

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

NUEVA SAPOGENINA AISLADA DEL CALIBANUS HOOKERII E IDENTIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE GASES DE SAPOGENINAS ESTEROIDALES Y ESTEROLES.

278

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO
P R E S E N T A

MARIA GUADALUPE PEREZ CABALLERO

MEXICO, D. F.

1975



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Dr. Francisco Giral G.
VOCAL: Dra. Carmen Rivera M.
SECRETARIO: Q.F.B. Socorro Salas T.
1er. SUPLENTE: Dr. Jorge Reyes L.
2o. SUPLENTE: M. en C. Leticia Jiménez

SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Química Farmacéutica y Productos
Naturales, División de Estudios Superiores, Fa--
cultad de Química, U.N.A.M.

SUSTENTANTE: María Guadalupe Pérez Caballero

ASESOR DEL TEMA: Dra. Carmen Rivera de Reyes.

Este tesis se realizó en el Departamento
Química Farmacéutica y Productos Natura-
les, División de Estudios Superiores, Fa-
cultad de Química, UNAM., bajo la direc-
ción de la Dra. Carmen Rivera de Reyes,-
con una beca de la Dirección General del
Profesorado de la Universidad Nacional -
Autónoma de México.

A MIS PADRES

con el cariño y agradeci-
miento de toda mi vida.

A MIS HERMANOS

A LALO

"Dios te ha dado una mente infinita,
te rodea un Universo sin fin, sólo
ponte a mirarlo"....

Quiero expresar mi gratitud
a la Dra. Carmen Rivera por
su apoyo y orientación en -
el desarrollo de esta Tesis.

I N D I C E

	Pág.
I.- INTRODUCCION.....	1
II.- PARTE EXPERIMENTAL.....	10
III.- DISCUSION Y RESULTADOS.....	24
IV.- CONCLUSIONES.....	40
V.- BIBLIOGRAFIA.....	42

C A P I T U L O I

INTRODUCCION.-

Dadas las considerables desventajas causadas por el empleo de insecticidas, uno de los temas de mayor interés, recientemente dentro de este campo, ha sido la investigación sobre el empleo de hormonas de insectos (juveniles) para su propio control, que además de no ser contaminantes, presentan una gran especificidad y un impedimento a que estos organismos desarrollen una resistencia contra sus propias hormonas.

Al mismo tiempo, otro hecho de gran trascendencia, muy relacionado con el primero, ha sido, el descubrimiento de plantas como fuentes de hormonas de insectos con actividades biológicas similares o idénticas, reportado por vez primera en 1966 por Galbraith y Horn⁽¹⁾. Este hallazgo, ha suscitado diversas preguntas entre químicos y bioquímicos acerca de su papel en las plantas, de si su existencia es universal o limitada a ciertas especies, su biosíntesis, su distribución dentro de la planta, sus posibles efectos sobre organismos fitófagos, etc.

Aunque es todavía un campo poco explorado, se sabe que estas sustancias tienen influencia en las interacciones entre insectos y plantas, requerimientos nutricionales, quimiorrepción, toxicidad, etc.

Existen evidencias experimentales que indican que el -

suministro externo de estas sustancias, puede ocasionar alteraciones en la sincronización precisa del desarrollo del insecto, provocando la aparición de criaturas mal formadas sin la capacidad para sobrevivir y reproducirse.

Estas sustancias no son tóxicas a los insectos ni les causa ningún daño metabólico, sino que producen cambios específicos en los mecanismos de regulación, y desarrollo, en forma similar a la acción de los antibióticos en los insectos. Debido a las cantidades increíblemente pequeñas en que actúan, se piensa que constituyen una tercera generación de pesticidas de insectos. (2)

Por otra parte, parece ser que los insectos susceptibles a este tipo de sustancias de origen vegetal, han desarrollado, como un resultado de adaptaciones evolutivas, mecanismos químico sensoriales que les permite identificar las plantas convenientes para su desarrollo y supervivencia. (3) Consecuentemente, las plantas con un alto contenido de este tipo de sustancias (en particular ecdisterona) son extremadamente resistentes a los ataques de estos insectos.

Entre las sustancias hormonalmente activas, encontradas en plantas, podemos distinguir dos tipos:

- A) Las que poseen actividad de hormona juvenil.
- B) Las que poseen actividad de hormona de crecimiento.

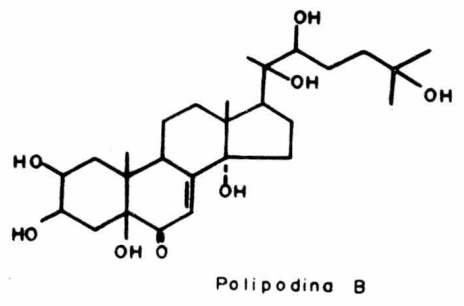
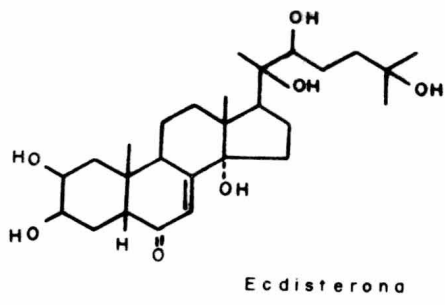
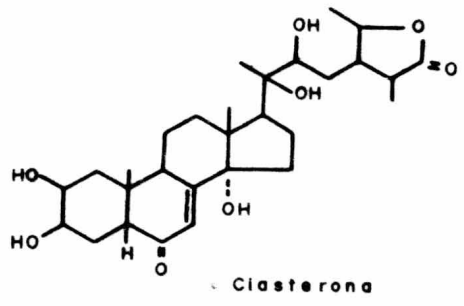
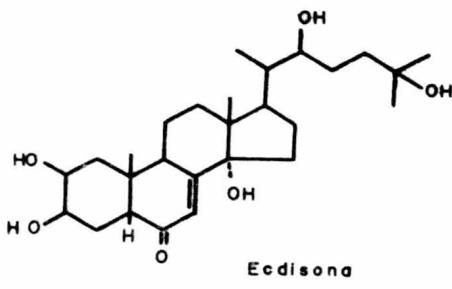
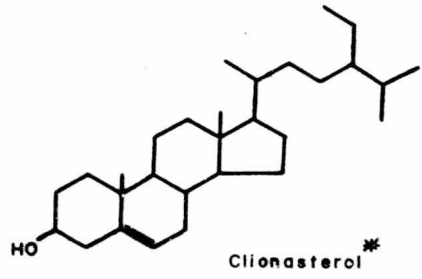
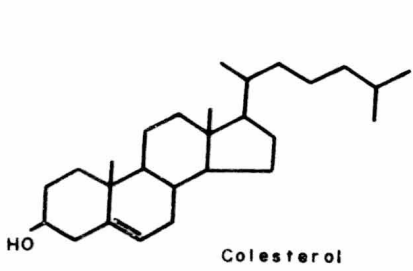
Las primeras son principalmente sesquiterpenos alifáticos

cos y monocíclicos del tipo del farnesano o bisabolenos, de naturaleza más bien apolar y químicamente relacionados con sesquiterpenos provenientes de insectos.

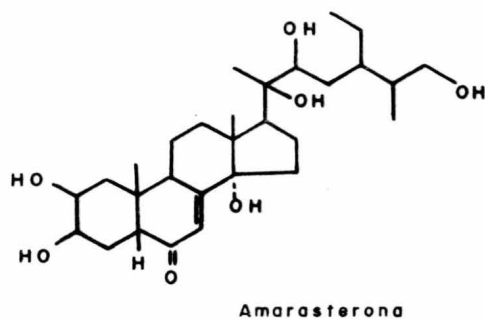
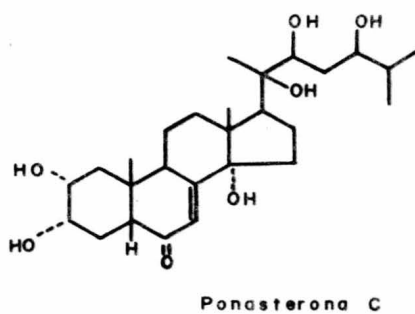
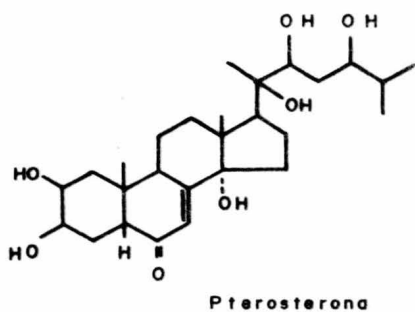
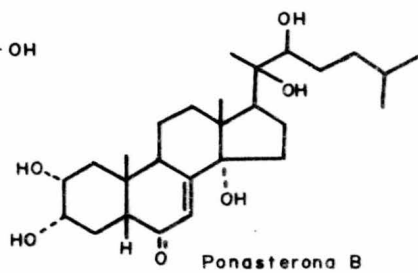
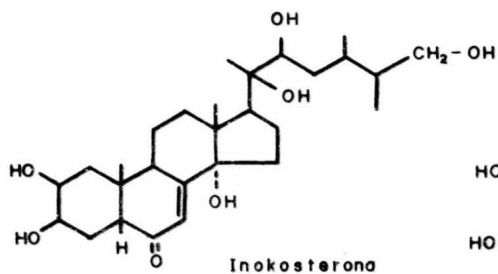
Las segundas, a las cuales nos referimos, en esta tesis, con más detalle, son esteroides de 27 átomos de carbono, a excepción de la ciasterona⁽⁴⁾ y de la amarasterona A y B⁽⁵⁾ que poseen 29. Cuentan con un alto número de hidróxilos (de 5 a 7), lo que les confiere una naturaleza altamente polar y por tanto muy solubles en agua en contraste con otros esteroides. Estos grupos hidróxilos se encuentran en posiciones raramente substituidas en los esteroides naturales. Estas hormonas presentan una relación química muy estrecha con la ecdisona, hormona muy común entre los insectos. En la figura 1 se presentan algunas de las hormonas de crecimiento aisladas de plantas, además de las estructuras del colesterol y del clionasterol que de alguna manera parecen estar relacionados con la biogénesis de estas hormonas, según han revelado recientes estudios metabólicos.⁽⁶⁾ y (7).

