

Bol. inst. quím. univ. nal. autón. Méx. XIV, págs. 19-31 (1962).

ESTUDIO DE LOS TRITERPENOS DE LA STEMMADENIA DONELL-SMITHII (ROSE) WOODSON*

H. Estrada, F. Walls, E. Santos, F. García y S. E. Flores

Contribución Nº 138 del Instituto de Química.

Recibido, septiembre 10, 1962

En el Instituto de Química se han estudiado los alcaloides que se encuentran en la madera y en la corteza de la *Stemmadenia Donell-Smithii* (1). Posteriormente se estudiaron los frutos y, en la fracción básica, se encontró un alcaloide indólico al que se denominó estemadenina y cuya estructura quedó recientemente aclarada (2).

Al estudiar la fracción neutra de los frutos, se encontraron tres componentes principales, que se separaron por cromatografía en alúmina. El primero, (N-1) fue un aceite incoloro cuyo espectro en el infrarrojo indicó que se trata de un hidrocarburo. Esta fracción no se estudió más.

El segundo producto, que representa el 10% del extracto bencénico, mostró p. f. 200-215°; $[\alpha]_D^{25} +53^\circ$ y por análisis se obtuvo la fórmula $C_{32}H_{52}O_2$. El espectro en el infrarrojo mostró que es un éster. Una pequeña porción se isomerizó en medio ácido, obteniéndose un producto con p. f. 238-240°; $[\alpha]_D^{25} +54^\circ$ y que no dio depresión con acetato de ψ -taraxasterol.

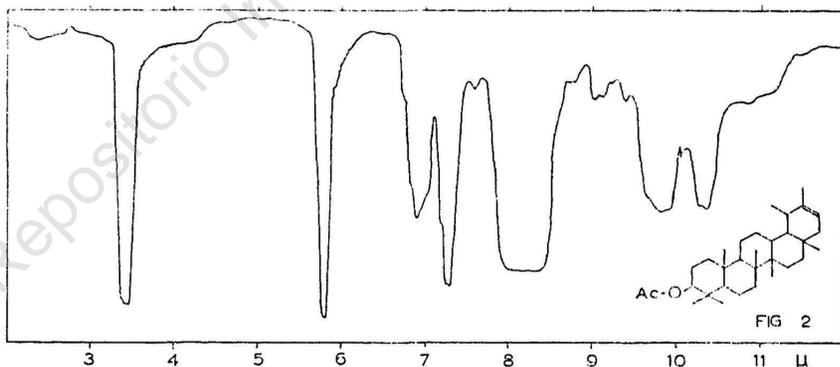
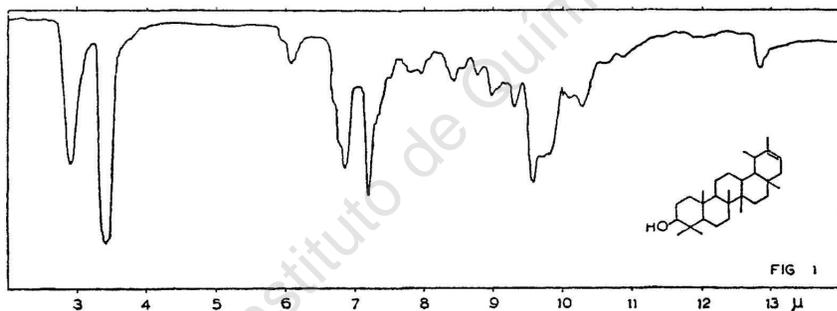
Por hidrólisis en medio alcalino se obtuvo un producto con p. f. 185-195° y que en cromatoplaaca dio una sola mancha.

Por lo tanto, se puede asumir que la fracción N-II es una mezcla de acetatos de isómeros del ψ -taraxasterol (lupeol, germanicol, taraxastenol y lupenol I).

* Tomado en parte de una tesis presentada por E. Santos a la Escuela Nacional de Ciencias Químicas, para obtener el título de Químico.

Finalmente, la tercera fracción dio un producto cristalino que se identificó como ψ -taraxasterol y que constituye el 1% del extracto bencénico de los frutos sin semilla (N-III). Se puede separar del extracto bencénico por cromatografía en alúmina, de donde se obtiene al eluir con benceno-cloroformo, 90/10. Cristalizando esta fracción de cloroformo-metanol, se obtiene un producto que funde a 218-219°; $[\alpha]_D^{24} +49^\circ$ y que, al cromatografiarlo en sílice, en capa delgada, da una sola mancha al revelar con solución ácida de sulfato cérico. El espectro en el infrarrojo, en pastilla de bromuro de potasio (figura 1), presenta máximos a 2.9 (oxhidrilo), 6.1 y 12.9 μ (doble ligadura).

