

# NUEVAS FUENTES NATURALES DE SAPOGENINAS ESTEROIDICAS V. TAMUS EDULIS LOWE

POR

R. FREIRE BARREIRA, A. G. GONZÁLEZ y E. SUÁREZ

Universidad de La Laguna. Instituto de Investigaciones Químicas de Tenerife,  
del C. S. I. C.

Recibido el 9 de enero de 1968

## SUMMARY

From the twigs of *Tamus edulis* LOWE we isolated  $\beta$ -sitosterol, diosgenin and a new steroidal sapogenin of botanic origin, which we provisionally call *tamusgenin* and identify as *11-ketodiosgenin* (I).

En publicaciones anteriores (1) dimos cuenta del aislamiento y estudio de un grupo de sapogeninas esteroidicas procedentes de diversos *Asparagus* (Liliaceas) endémicos o introducidos en las Islas Canarias. En esta comunicación exponemos los resultados obtenidos al estudiar las sapogeninas procedentes de las ramas del *Tamus edulis* Lowe.

R. Laorga y M. Pinar (2) investigaron las sapogeninas de varias plantas de la Flora española; entre ellas el *Tamus communis* L., del cual aislan exclusivamente *diosgenina*, en proporción de 0,02 gr/kg. Nosotros, siguiendo los métodos de aislamiento y purificación de sapogeninas de las plantas, utilizados en trabajos anteriores (1), llegamos, a partir de ramas de *Tamus edulis* Lowe recogidas en mayo y junio en el Monte de las Mercedes (Isla de Tenerife) y secadas a la sombra, a una mezcla de productos esteroidales con un rendimiento bruto de 2 gr/kg.

La mezcla de sapogeninas obtenidas se resuelve en cromatografías en capa fina en tres manchas: la de mayor desplazamiento se alinea con muestras auténticas de *diosgenina* y *tigogenina* (estas dos sapogeninas presentan el mismo  $R_f$  en el sistema cromatográfico empleado); la segunda presenta un desplazamiento intermedio entre la *diosgenina* y la *hecogenina*, y la última, muestra muy poco desplazamiento.

Por cromatografía preparativa en columna (ver parte experimental) se eluye una sapogenina esteroidica  $C_{27}H_{42}O_5$ , P. F. 200-202 °C;  $[\alpha]_D^{20} - 116^\circ$ , que forma un acetato de P. F. 196 °C  $[\alpha]_D^{20} - 118^\circ$ . Se identifica con la *diosgenina*. P. F. mixtos con muestras auténticas de *diosgenina* y *acetato de diosgenina* no muestran depresión. Los espectros I. R. de sus acetatos, en solución de  $S_2C$ , son superponibles.

Después de la *diosgenina* es eluida otra sapogenina esteroidica  $C_{27}H_{40}O_4$  de P. F. 180-182 °C;  $[\alpha]_D^{20} - 75^\circ$ . Forma un derivado monoacetilado  $C_{29}H_{42}O_5$  de P. F. 209-213 °C;  $[\alpha]_D^{20} - 81^\circ$  y un monobenzoato de P. F. 210-213 °C;  $[\alpha]_D^{20} - 58^\circ$ . Esta sapogenina presenta en el I. R. las absorciones de los agrupamientos ce-

(1) FERNÁNDEZ DÍAZ, R., FREIRE BARRERA, R. y GONZÁLEZ, A. G.; *Estos ANALES*, 63-B, 927, 939 (1967).

(2) LAORGA, R. y PINAR, M.; *Estos ANALES*, 56-B, 797 (1960).

tónicos, pero no forma complejos con el reactivo Girard T, por lo que pensamos en la presencia de un agrupamiento cetónico impedido, posiblemente sobre C<sub>11</sub>. Esta conclusión fue confirmada porque su espectro I. R. presenta bandas de absorción para  $\nu$  max. 1.708 y 968 cm<sup>-1</sup> y en su derivado acetilado la banda de absorción a  $\nu$  max. 1.708 del agrupamiento cetónico es marcadamente más débil que la banda a  $\nu$  max. 1.734 cm<sup>-1</sup> correspondiente al agrupamiento acetato (3), característica de un agrupamiento cetónico sobre C<sub>11</sub>, en un esteroide. El espectro R. M. N. de nuestra sapogenina apoya esta conclusión; presenta una señal aguda, intensidad 3H, para  $\delta$ , 77  $\zeta$ , de acuerdo con el valor calculado según el método de Zürcher (4) para el metilo C<sub>19</sub> en un  $\Delta^5$ -11-ceto-androstano y otra señal aguda, intensidad 3H, para  $\delta$ , 9,25  $\zeta$ , idéntico al valor calculado por el método de Zürcher para el metilo C<sub>18</sub> del compuesto citado.