Como se puede observar de la figura, todas estas hormonas están estructuralmente relacionadas con la ecdisona. La ciasterona tiene una lactona de 5 miembros, pero su núcleo es similar a la ecdisona.

FIGURA I



* epímero en C-24 del β -sitosterol



La ecdisterona, también llamada ecdisona, isoinokosterona, polipodina A; crustecdisona sólo se diferencia de la ecdisona por tener un hidróxilo adicional en la posición 20- (20 hidroxiecdisona). Similarmente la ponasterona A⁽⁸⁾, inokosterona⁽⁹⁾ y pterosterona⁽¹⁰⁾ presentan el mismo núcleo esteroidal, con diferencias sólo en la cadena lateral. La polilipodina B⁽¹¹⁾ con 7 hidróxilos (5 ecdisterona) presenta una alta actividad hormonal. Sin embargo en lo que concierne a las ponasteronas B y C⁽¹²⁾, la orientación de los hidróxilos 2 y 3 es α , a diferencia de los de la ecdisona que son hidróxilos β .

Por otra parte se sabe que los insectos requieren de una fuente exógena de esteroides, es decir, muchos insectos pueden crecer y desarrollarse normalmente con una dieta artificial a base sólo de colesterol y algunos fitosteroides comunes, y que por el contrario todas las plantas con alguna posible excepción⁽¹³⁾, son capaces de sintetizar esteroides.

En cuanto a la distribución de estas hormonas, se en---cuentran ampliamente dispersas en el reino vegetal como se --puede ver en la tabla 1.

De ser la distribución más uniforme, podría pensarse que las hormonas de crecimiento tuvieran algún significado en los procesos vitales de la vida y no siempre están presente en la misma cantidad.

T A B L A 1

HORMONAS DE CRECIMIENTO DE INSECTOS EN PLANTAS

PLANTA	HORMONA	RENDIMIENTO	FUENTE	NO. REF.
<u>Polipodiaceae:</u>				
Polipodium vulgarel helecho polipodio	Ecdisona	18 mg. /Kg. seco	rizomas	(15)
	Ecdisterona	1g /Kg. seco	rizomas	(16)
	Polipodina B	400 mg. /Kg. seco	rizomas	(11)
Pteridium aquilinum Kuhn (helecho)	Ecdisterona	1 mg /Kg. seco	pinnae	(17)
	Ecdisona	0.45 mg. /Kg. seco	pinnae	(17)
Matteuccia struthiopteris Todaro (helecho avestruz)	Ecdisterona		total	(18)
	Ponasterona A		total	(18)
Lastrea thelipteris Bory (helecho de pantano)	Ecdisterona		total	(18)
	Ponasterona A		total	(18)
	Pterosterona		total	(19)
Onoclea sensibilis linné (helecho sensitivo)	Ecdisterona		total	(18)
	Ponasterona A		total	(18)
	Pterosterona		total	(19)
<u>Taxaceae:</u>				
Taxus baccata	Ecdistorona	300 mg. /Kg. fresco	hojas	(20)
Taxus cuspidata Sieb. et zucc.	Ponastenona A	445 mg. /Kg. fresco	hojas	(21)
	Ecdisterona	13.5 mg. /Kg. fresco	hojas	(21)

PLANTA	HORMONA	RENDIMIENTO	FUENTE	NO. REF.
<u>Podocarpaceae:</u>				
Podocarpus elata R. Br.	Ecdisterona		madera	(1)
Podocarpus chinensis Wall.	Ponasterona A	300 mg. /Kg. fresco	hojas	(21)
Podocarpus maciofila D. Don,	Ponasterona A	380 mg. /Kg. fresco	hojas	(21)
	Ecdisterona	7 mg. /Kg. fresco	hojas	(21)
Podocarpus nakaii Hay	Ponasterona A	1.6 g. /Kg. seco	hojas	(22)
	Ponasterona B	150 mg. /Kg. seco	hojas	(12)
	Ponasterona C	100 mg. /Kg. seco	hojas	(12)
	Ponasterona D	4 mg. /Kg. seco	hojas	(12)
<u>Moraceae:</u>				
Morus L. (árbol de mora)	Inokosterona	10 mg. /Kg. seco	hojas	(23)
	Ecdisterona	1 mg. /Kg. seco	hojas	(23)
<u>Amaranthaceae:</u>				
Achyranthes fauriei Ler. et. van. (hinata-inokozuchi)	Edisterona	100 mg. /Kg. seco	raíces	(24)
	Inokosterona	100 mg. /Kg. seco	raíces	(24)
Achyranthes obtusifolia lam.	Edisterona	250 mg. /Kg. seco	raíces	(25)
Achyranthes rubrosfusca Wight	Ecdisterona	490 mg. /Kg. seco	raíces	(26)
Achyranthes longifolia makino.	Ecdisterona	470 mg /Kg. seco	raíces	(26)
Ciathula capitata Moquin-tandon	Ciasterona	200 mg. /Kg. seco	raíces	(27)
<u>Verbenaceae:</u>				
Vitex megapotámica Spreng. Moldenke	Ecdisterona	880 mg. /Kg. seco	hojas	(28)

El papel real de estas hormonas muy análogas a la ecdisona, en plantas, todavía no está muy claro, no obstante hay algunas evidencias experimentales⁽¹⁴⁾ de que la ingestión de ciertos derivados sintéticos de la ecdisona inhiben el crecimiento de una larva, la maduración de un ovario o la producción de un huevo.

C A P I T U L O I I

PARTE EXPERIMENTAL.-

El desarrollo experimental de esta tesis consta de --
dos partes:

- I.- Aislamiento de una nueva sapogenina esteroidal -
del Calibanus Hookerii.
- II.- Desarrollo de un método de identificación de sa-
pogeninas esteroidales y esteroles por cromato--
grafia de Gas - Líquido.

Al iniciar este trabajo se contaba con una planta de
enormes rizomas de aproximadamente medio metro, llamada popu-
larmente "sacamecate" y que botánicamente se le conoce como -
Calibanus Hookerii, perteneciente a la familia de las Liliá-
ceas.

En trabajos anteriores se ha reportado la presencia -
en esta misma planta de diosgenina yamogenina, β sitosterol
y una sapogenina nueva llamada Calibagenina, ⁽²⁹⁾ principal -
componente de la planta.

Fue a partir de estos antecedentes, que se pensó en -
la posibilidad de encontrar otras sapogeninas de naturaleza-
muy semejante a la calibagenina y que por otra parte, pudie-
ran plantear interesantes relaciones con las hormonas de in-
sectos.

I.- Aislamiento de una nueva sapogenina esteroideal del Calibanus Hookerii.

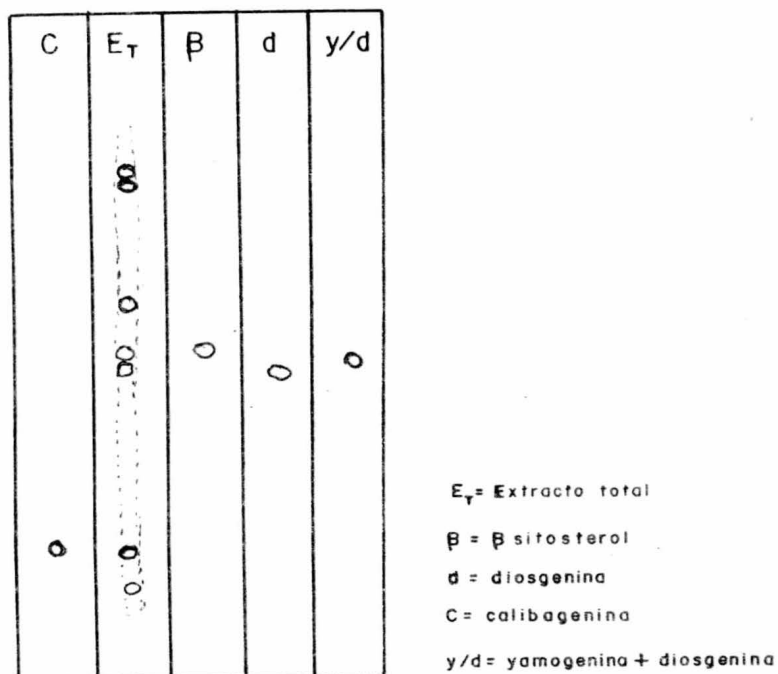
Para el presente trabajo se partió de un kilo de planta molida y puesta a secar a la intemperie. Con esta cantidad, se efectuó una hidrólisis directa, empleando 700 ml. de HCl - concentrado en 7 litros de agua y calentado a reflujo durante 18 horas. El producto fue filtrado, desechando la parte líquida. El residuo sólido fue neutralizado con NaHCO_3 al 1% y --- agua destilada hasta $\text{pH}=7$.

Una vez seco el producto hidrolizado (café, de aspecto terroso) fue extraído en soxhlet con heptano hasta que se hubo agotado. Después de evaporar el heptano, se obtuvo un extracto crudo de sapogeninas totales que pesó 27 g. Este extracto tenía apariencia cerosa, de color café y olor suigéneris.

Se hizo cromatografía en placa fina (CPF) de este extracto usando medios eluyentes de diferente polaridad. Se empleó como revelador H_2SO_4 5N, el cual desarrolla colores - muy específicos según la estructura de la sapogenina.