El espectro de resonancia magnética nuclear (figura 5) muestra bandas a 3.45 (alcohol) y 5.22 ppm* (protón vinílico). La integración de este espectro, indica la presencia aproximada de 50 protones en la molécula.

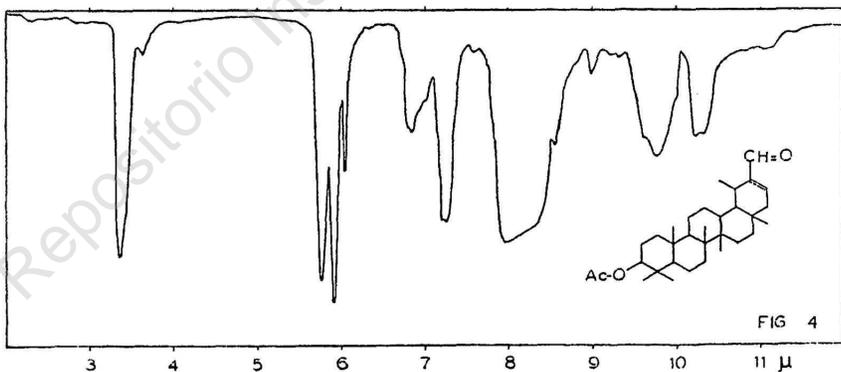
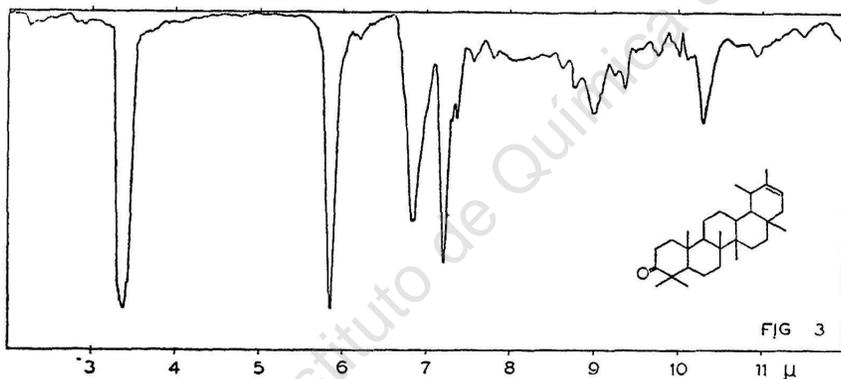


* Los valores de los máximos de resonancia magnética nuclear están dados directamente en valores δ , tomando como cero de referencia el máximo del tetrametilsilano.

El análisis elemental y el peso molecular de 426, determinado por espectrometría de masas*, son correctos para la fórmula empírica $C_{30}H_{50}O$.

Por acetilación de N-III se obtuvo un producto cristalino con p. f. 247-248°; $[\alpha]_D^{24} +57^\circ$. En el infrarrojo presenta la banda a 5.8 μ , característica del grupo acetilo (figura 2).

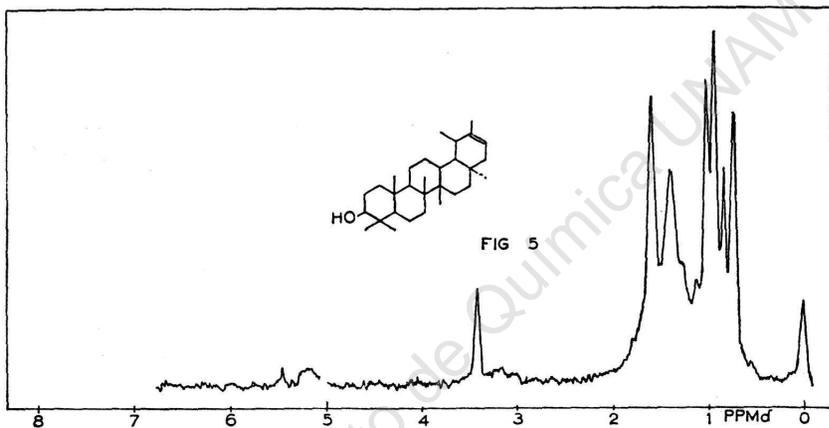
El espectro de resonancia magnética nuclear (figura 6) presenta un máximo en 2.0 ppm, característico del agrupamiento acetilo. La integración de este espectro da un total de 52 protones y el análisis elemental coincide para la fórmula $C_{32}H_{52}O_2$.