Dado que la banda de absorción del espectro I. R. del acetato de nuestra genina a  $\nu$  max. 900 cm<sup>-1</sup> es sólo ligeramente superior a la banda a  $\nu$  max. 920 cm<sup>-1</sup>, pensamos que podía tratarse de una mezcla de *iso*- y *neo*-sapogeninas, con un ligero predominio de la primera. Por un tratamiento prolongado con clorhídrico de nuestras sapogeninas, con el fin de isomerizar la forma *neo*, no se altera el producto de partida en lo que se refiere a la *estereoisomería del C-25*. Esto parece confirmar que se trata exclusivamente de una sapogenina de serie *iso*. En este sentido abunda también el hecho de que en su espectro de R. M. N. aparece un triplete confuso de intensidad 2H ( $J = 6$ ) a 6,37  $\zeta$  que se suele asignar a las sapogeninas de la serie *iso* (5).

Revisada la Literatura, no encontramos ninguna sapogenina esteroídica de *procedencia natural* que se identifique con la aislada por nosotros del *Tamus edulis* Lowe, por lo que proponemos que se denomine provisionalmente *tamusgenina*, a la cual le correspondería la estructura I, de una 11-ceto-diosgenina (3 $\beta$ -hidroxi-22 $\alpha$ -25D-espirost-5-en-11-ona). Sin embargo, entre los derivados obtenidos por síntesis a partir de sapogeninas naturales, con objeto de sintetizar diferentes tipos de hormonas esteroídicas, nos encontramos con la 11-ceto-diosgenina obtenida por E. S. Rothman y M. E. Wall (3) con un rendimiento del 35 % a partir de la *gentrogenina II* procedente de la *D. spiculiflora*, considerada como material idóneo para la síntesis de la *cortisona*.

Las constantes y espectros I. R. de nuestra *tamusgenina* encajan perfectamente con los datos para la 11-ceto-diosgenina sintetizada por Rothman y Wall (loc. cit.). Por reducción del grupo cetónico C<sub>11</sub> de la *tamusgenina*, con amoníaco líquido y sodio, obtuvimos un producto de P. F. 231-233 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -110^\circ$  (en el cual ha desaparecido en el I. R. la absorción para el agrupamiento cetónico), que concuerda perfectamente con la 11 $\alpha$ -hidroxi-diosgenina (P. F. 233-235 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -116^\circ$ ) obtenido por Rothman y Wall (loc. cit.) como producto secundario en la síntesis de la 11-ceto-diosgenina a partir de la *gentrogenina*.

Es de destacar la importancia que la *tamusgenina* puede tener como sustancia precursora en la síntesis de la *cortisona*.

#### PARTE EXPERIMENTAL

11,75 kg de ramas secadas a la sombra (tallos y hojas) de *Tamus edulis* Lowe, recogidas en el Monte de las Mercedes (Isla de Tenerife) durante los meses de mayo y junio,

(3) ROTHMAN, E. S. y WALL, M. E.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 3228 (1957).

(4) ZÜRCHER; *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2054 (1963).