El medio de mejor resolución resultó ser: benceno - - acetato de etilo (6:4), en el cual se logra una separación- aceptable de 7 manchas principales más o menos definidas, como se puede observar en la figura:

FIG-2



De estas manchas principales se pudieron identificar por comparación de R_f y color de revelado, las sapogeninas ya reportadas en trabajos anteriores.

Una vez encontrado el medio eluyente de mejor resolución, se procedió a montar una columna piloto con 100 g. de sílice (kiesegel 60) y se aplicó 1 g. del extracto crudo de sapogeninas totales. Se recogieron 1500 fracciones de 1 ml. cada una. Estas fracciones fueron controladas de 5 en 5 por-

CPF obteniendo 19 nuevas fracciones. El rendimiento aproximado de la columna fue del 70%.

De estas fracciones, al correrlas por CPF en medios diferentes, se encontraron algunas aún más polares que la calibagenina, lo cual resultó de gran interés. Debido a la pequeña proporción en que se encontraban se montó una segunda columna, aplicando esta vez, 15 g. de extracto crudo y empleando 1.5 Kg. de silica gel. Se recogieron 1500 fracciones de 10 ml. cada una, con el mismo sistema eluyente, benceno - acetato de etilo (6:4).

Finalmente se acabó de bajar la columna con cloroformo, recogién dose volúmenes de 500 ml. De estas fracciones clorofórmicas la fracción No. 9 no identificada hasta ahora, era una de las de naturaleza más polar que la calibagenina. La CPF parecía indicar que se trataba de una sola sapogenina, que aunque impura, presentaba una sola mancha de color café - rojiza al revelar con H_2SO_4 5N.

Esta sapogenina que nosotros llamamos Sapogenina 9, fue purificada por cristalizaciones sucesivas en cloroformo - acetona, obtenién dose unas primeras agujas blancas de p.f. 150-55°C.

Esta sapogenina, aparentemente pura, se resolvió en cuatro manchas cuando se usó como medio eluyente hexano - acetato de etilo (5:5), por lo que fue necesario para su completa-

purificación, montar una pequeña columna aplicando 66 mg. Se recogieron 405 fracciones de 1 ml., las que se controlaron de 5 en 5. Las fracciones, con mayor contenido de Sapogenina 9, se juntaron y cristalizaron de hexano-acetato de etilo, - obteniéndose finalmente unos cristales blancos de p.f. 159-160°C.

Se corrieron los espectros de IR (en KBr y en CHCl_3), de RMN en CDCl_3 y de Masas.

ACETATO DE SAPOGENINA 9.

50 mg. de Sapogenina 9 se sometieron a reflujo con 0.3 ml. de anhídrido acético. Ya frío, se vertió sobre agua con hielo y el precipitado blanco obtenido, se filtró. Se lavó -- con solución acuosa de KHCO_3 al 5% y después con agua. El precipitado seco, se recristalizó de hexano-acetato de etilo.

Se corrieron espectros de este acetato, de IR (en KBr) y RMN en CDCl_3 .

II.- Desarrollo de un método de identificación de saponinas esteroidales y esteroides por Cromatografía de Gas - Líquido.

Dada la enorme importancia de las saponinas esteroidales dentro de la Industria Farmacéutica, así como en su --- identificación en nuevas plantas, se ha hecho necesario contar con un método de identificación sistemático capaz de resolver mezclas esteroidales, aún aquellas en que alguno de --

los componentes se encontrara en pequeña proporción. Este método, a la vez que preciso, se requiere que sea razonablemente rápido con respecto a los métodos de separación e identificación empleados hasta ahora en el campo de la Fitoquímica.

En 1959 Eglinton, descubrió que el método de cromatografía en fase de vapor, podría ser usado para analizar sustancias de alto peso molecular incluyendo esteroides⁽³⁶⁾. A partir de entonces se han reportado un sinnúmero de trabajos sobre este en particular, usando altas temperaturas y diversos líquidos de partición (37, 38, 39, 40). Estos, han sido de muy diversa naturaleza, desde los no selectivos, como los ésteres de metil silicón, hasta los de polaridad específica como el succinato de polietilén glicol.

Sin embargo, el análisis por este método no resulta tan simple como para otro tipo de sustancias como hidrocarburos; la baja presión de vapor, la sensibilidad térmica y la alta polaridad de estas moléculas, hacen necesarias ciertas precauciones y en algunos casos, algunos tratamientos previos al análisis. El diseño de los empaques tanto como el material de la columna cromatográfica, algunas veces debe ser de tipo especial.

Se ha visto que el análisis de estas mezclas esteroidales en forma de derivados tales como: éteres metílicos, acetatos, trifluoroacetatos y trimetilsilil éteres, facilitan nota

blemente el análisis, ya que a la vez que se aumenta su presión de vapor y se disminuye su polaridad, son apreciablemente menos sensibles a las altas temperaturas.

El presente trabajo no tiene más miras, que ser el principio de una investigación, que resulta extensa y que hasta ahora ha estado limitada por el reducido número de muestras a nuestro alcance.

No obstante, estos primeros resultados han sido satisfactorios y aplicables en un futuro a la identificación de sapogeninas esteroidales en plantas en un tiempo mínimo.

Al iniciar este trabajo, contábamos con cuatro muestras y diez sapogeninas de las cuales fueron descartadas tres por estar impurificadas. Todos estos compuestos fueron separados como trimetilsilil éteres.

PREPARACION DE TRIMETILSILIL ETERES:

Se disuelven 10 mg. de muestra en 0.5 ml de piridina, se añaden 0.3 ml. de hexametil disilazano y 0.1 ml. de cloruro de trimetilsilano y la mezcla se calienta a 60°C durante 30 minutos. Una vez preparados, se guardan en frascos con tapón y se conservan en un desecador bajo refrigeración.

COLUMNA.

Se hicieron algunos ensayos sobre columnas de diferente naturaleza y concentración de fase líquida (hasta 5%) con el -

fin de encontrar la más apropiada.

La columna empleada fue de acero inoxidable de 1.5 m. de largo y 3 mm. de diámetro, empacada con SE-30 al 3.0% sobre varaport de 80-100 mallas.

El empaque se preparó disolviendo 0.098 g. de fase líquida en 10 ml. de cloroformo, a esta solución se le incorporaron 3.5 g. del soporte sólido. La mezcla se agitó, haciendo girar el recipiente y el cloroformo se eliminó en un rotavapor, girando suavemente sobre un baño "María".

La columna se relleno con el empaque preparado, haciéndola vibrar suave y continuamente, con uno de sus extremos conectado al vacío, hasta que el soporte quedo en forma uniforme a lo largo de la columna. Luego se acondiciono durante 24-horas a 300°C con un flujo de 80 ml./min.

EQUIPO Y CONDICIONES DE OPERACION:

Su utilizo un cromatografo de gases Perkin Elmer 811 - con detector de ionización de flama. La señal amplificada pasa a un registrador potenciométrico con entrada de 1 mv. con una velocidad de carta de 0.1 y 0.2 pulgadas por minuto.

La columna fue mantenida isotérmicamente a 235°C con un flujo de nitrógeno de 40 ml./min.

Las temperaturas del inyector y del detector fueron -- 280°C y 250°C respectivamente. Los flujos de hidrógeno y aire

para la flama del micromechero fueron de 30 ml/min. y 300 ml./min. respectivamente.

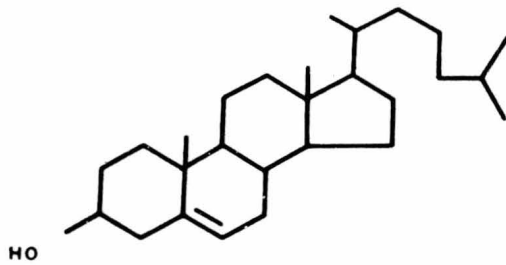
TIEMPOS DE RETENCION.

Los valores de los tiempos de retención son relativos al tiempo de retención del colesterol para todos los cromatogramas.

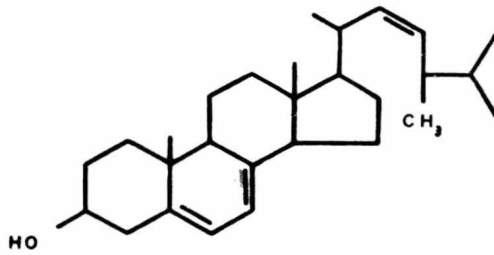
Para determinar estas relaciones, se inyectaron varias veces mezclas de colesterol con cada una de las otras muestras.