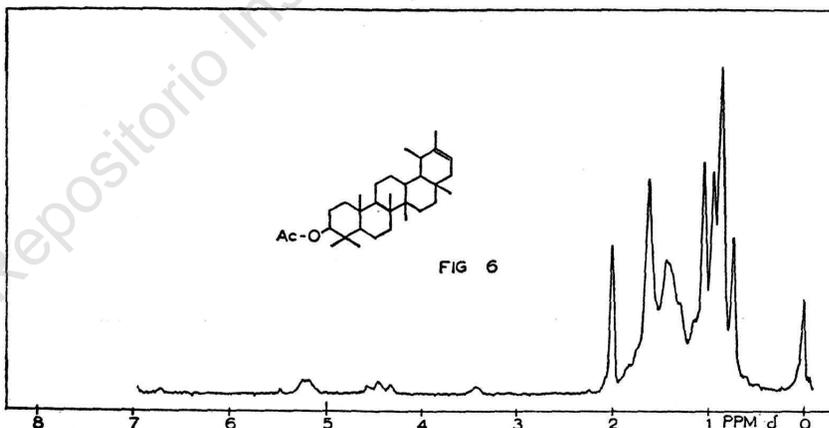
* Agradecemos esta determinación al Dr. Herbert Budzikiewicz, de la Universidad de Stanford, Calif.

El cloruro de benzoilo reacciona con N-III, produciendo un producto cristalino, p. f. 285-288°; $[\alpha]_D^{24} +70^\circ$. En el infrarrojo presenta los máximos de absorción característicos del agrupamiento benzoato.

Por oxidación de N-III con trióxido de cromo, se obtiene un producto cristalino blanco, p. f. 167-168°; en el infrarrojo (figura 3), presenta bandas de absorción en 5.85 μ , característico de un grupo cetónico en anillo de seis miembros.



La resonancia magnética nuclear (figura 7) muestra la desaparición de la banda en 3.45 ppm (alcohol).