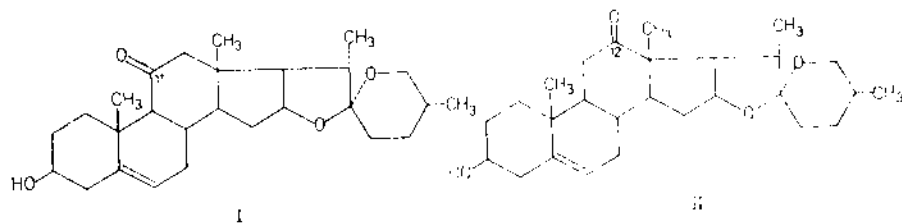
(5) KUTNEY, J. P.; *Steroids*, **2**, 225 (1963).

fueron troceadas y extraídas varias veces con alcohol. Los extractos fueron concentrados a 6 litros, se preparó el precipitado formado que no da reacción de esteroides. Al concentrado, después de ser desengrasado con benceno en un extractor líquido-líquido, se le agregó  $\text{SO}_2\text{H}_2$  hasta que la solución quedó aproximadamente 3N y se calentó a reflujo unas cinco horas. Se separó el precipitado formado y se trató con 1.000 cc de solución de potasa en metanol al 10 % y 3 litros de benceno, a continuación se hirvió a reflujo la mezcla, durante una hora, se separó la capa bencénica y la capa alcohólica fue extraída con benceno.

Los extractos bencénicos, al ser destilados, dejaron un residuo sólido, marrón, de aspecto resinoso de 24.3 gr que en capa fina, sobre Kieselgel G Merck con cloroformo:etanol (99:1) como eluyente y "oleum" como revelador, se resuelve en tres manchas, como se indica al principio del trabajo.

#### Separación de las geninas por cromatografía preparativa

12 gr del producto se cromatografiaron a través de 600 gr de alúmina Merck de actividad I, estandarizada según Broockmann se eluyó con 29 fracciones de benceno\*, 8 fracciones de  $\text{C}_6\text{H}_6\text{CHCl}_3$  (1:1), 4 fracciones de  $\text{CHCl}_3$  y 2 fracciones de acetato de etilo. Todas las fracciones obtenidas fueron estudiadas en cromatografía en capa fina y los productos separados se agruparon de acuerdo con los resultados cromatográficos. Se llegó a las conclusiones siguientes:



**Fracciones 1-6.**—Indicios de un producto céreo (alcanos) y de otro cristalino, caracterizado como  $\beta$  sitosterol. Estas fracciones se descartan.

**Fracciones 7-8.**—Se obtienen 0,67 gr de un producto que, cristalizado en metanol, da P. F. 200-202 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -116^\circ$  en  $\text{CHCl}_3$  (c = 1,48 %). En cromatografía de capa fina se alinea con una muestra auténtica de *diosgenina*. Su espectro I. R. en solución cloroformica (c = 14 g/litro) con célula de 0,5 mm de espesor, es típico de una sapogenina espirostánica (v max. 981, 920, 900 y 875  $\text{cm}^{-1}$ ) de la serie iso (v max. 900  $\text{cm}^{-1}$  aproximadamente cuatro veces superior a v max. 900  $\text{cm}^{-1}$ ) y grupos alcohólicos (v max. 3.620  $\text{cm}^{-1}$ ).

Da color amarillo intenso con tetranitrometano en solución cloroformica.

Tratada esta genina con ácido perclórico del 70-72 % durante 10 minutos da en el visible, con célula de 1 cm, bandas de absorción para  $\lambda$  max. 410 y 490  $\mu$ .

Esta sapogenina forma un acetato de P. F. 196 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -118^\circ$  en  $\text{CHCl}_3$  (c = 1,7 %). Un P. F. mixto, con una muestra auténtica de acetato de *diosgenina*, no experimenta depresión.

El espectro I. R. de este acetato, en solución de  $\text{S}_2\text{C}$  (c = 13,2 g/litro), con célula de 0,5 mm, es perfectamente superponible con el obtenido con una muestra auténtica de acetato de *diosgenina*, en las mismas condiciones.

**Fracciones 12-15.**—Se obtiene 0,47 gr de producto que da, en cromatografía en capa fina, una mancha de color rosa, con una ligera impureza al revelar el cromatograma con  $\text{SO}_2\text{H}_2$  al 50 %. Se percola a través de 30 gr de alúmina, estandarizada según Broockmann, eluyéndose con benceno. Cristalizada la sapogenina separada en acetato de etilo-éter de petróleo da, en cromatografía en capa fina, una sola mancha de color rosa, empleándose los mismos sistemas de eluyentes que se utilizan en las fracciones siguientes.