FIGURA-3

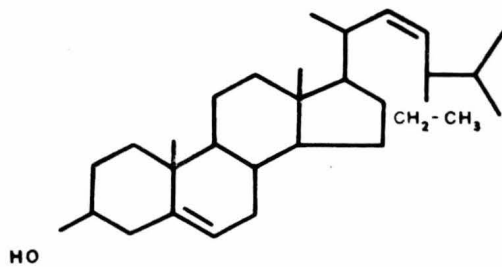
ESTEROLES



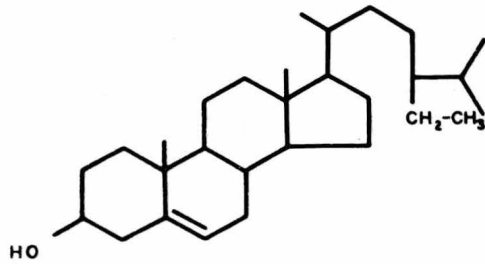
Colesterol



Ergosterol

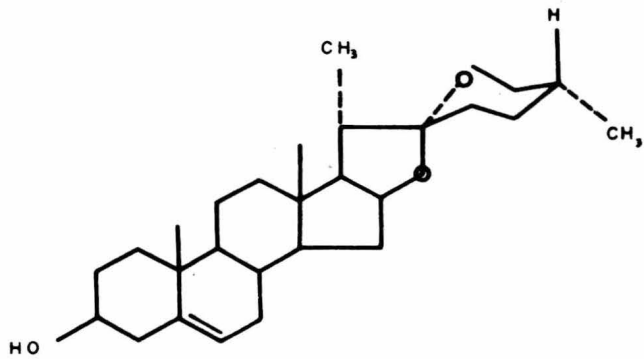


Stigmasterol

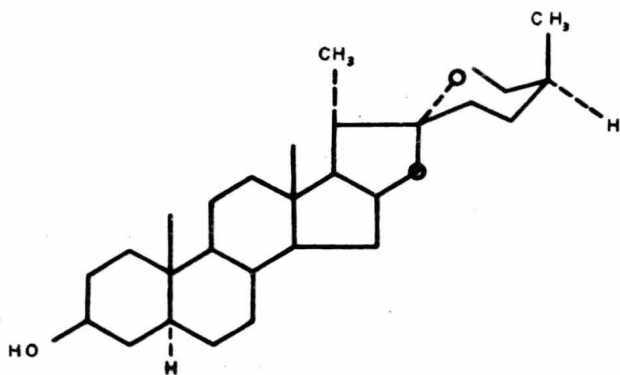


β Sitosterol

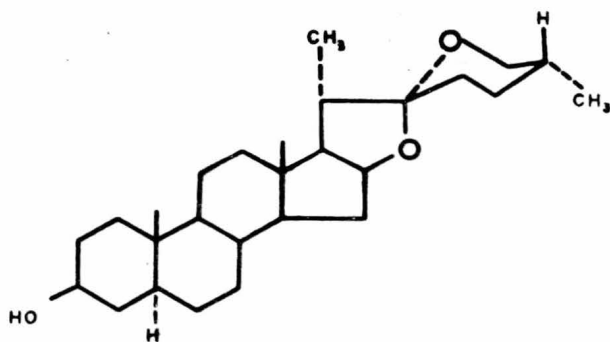
SAPOGENINAS



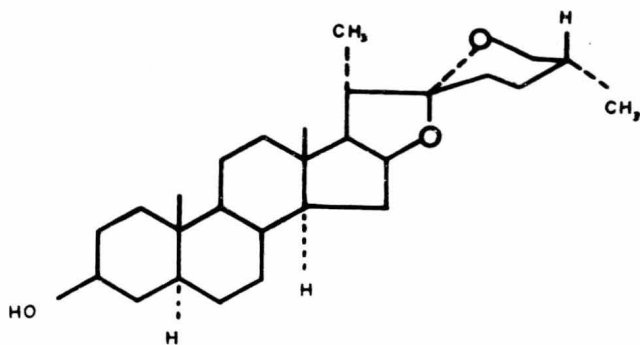
Diosgenina



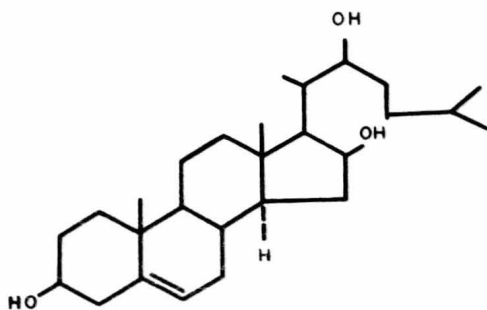
Sarsasapogenina



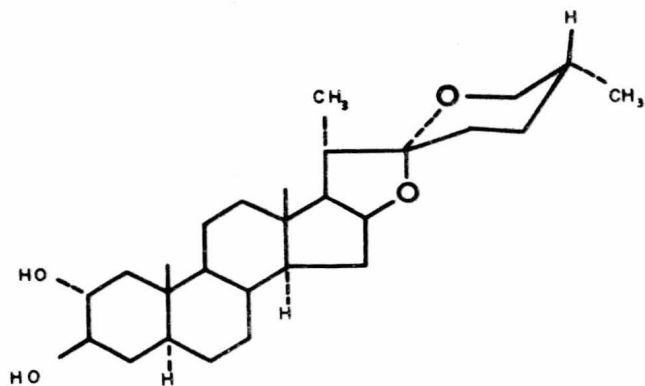
Esmilagenina



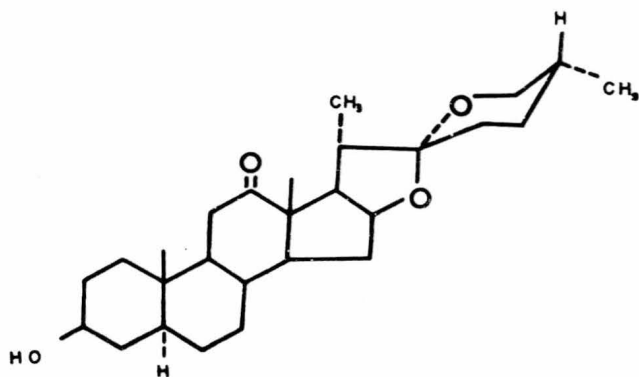
Tigogenina



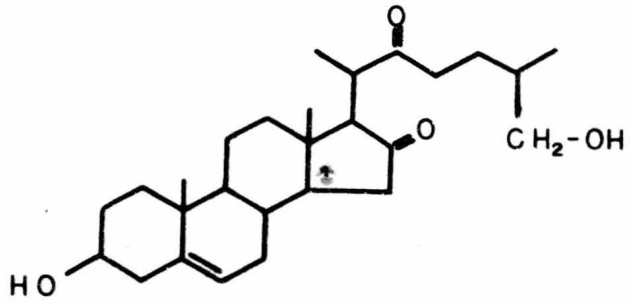
Calibagenina



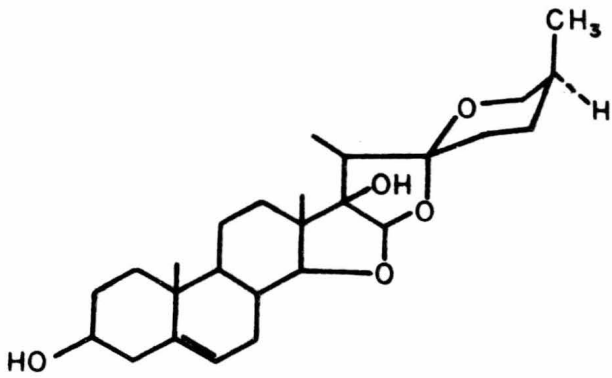
Gitogenina



Hecogenina



Criptogenina



Pennogenina

C A P I T U L O I I I

DISCUSION Y RESULTADOS

A) Se aisló una nueva sapogenina de las siguientes características:

Presenta un p.f. de 159-160°C. Su espectro de masas presenta un ión molecular M^+ de m/e 434. Sacando la relación del número de átomos de carbono se tiene:

$$C_n = \frac{30\%}{1.1\%} = 27.2$$

Por tanto el compuesto debe tener: 27 átomos de carbono +1 .

El espectro IR en KBr muestra una banda ancha de 3600 a-3200, la cual indica grupos OH. Esta región corrida en $CHCl_3$ -- da tres bandas débiles de OH en 3600, 3600 y 3410 que corresponden a diferentes clases de OH:

3660 cm^{-1}

3600 cm^{-1}

OH de alcohol secundario

3410 cm^{-1}

Otras bandas que aparecen en este espectro son:

2900 (s), 2875 (m) cm^{-1} C-H

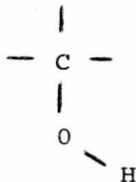
1625 (w) banda ancha doble enlace

1480	(m)	banda fina	CH ₃ Y CH ₂
1390	(m)	banda fina	CH ₃ Y CH ₂
1050	(s)	banda ancha	C-OH
980, 960		bandas características de sapogeninas esteroidales con cadena abierta, puesto que falta la banda en 900 cm ⁻¹ .	

El compuesto no absorbe en el U.V.

El espectro de RMN en CDCl₃ muestra las siguientes señales:

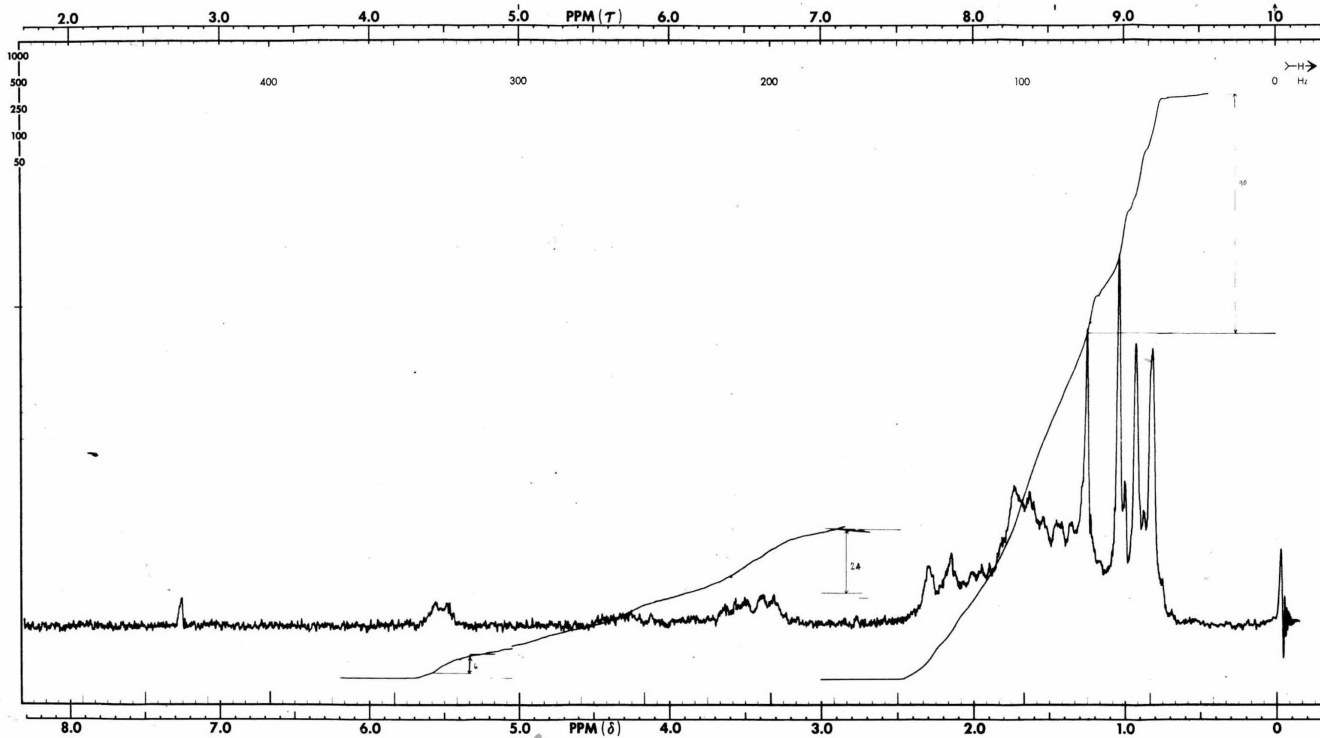
0.8	ppm	6H	metilos de C ₂₀ Y C ₂₇
0.91	ppm	3H	metilo angular de C ₁₈
1.03	ppm	3H	metilo angular de C ₁₉
1.23	ppm	3H	metilo de C ₂₁
3.2-3.7	ppm	4H	protones unidos a un C que tiene un OH.



5.52	ppm	1H	protón vinflico
------	-----	----	-----------------

El espectro de masas de la Sapogenina 9 muestra los siguientes:

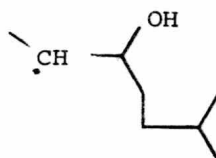
m/e	Interpretación
434	M ⁺



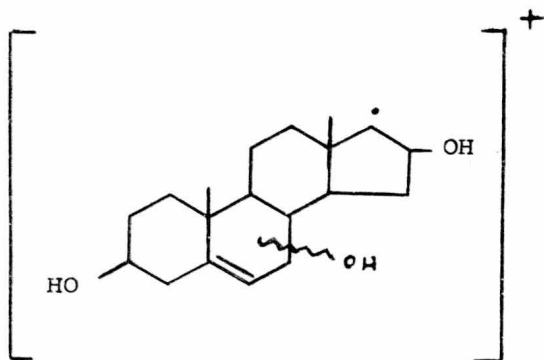
60 MH: NMR
 SPECTRUM NO. 1414
 OPERATOR: *Quio* DATE _____
 SAMPLE: *Carmen Rivera*
Sagegrum 4

SOLVENT	<i>CDCl₃</i>	---	---
TEMPERATURE	<i>A</i>	---	°C
FILTER BANDWIDTH	<i>Z</i>	---	Hz
R.F. FIELD	<i>0.05</i>	---	mG
SWEEP TIME	<i>500</i>	---	sec
SWEEP WIDTH	<i>500</i>	---	Hz
SWEEP OFFSET		---	Hz
SPECTRUM AMP.	<i>125</i>	---	---
INTEGRAL AMP.		---	---
REMARKS:		---	---

416	M - H ₂ O
398	416 - H ₂ O
380	398 - H ₂ O
365	380 - Me
287	M - CH ₃



287 tiene la siguiente estructura:



y corresponde a la eliminación de la cadena lateral.

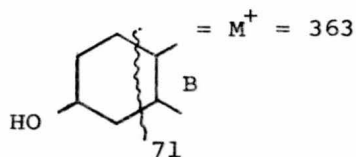
213	249 - 2H ₂ O
199	C ₁₅ H ₁₉
185	M ⁺ - 249 (ruptura C ₁₃ -C ₁₇ y C ₁₄ -C ₁₅) con transferencia de un protón al núcleo = C ₁₁ H ₂₁ O ₂
167	185 - 18 = C ₁₁ H ₂₁ O ₂ - H ₂ O = C ₁₁ H ₁₉ O

149

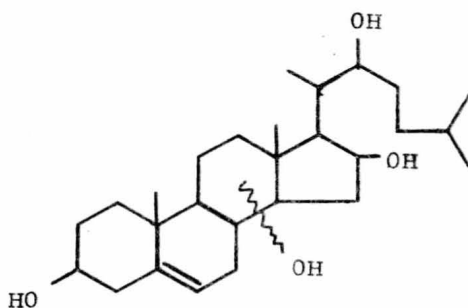
 $167 - H_2O = C_{11}H_{17}$

71

ruptura del anillo A



La interpretación de todos los espectros correspondientes de I.R como el de R.M.N. son característicos de esta clase de compuestos y la interpretación del espectro de masas lo confirma y nos lleva a la estructura:

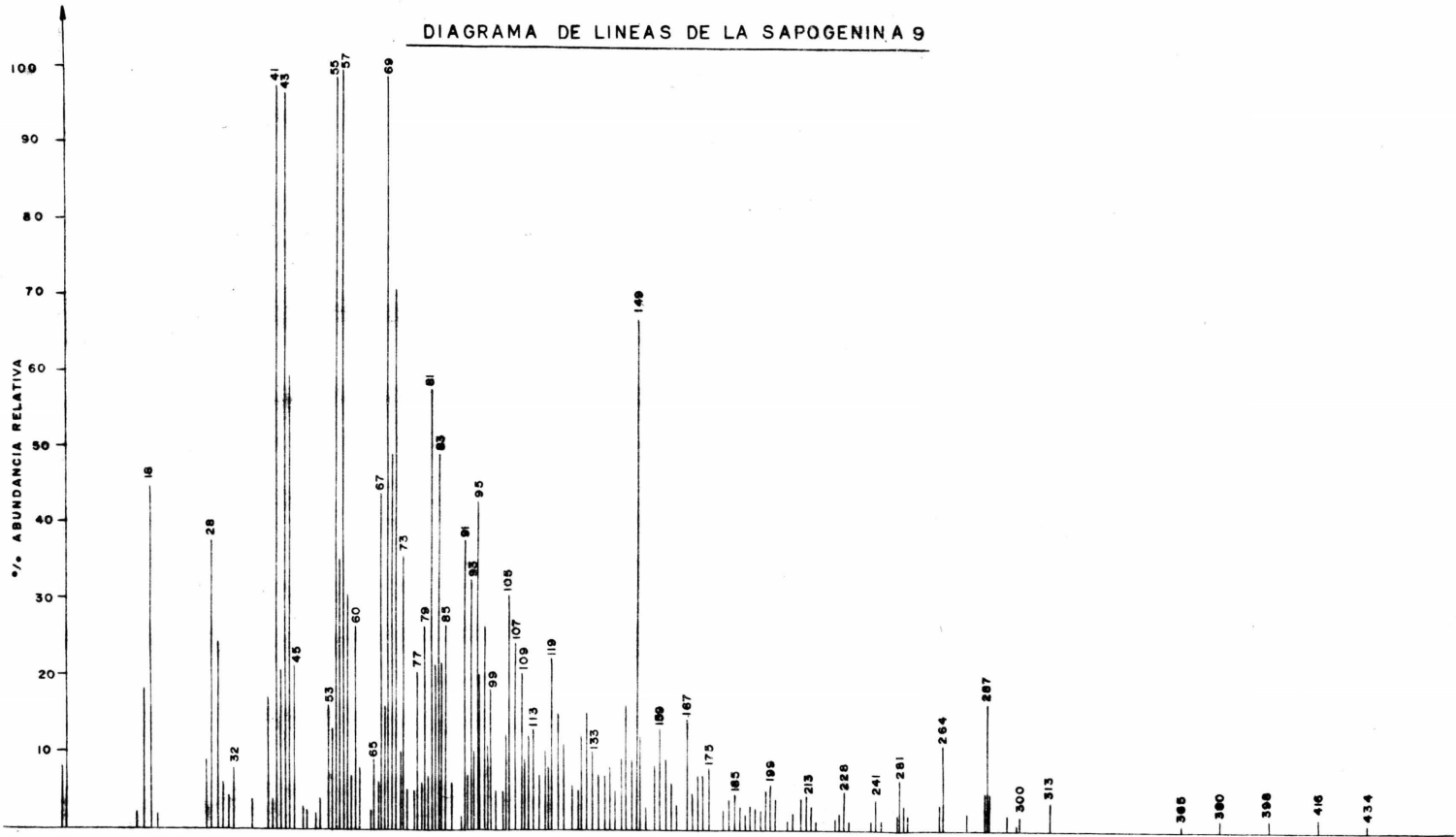


La sapogenina 9 tiene 4 oxhidrilos confirmados por el espectro de RMN del acetato (un singulete que integra para 12-hidrógenos de 4 grupos CH_3-CO en 2.23 ppm).

Esta estructura tiene la misma cadena lateral que la calibagenina ya conocida (29) y el fragmento m/e 185 confirma la existencia de la misma cadena lateral (42).