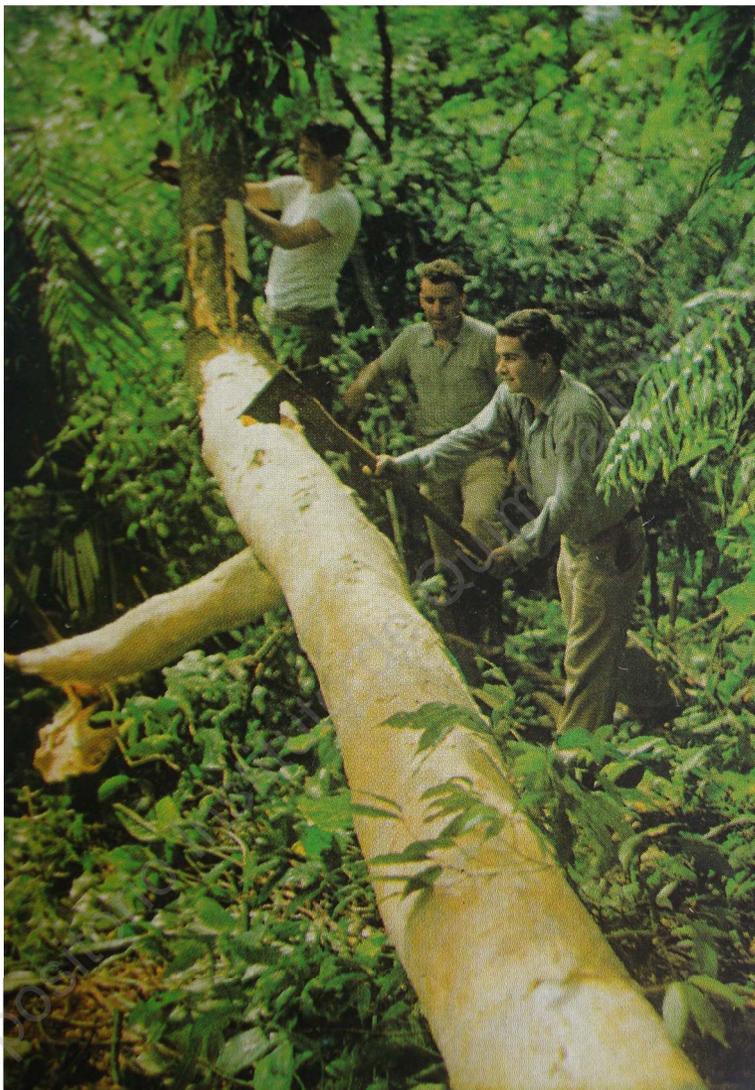
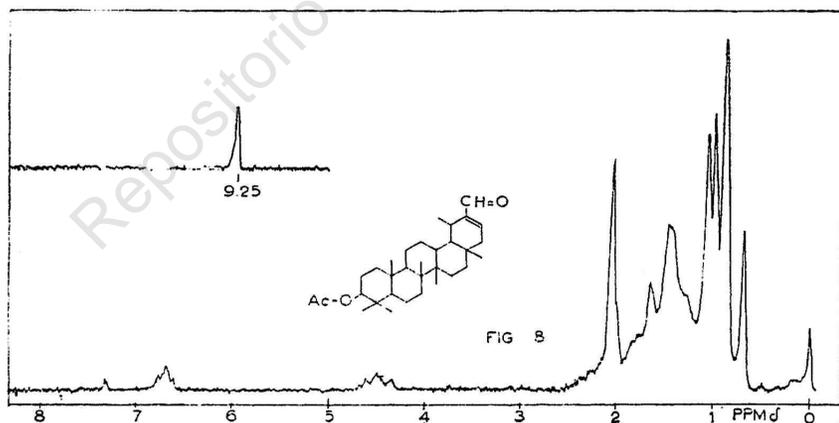
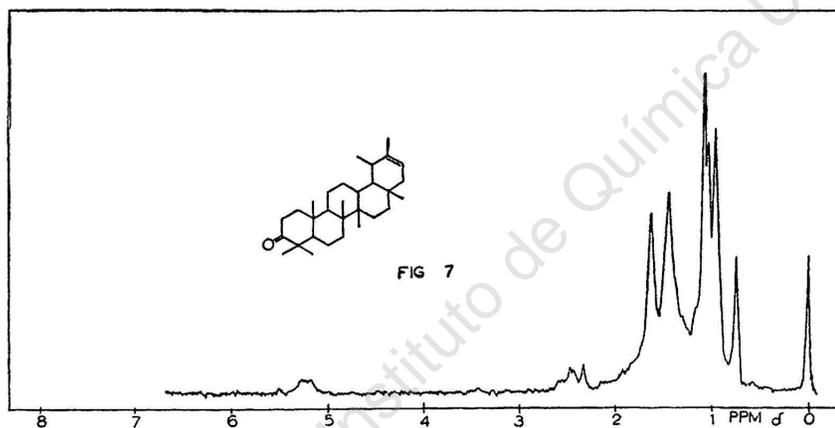


Foto: A. Sandoval, 1956.

Recolección de corteza y madera de *Stemmadenia Donnell-Smithii* en la selva tropical de los Tuxtlas, Veracruz. Del frente hacia atrás, los Dres. Fernando Walls, Javier Padilla y José Luis Mateos.

Al oxidar el acetato de N-III con bióxido de selenio, se obtuvo un producto cristalino, p. f. 256-258°; $[\alpha]_D^{20} +87^\circ$. Su espectro en el infrarrojo (figura 4) presenta máximos de absorción a 5.77 y 5.92 μ , correspondientes al acetato y a un aldehído conjugado. En el ultravioleta presenta un máximo de absorción a 233 $m\mu$, ϵ , 14,700, y el espectro de resonancia magnética nuclear (figura 8) muestra un máximo en 9.25 ppm, correspondiente al protón de un aldehído, y el máximo a 6.7 ppm que corresponde a un protón vinílico conjugado con el aldehído. La integración de la gráfica indica la presencia de



50 protones en la molécula. El análisis elemental corresponde a $C_{32}H_{50}O_3$.

En la literatura se encuentra que las constantes físicas de N-III y de sus derivados, son mas o menos semejantes a las reportadas para el ψ -taraxasterol y sus derivados (pág. 25).

Como se ve, hay una gran variación en las constantes que se encuentran en la literatura, tanto en los puntos de fusión como en las rotaciones y, por lo tanto, no hubiera sido posible identificar esta sustancia directamente, sin recurrir a la formación de los distintos derivados de N-III, sin contar con los datos físicos que proporcionan los distintos espectros en el infrarrojo, ultravioleta y en la resonancia magnética nuclear y sobre todo, sin el análisis que se obtiene del espectro de masas, ya que los análisis elementales dan datos bastante inexactos con esta clase de compuestos.