El producto obtenido en estas fracciones, una vez purificado, se unió al eluido en las fracciones 16-29.

#### Obtención de la *tamusgenina*

**Fracciones 16-29.**—Todas estas fracciones dan una sola mancha rosa, cuando se cromatografían en capa fina, empleándose como soporte gel de sílice y como eluyente

benceno-acetato de etilo (1:1) o cloroformo-etanol (99:1), utilizándose en este último caso el método de elución continua, durante 4 horas, y como revelador,  $\text{SO}_2\text{H}_2$  al 50 %.

Unido este producto al obtenido de las fracciones 12-15, ya purificado, se cristalizó en la mezcla acetato de etilo-éter de petróleo, llegamos a una sustancia, pura en cromatografía de capa fina, perfectamente cristalizada, fija su P. F. a 180-182 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -75^\circ$  en  $\text{CHCl}_3$  ( $c = 1,17\%$ ). Da fuerte coloración amarilla con el tetranitrometano. Su espectro I. R., en solución clorofórmica ( $c = 14,5$  g/litro) con célula de 0,5 mm de espesor, muestra bandas de absorción a  $\nu$  max. 982, 920, 900 y 870  $\text{cm}^{-1}$ , típicas del agrupamiento espiroestánico, y max. 900  $\text{cm}^{-1}$  es *ligeramente más intensa* que  $\nu$  max. 920  $\text{cm}^{-1}$ , apareciendo sobre  $\nu$  max 1.050  $\text{cm}^{-1}$  un hombro a 1.062, lo que parece corresponder a una sapogenina esteroídica de la serie iso (?), muestra bandas a  $\nu$  max. 3.620 y 1.050  $\text{cm}^{-1}$  (—OH, posiblemente ecuatorial) y entre otras una banda a  $\nu$  max. 1.708  $\text{cm}^{-1}$  (grupo cetónico sobre ciclo hexagonal, probablemente sobre  $\text{C}_{11}$ ).

Un espectro I. R. de esta genina, en solución de  $\text{S}_2\text{C}$  y célula de 0,2 mm en un espectrofotómetro Beckman. I. R. 7, muestra las bandas intensas a  $\nu$  max. 1.708 y 968  $\text{cm}^{-1}$ , típicas de un grupo cetónico sobre  $\text{C}_{11}$  en un esteroide. En el U. V. da dos hombros de baja intensidad a  $\lambda$  max. 240 y 280  $\mu$ .

El espectro R. M. N. de la *tamusgenina* en solución de  $\text{Cl}_3\text{DC}$  al 6 %, con tetrametilsilano como referencia, en un espectrofotómetro Perkin-Elmer de 60 Mc, mod. R-10, presenta las bandas de absorción que se reseñan en el cuadro siguiente:

	J	H	Forma de la señal	Asignación probable
4,62	7 cps	1	Singlete amplio	Protón en $\text{C}_6$
5,63	24 "	1	Banda muy ancha	Protón en $\text{C}_{16}$
6,37	6 "	3	Triplete confuso	Protones en $\text{C}_{26}$ y $\text{C}_3$
7,20	15 "	1		
7,45				
7,67		2	Agudo	Protones en $\text{C}_7$
7,82		2	Agudo	Protones en $\text{C}_{12}$
8,77		3	Agudo	Metilo en $\text{C}_{19}$
8,25		3	Agudo	Metilo en $\text{C}_{18}$
9,00				
9,12			Agudo	Metilos en $\text{C}_{21}$ y $\text{C}_{27}$
9,18		6		

Valor calculado para la banda de absorción R. M. N. del metilo en  $\text{C}_{18}$ , de un  $\Delta^5$ -11-ceto-androstano, según el método propuesto por Zürcher (loc. cit.), 8,76  $\zeta$ .

Valor hallado por nosotros: 8,77  $\zeta$ .

Valor calculado para el metilo en  $\text{C}_{19}$ : 9,25  $\zeta$ .

Valor hallado por nosotros: 9,25  $\zeta$ .

#### Análisis:

Calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_4$ : C, 75,66; H, 9,45 %.

Hallado: C, 75,64; H, 8,19 %.

