. C. Horning y J. S. Young; Lipids, 3, 391 ( 1968 ).
- 236 ) J. Diekman y C. Djerassi; J. Org. Chem., 32, 1005 ( 1967 ).
- 237 ) C. J. Brooks, W. Henderson y G. Steal; Biochim. Biophys. Acta, 296, 431 ( 1973 ).
- 238 ) B. A. Knights; J. Gas Chromatog., 5, 273 ( 1967 ).
- 239 ) M. Farines, M. Charrouf y J. Soulier; Phytochemistry, 20, 2039 ( 1981 ).
- 240 ) S. G. Wyllie y C. Djerassi; J. Org. Chem., 33, 305 ( 1968 ).
- 241 ) H. Budzikiewicz, C. Djerassi and C. H. Williams; " Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry ", Vol. 2: Steroids, Terpenoids, Sugars and Miscellaneous Classes, Holden-Day, San Francisco ( 1964 ).

- 242 ) R. H. Shapiro y C. Djerassi; J. Am. Chem. Soc., 33, 1741 ( 1968 ).
- 243 ) C. Djerassi; Pure and Appl. Chem., 50, 171 ( 1978 ).
- 244 ) I. V. Torgorov y T. P. Fradkina; Tetrahedron Letters, 3015 ( 1964 ).
- 245 ) H. E. Audier, R. Beugelmans y B. C. Das; Tetrahedron Letters, 4341 ( 1966 ).
- 246 ) R. T. Aplin y G. M. Hornby; J. Chem. Soc. B, 1076 ( 1966 ).
- 247 ) X. A. Dominguez; " Métodos en Investigación Fitoquímica ", Ed. Limira, México, (1973) .
- 248 ) L. H. Briggs y R. H. Locker; J. Chem. Soc., 3131 ( 1951 ).
- 249 ) P. Rivaille y C. Mentzer; C. R., 268, 2213 ( 1969 ).
- 250 ) J. Mears y T. J. Mabry; Phytochemistry, 11, 411 ( 1972 ).
- 251 ) K. Fukui y T. Matsumoto; Bull. Chem. Soc. Jp., 36, 806 (1963).
- 252 ) M. Goudard y J. Chopin; C. R., 282, 683 ( 1976 ).
- 253 ) R. C. Shah, C. R. Mehta y T. S. Wheeler; J. Chem. Soc., 591 ( 1936 ).
- 254 ) T. P. Popova, V. I. Litvinenko y I. P. Kovalev; Khim. Prir. Soedin., 9, 729 ( 1875 ); Chem. Abstr., 82, 28553z ( 1975 ).
- 255 ) N. P. Beshko, E. V. Gella, V. I. Litvinenko, I. P. Kovalev y V. G. Gordienko; Khim. Prir. Soedin., 11, 514 ( 1975 ); Chem. Abstr., 84, 27991v ( 1976 ).
- 256 ) T. P. Popova, V. I. Litvinenko, D. A. Pakaln y K. F. Blinova; Farm. Zh., 31, 89 ( 1976 ); Chem. Abstr., 85, 90145h ( 1976 ).
- 257 ) P. Rivaille y C. Mentzer; C. R., 260, 2243 ( 1965 ).
- 258 ) N. C. Franca, O. R. Gottlieb, M. T. Magalhães, P. T. Mendes, J. G. S. Maia, M. L. Da Silva y H. E. Gottlieb; Phytochemistry, 15, 572 ( 1976 ).
- 259 ) W. K. Slater y H. Stephen; J. Chem. Soc., 117, 309 ( 1920 ).