La identidad de N-III con ψ -taraxasterol quedó confirmada, al determinar el punto de fusión de la mezcla del acetato de N-III con una muestra auténtica de acetato de ψ -taraxasterol*, que no mostró depresión, y también por los espectros en el infrarrojo de las dos sustancias que fueron idénticos.

El producto de oxidación del acetato de N-III con bióxido de selenio en ácido acético (β -acetoxi ψ -taraxastenal), no se encuentra descrito en la literatura. Se le asigna la estructura que aparece en la figura 7, basada en el estudio de sus espectros en el infrarrojo, en el ultravioleta y de resonancia magnética nuclear, en el que aparece un triplete a 6.7 ppm, que corresponde a un protón vinílico vecino a un metileno. Ya que la doble ligadura está conjugada con el aldehído, la única posición en que se satisfacen estos requisitos, es en $\Delta^{20, 21}$ como aparece en la fórmula.

Además, en la literatura se encuentra reportada la oxidación con bióxido de selenio, de ψ -taraxasteno y taraxasteno para producir ψ -taraxastenal (6, 7).

De la fracción neutra de la madera, se aisló, además de ψ -taraxasterol, β y δ -sitosteroles.

* Agradecemos al Prof. E. R. H. Jones de la Universidad de Oxford, Inglaterra, el haber suministrado esta muestra.

Constantes físicas del ψ -taraxasterol y de sus derivados

ψ -taraxasterol		Acetato		Benzoato		Cetona		Taraxasteno		Cita
p. f.	$[\alpha]_D$	p. f.	$[\alpha]_D$	p. f.	$[\alpha]_D$	p. f.	$[\alpha]_D$	p. f.	$[\alpha]_D$	
200°	+47°	235°	+53°	276°	+53°	---	---	---	---	(3)
213-215°	+41°	238-240°	+56°	275-278°	+72°	172°	+85°	---	---	(4)
219-221°	+45°	238-240°	+56°	273-275°	+75°	174-175°	+81°	182-184°	+50°	(5)
Constantes físicas de N-III y de sus derivados										
218-219°	+49°	247-428°	+57°	285-288°	+70°	167-168°	---	265-268°	---	181-183°
					oxima	265-168°				

PARTE EXPERIMENTAL*

FRUTOS

Extracción del alcaloide estemadenina.

Los frutos frescos sin semilla (200 Kg) de la *Stemmadenia Donell Smithii* (Rose) Woodson, se molieron en un molino Mikro-Pulverizer modelo 1-W, se agregó ácido clorhídrico al 2% y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante ocho días. Se filtró a través de manta y al filtrado se le agregó acetona hasta que ya no precipitaron más resinas. Las resinas se separaron del extracto clorhídrico por filtración en papel con ayuda de celita. Al filtrado se le agregó NaOH al 10%, hasta pH 10, obteniéndose un precipitado que después de filtrarlo, se secó al vacío a temperatura ambiente, durante tres días. El polvo seco se extrajo con cloroformo a temperatura ambiente, dejándolo reposar durante un día en cada extracción. El extracto clorofórmico se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró al vacío, quedando un residuo que se purificó por cromatografía en alúmina. De las fracciones eluidas con cloroformo-metanol, 98/2, se obtuvieron 8 g de estemadenina, con p. f. 200-201° (d).*

El residuo de los frutos, después de extraer con ácido clorhídrico, se dejó secar al aire, a temperatura ambiente y se extrajo tres veces con benceno, refluendo ocho horas cada vez.

Los extractos bencénicos se reunieron y se concentraron, quedan-

* Los puntos de fusión se determinaron en un bloque de Kofler. Las rotaciones se determinaron en solución clorofórmica en un polarímetro Shmidt and Haensch. Los espectros en el infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 21 en CHCl_3 , con excepción del de la fig. 1, que se determinó en KBr. El espectro en el ultravioleta se determinó en etanol de 96% en un aparato Beckman DK-2. Los espectros de resonancia magnética nuclear, se determinaron en un aparato Varian A-60 en CHCl_3 (figs. 5, 6 y 7) o en CDCl_3 (fig. 8). Los microanálisis fueron efectuados por el Dr. Franz Pascher de Bonn, Alemania. Las cromatografías se efectuaron en alúmina Alcoa grado F-20 de 80 a 200 mallas. El desarrollo de las cromatografías se siguió a base de cromatoplasas, determinando la pureza de cada fracción o la identidad entre ellas, a base del número de manchas que aparecían al revelar con solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N.