La *tamusgenina* forma un acetato que, percolado a través de alúmina estandarizada y cristalizado en acetato de etilo-éter de petróleo, fija su P. F. 209-213 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -81^\circ$ , en  $\text{CHCl}_3$  ( $c = 1,0\%$ ). Su espectro I. R., en  $\text{S}_2\text{C}$  ( $c = 1\%$ ) y célula de 0,1 mm en un espectrógrafo Beckman I. R. 7. I. R. presenta bandas de absorción a  $\nu$  max. 1.708 y 968  $\text{cm}^{-1}$  características de un grupo cetónico en  $\text{C}_{11}$ . A 1.734  $\text{cm}^{-1}$  aparece la banda de absorción del grupo acetato que es mucho más intensa que la banda a  $\nu$  max. 1.708  $\text{cm}^{-1}$  del grupo cetónico.

#### Análisis:

Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_5$ : C, 74,0; H, 8,99 %.

Hallado: C, 74,11; H, 9,06 %.

### Isomerización del acetato de la *tamusgenina*

100 mgr del acetato de *tamusgenina* se disuelven en 90 cc de etanol y a la solución se agregan 45 cc de ClH concentrada (solución 4N). La solución se calienta a reflujo durante 95 horas. El producto recuperado se comporta como el de partida, presentando en el I. R. la misma relación de las bandas  $\nu$  max. 900 y 920  $\text{cm}^{-1}$ .

El benzoato de la *tamusgenina*, cristalizado en éter de petróleo-acetato de etilo, de P. F. 210-213 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -58^\circ$  en  $\text{CHCl}_3$  ( $c = 1,13\%$ ).

### Reducción de la *tamusgenina* en $\text{NH}_3$ líquido

Se adicionó sodio metálico a 20 cc de  $\text{NH}_3$  líquido, hasta persistente color azul, y a esta solución se le agregó lentamente una solución de 0,1 gr de *tamusgenina* en 5 cc de tolueno. Después de agitar la mezcla 5 minutos se le adicionó otra formada por 1,5 cc de bromo-benceno en 6 cc de tolueno y luego se dejó una noche el frasco de reacción abierto, en una atmósfera húmeda. Se formó un precipitado que se extrajo con éter sulfúrico; estos extractos fueron lavados con agua, secados y destilados. El producto obtenido, en cromatografía en capa fina, da una mancha de menor  $R_f$  que la *tamusgenina*, con ligeras impurezas. Se percoló a través de 20 gr de gel de sílice, y luego, debido a la persistencia de algunas impurezas, fue separada en capa fina preparativa, placas de 1 mm de espesor y  $\text{CHCl}_3 + 1\%$  EtOH como eluyente, se llega a una sustancia que da una mancha en cromatografía en capa fina. Cristalizada en acetato de etilo-éter de petróleo, da P. F. 231-233 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -110^\circ$  en  $\text{CHCl}_3$  ( $c = 1,5\%$ ). Su espectro I. R. en  $\text{NaCl}$  ( $c = 1,3\%$ ), con célula de 1 mm, presenta bandas de absorción a  $\nu$  max 985, 922, 900 y 870  $\text{cm}^{-1}$ , siendo  $\nu$  max. 900  $\text{cm}^{-1}$  más intensa que  $\nu$  más 922  $\text{cm}^{-1}$ , también presenta, entre otras,  $\nu$  max. 3.600 y 1.050  $\text{cm}^{-1}$  (C-OH) y  $\nu$  max. 3.030 y 825  $\text{cm}^{-1}$  (insaturación). Desaparece la absorción a  $\nu$  max. 1.708  $\text{cm}^{-1}$ .

Agradecemos a la Comisaría de Protección Escolar la Beca disfrutada por uno de nosotros (R. F. B.) durante la realización de este trabajo, al Dr. Hidalgo los espectros I. R. hechos en el Beckman I. R. 7; los otros fueron hechos por nosotros en un Perkin-Elmer, modelo 237. Al Departamento de Microanálisis del Instituto "Alonso Barba" le agradecemos los análisis realizados; al Dr. Bretón, el N. M. R. de la *tamusgenina*, y al Dr. Rothman, los espectros I. R. de 11-cetodiosgenina y de su acetato.