La existencia del fragmento m/e 249 y su posterior fragmentación nos indica que el núcleo tiene 2 oxhidrilos en los -

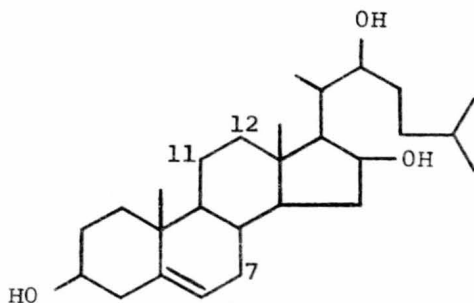
DIAGRAMA DE LINEAS DE LA SAPOGENINA 9



anillos A, B y C. Uno de los oxhidrilos está en 3 β .

La existencia del fragmento m/e 71 indica que el segundo oxhidrilo no se encuentra en el anillo A, por lo tanto debe estar en B ó en C.

Las 3 posibles estructuras para esta nueva sapogenina 9 son:



con un OH en 7, en 11 ó en 12. Por tanto, la sapogenina 9 debe ser:

- | | |
|---|-------------------------|
| | 7- hidroxí-calibagenina |
| 6 | 11-hidroxí-calibagenina |
| 6 | 12-hidroxí-calibagenina |

B) En la tabla II se presentan los valores del número de platos teóricos para cada uno de los compuestos estudiados. Aunque son bajos, el mayor es de 1600, la columna es capaz de resolver estos compuestos.

La figura 4, es un cromatograma que presenta la separación de 7 compuestos. Puede verse que todos los picos son simé

tricos excepto para la hecogenina.

La figura 5, muestra otra de las mezclas separadas. A diferencia del primer cromatograma, en éste fueron sustituidos la esmilagenina y la tigogenina por sarsasapogenina y diosgenina. Por otra parte, puede verse que aún cuando un componente esté en menor proporción, es posible su separación y en consecuencia su identificación.

La figura 6, corresponde a otro de los cromatogramas posibles: aquí aparecen la diosgenina y yamogenina no separadas, además de la pennogenina entre dos picos más pequeños debidos posiblemente a impurezas, más bien que a su descomposición ya que a distintas temperaturas, el área, permanece más o menos constante.

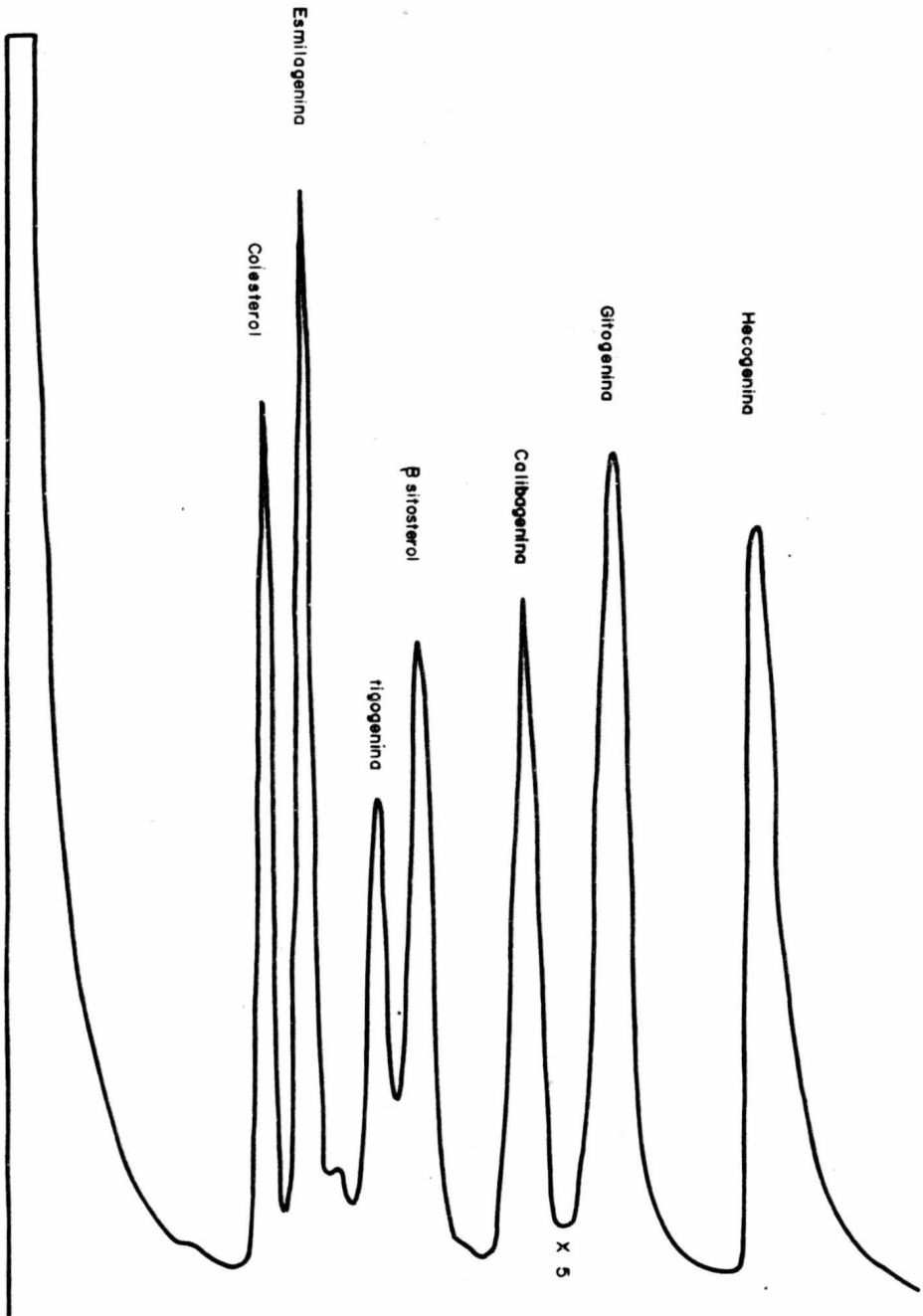
La figura 7, muestra la separación de 4 esteroides. En esta separación, se pueden apreciar ciertas relaciones entre la estructura y el tiempo de retención:

1) El tiempo de retención aumenta al aumentar las ramificaciones; este es el caso del colesterol y β sitosterol; este último tiene un grupo propilo más en el átomo del carbono 23.

2) A medida que el número de insaturaciones aumenta, el tiempo de retención disminuye; caso del estigmasterol y β -sitosterol.

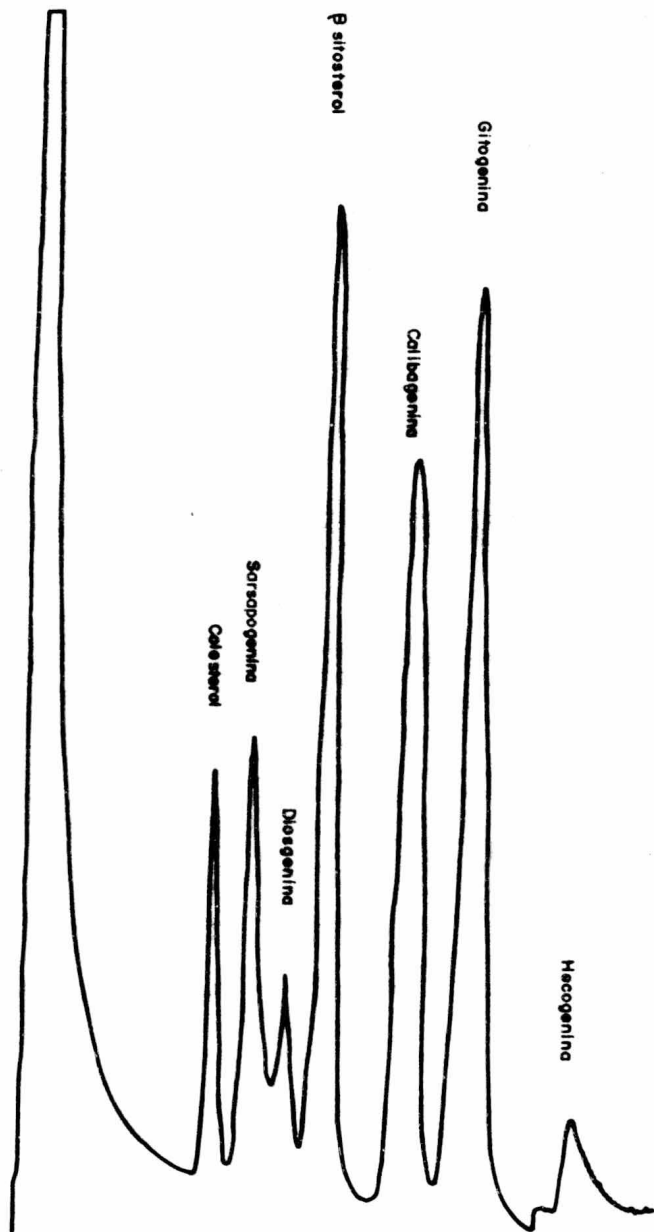
La figura 8, muestra la separación entre el colesterol, la sapogenina 9 y la calibagenina.