* Este método de obtención de estemadenina difiere bastante del descrito originalmente (1).

do un residuo pastoso (2.1 Kg), que contenía las sustancias neutras de los frutos.

Un Kg de este residuo, disuelto en cloroformo, se lavó con HCl al 3%, hasta que las aguas de lavado no dieron reacción de alcaloides con el reactivo de Mayer. A continuación se lavó con agua hasta neutralidad y después se extrajo con una solución de bicarbonato de sodio al 5% y la solución clorofórmica se decantó. La fracción acuosa se aciduló y extrajo con éter. Al evaporar esta última fase no quedó residuo, con lo que se demuestra que no había ácidos libres.

La solución clorofórmica, conteniendo las sustancias neutras, se lavó con agua hasta neutralidad y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se filtró y al filtrado se le agregó 1% de carbón activado y 1% de celita, filtrando en seguida a través de un Buchner, obteniéndose así un extracto bastante claro, que se concentró al vacío, dejando un residuo total de 900 g de productos neutros.

Se tomaron 50 g de la fracción neutra y se cromatografiaron en 4 Kg de alúmina, empleando como eluyente inicial, una mezcla de hexano-benceno 75/25, separando fracciones de medio litro. Se obtuvieron tres fracciones principales, con las siguientes mezclas de disolventes:

Primera fracción (hexano-benceno, 75/25) (10 l). Aceite incoloro (10 g) (N-I). De su espectro en el infrarrojo se deduce que es un hidrocarburo. No se estudió.

Segunda fracción (hexano-benceno, 50/50) (6 l). Producto cristalino (16 g) (N-II), con p. f. 200-215°. Por sublimación, el p. f. fue de 213-217°.

Andl. Calc. para $C_{32}H_{52}O_2$: C, 81.99; H, 11.18 .

Encontrado: C, 82.02; H, 11.03

Eluyendo con 5 l de hexano-benceno, 25/75 y con 3 l de benceno no se obtuvo nada

Tercera fracción (benceno-cloroformo, 90/10) (7 l). Producto cristalino (13 g) (N-III) identificado posteriormente como ψ -taraxasterol. Se purificó cristalizándolo hasta que el punto de fusión fue constante (218-219°).

Anal. Calc. para $C_{30}H_{50}O$: C, 84.44; H, 11.81

Encontrado: C, 84.45; H, 11.77

En la alúmina quedaron retenidos 11 g que no se pudieron eluir con ningún disolvente.

Fracción N-II.

Isomerización. En 2 ml de benceno anhidro y 2 ml de ácido acético conteniendo 6% de H_2SO_4 , se pusieron 100 mg de N-II. Se calentó a 80° durante 4 h, con agitación. Se virtió en agua helada, se neutralizó con $NaHCO_3$ y se extrajo con éter. La fase etérea se lavó, secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se cristalizó de $CHCl_3$ -MeOH (85 mg), p. f. $238-240^\circ$, idéntico al acetato de ψ -taraxasterol.

Saponificación. En 25 ml de diglima y 5 ml de etanol de 96% se pusieron 200 mg de KOH y 500 mg de N-II y se reflujo la mezcla durante 3 horas. Después de las operaciones usuales se obtuvieron 450 mg de cristales con p. f. $185-195^\circ$. Por recristalización de cloroformo-hexano se obtuvieron 75 mg con p. f. $214-216^\circ$; $[\alpha]_D^{22} +48^\circ$, idéntico al ψ -taraxasterol.

Fracción N-III.

Debido a las constantes que mostró este producto, y a las de los compuestos que adelante se describen, quedó identificado como ψ -taraxasterol.

Acetato de ψ -taraxasterol.

Se acetilaron en baño de vapor, 460 mg de N-III (ψ -taraxasterol), con anhídrido acético y piridina; el residuo se purificó por cromatografía en alúmina y de la elución con hexano-benceno, 90/10, se obtuvo un producto que se cristalizó de cloroformo-metanol hasta que el p. f. fue constante ($247-248^\circ$).

Anal. Calc. para $C_{32}H_{52}O_2$: C, 81.99; H, 11.18

Encontrado: C, 81.81; H, 11.14

Benzoato de ψ -taraxasterol.