- 260 ) R. Robinson y K. Venkataraman; J. Chem. Soc., 126, 61 (1929).
- 261 ) P. E. Kolattubudy; Phytochemistry, 6, 963 ( 1967 ).
- 262 ) J. R. Dyer; " Aplicaciones de espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos ", Ed. Prentice-Hall Internacional, España, (1973) .
- 263 ) H. Budzikiewicz, J. M. Wilson y C. Djerassi; J. Am. Chem.Soc., 85, 3688 ( 1963 ).
- 264 ) L. Ogunkoya; Phytochemistry, 20, 121 ( 1981 ).
- 265 ) H. Budzikiewicz y W. Ockels; Tetrahedron, 32, 143 ( 1976 ).
- 266 ) Lee Kum-Tatt; Nature, 182, 655 ( 1958 ).
- 267 ) " The Sadtler Standard Spectra ", espectro de  $^1\text{H}$ -RMN N°6803, Sadtler Reserch Laboratories Inc., E. U. ( 1976 ).
- 268 ) " The Sadtler Standard Spectra ", espectro de  $^1\text{H}$ -RMN N°6845, Sadtler Reserch Laboratories Inc., E. U. ( 1976 ).
- 269 ) K. R. Markham, B. Ternai, R. Stanley y H. Geiger; Tetrahedron, 34, 1389 ( 1978 ).
- 270 ) N. Yamoaka, T. Usui, K. Matsuda, K. Tuzimura, H. Sugiyama y S. Seto; Tetrahedron Letters, 2047 ( 1971 ).
- 271 ) P. A. J. Gorin y M. Mazurek; Can. J. Chem., 53, 1212 ( 1975 ).
- 272 ) R. G. S. Ritchie, N. Cyr, B. Korsch, H. I. Koch y A. S. Perlin; Can. J. Chem., 53, 1424 ( 1975 ).
- 273 ) E. Breitmeier, W. Voelter, G. Jung y C. Tänzer; Chem. Ber., 104, 1147 ( 1971 ).
- 274 ) W. Klyne; Biochem. J. 47, xli ( 1950 ).
- 275 ) H. Rösler, U. Rösler, T. J. Mabry y J. Kagan; Phytochemistry, 5, 189 ( 1966 ).
- 276 ) H. Wagner, M. A. Iyengar, O. Seligmann y L. Hörhammer; Phytochemistry, 11, 2630 ( 1972 ).
- 277 ) I. Malinowski y H. Strzelecka; Acta Pol. Pharm., 33, 767 ( 1976 ); Chem. Abstr., 87, 180762c ( 1977 ).



- 278 ) L. S. Teslov y K. F. Blinova; Rastit. Resur., 10, 371 (1974); Chem. Abstr., 82, 28482a ( 1975 ).
- 279 ) G. S. Burasheva, M. M. Mukhamed'yarova y T. K. Chumbalov; Khim. Prir. Soedin., 663 ( 1976 ); Chem. Abstr., 86, 136309r ( 1977 ).
- 280 ) W. Herz, S. V. Govindan, I. Piess-Maurer, B. Kreh, H. Wagner, L. Farkas y J. Strelisky; Phytochemistry, 19, 669 ( 1980 ).
- 281 ) K. Biemann; " Mass Spectrometry, Organic Chemical Application ", Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York- San Francisco- Toronto-London,(1962) .
- 282 ) Y. Asakawa, F. Genjida y T. Suga; Bull. Chem. Soc. of Japan, 44, 297 ( 1971 ).
- 283 ) K. Panichpol y P. G. Waterman; Phytochemistry, 17, 1363 (1978).
- 284 ) R. Hänsel y D. Ohlendorf; Tetrahedron Letters, 431 ( 1969 ).
- 285 ) E. M. Gaydou y J. P. Bianchini; Bull. Soc. France, II-43 (1978).
- 286 ) B. Méndez, A. C. Rojas, A. Bahsas, R. Jaime y J. Triana; Acta Cient. Venezolana, 31, 394 ( 1980 ).
- 287 ) O. Hofer; Tetrahedron Letters, 3415 ( 1975 ).
- 288 ) E. Heftmann; Journal of Chromat. Library, Vol. 8: Chromatography of Steroids. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam-Oxford-New York,(1976) .
- 289 ) G. von Unruh y G. Spiteller; Tetrahedron, 26, 3329 ( 1970 ).
- 290 ) F. Hampshire; Chem. Comm., 2, 37 ( 1966 ).
- 291 ) H. Hoffmeister, C. Rufer, H. H. Keller, H. Schairer y P. Karlson; Chem. Ber., 98, 2361 ( 1965 ) y otras allí citadas.
- 292 ) F. A. Longs y J. G. Pritchard; J. Am. Chem. Soc., 78, 2663 ( 1956 ).
- 293 ) A. T. Hunziker; Kurtziana, 6, 297 ( 1971 ).
- 294 ) E. Thyihák; J. Chromatog., 14, 125 ( 1964 ) y " Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel ", E. Merck, Darmstadt ( R. F. de Alemania ).

- 295 ) J. A. Scarrow y C. F. H. Allen; Org. Synthesis, Coll. Vol.2, John Wiley y Sons, Inc.; London: Chapman y Hall limited, 387 ( 1943 ).
- 296 ) T. A. Geissman; " The Chemistry of Flavonoid Compounds ", The Mc Millan Co., New York,(1962) .