FIGURA-4



SE - 30 3%
temp. columna : 243 ° C.
temp. inyector : 280 ° C.
flujo N₂ : 40 ml./min.
vel. carta : 0.2 pulg./min.
H₂ : 25 kg/cm²
Perkin Elmer 811
Atenuación : X 10

FIGURA-5



SE-30 3%

temp. columna: 235° C

temp. inyector: 272° C

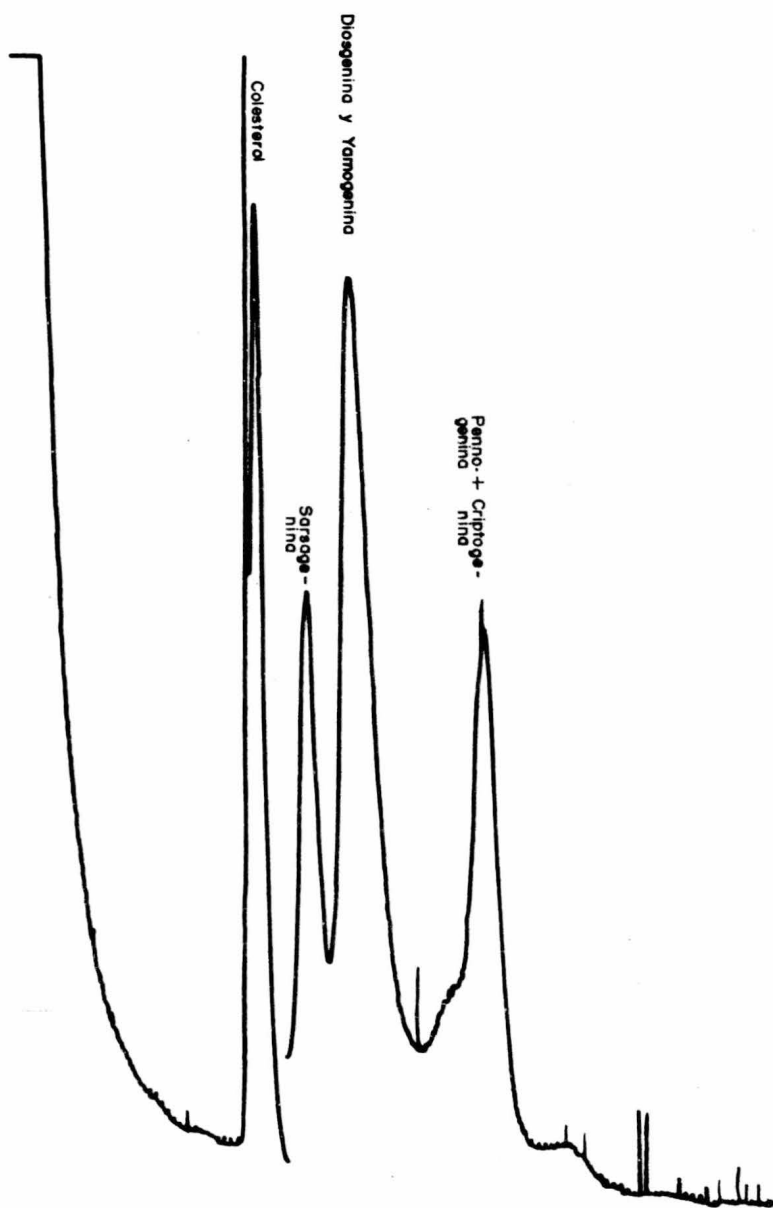
flujo N₂: 40 ml./min.

vel. carta: 0.1 pulg./min.

atenuación: X 10

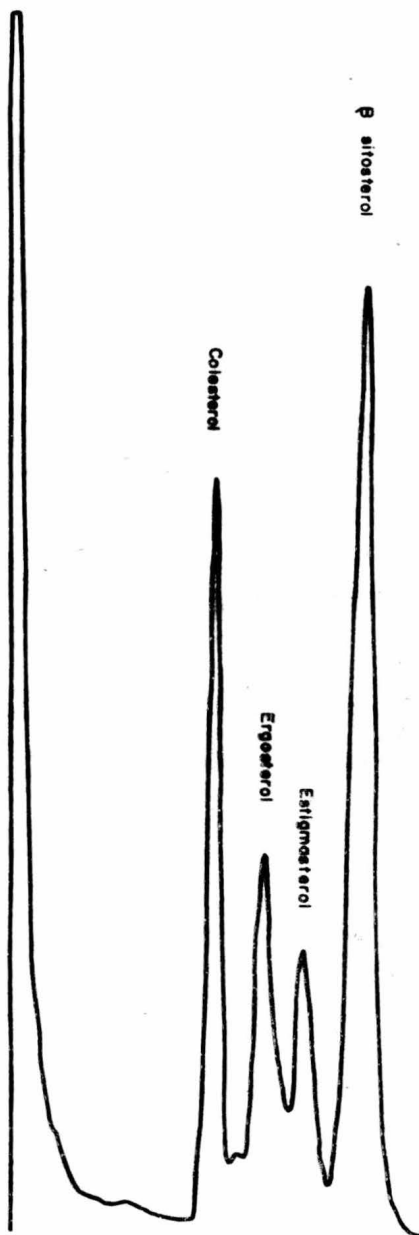
Perkin Elmer 811 H₂: 25 kg/cm²

FIGURA-6



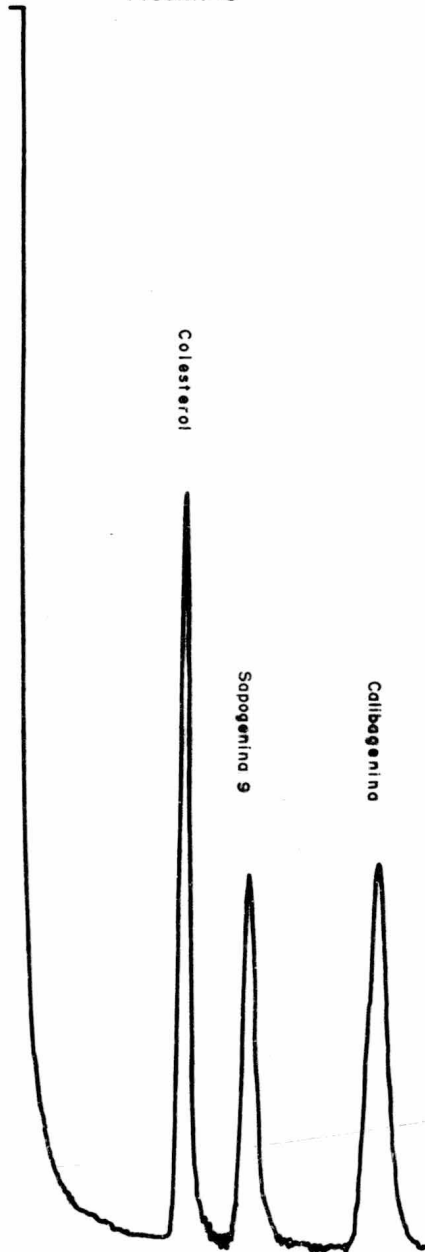
SE-30 3%
temp. columna: 235° C.
temp. inyector: 272° C.
flujo N₂: 40 ml/min.
vel. carta: 0.1 pulg/min.
atenuación: X 10
Perkin Elmer 811
H₂ 25 kg/cm²

FIGURA-7



SE-30 3%
temp. columna: 230° C.
temp. inyector: 272° C.
flujo N₂: 40 ml/min.
vel. carta: 0.1 pulg./min
atenuación: X 50
Perkin Elmer 811
H₂: 25 kg/cm²

FIGURA-8



SE-30 3%
temp. columna: 230°
temp. inyector: 272°
flujo N₂: 40ml/min
vel. carta: 0.1 pulg./min
atenuación: X 10
Perkin Elmer 911
H₂: 25 kg/cm²

TABLA II

SUBSTANCIA	Tiempo de Retención Relativa	No. de Picos Teóricos
Colesterol	1.00	1475
Esmilagenina	1.14	1600
Sarsasapogenina	1.19	1383
Ergosterol	1.24	1239
Diosgenina	1.37	778
Yamogenina	1.37	778
Tigogenina	1.43	1212
Estigmasterol	1.43	1413
B Sitosterol	1.59	1159
Criptogenina	1.90	597
Pennogenina	1.90	1024
Calibagenina	2.00	1414
Gitogenina	2.33	1600
Hecogenina	2.83	1454

TABLA III

Compuesto	P. f. (°C)	P. M.	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo
Colesterol	148.5	386.64	1.36	1
Esmilagenina	185	416.62	1.9	1.1
Sarsasapogenina	199	416.62	1.6	1.2
Ergosterol	168	396.3	1.68	1.23
Sapogenina 9	159-160	434	1.7	1.3
Diosgenina	204-7	414.61	1.8	1.38
Tigogenina	203	416.62	2.37	1.4
Estigmasterol	170	412.67	1.94	1.43
B Sitosterol	140	414.69	2.24	1.64
Calibagenina	195-6	418.34	2.6	2.0
Gitogenina	271.5-5	432.62	3.06	2.3
Hecogenina	264-6	430.61	3.73	2.8

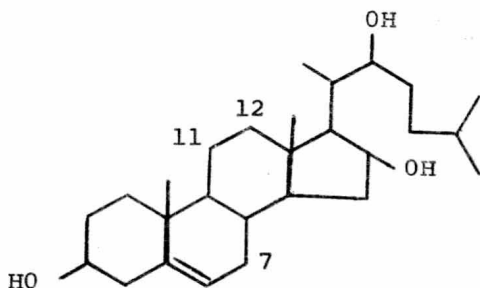
En la tabla III tenemos los tiempos de retención y algunas propiedades físicas de los compuestos estudiados.

El resultado de este trabajo, ha sido el de haber encontrado las condiciones para separar e identificar por C.G.L., - algunas sapogeninas esteroidales y esteroides. Esto constituye una aportación a su análisis para un futuro poder resolver mezclas de este tipo de compuestos tanto cuali como cuantitativamente.

C A P I T U L O I V

CONCLUSIONES

1.- Se aisló por primera vez una nueva sapogenina este--
roidal para la cual se propone la siguiente estructura:



con un OH adicional en 7, 11 ó 12, resultando ser una hidroxi--
calibagenina.

Esta sapogenina es una de las secundarias del Calibanus-
Hookerii.

2.- Se encontraron las condiciones para identificar por--
Cromatografía de Gas-Líquido, algunas sapogeninas esteroidales--
y esteroles en una mezcla, haciendo que ya no sea necesario, --
en el análisis de una planta, aislar cada componente.

3.- Las condiciones de operación encontradas son las si--
guientes:

COLUMNA:

Acero inoxidable

1.5 m. de largo

3 mm. de diámetro

EMPAQUE:

3% SE - 30

Varaport 80/100 mallas

DETECTOR:

Ionización de Flama

TEMPERATURAS:

Inyector: 272°C

Columna: 235°C

Detector: 250°C

FLUJOS:

Nitrógeno: 40 ml./min.

Hidrógeno: 30 ml./min.

Aire: 300 ml./min.

C A P I T U L O V

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Galbraith, M. N. and D. G. S. Horn, 1966. An insect-moulting-hormone from a plant. Chem. Commun., pp. 905-6.
- 2.- Williams, C. M. (1967 a). Third generation of pesticides.- Scientific American. 217: 13-17.
- 3.- Schoonhoven, L. M. (1968). Chemosensory bases of host plant selection. Ann. Rev. Entomol. 13: 115-136.
- 4.- Takemoto, T., Y. Hikino, K. Nomoto and H. Hikino. (1967) - Structure of Cyasterone, a novel C₂₉ insect-moulting - -- substance from *Cyathula capitata*. Tetrahedron Lett., 33: 3191-4.
- 5.- Takemoto, T., Nomoto, K. and Hikino, H. (1968). Structure- of amarasterone A and B, novel C₂₉ insect moulting subs-- tances from *Cyathula capitata*. Tetrahedron Letters. - --- 4953-4956.
- 6.- Heftmann. E. 1967a. Steroid hormones in plants. Amer. - - Perfumer Cosmet., 82:47-9.
- 7.- Saver, H. H., R. D. Bennett, and E. Heftmann 1968. Ecdys-- terone biosynthesis in *Podocarpus elata*. Phytochemistry. - 7:2027-30.

- 8.- Nakanishi, K., M. Koreeda, S. Sasaki, M. L. Chang, and H.-Y. Hsu 1966. Insect hormones. The structure of ponasterone A, an insect-moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay. Chem. Commun., pp. 915-17.
- 9.- Takemoto, T. S. Ogawa, and N. Nishimoto. 1967 b. Studies on the constituents of *Achyranthis radix* III. Structure of inokosterone. Yakugaku Zasshi. 87:1474-7.
- 10.- Takemoto, T. S. Arihara, Y. Hikino, and H. Hikino. 1968. Structure of pterosterone. A novel insect-moulting substance from *Lastrea Thelypteris* and *Onoclea sensibilis*. Tetrahedron Lett., pp. 375-8.
- 11.- Jizba, J., (1967 b). Polypodine B- a novel ecdysone substance from plant material. Tetrahedron Letters. 51:5139-5143.
- 12.- Nakanishi, K., M. Koreeda, M. L. Chang, and H. Y. Hsu. 1968 Insect Hormones V. The structures of panasterones B and C. Tetrahedron Lett., pp. 1105-10.
- 13.- Levin, E. Y. and K. Bloch. 1964. Absence of sterols in blue-green algae. Nature, 202:90-1
- 14.- Robbins, W. E., Kaplanis, J. N., Thompson, M. J., Shortino, T. J. Cohen, C. F. and Joyner, S. C. (1968). Ecdysones and

- analogs: Effects on development and reproduction of --
insects. Science 161: 1158-1160.
- 15.- Heinrich, G. and H. Hoffmeister, 1967. Ecdyson als Beg- --
leitsubstanz des Ecdysterons in Polypodium vulgare L. Ex--
perientia. 23:995.
- 16.- Jizba, J., V. Heront, and F. Sorm. 1967a. Isolation of --
ecdysterone (crystecdysone) from Polypodium vulgare L. --
rhizomes. Tetrahedron Lett., 18:1689-91.
- 17.- Kaplanis, J N., M. J. Thompson, W. E. Robbins, and B. M. --
Bryce. 1967. Insect hormones: Alpha-ecdysone and 20-hy- --
droxyecdysone in bracken fern. Science, 167:1436-8.
- 18.- Hikino. 1967 h Isolation of insect moulting substances --
from Matteuccia structiopteris, Lastrea thelypteris, and-
Onoclea sensibilis. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 15:1816.
- 19.- Takemoto, T., S. Arihara, Y. Hikino and H. Hikino, 1968 --
Structure of pterosterone. A novel insect-moulting subs- --
tance from Lastrea thelypteris and Onoclea sensibilis. --
Tetrahedron Lett., pp. 375-8.
- 20.- Hoffmeister, J., and H. F. Grützmacher, 1966. Zur Chemie-
des Ecdysterons. Tetrahedron Lett., pp. 4071-23.

- 21.- Imai, S., S. Fujioka, K. Nakanishi, M. Koreeda, and T. --
Kurokawa. 1967. Extraction of panasterone A and ecdysterone
from Podocarpaceae and related plantas. Steroids, 10;557-
65.
- 22.- Nakanishi, K., M. Koreeda, S. Sasaki, M. L. Chang, and H.
Y. Hsu. 1966. Insect hormones. The structure of ponaste--
rone A, an insect-moulting hormone from the leaves of Po-
docarpus nakaii Hay. Chem. Commun, pp. 915-17.
- 23.- Takemoto, T., S. Ogawa, N. Nishimoto, H. Hirayama, and S.
Taniguchi. 1967g. Isolation of the insect-moulting hormo-
nes from mulberry leaves. Yakugahua Zasshi, 87:748.
- 24.- Takemoto, T., S. Ogawa, and N. Nishimoto. 1967a. Studies-
on the constituents of Achyranthis radix II. Isolation --
of the insect moulting hormones. Yakigaku Zasshi, 87:1469
-73.
- 25.- Hikino, S. Ogawa, N. Nishimoto, K. Y. Yen, K. Abe. T. Sa-
to, K. Osaea, and M. Takahashi. 1967i. The isolation of -
ecdysterone from the radix of Achyranthes obtusifolia Lam.
Yakugaku Zasshi, 87:1521-3.
- 26.- Takemoto, T., S. Ogawa, N. Nishimoto, and S. Taniguchi. -
1967e. Studies on the constituents of Achyranthis radix -

- IV. Isolation of the insect moulting hormones from Formosan *Achyranthes* spp. *Yakugaku Zasshi*, 87:1478-80.
- 27.- Takemoto, T., Y. Hikino, K. Nomoto, and H. Hikino, 1967c. Structure of cyasterone, a novel C₂₉ insect-moulting substance from *Cyathula capitata*. *Tetrahedron Lett.*, 33:3191-4.
- 28.- Rimpler, H. and G. Schulz. 1967. Vorkommen von 20-Hydroxyecdysone in *Vitex megapotamica*. *Tetrahedron Lett.* 22:2033-5.
- 29.- Giral, F. and Rivera, C. 1975. The Structure of --- Calibagenin. *Phytochemistry*. (en prensa).
- 30.- Heftmann, E. 1967 b. Biochemistry of steroidal saponins - and glycoalkaloids. *Lloydia*, 30:209-30.
- 31.- Heftmann, E. 1969. Insect Molting Hormones in Plants. *Recent Advances in Phytochemistry* pp. 211-27.
- 32.- Staal, G. B. 1967. plants as a source of insects hormones. *Koninkl. Nederl. Wetenschappen*, 70: Ser. C, 409-18.
- 33.- Reigner, E., and Law, J. 1968. Insect Pheromones. *Journal of Lipid research*, 9:541-51.

- 34.- Robbins, W.E., Kaplanis, J.N., Thompson, M.J., Shortino, T. J., Cohen, C.F. and Joyner, S.C. 1968. Ecdysones and analogs: Effects on development and reproduction of insects. *Science*, 161:1158-60.
- 35.- Karel, S. Plants as a source of materials with insect hormone activity. 1969. *Ent. exp. and appl.*, 12:721-28.
- 36.- Eglinton, G., Hamilton, R.J.; Hodges, R. and Raphael, R.A. 1959. *Chem. and Ind. (London)* 955.
- 37.- Kanae, Y. Gas Chromatographic analysis of steroid hormones II. Gas chromatographic behavior of trimethylsilyl ethers. *Nagoya J. Med. Sci.* 1967, 30 (3), 269-307.
- 38.- *Modern Methods of Steroid Analysis* 1973. 37-54. Edited by Heftmann, E. Academic: New York, N. Y.
- 39.- Horning, E. C., *Studies of Analytical Separations of Human Steroids and Steroids Glucosonidos. Advances in Gas Chromatography*, pag. 122, *Preston technical Abstracts*, 1967.
- 40.- Clark, S. J., Wotiz, H. H. Gas chromatography of steroid hormones. *Modern Methods of Steroidal Analysis*. 1973. 71-102.

- 41.- Dabico, M. V. Cromatografía de Gases I. Ed. Alhambra, S.A. España. 1971.
- 42.- Biemann, K. Mass Spectrometry. Organic Chemical Applications. Mc. Graw Hill Book Co., New Youk, 338 (1962)
- 43.- Fieser, L.F. and Fieser M. Steroids. Reinhold Pu. Co. New York. 1959.
- 44.- Nakanishi, Infrared Absorption Spectroscopy Practical, -- Holden-Dax, San Francisco, Calif., 1962.
- 45.- Silverstein y Bassler, Spectrometric Identification of -- Organic Compounds. John Wile y and Sons, Nueva York, 1963.
- 46.- Simon, W. and Clerc, T. Elucidación estructural de com-- puestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Tomo I. - Ed. Alhambra S.A. España. 1970.
- 47.- Shriner, L., Fuson, C. and Curtin, D. Identificación sis-- temática de Compuestos Orgánicos Limusa - Wiley S.A.; Mé-- xico 1972.