Se calentaron durante 12 horas, a baño de vapor, 290 mg de N-III, 6 ml de piridina y 1 ml de cloruro de benzoilo. Se virtió en agua con hielo y se extrajo con cloroformo. El extracto clorofórmico se evaporó al vacío, hasta eliminar la piridina y el cloruro de benzoilo excedente.

El residuo se purificó por cromatografía en alúmina. Por elución con hexano-benceno, 50/50, se obtuvieron 135 mg de un producto que se recrystalizó varias veces de cloroformo-metanol. P. f. 285-288°; λ máx. 3.4, 5.85, 6.2, 6.85 y 8.95 μ .

 ψ -Taraxasterona.

A 8 ml de piridina a 5°, se agregaron lentamente y con agitación 110 mg de anhídrido crómico (7). Cuando se disolvió perfectamente, se agregó una solución a 5° de 210 mg de N-III en 5 ml de piridina. Se dejaron reaccionar a temperatura ambiente 12 horas y se virtió la mezcla en agua. Se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó con HCl al 5% y agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró, quedando un sólido (196 mg), que se purificó por cromatografía en alúmina. Por elución con hexano-benceno 50/50, se obtuvo un sólido (80 mg), que después de cristalizarlo de cloroformo-metanol, mostró p. f. 167-168°. En dioxano da un efecto de Cotton positivo, con un máximo en 303 $m\mu$ y una intensidad de +784°.

 ψ -Taraxasteno.

66 mg de ψ -taraxasteno se disolvieron en 50 ml de dietilenglicol, se añadieron 3 ml. de hidrato de hidrazina al 95% y se calentó 6 horas a 200°. Se agregaron entonces 2.5 g de KOH y se continuó el calentamiento durante 6 horas más. Se virtió en agua, extrajo con éter y se cromatografió el residuo en 14 g de alúmina. En la fracción de hexano 100%, se obtuvieron 32 mg de residuo que se cristalizó de éter y mostró p. f. 181-183°.

Oxima de la ψ -taraxasterona.

En una mezcla de alcohol-éter se disolvieron 20 mg de ψ -taraxasterona y se virtieron sobre 5 ml de NaOH al 50% que contenían 60

mg de clorhidrato de hidroxilamina. Se dejaron reaccionar seis días en baño de vapor (8). La mezcla de reacción se virtió en agua y se neutralizó con ácido clorhídrico. Se extrajo con cloroformo varias veces. El extracto se concentró al vacío, se agregó etanol y se concentró, repitiendo lo anterior varias veces. El residuo se purificó en cromatoplaça, en escala preparativa, utilizando como fase móvil una mezcla de benceno-acetato de etilo, 95/5. Se separó la zona en que quedó adsorbida la oxima, se eluyó con cloroformo-metanol, y el eluato se concentró, dando un residuo que se cristalizó de cloroformo-metanol y que mostró p. f. 264-268°.

3-Acetoxi ψ -taraxastenal.

A 209 mg de acetato de N-III, disueltos en 25 ml de ácido acético, se añadieron 267 mg de bióxido de selenio recién sublimado a presión ordinaria (9). Después de calentar tres horas a reflujo se filtró. El filtrado se virtió en agua y se extrajo cuatro veces con benceno. El extracto bencénico se lavó con HCl al 5%, NaHCO₃ al 5% y agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró, quedando un residuo cristalino mezclado con selenio coloidal, que se purificó por cromatografía en alúmina. Por elución con hexano-benceno, 70/30, se obtuvo un sólido (80 mg) que se purificó cristalizándolo de cloroformo-metanol. P. f. 256-258°.

Anal. Calc. para C₃₂H₅₀O₃: C, 79.62; H, 10.44; O, 9.94

Encontrado: C, 79.22; H, 10.61; O, 10.08

MADERA

El aserrín obtenido del tronco de la *S. Donell-Smithii* (40 Kg) se extrajo con etanol (1).

Después de separar los alcaloides, la fracción neutra se evaporó a sequedad (2.375 Kg). De esta fracción se tomaron 26 g y se cromatografiaron en 1.8 Kg de alúmina, y de los eluatos de benceno-éter 50/50, se obtuvieron 270 mg de cristales, p. f. 183-190°, que por recrystalizaciones de cloroformo-metanol dieron p. f. 196° y después de sublimarlo, p. f.

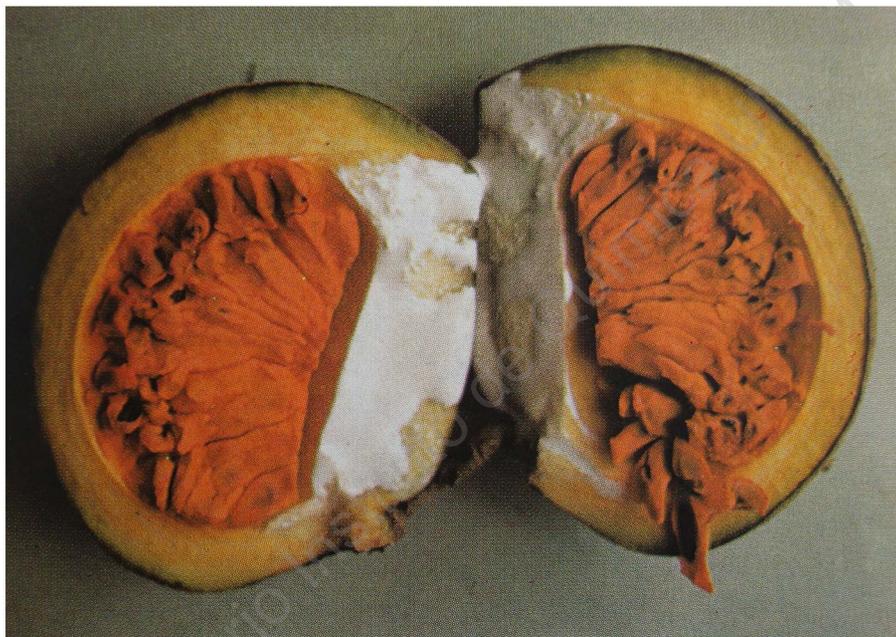


Foto: A. Sandoval, 1961.

Fruto maduro de *Stemmadenia Donnell-Smithii*. Nótese el latex y el colorante de la pulpa, que cubre las semillas. El tamaño natural es el doble del de la fotografía.

197.5-199.5°. Aun cuando el p. f. fue mucho más bajo que el obtenido de los frutos, este producto se identificó como ψ -taraxasterol.

De la fracción eluida con éter-cloroformo 50/50, se obtuvieron cristales con p. f. 106-136°. Se recrystalizó de cloroformo-etanol y dio 1.09 g con p. f. 134-139°. Se recromatografió en 110 g de alúmina, y de los eluatos benceno-éter, 75/25, se obtuvieron 510 mg con p. f. 141-146° y que por recrystalización dio 125 mg con p. f. 147-150°; $[\alpha]_D -41^\circ$ que se identificó como γ -sitosterol (10). De las aguas madres se obtuvieron 260 mg con p. f. 135-137°; $[\alpha]_D -46^\circ$, que se identificó como β -sitosterol (10).

RESUMEN

De la fracción neutra de los frutos y madera de *Stemmadenia Donnell-Smithii*, se aisló e identificó ψ -taraxasterol y acetato de ψ -taraxasterol. De la madera se aisló, además, γ y β sitosteroles.

BIBLIOGRAFIA

1. F. Walls, O. Collera y A. Sandoval L., *Tetrahedron*, **2**, 173 (1958).
2. A. Sandoval, F. Walls, J. N. Shoolery, J. M. Wilson, H. Budzikiewicz y C. Djerassi, *Tetrahedron Letters*, 409, (1962).
3. S. Burrows y J. C. E. Simpson, *J. Chem. Soc.*, 2042 (1938).
4. W. Fruhstorfer. *Ber.*, **87**, 431 (1954).
5. T. R. Ames, J. L. Beton, A. Bowers, T. C. Halsall y E. R. H. Jones, *J. Chem. Soc.*, 1905 (1954).
6. G. Lardelli, Hs. K. Krüsi, O. Jeger y L. Ruzicka, *Helv. Chim. Acta.* **31**, 1815 (1948).
7. G. I. Poos, G. E. Arth, R. E. Beyler y L. H. Sarett. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 422 (1953).
8. A. Vesterberg. *Ber.*, **24**, 3836 (1891).
9. D. H. R. Barton, N. J. Holness, K. H. Overton y W. J. Rosenfelder. *J. Chem. Soc.*, 3571 (1952).
10. W. Karrer, *Konstitution und Verkommen der Organischer Pflanzenstoffe*, 855 (1958). Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart.