

Instituto de Productos Naturales
Orgánicos del CSIC
Instituto de Química Orgánica de
la Universidad de La Laguna

"METABOLITOS DE HONGOS SUPERIORES"

MEMORIA presentada para
aspirar al grado de Doctora
en Ciencias Químicas por la
Lcda M^aJesús Mediavilla Pérez

La Laguna Junio de 1984

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Productos Naturales Orgánicos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Química Orgánica de la Universidad de La Laguna , durante los cursos 1981-1982, 1982- 1983 y 1983-1984 , bajo la dirección del Catedrático Dr. D. Antonio Gonzalez Gonzalez y del Investigador del CSIC Dr. D. Jaime Bermejo Barrera a quienes expreso mi mas profundo agradecimiento.

Agradezco asimismo al Dr.D. Francisco Javier Toledo Marante su colaboración en la realización de esta tesis.

Agradezco a la Doctora Esperanza Beltrán Tejera del Departamento de Botánica de la Facultad de Biológicas de la Universidad de La Laguna, la identificación de los hongos, así como su constante interés por nuestro trabajo.

INDICE

pag.

8	<u>Introducción</u>
9	Los hongos
12	Triterpenos y esteroides de hongos
14	Esqueleto del colestano
15	" " ergostano
17	" " estigmastano
18	" " lanostano
25	" " fusidano
27	" " protostano
28	Triterpenos y esteroides de hongos: Phycomycetes
31	Ascomycetes y Fungi Imperfecti
36	Basidiomycetes
37	Triterpenos pentacíclicos de Basidiomycetes
48	<u>Capítulo I</u>
49	Estudio del hongo Ganoderma australe
	Sustancia G-1: linoleato de metilo
50	Sustancia G-2: ergosta-7,22-dien-3-ona
51	Sustancia G-3: ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona
53	Sustancia G-4: mezcla de ácidos docosanoico, tricosanoico, tetracosanoico, pentacosanoico y hexacosanoico.
55	Sustancia G-5: mezcla de ergosta-7,22-dien-3 β -ol y de ergosta-7-en-3 β -ol.
58	Sustancia G-6: mezcla de peróxido de ergosterol y de su 9(11) dehidro derivado.

62 Sintésis parciales

Sintésis de la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona
ergosta-4,7,22-trien-3-ona

63 Formación del ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -acetoxi
Fotooxigenación del ergosterol y del acetato de 9(11)
dehidro ergosterol.

66 Reducción de endoperóxidos

Reducción con cinc, formación del ergosta-6,22-dien-
3 β ,5 α ,8 α -triol

Reducción con sodio en etanol, formación del ergosta-
7,22-dien-3 β -ol

67 Reducción de Birch:

68 " de la mezcla natural 82:18 de peróxido de er
gosterol y de su 9(11) dehidro derivado

Reducción del ergosterol

69 " de la mezcla 82:18 de ergosta-6,22-dien-3 β ,
5 α ,8 α -triol y de ergosta-6,9(11),22-trien-3 β ,5 α ,8 α -tric

Reducción de peróxido de ergosterol

70 " del 9(11) dehidro peróxido del ergosterol

72 Conclusiones sobre el mecanismo de la reducción de Bir

Oxidación del ergosta-7,22-dien-3 β -ol

74 El peróxido del ergosterol ¿ Es un artefacto fúngico?

77 Configuración absoluta en C-20 y C-24 del ergosterol

78 Parte experimental

95 Capítulo II

96 Estudio del hongo *Phellinus pomaceus*

página.

- 99 Sustancia F-1: friedelina
- 101 " F-2: taraxerol
- 102 " F-3: ergosta-7,22-dien-3-ona
- " F-4: mezcla de palmitato de metilo y de oleato de metilo.
- 103 " F-5: ácido β -boswéllico
- 105 " F-6: ácido ursólico
- 106 " F-7: ester dimetílico del ácido javieroico: 4β , 14α -dimetil-A-nor- 5α -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi.
- 107 Descripción del $7,11$ -dioxo- 4β , 14α -dimetil-A-nor- 5α -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi.
- 110 Descripción del $7,11$ -dioxo- 4β , 14α -dimetil-A-nor- 5α -pregnan-4,20-dicarbometoxi.
- 114 Sustancia F-8: ácido phellínico: ácido 20-oxo- 4β , 14α -dimetil-A-nor- 5α -pregnen-8-en-4-oico.
- 117 Parte experimental
- 128 Espectros
- 129 Índice de espectros
- 172 Bibliografía
- 188 Apéndice:
- 189 Espectrometría de masas de esteroides
- 205 Métodos generales
- 209 CONCLUSIONES
- 213 Publicaciones a que ha dado origen esta tesis.

INTRODUCCION

LOS HONGOS

Los hongos constituyen un grupo muy extenso dentro de los organismos vivientes; a medio camino entre los vegetales y los animales, se clasifican junto con algas y bacterias como Thallophitas.

Se cree (224) que los hongos derivan filogenéticamente de las algas, de las que difieren, desde el punto de -- vista funcional, por haber perdido la facultad de vivir -- autotróficamente, desprovistos como están de toda clase de pigmentos asimiladores de carbono. En algas se observan -- ejemplos del paso de la vida autótrofa a la parásita, con la consiguiente desaparición del pigmento y la reducción -- del talo. En hongos, esta modificación es más profunda, co -- mo resultado del paso de la vida acuática a la terrestre. Los hongos acuáticos presentan muchas analogías con las al -- gas, fundamentalmente en lo que se refiere a los procesos fecundativos.

Aunque con el término hongo se engloba a un gran núme -- ro de especies muy diferentes entre si, todas ellas poseen una característica común: la ausencia de clorofila. Este -- pigmento, presente en todas las plantas superiores, permi -- te la asimilación del carbono atmosférico (1).

La carencia de clorofila y de toda clase de pigmentos asimiladores de carbono, obliga a los hongos a procurarse el carbono indispensable ya sea viviendo sobre otros vege --

tales o animales (parásitos), ya sea a expensas de restos orgánicos (saprófitos).

Las sustancias alimenticias son absorbidas por medio de un aparato vegetativo subterráneo: el micelio, que vive sobre suelo, madera,.. etc durante todo el año y solo cuando las condiciones ambientales lo permiten, emite -- unas protuberancias que mas tarde se convertiran en los -- órganos reproductores o carpófogos; en ellos se producen las esporas que aseguran la supervivencia de la especie.

Aunque existen un gran número de hongos, la mayor parte son fugaces y poco visibles, otros son incluso microscópicos. Entre estos últimos, se encuentran los hongos -- que constituyen las levaduras, indispensables en todos -- los procesos fermentativos; los Penicillium, que han permitido el conocimiento y desarrollo de las penicilinas, y otros que forman parte de la vida de los suelos.

En hongos, se encuentran con frecuencia sustancias antibióticas, alcaloides y otros productos de alta actividad farmacológica; que son los causantes de la elevada -- toxicidad de algunas especies.

Los hongos parásitos de animales y plantas son otro grupo de excepcional interés, no solo desde el punto de vista médico y veterinario, sino también por el deterioro que ejercen sobre las plantas que parasitan, llegando incluso a producir la muerte de algunas especies vegetales.

En la investigación química, el estudio de los hongos se enfoca en dos sentidos, por un lado la obtención de nuevos compuestos, por otro el uso de extractos de hongos (o de enzimas encontradas en los mismos) como catalizadores en procesos sintéticos.

TRITERPENOS Y ESTEROIDES
DE HONGOS

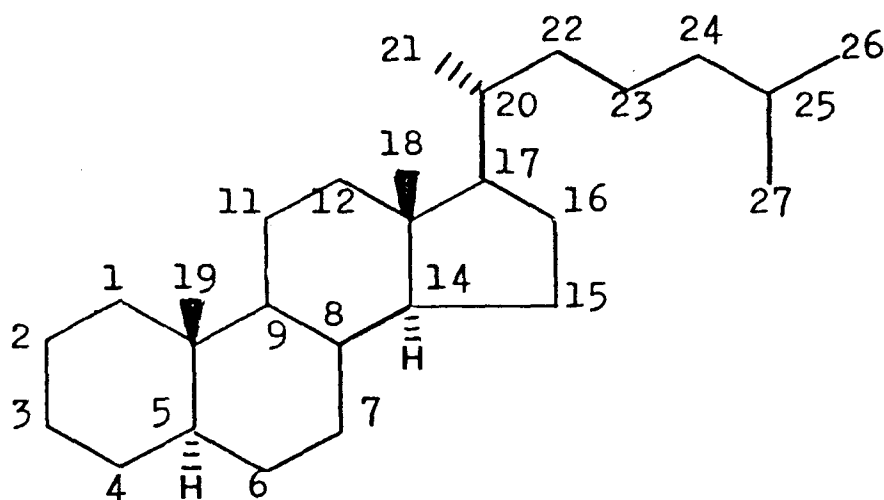
Los hongos se dividen atendiendo a sus propiedades botánicas en Phycomycetes, Ascomycetes, Fungi Imperfecti y Basidiomycetes.

En general, el colesterol y sus derivados solo son frecuentes en Phycomycetes, mientras que el ergosterol se muestra como estero^l predominante en el resto de los hongos.

Respecto a los triterpenos, los fusidanos (F) y protostanos (Pr) son característicos de ciertos Fungi Imperfecti y aunque el lanosterol y sus 24-metil y 24-metilen derivados se muestran en todos los grupos taxonómicos, los C-30 -lanostanos unicamente se observan en Basidiomycetes.

De las 198 especies aportadas en esta revisión, solo - en seis . de ellas se han encontrado triterpenos pentacíclicos.

ESQUELETO DEL COLESTANO



C-1 colesterol: colest-5-en-3-ol

C-2 desmosterol: colest-5,24-dien-3-ol

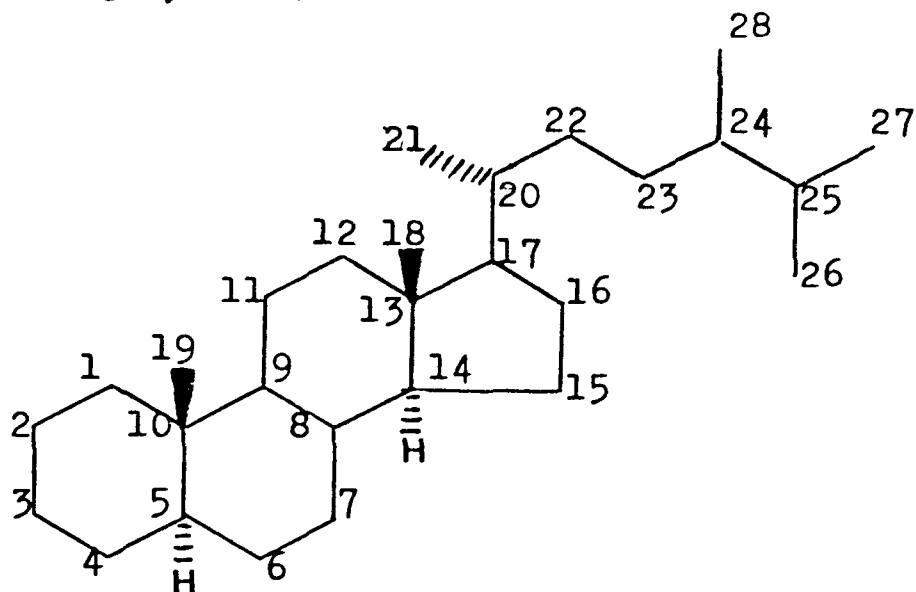
C-3 zymosterol: colest-8,24-dien-3-ol

C-4 22-dehidrocolesterol: colest-5,22-dien-3-ol

C-5 colest-7-en-3-ol

Todos los hidroxilos en 3 son β

ESQUELETO DEL ERGOSTANO

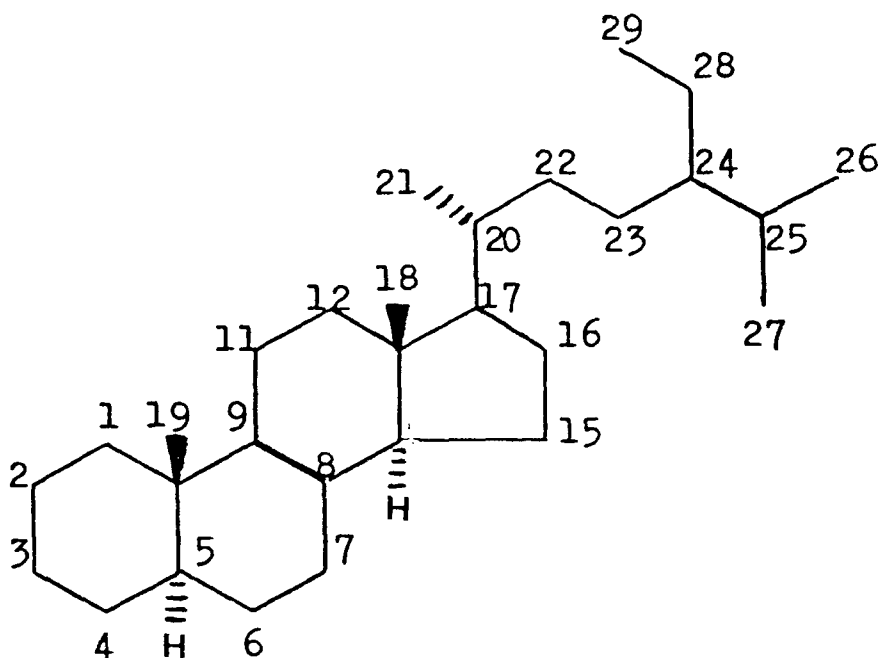


- E-1 24-metilcolesterol (campesterol): ergost-5-en-3-ol
- E-2 fungisterol: ergost-7-en-3-ol
- E-3 22-dihidroergosterol: ergosta-5,7-dien-3-ol
- E-4 ergosta-7,22-dien-3-ol
- E-5 ergosta-7,22-dien-3-ona
- E-6 brassicasterol: ergosta-5,22-dien-3-ol
- E-7 episterol: ergosta-7,24(28)-dien-3-ol
- E-8 ascosterol: ergosta-8,23-dien-3-ol
- E-9 fecosterol: ergosta-8,24(28)-dien-3-ol
- E-10 24-metilen-colesterol: ergosta-5,24(28)-dien-3-ol
- E-11 ergosta-7,16-dien-3-ol
- E-12 cerevisterol: ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α ,6 β -triol
- E-13 ergosterol: ergosta-5,7,22-trien-3-ol
- E-14 peróxido de ergosterol: 5 α ,8 α epidioxi-ergosta-6,
22-dien-3-ol
- E-15 ergosta-5,7,9(11),22-trien-3-ol

- E-16 5 α ,8 α epidioxi.ergosta-6,9(11),22-trien-3-ol
- E-17 ergosta-5,7,24(28)-trien-3-ol
- E-18 ergosta-5,7,14-trien-3-ol
- E-19 ergosta-5,8,22-trien-3-ol
- E-20 ergosta-4,6,22-trien-3-ona
- E-21 ergosta-5,7,14,22-tetraen-3-ol
- E-22 ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol
- E-23 ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona
- E-24 campestanol: ergost-3-ol
- E-25 ergosta-7,14,22-trien-3-ol
- E-26 12-oxo-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,9(11),22-trien-3-ol
- E-27 4 α -metil-ergosta-7,24(28)-dien-3-ol
- E-28 4 α -metil-ergosta-8(9),14-dien-3-ol
- E-29 4 α -metil-ergosta-8,24(28)-dien-3-ol (4 α -metil-24-me
tilen-24,25-dihidrozymosterol)
- E-30 ergosta-6,8,22-trien-3-ol
- E-31 ergosta-5,7-dien-3,23-diol

A menos que se especifique lo contrario, todos los hidroxi
los en posicion 3 son β

ESQUELETO DEL ESTIGMASTANO



S-1 estigmasterol: estigmasta-5,22-dien-3-ol

S-2 estigmast-7-en-3-ol

S-3 estigmasta-7,24(28)-dien-3-ol

S-4 estigmasta-5,7-dien-3-ol

S-5 fucosterol: estigmasta-5,24(28)-dien-3-ol

S-6 estigmast-22-en-3-ol

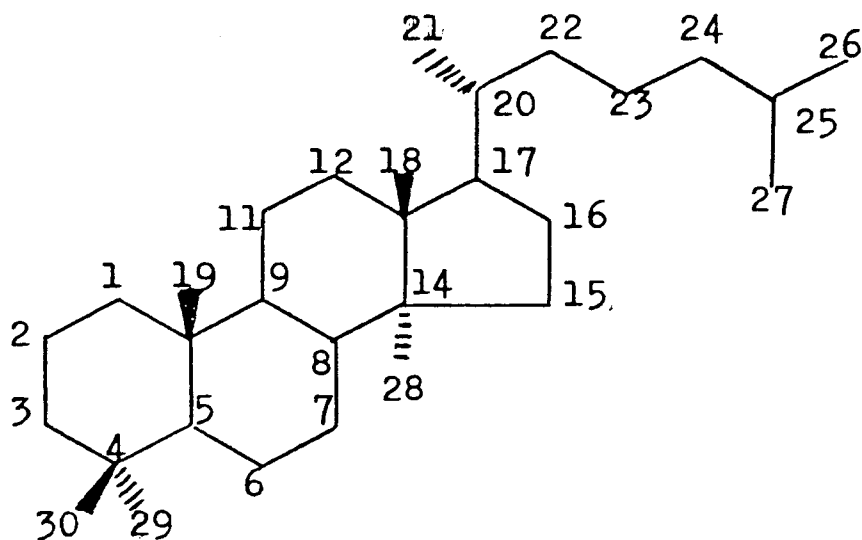
S-7 β -sitosterol: estigmast-5-en-3-ol

S-8 estigmasta-5,22-dien-3-ol

S-9 estigmastanol: estigmast-3-ol

Todos los hidroxilos en 3 son β

ESQUELETO DEL LANOSTANO



L-1 lanosterol: lanosta-8,24-dien-3 β -ol

L-35 Lanosta-7,9(11),24-trien-3 β ,21-diol

L-36 21-hidroxi-lanosta-7,9(11),24-trien-3-ona

L-37 Acido pinicólico: ácido 3-oxo-lanosta-8,24-dien-21-oico

L-38 Inotodiol: lanosta-8-en-3 β ,22-diol

L-39 Acido ganodérico A: ácido 3,11,23-trioxo-7 β ,15 α -dihidroxi-lanosta-8-en-26-oico

L-40 Acido ganodérico B: ácido 11,15,23-trioxo-3 β ,7 β -dihidroxi-lanosta-8-en-26-oico

Acidos ganodéricos T aZZ:

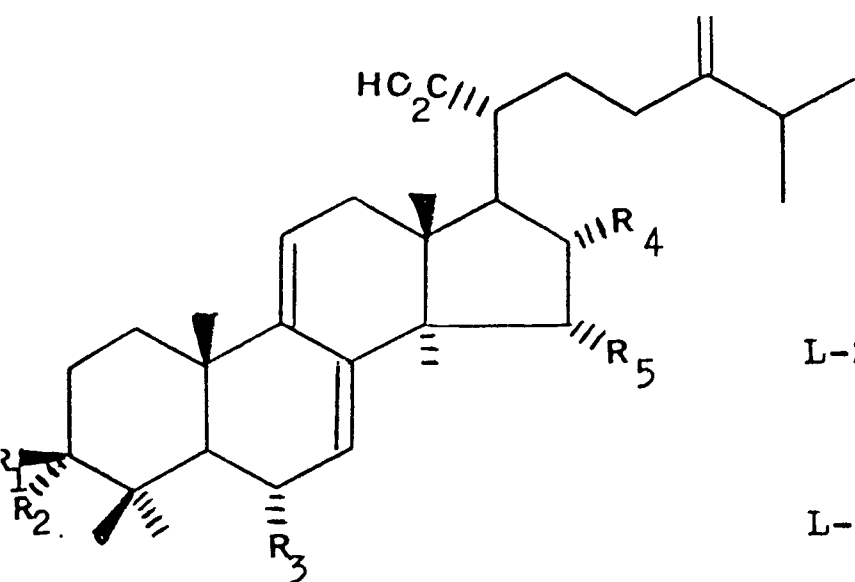
L-41 Acido 3 β -hidroxi-lanosta-8,24-dien-26-oico

L-42 Acido 3 α ,15 α -diacetoxi-7 α -hidroxi-lanosta-8,24-dien-26-oico

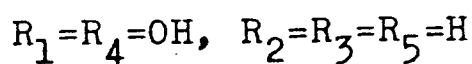
L-43 Acido 3-oxo-15 α -acetoxi-7 α -hidroxi-lanosta-8,24-dien-26-oico

- L-44 Acido $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi-lanosta-8,24-dien-26-oico
- L-45 Acido 3β -hidroxi-lanosta-7,9(11),24-trien-26-oico
- L-46 15α -acetoxi- 3α -hidroxi-lanosta-7,9(11),24-trien-26-oico
- L-47 Acido trametenólico: ácido 3β -hidroxi-lanosta-8,24-dien
21-oico
- L-48 Acido $3\beta,15\alpha$ -dihidroxi-lanosta-8,24-dien-21-oico
- L-54 Acido tyromycico: ácido 3-oxo-lanosta-7,9(11),24-trien
26-oico
- L-56 Lanosta-7,9(11),24-trien- 3β -ol
- L-57 Acido 3β -hidroxi-lanosta-7,9(11),24-trien-21-oico
- L-59 (23S) lanosta-8,24-dien- $3\beta,23$ -diol
- L-60 Acido $3\beta,15\alpha$ -dihidroxi-lanosta-8,24-dien-21,27-dioico
- L-61 Acido 3β -acetoxi-lanosta-8,24-dien-21-oico
- L-62 Acido $3\beta,15\alpha$ -dihidroxi-lanosta-8,24-dien-21-oico
- L-63 3α -acetoxi-lanosta-8,24-dien-21-oato de metilo

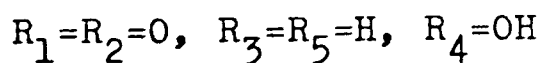
24-metil y 24 metilen lanostanos



L-2 Acido dehidrotumulósico



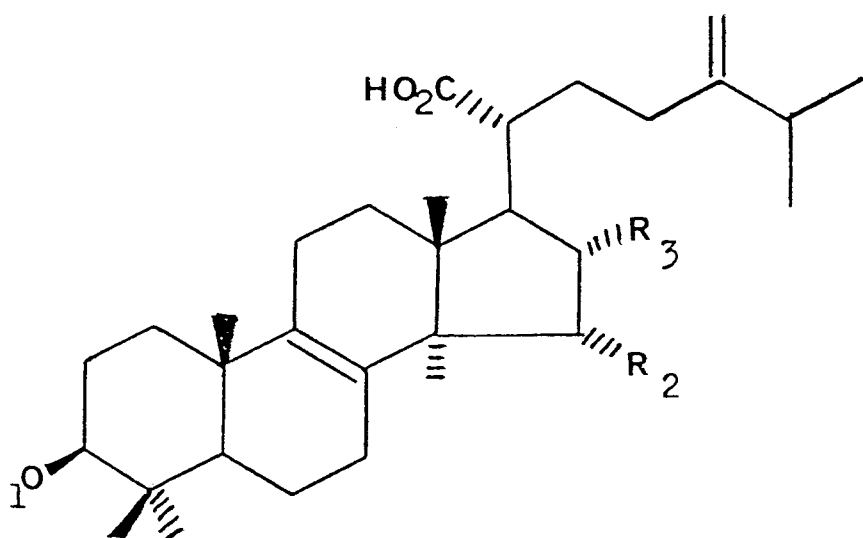
L-3 Acido polyporénico C:



L-4 $R_1=R_2=O, R_3=R_4=OH, R_5=H$

L-5 Acido dehidroeburicoico: $R_1=OH, R_2=R_3=R_4=R_5=H$

L-6 $R_1=R_2=O, R_3=R_4=H, R_5=OH$.



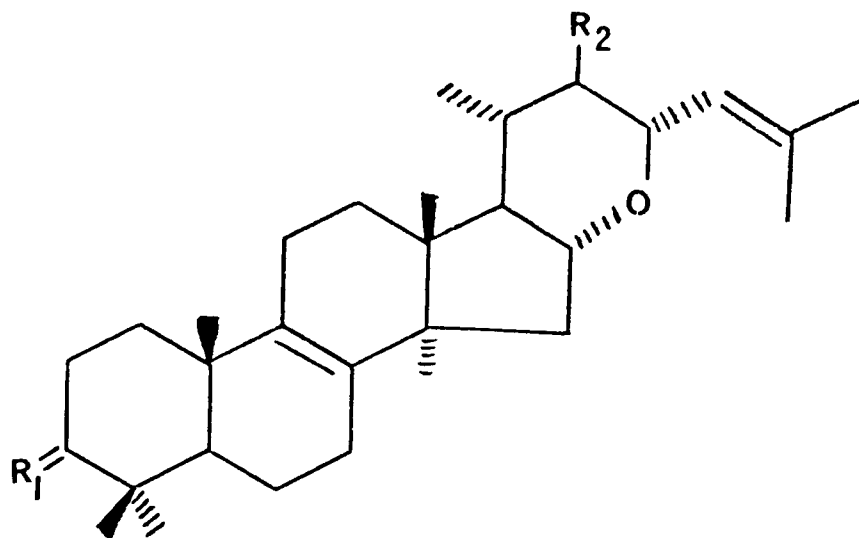
L-7 Acido eburicoico: $R_1=R_2=R_3=H$

L-8 Acido 3-O-acetil eburicoico: $R_1=Ac, R_2=R_3=H$

L-9 Acido tumulósico: $R_1=R_2=H, R_3=OH$

L-10 Acido sulfurénico: $R_1=R_3=H, R_2=OH$

L-11 Acido pachymico: $R_1=Ac, R_2=H, R_3=OH$



L-12 Echinodol $R_1 = \beta\text{OH}$, $R_2 = \text{OAc}$

L-13 Echinodona $R_1 = \text{O}$, $R_2 = \text{OAc}$

L-14 $R_1 = \text{O}$, $R_2 = \text{OH}$

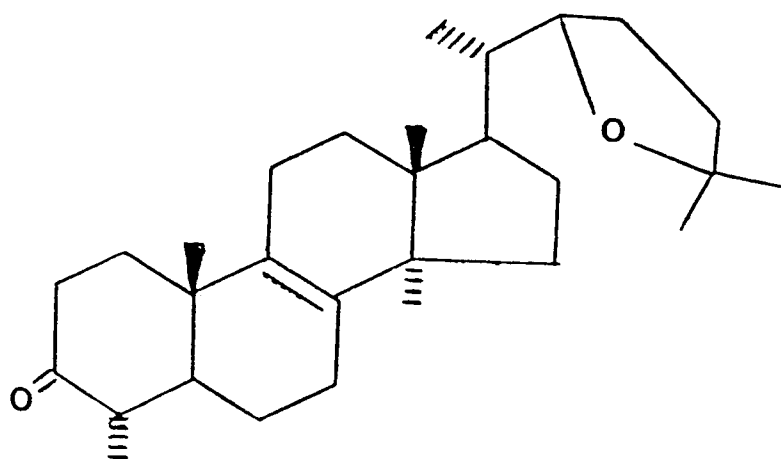
L-15 $R_1 = \alpha\text{OH}$, $R_2 = \text{OAc}$

L-16 $R_1 = \alpha\text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$

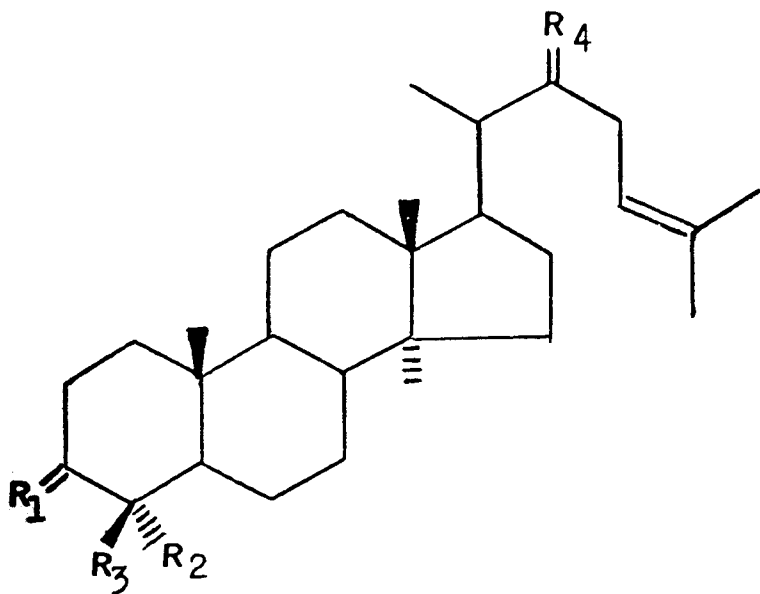
L-17 $R_1 = \alpha\text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

L-18 $R_1 = \beta\text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

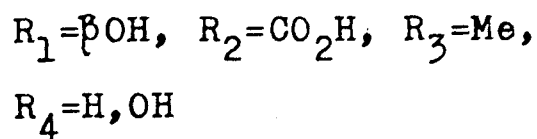
L-19 $R_1 = \text{O}$, $R_2 = \text{H}$



L-20 Oxidosenexona

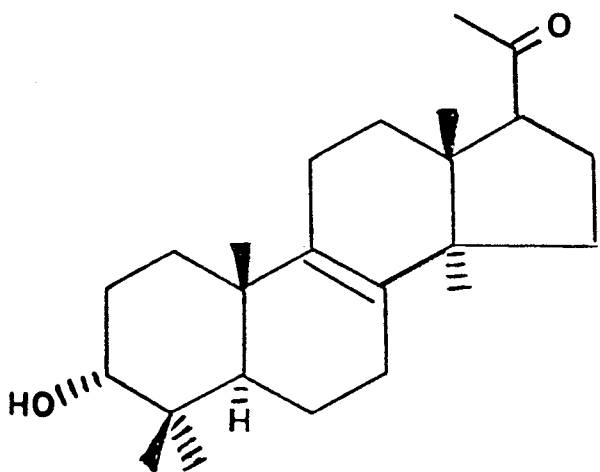


L-21 Acido senexdiólico:

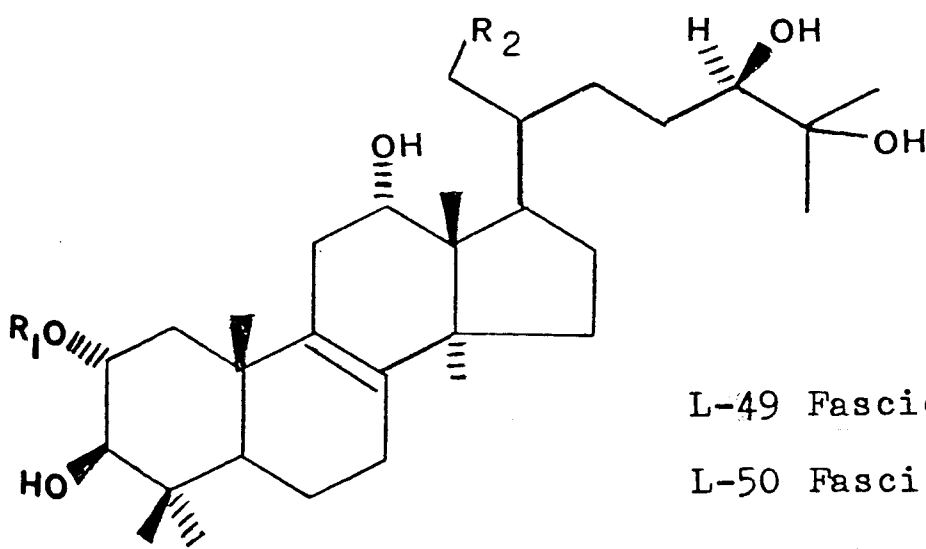


L-22 Senexonol: $R_1 = \text{O}, R_2 = \text{Me},$
 $R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H, OH}$

L-23 Senexdiona: $R_1 = R_4 = \text{O},$
 $R_3 = \text{H}, R_2 = \text{Me}$

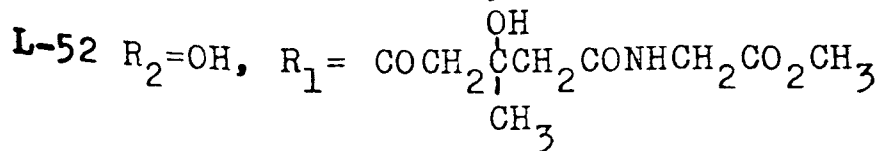
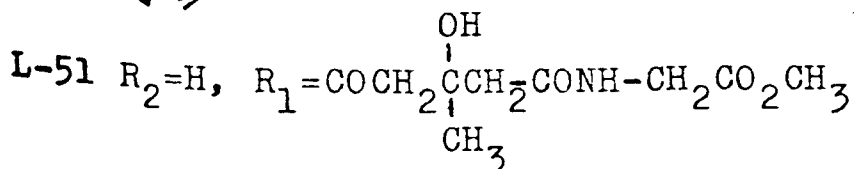


L-34 3 α -hidroxi-4,4,14 α -trimetil-5 α -pregnen-8-en-20-ona



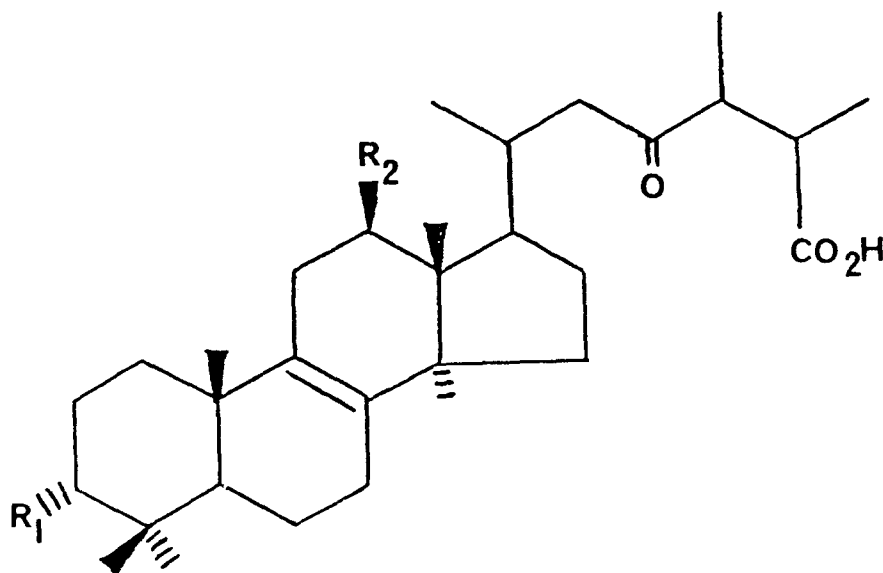
L-49 Fasciculol B: $R_1 = R_2 = \text{H}$

L-50 Fasciculol C: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$



L-24 Acido polyporénico A: $3\alpha,12\alpha$ -dihidroxi-24-metilen-lanosta-8-en-26-oico

L-25 Acido polyporénico D: 3α -hidroxi-24-metilen-lanosta-8-en-26-oico



L-26 Acido quercínico: $R_1=OH$, $R_2=H$

L-27 $R_1=OCOCH_2CO_2Me$, $R_2=H$

L-28 $R_1=OCOCH_2CO_2H$, $R_2=H$

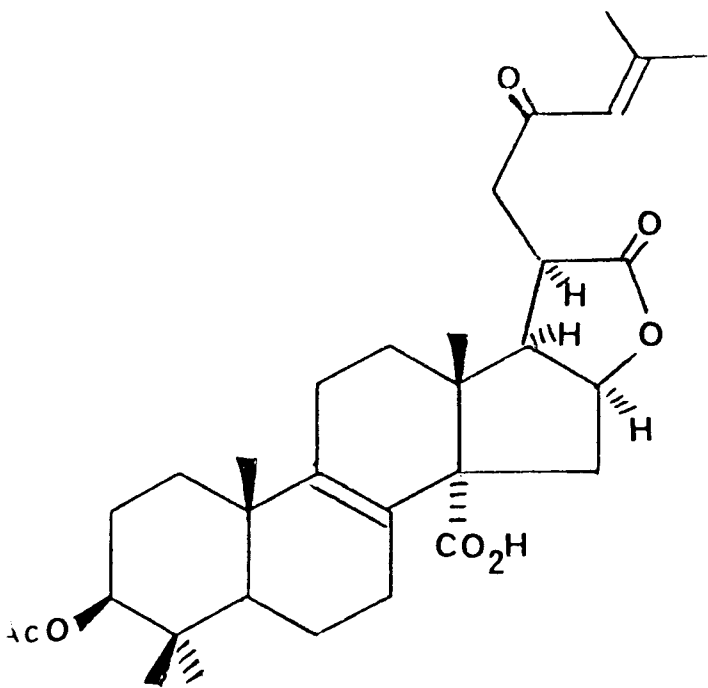
L-29 $R_1=OCOCH_2CO_2H$, $R_2=OH$

L-30 24-metilen-lanosterol: 24-metilen-lanosta-8-en- 3β -ol

L-31 Eburicol: 24-metilen-lanosta-8-en- 3α -ol

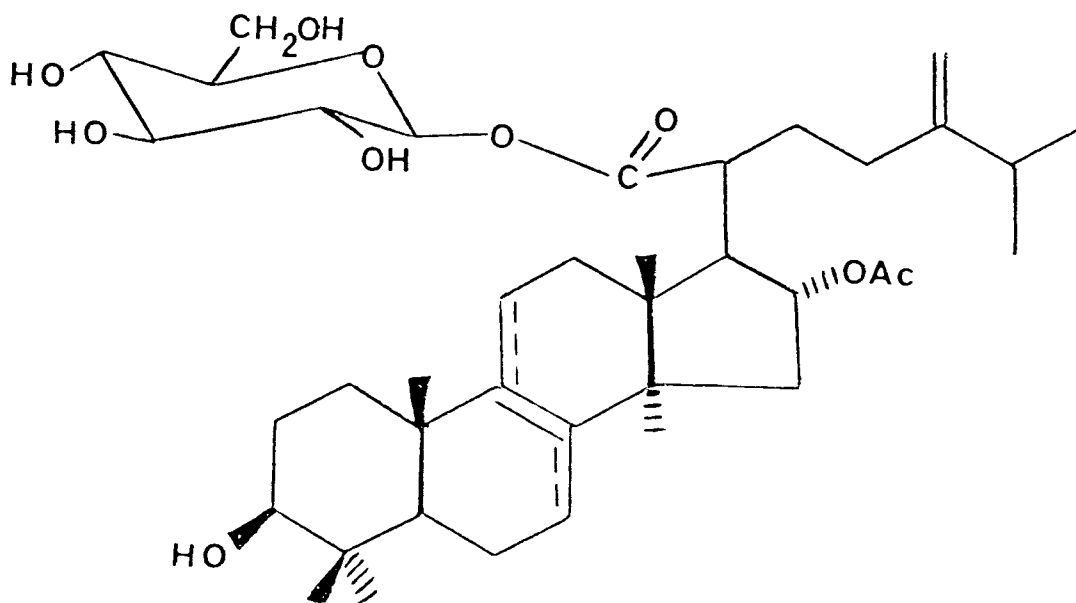
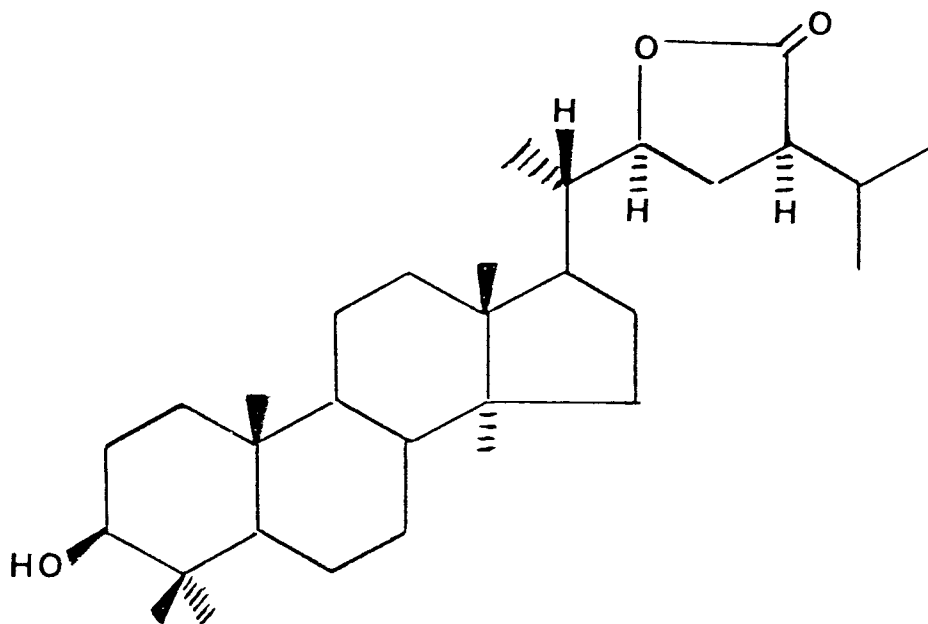
L-32 Eburical: 3β -hidroxi-24-metilen-lanosta-8-en-21-al

L-33 Eburicodiol: 24-metilen-lanosta-8-en- 3β ,21-diol



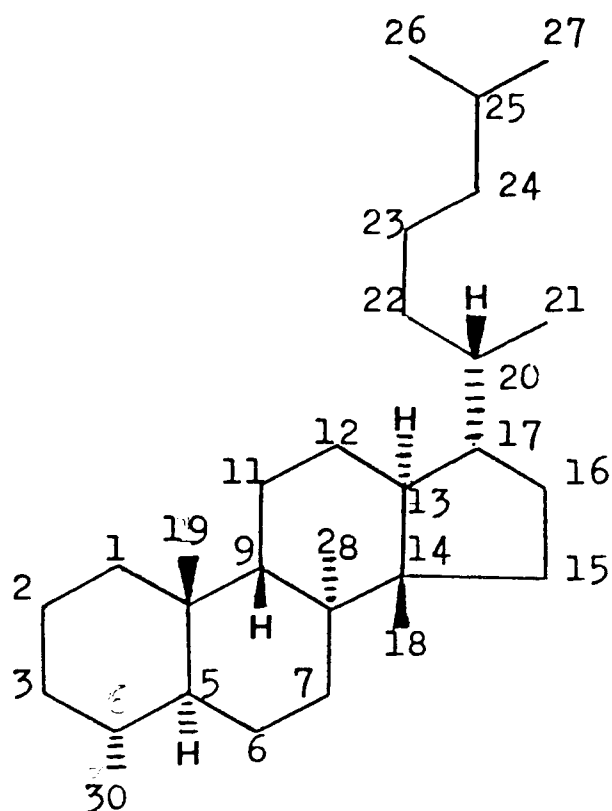
L-53 Acido tricholídico

L-55



L-58 mezcla de ácido acetil-glucosil-tumulósico y su corres-

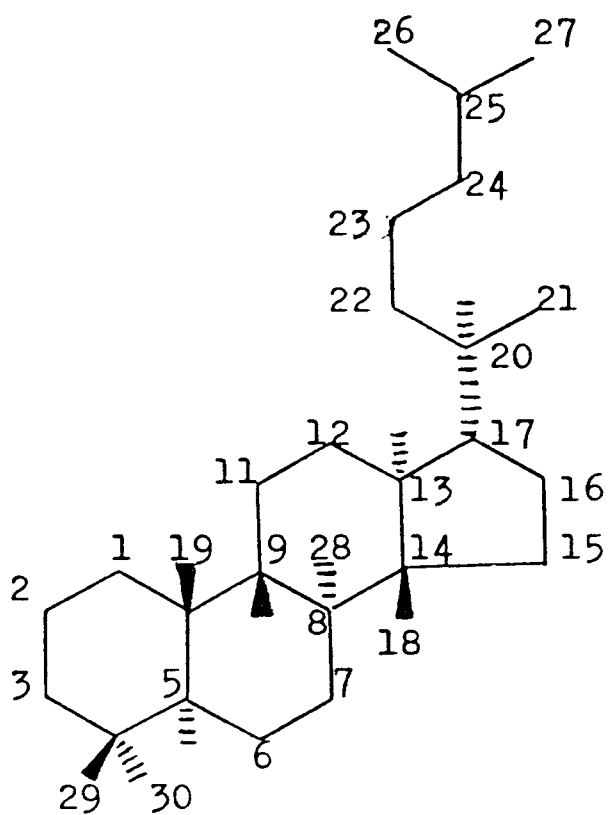
ESQUELETO DEL FUSIDANO



- F-1 ácido fusídico: ácido 16 β -acetoxi-3 α ,11 α -dihidr \acute{o} xi-fusida-17(20) [16, 21 cis] 24-dien-21-oico
- F-2 cephalosporina P₁: ácido 6 α ,16 β -diacetoxi-3 α ,7 β -dihidr \acute{o} xi-fusida-17(20) [16, 21 cis] 24-dien-21-oico
- F-3 desacetilcephalosporina P₁: ácido 16 β -acetoxi-3 α ,6 α ,7 β -trihidr \acute{o} xi-fusida-17(20) [16, 21 cis] 24-dien-21-oico
- F-4 ácido helv \acute{o} lico: ácido 3,6-dioxo-7 α ,16 β -diacetoxi-fusida-1,17(20) [16, 21 cis] 24-trien-21-oico
- F-5 ácido helvol \acute{i} nico: ácido 3,6-dioxo-16 β -acetoxi-7 α -hidr \acute{o} xi-fusida-1,17(20) [16, 21 cis] 24-trien-21-oico
- F-6 ácido 7 desacetoxihelv \acute{o} lico: ácido 3,6-dioxo-16 β -acetoxi-fusida-1,17(20) [16, 21 cis] 24-trien-21-oico

- F-7 ácido 3-oxo-16 β -acetoxi-fusida-1,17(20)(16,21 cis) 24
trien-21-oico
- F-8 ácido viridomínico A: ácido 11-oxo-6 α , 16 β -diacetoxi-
3 α ,7 β -dihidroxi-fusida-17(20)(16,21 cis) 24-dien-21oico
- F-9 ácido viridomínico B: ácido 11-oxo-6 α ,16 β -diacetoxi-3 α ,
7 β , 12 α -trihidroxi-fusida-17(20)(16,21 cis) 24-dien-21
oico
- F-10 ácido viridomínico C: ácido 6 α ,16 β -diacetoxi-3 α ,7 β ,
11 β -trihidroxi-fusida-17(20)(16,21 cis) 24-dien-21oico
- F-11 ácido 3,11-dioxo-12,15-diacetoxi-fusida-1,17(20)(16,
21 cis) 24-trien-21-oico

ESQUELETO DEL PROTOSTANO



- P-1 4β -hidroxi-metilfusida-17(20) [16, 21 cis] 24-dien- 3β -ol
 P-2 4β -metilfusida-17(20) [16, 21 cis] 24-dien- 3β -ol
 P-3 protosta-13(17), 24-dien- 3β -ol (fusisterol)

TRITERPENOS Y ESTEROIDES DE HONGOS

PHYCOMYCETES

Los Phycomycetes, constituyen la clase mas primitiva de hongos y a menudo son unicelulares. El grupo incluye parásitos de plantas (*Pythium*, *Phytophthora*), de hombres (*Absidia* *Mucor*), especies acuáticas...

Los esteroides mas frecuentemente encontrados en estas especies son el colesterol y los 24-alquilen colestanos tales como el 24-metilen colesterol (3, 5, 6).

En 1969, McCorkindale y col. (2) examinaron 22 especies de Phycomycetes, de los ordenes Saprolegniales, Leptomitales y Mucorales, de los esteroides identificados, solo el colesterol fue encontrado en los tres grupos taxonómicos, aunque solo en dos de las diez especies Mucorales. Desmosterol, 24-metil colesterol y fucosterol fueron identificados en especies de Saprolegniales y Leptomitales. El ergosterol y el 22-dihidroergosterol fueron observados en especies Mucorales.

Parece ser que algunos Phycomycetes tales como *Lagenidium giganteum*, *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum* y *P. debaryanum* no sintetizan esteroides (3,4,6).

En Saprolegniales acuáticas (*Allomyces macrogynus*, *Rhizidiomyces apophysatus*, *Rhizophylctis rosea* e *Hypochoytrium catenoides*) el colesterol se muestra tambien como esteroide

predominante (9) acompañado en algunos casos por 24-etil-22-dehidrocolesterol, 24-etilcolesterol, 22-dehidrocolesterol y 24-metilcolesterol.

El ergosterol, ergosta-5,7-dien-3 β -ol y ergost-7-en-3 β -ol se encuentran con relativa frecuencia en el orden Mucorales (223).

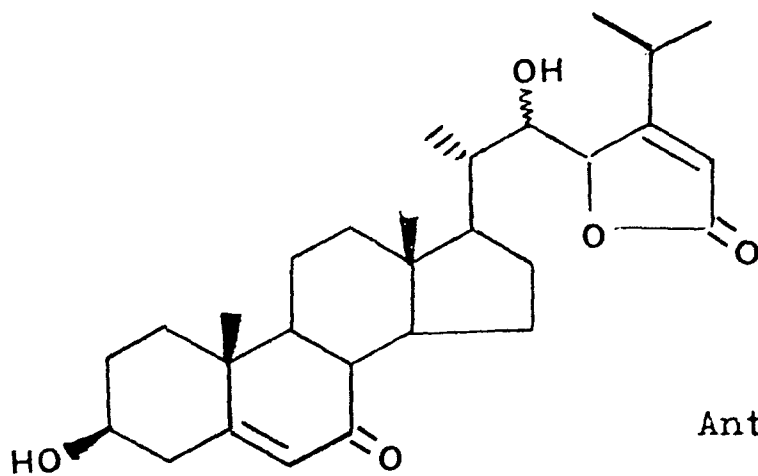
Otros resultados se muestran en la tabla I

TABLA I

Espece	Productos identificados	ref.
<i>Achlya bisexualis</i>	E-32	15,16
<i>Dictyostelium discoideum</i>	S-6	8
<i>Mucor ramannianus</i>	F-1	13,14
<i>Mortierella isabellina</i>	L-30	223
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	E (13,17) L (1,2)	10,11
<i>Physarum polycephalum</i>	S (1,7,9) E (1,24) y C-1	17
<i>Rhizopus arrhizus</i>	E (2,4,13,18)	12
<i>Zoophagus insidians</i>	E (7,13,25,28) L-1	7

Como productos interesantes se pueden citar: el antheridiol (E-32), que es una hormona sexual del moho de agua

Achlya bisexualis (15,16) y el ácido fusídico F⁻¹ que es un producto antibiótico raro en Phycomycetes.

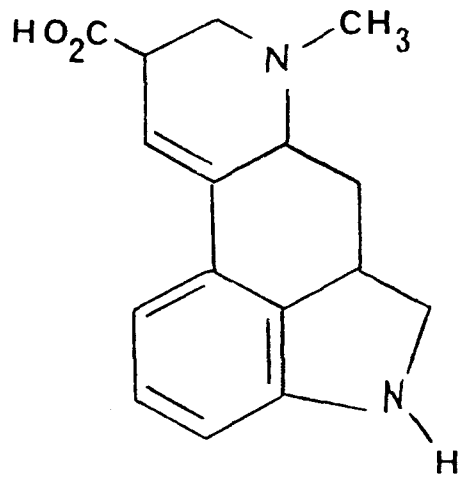


Antheridiol E-32

ASCOMYCETES
Y
FUNGI IMPERFECTI

En los Ascomycetes se incluyen, tanto levaduras unicelulares, como hongos macroscópicos tales como trufas o pezizas. Muchos de estos hongos son parásitos de plantas y algunas levaduras son responsables de enfermedades humanas.

Entre las especies nocivas (parásitas de plantas), caben destacar las Claviceps, que producen gran cantidad de ergoalcaloides (18); muchos de los cuales están relacionados con el ácido lisérgico (I).



Acido lisérgico I

Bajo el nombre de Fungi Imperfecti se agrupan una serie de hongos imperfectamente conocidos. Son hongos pluricelulares y en parte pueden considerarse como formas conidiales de los Ascomycetes. Muchos de ellos no presentan jamás órganos sexuales (224). Las especies más conocidas co-

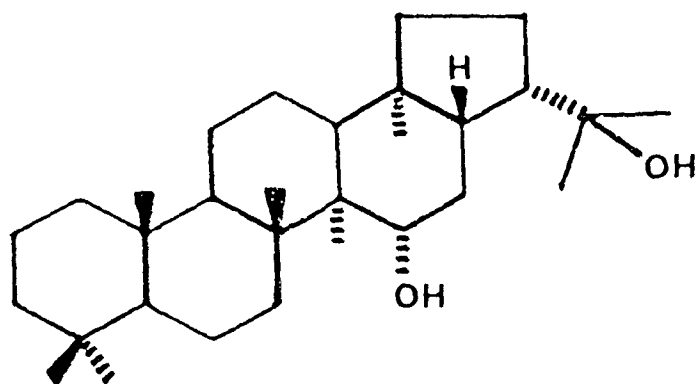
responden a los géneros *Penicillium* y *Aspergillum*, en donde se originan gran variedad de antibióticos.

Muchas especies, localizadas entre los Fungi Imperfecti, se conocen hoy en su estado perfecto e imperfecto y muchos Ascomycetes se nombran indistintamente por los nombres de ambos estados; este es el caso de *Fusarium moniliforme* -- (*Gibberella fujikuroi*) y *Helminthosporium sativum* (*Cochliobolus sativus*).

En la tabla II, se muestran los esteroides y triterpenos encontrados en Ascomycetes y Fungi Imperfecti. Los esteroides mas frecuentes corresponden al esqueleto del ergostano. El colesterol, mucho menos frecuente que en *Phycomyces*, se encuentra como único componente esteroidal en el *Penicillium funiculosum* (19).

En levaduras, el ergosterol (9) se presenta como estero^l predominante, acompañado de lanosterol (167), fecosterol, ascosterol (169,163), ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol (74,75), ergosta-7,22-dien-3 β -ol (20,46), episterol (10, 163) y zymosterol (163). El peróxido de ergosterol se encuentra también en levaduras, aunque algunos investigadores afirman que es un artefacto de los procedimientos experimentales (21).

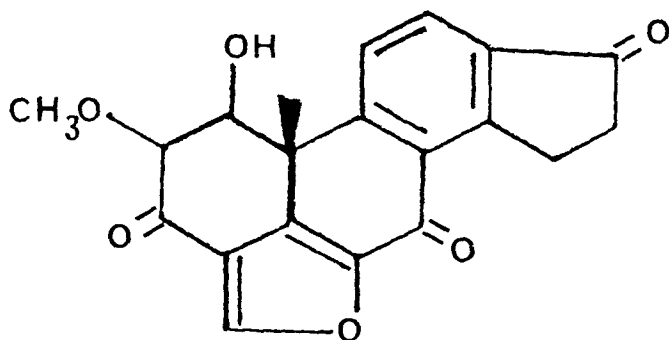
Por otra parte, mientras el lanosterol y sus 24-metil y 24-metilen derivados, se observan con cierta frecuencia en Ascomycetes, la dustarina P-7 es el único triterpeno pentacíclico encontrado en estos hongos (22).



Dustarina P-7

Los triterpenos mas característicos de estas especies, poseen los esqueletos del fusidano (F) y protostano (Pr). La cephalosporina P₁, y los ácidos fusídico (130), helvólico y -viridomínicos, pertenecen a un grupo de triterpenos antibióticos producidos por varias especies de *Fusarium*, *Cephalosporidium* y *Cladospodium*.

Otro grupo de compuestos de interés, que se biosintetizan a partir del escualeno por via esteroidal (26), lo representan la viridina II y productos relacionados. Estos se encuentran en *Penicillium* (23) y *Gliocladium virens* (24,25). La viridina II, posee un elevado poder antifúngico.



Viridina II

TABLA II

Especie	productos encontrados	ref.
Acrocyllindrium oryzae	F-4	27
Aspergillus sp.	P-7	28,29
A. phalloides	E-12	30,31
A. flavus	E (3,13,14)	21
A. fumigatus	E (14,27) L-1, F(4,11)	170 11,32,33.
A. niger	E (13,21)	34
Cephalosporium sp.	F (1,2)	35
C. acremonium	F-3	36
C. caerulens	F (4,5,6,7) Pr(1,2,3)	37,38,39 40,41.
Cladosporium sp.	F (2,8,9,10)	42,43,44 45.
Candida utilis	E-23	164.
Claviceps purpurea	E (2,4)	20,46,47.
Debaromyces hansenii	S-1	48.
Emericellopsis terricola	F-4	37.
Epidermophyton floccosum	E (6,13)	49.
Fusarium moniliforme	E(12,14,26)	50.
Fusidium coccineum	F-1 Pr-3	28,29 51,165.
Helvella crispa	E-13	52.
Microsporium audonini	F(6,13)	40

TABLA II (cont.)

Espece	productos encontrados	ref.
Neurospora crassa	E(13,19)	53,54.
Oospora astringens	L-7	55.
Penicillium chrysogenum	E-30	56.
P. funiculosum	C-1	19.
P. sclerotigenum	E-14	57.
Pullularia pullulans	S-1	166.
Saccharomyces cerevisiae	E(13,19,29,31)	58,59 53,60.
Trichophyton interdigitale	E(6,13)	49.
T. schönleini	E-14	61.
Ustilago longissima	E-19	62.
Xanthoria parietina	E-19	63.

BASIDIOMYCETES

Los Basidiomycetes son los hongos mas evolucionados. Algunos de ellos, correspondientes a los ordenes Uredinales y Ustilaginales, son los causantes de mohos y "herrumbres" muy perjudiciales para la agricultura; en estos hongos se observan con frecuencia esteroides de tipo estigmastano, que no se presentan en el resto de los Basidiomycetes.

Entre los agentes perjudiciales para la silvicultura se encuentran las Poliporaceas, fundamentalmente el *Inonotus hispidus* y el *Fomes fomentarius*. Entre las Agaricaceas la *Armillaria mellea*, se instala sobre los troncos de los árboles, segregando una sustancia tóxica que destruye incluso las células mas alejadas de su micelio. El *Merulius lacrymans*, es otro hongo peligroso, puesto que destruye rapidamente la madera seca. (1).

Otros Basidiomycetes, contienen sustancias tóxicas, -- tal es el caso de especies de *Psilocybe* (usadas por los indios sudamericanos para producir alucinaciones) y otras especies de *Inocybe*, *Clitocybe* y *Amanita*. Sin embargo, solo la *Amanita virosa*, *A. verna*, *A. phalloides*, *A. pantherina* y *Lepiota fuscovinacea* provocan envenenamientos mortales. En contraposición existen setas perfectamente asimilables como el champignon (*Agaricus campestris*) o los níscalos (*Lactarius deliciosus* y *L. sanguifluus*). Otras especies de *Boletus*, *Cantharellus*..., son tambien excelentes comestibles.

Entre los esteroides mas frecuentes (tabla III), destacan el ergosterol y el ergosta-7,22-dien-3 β -ol, no habiéndose encontrado en ningún caso esteroides del tipo del colestano.

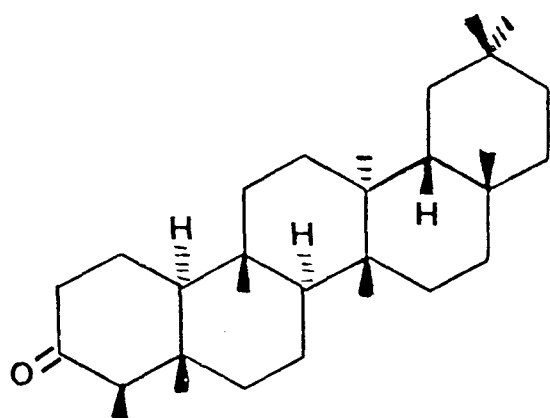
Los triterpenos mas comunes, poseen el esqueleto del lanostano y 24-metil ó 24-metilen lanostano, mientras que no se observan fusidanos ni protostanos (característicos de algunas especies de Fungi Imperfecti).

Aunque se han descrito algunos productos de degradación de esteroides y triterpenos, solo el 3 α -hidroxi-4,4,14 α -trimetil-5 α -pregnan-8-en-20-ona (L-34) ha sido identificado en *Fomes officinalis* (94).

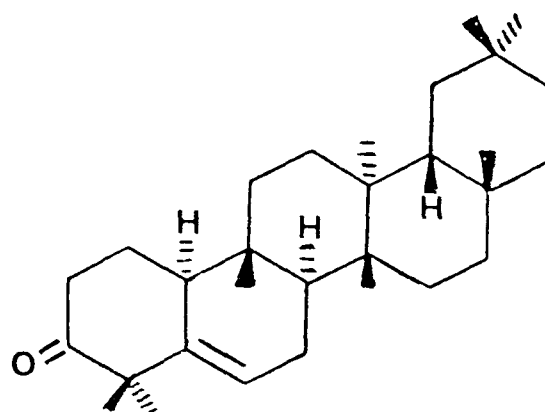
Entre los triterpenos pentacíclicos, solo siete han sido encontrados en *Ganoderma applanatum* (109), *Gloeophyllum saepiarium* (71), *Mycocalia reticulata* (171), *Phellinus pomaceus* (133) y *Phellodon ferrugineum* (137). (estos dos últimos estudiados por nosotros).

TRITERPENOS PENTACICLICOS DE BASIDIOMYCETES

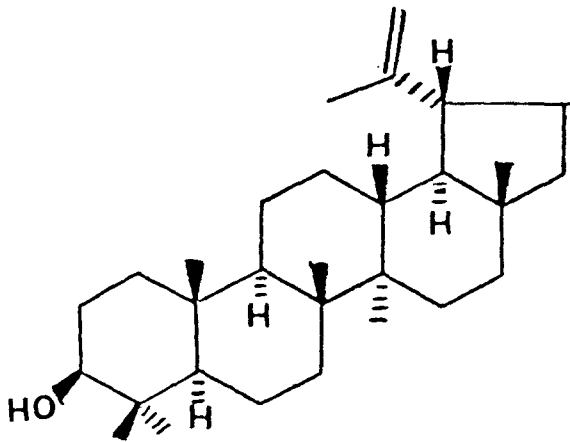
P-1 Friedelina



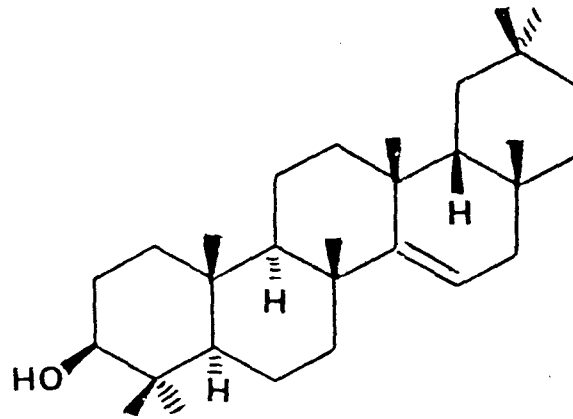
P-2 Alnusenona



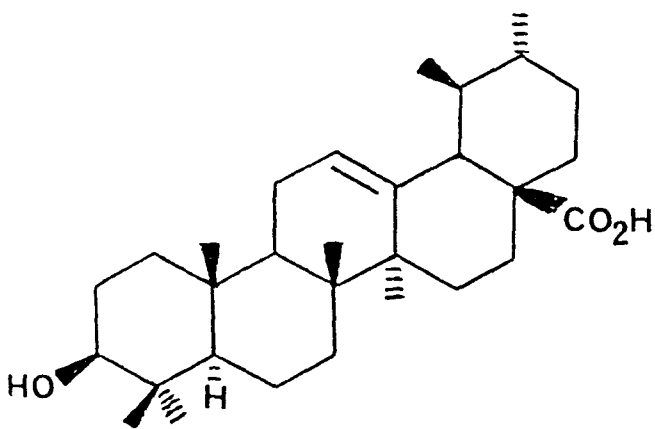
P-3 Lupeol



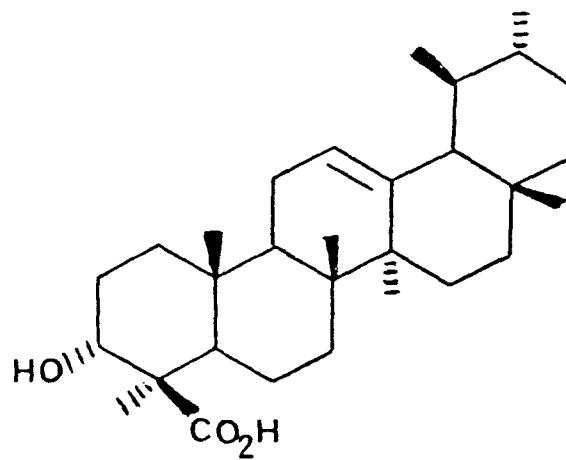
P-4 Taraxerol



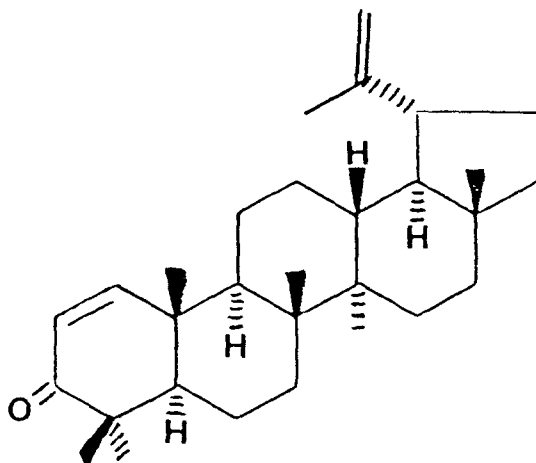
P-5 Acido ursólico



P-6 Acido β boswéllico



P-8 Glochidona



Entre los terpenoides aislados de Basidiomycetes con interés farmacológico, caben destacar algunos sesquiterpenos, muy frecuentes en Russulas y Lactarius (168) y los ácidos ganodéricos A y B y T a Z, que son ácidos triterpénicos de alta actividad citotóxica obtenidos del hongo *Ganoderma Lucidum* (111).

TABLA III

Especie	productos encontrados	ref.
Agaricus campestris	E(2,3,13)	64,65
A. arvensis	E-13	52
A. silvicola	E-13	52
Amanita caesarea	E(3,13)	52,66
A. bisporigera	E-13	52
Antrodia mollis	E(2,4)	67
Armillaria mellea	E(2,3,4,13)	68
Bjerkandera adusta	E(2,4)	67
B. fumosa	E(2,4)	67
Boletus luridus	E(2,3,4,13)	68
Clavatia giganteum Licoperdon giganteum	E-13	69
Clavariadelphus truncatus	E-13	52
Clitocybe illudens	E-13	52
Collybia maculata	E-13	70
Coprinus atramentarius	E(3,13)	66
Coriolus heteromorphus	E(3,4) y L(1,30)	71

TABLA III (cont.2)

Especie	productos encontrados	ref.
C. versicolor Polystictus versicolor	E(2,4,13)	71,73
C. pargamenus	E(2,13) y L(1,30)	71
C. sanguineus Polyporus sanguineus, P. cinnabarius, Tramates cinnabarina.	E(4,5,13) y L-3	72
C. brevis	E(2,4)	67
C. flabelliformis	E(2,4)	67
C. hirsutus	E(2,4,13)	67
C. meyenii	E-4	67
C. pubescens	E-4	67
C. subluteus	E(2,4)	67
C. unicolor	E(2,4)	67
Criptoderma citrium	E(2,4,13) y L(1,30)	71
Criptoporus volvatus	E(2,4)	67
Daedalea quercina	E(4,13,14) y L-28	74,75,76
D. dickinsii Tramates dickinsii	E(2,4) L(2,3,9,26,27,28,58)	77,78,160
D. tanakae	E(2,4) y L-3	79
Daedaleopsis confragosa	E(2,3,4,13)	67,80
D. lata	E(2,4)	67

TABLA III (cont. 3)

Especie	productos encontrados	ref.
<i>D. purpúrea</i>	E(2,4)	67
<i>D. tricolor</i>	E(3,4,13)	67,80
<i>Dentipellis echinospora</i>	E(2,4)	67
<i>Echinodontium tictorium</i>	L-12	81
<i>E. Tsugicola</i>	L(13,14,15,16,17,18,19)	82
<i>Favolus arcularius</i>	E(2,4,13)	67
<i>Flammulina velutipes</i>	E(3,4,13,19)	66
<i>Fomes fomentarius</i>	E(4,5,13,20)	83,84,85,86
<i>F. officinalis</i>	E-23	89,90,91,92
<i>Polyporus oficinalis</i>	L(5,6,7,10,25,31,32,33,34)	93,94,105
<i>F. senex</i>	L(20,21,22,23)	87,88
<i>Fomitella cytisina</i>	E(2,4)	67
<i>F. latissima</i>	E-4	67
<i>F. rhodophaea</i>	E(2,4)	67
<i>Formitopsis cytisina</i>	E(4,13) y L-30	71
<i>F. pinicola</i>		
<i>Fomes pinicola</i>	E(2,4,13)	71,73,95
<i>Polyporus pinicola</i>	L(1,3,7,30,35,36,37,63)	96,97,98,99
<i>Fuscoporia obliquus</i>		
<i>Inonotus obliquus</i>	L(1,38)	100,101
<i>Poria obliqua</i>		102,104

TABLA III(cont.4)

Especie	productos encontrados	ref.
<i>Ganoderma australe</i>	E(2,4,5,14,16,23)	103
<i>G. applanatum</i> <i>Fomes applanatum</i>	E(1,4,5,11,13,23) P(1,2)	106,107 108,109,110
<i>G. lucidum</i>	L(39,40,41,42,43,44,45,46)	111
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	E-4 y L(7,47)	79
<i>G. saepiarium</i>	E(2,4,13); L(7,47) y P-3	71,79
<i>G. striatum</i>	E(2,4) y L(7,47)	79
<i>Gloeoporus amorphus</i>	E-4	67
<i>Grifola frondosa</i>	E(2,13) y L(1,30)	71
<i>G. umbellata</i>	E-13	67
<i>Hirschioporus abietinus</i> <i>Polyporus abietinus</i>	E-13	112
<i>H. durus</i>	E-4	67
<i>H. fuscoviolaceus</i>	E(2,4)	67
<i>Hygrocibe punicea</i>	E(3,13)	66
<i>Inonotus hispidus</i>	L-7	113
<i>Ishnoderma resinosum</i> <i>Polyporus benzoinus</i>	E(2,4) y L-3	67,114 138,139
<i>Lampteromyces japonicus</i>	E(3,13,14,23)	66,115

TABLA III (cont.5)

Espezie	productos encontrados	ref.
Lactarius scrobiculatus	E-12	116
Lentinus edodes	E(3,13)	66,162
L. dactyloides	L(5,7)	120,113,121
L. lepideus	E(4,13) y L(7,10,47)	79,95,122
Lenzites betulina	E(2,4)	67
L. trabea Daedalea trabea Gloeophyllum trabea	E(2,4,13) L(7,10,30,47,48)	117,118,119
Leucopaxillus giganteus	C-5 y E(3,13)	66
Melampsora lini (moho)	S(2,3,4)	123
Melanoporia cajanderi	E-4	67
M. juniperina	E(2,4) y L-3	79
M. nigra	E(2,4)	67
M. purpuraceae	E(2,4)	67
M. rosea	L(3,9,28)	79
Microporus flabelliformis	E(3,13) y L(1,30)	71
Naematoloma fasciculare	E(12,13,14) y L(49,50,51,52)	124,125,126
N. sublateritium	E(12,13,14) y L(49,50,51,52)	124
Mycocalia reticulata	S-7 P-8	171

TABLA III (cont.6)

Especie	productos encontrados	ref.
Oxyporus populinus	E(2,4)	67
Perenniporia ochroleuca	E(2,4)	67
P. tephlopora	E(2,4)	67
Phaeolus. schweinitzii	E(2,4)	67
Phellinus hartigii Fomes hartigii	E-4 y L-47	67,99
P. igniarius	E(2,4)	67
P. linteus Fomes rimosus	E(2,4,13)	131
P. gilvus	E(4,13) y L(37,47)	132
P. pachyphloeum	E-4	67
P. pomaceus	E(4,5) y P(1,4,5,6)	133
P. robustus	E(2,4)	67
Phellodon ferrugineum Hidnum ferrugineum	P-1	137
Pholiota aegerita	E(2,3,4,13)	68
Pisolithus tinctorius	L-55	127
Piptoporus betulinus	E(2,3,4,13) L(2,3,9,24,56)	71,112 128,129
P. yucateensis	E-4	161

TABLA III (cont. 7)

Espece	productos encontrados	ref.
<i>Polyporus anthracophilus</i>	L(7,8)	176,120,121
<i>P. australiensis</i>	L(2,9)	113
<i>P. betulinus</i>	L(2,3,9,24)	,138,139, 113,140.
<i>P. eucalyptorum</i>	L-7	120,121
<i>P. hispidus</i>	L(7,5)	113
<i>P. sulphureus</i> <i>Laetiporus sulfureus</i>	E-4 y L(7,10,30,47)	120,122 134,135
<i>P. tumulosus</i>	L(2,9)	113
<i>Poria cocos</i>	E(2,13) y L(2,3,7,9,11,57)	113,141,142, 143,144,145,148.
<i>P. nigrescens</i>	E(2,4)	67
<i>P. subacida</i>	E(2,4,13)	67,112
<i>Porodaedalea abietis</i>	E-4	67
<i>P. pini</i> <i>Criptoderma pini</i> <i>Fomes pini</i>	E(4,13) y L(1,56)	67,86
<i>P. sanfordii</i>	E(2,4)	67
<i>Puccinia graminis</i>	E-2	146.
<i>Russula foetens</i>	E(3,13)	66
<i>R. nigricans</i>	E(3,13)	66
<i>R. senecis</i>	E(2,13)	66
<i>R. sardonias</i>	E-12	147

TABLA III (cont.8)

Espece	productos encontrados	ref.
Scleroderma aurantium	E(13,14,16)	150,151 152,153
S. polyrhizum	E(14,23)	149
Stereum hirsutum	E-4	67
S. lasciatum	E(4,13)	67
Spongiporus appendiculatus	E(2,4) y L(7,9)	79
Trametes gibbosa	E(2,4)	67
T. feei	L-4	156
T. odorata	E(2,4,13)	172,173,174
Gloeophyllum odorata	L(47,60,61,62,37)	175,154,155
T. orientalis	E(2,4,13)	67,84.
T. palisoti	E(2,4)	67
T. suaveolens	E-4	67
Tricholoma sp.	L-53	157
T. rudum	E-13	158
Tyromyces albidus	L-54	159
Veluticeps angularis	L-47	79

E=ergostano, L=lanostano, S= stigmastano, C=colestano.

CAPITULO I

ESTUDIO DEL HONGO GANODERMA AUSTRALE

Del extracto del hongo y tal como se muestra en la parte experimental, se aislaron seis esteroides y seis ácidos grasos, cuya identificación se describe a continuación.

SUSTANCIA G-1

Se presenta como un aceite homogéneo (2,5 gr), $n_D^{20}=1,459$
P.eb=190-192°C a 6 mm Hg.

Su espectro IR (gráfica I) muestra señales a 1720 y a 700 cm^{-1} asignadas a un éster etílico y a una cadena larga.

En su espectro de RMN aparecen: un triplete centrado en 5,3 δ , correspondiente a cuatro protones vinílicos, un cuádruplete en 4,06 δ que integra para dos protones y se asigna al CH_2 de un éster etílico y un triplete en 2,71 δ debido a los protones en α a dicho éster.

Tanto los datos espectroscópicos como las constantes físicas de nuestro producto fueron coincidentes con los del linoleato de etilo (figura I).



Figura I

SUSTANCIA G-2

Se obtuvo como un sólido (45 mgr) que cristalizado de metanol dio un p.f.= 178°C, $(\alpha)_D^{20} = +9^\circ$ (CHCl₃, c = 2,44).

Su espectro de masas (gráfica II) da un peso molecular de 396,3400 que corresponde a la fórmula empírica -- C₂₈H₄₄O, el espectro presenta además las rupturas típicas de la cadena del ergosterol (ver apéndice).

El producto forma un precipitado naranja cristalino de p.f.= 85°C al tratarlo con 2,4 dinitro fenil hidracina; la presencia de una cetona saturada se confirma por una señal a 1700 cm⁻¹ en su espectro de IR.

En el espectro de RMN se observa un multiplete centrado en 5,2 δ correspondiente a tres protones vinílicos.

Hidrogenación con Pt-Adams en eter (177) condujo a -- una mezcla de tres productos esteroidales, que fueron identificados por sus datos espectroscópicos como: ergost-7-en-3-ona, ergosta-7,22-dien-3-ol y ergost-7-en-3-ol.

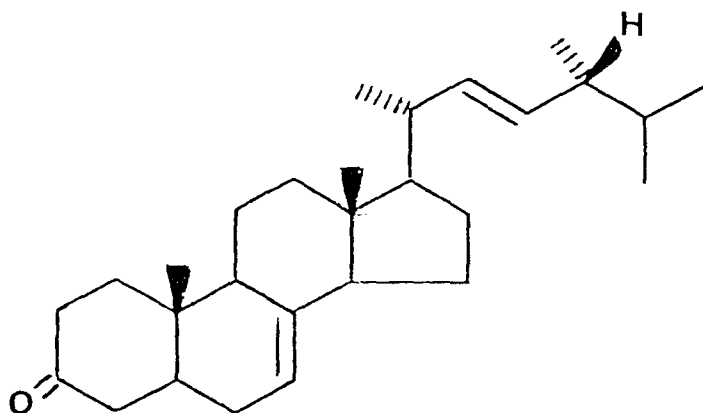


Figura II

El producto G-2 fue identificado a partir de sus propiedades físicas, químicas y espectroscópicas (110) como ergosta-7,22-dien-3-ona (figura II) [lit (109): p.f.= 174° (α)_D = +5].

SUSTANCIA G-3

Fue obtenida como un aceite amarillento, que cristalizó de metanol en forma de placas amarillas (200 mgr) de -- p.f.= 112-114°C.

El espectro de masas (gráfica III) muestra un peso molecular de 392,3074 que corresponde a la fórmula empírica $C_{28}H_{40}O$.

En su espectro UV se observa una absorción a $\lambda_{\text{máx}} = 350$ nm. con $\log \epsilon = 4,18$ (etanol).

En el espectro IR aparece una señal a 1640cm^{-1} correspondiente a una cetona poliinsaturada.

Su espectro de RMN presenta un multiplete en 5,2 δ característico de un doble enlace en posición 22 sobre la cadena del ergosterol, un singlete en 5,64 δ asignado a un hidrógeno vinílico en α a una cetona y un sistema AB cen-

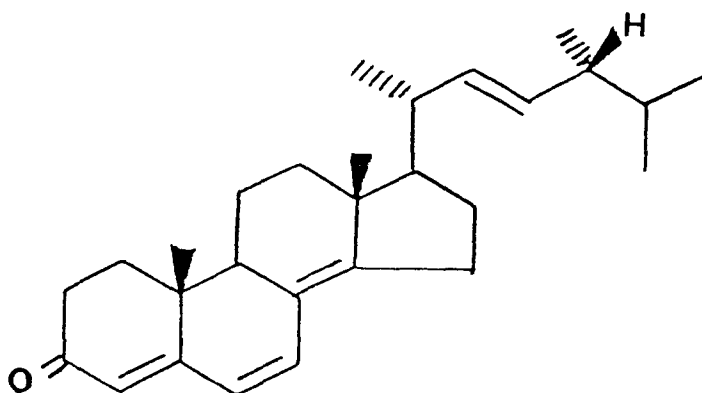


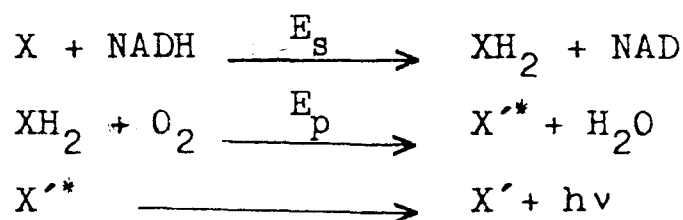
Figura III

trado en 6,25 δ y de $J= 10$ Hz correspondiente a dos protones vinílicos de un sistema cis-alquénico.

Los datos de nuestro producto coinciden con los dados (178, 108) para la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (figura III) [lit(108): p.f.= 113-114°C].

Este producto fluorescente ha sido relacionado con la bioluminiscencia de hongos (108) y bacterias (182).

La emisión de luz producida por algunos extractos de hongos fue observada por primera vez por Airth y McElroy - (189). Estudios posteriores (190) mostraron que la luz es emitida a través de las siguientes etapas:



Donde: E_s = enzima soluble, E_p = enzima particular, X = aceptor de electrones, XH_2 = luciferina, X^{*} = estado excitado de oxiluciferina y X' = oxiluciferina.

Aunque se han realizado numerosas investigaciones sobre las transformaciones biológicas y los sistemas enzimáticos involucrados en las etapas anteriores (193), se desconoce aún la naturaleza de la luciferina fúngica.

La razón por la cual se relaciona la ergosta-4,6,8(14) 22-tetraen-3-ona con esta bioluminiscencia, se basa en el hecho de que la emisión de luz por parte de extractos[†] de

[†] *Armillaria mellea*, *Collybia velutipes*, *Mycena citricolor* y *Lampteromyces japonicus*.

hongos(182,192), está centrada en 528 nm y es idéntica a la emisión fluorescente de la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.

Es interesante que este producto, se encuentre también en hongos no luminosos como *Ganoderma applanatum* (108) y *G. australe*.

SUSTANCIA G-4

Se muestra como un aceite viscoso (300 mgr).

Su espectro de IR presenta bandas a 3500-2300 y 1700 cm^{-1} (ácido) y señales intensas en 735 y 725 cm^{-1} (cadena larga).

Su espectro de RMN es característico de ácidos grasos saturados (gráfica IV).

Por tratamiento de G-4 con diazometano en eter se obtuvo un aceite, homogéneo por capa fina, que demostró ser, -- por análisis de GLC, una mezcla de cinco productos.

El espectro de RMN de esta mezcla (gráfica V) es característico de ésteres metílicos de ácidos grasos saturados.

La identificación de estos cinco productos, se llevó a cabo por inyección mixta en GLC de la muestra metilada con ésteres metílicos de ácidos grasos conocidos.

Se efectuaron dos inyecciones mixtas (gráfica V), una con estearato de metilo y otra con tricosanoato de metilo, la representación gráfica del número de átomos de carbono frente al logaritmo de los tiempos de retención, indicó por

extrapolación, que la mezcla estaba compuesta por: docosa
noato de metilo (9,7 %), tricosanoato de metilo (24 %), -
tetracosanoato de metilo (53 %), pentacosanoato de metilo
(6,8 %) y hexacosanoato de metilo (5,5 %).

La etilación del material ácido con etanol y ácido -
sulfúrico según el método Fischer, rindió la correspon- -
diente mezcla de ésteres etílicos (gráfica VI). Inyección
de esta mezcla en GLC con una muestra auténtica de palmi-
tato de etilo ($C_{18}H_{36}O_2$), confirmó la conclusión anterior
(gráfica VI).

El espectro de masas del material ácido (gráfica IV)
concuerta tambien con estos resultados: m/z (%): 396,3975
(9,6 , $C_{26}H_{52}O_2$); 382,3831 (10,6 , $C_{25}H_{50}O_2$); 368,3655 - -
(37,4 , $C_{24}H_{48}O_2$); 354,3516 (13,6 , $C_{23}H_{46}O_2$); 340,3422 -
(4,7 , $C_{22}H_{44}O_2$).

SUSTANCIA G-5

El producto (180 mgrs), homogéneo en capa fina, se muestra como una mezcla de dos por análisis de GLC. Esta mezcla cristalizó de metanol dando un p.f. = 168-170°C, $(\alpha)_D^{20} = -21^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1.78$). Da positiva la reacción de Liebermann-Burchard para esteroides.

En su espectro de masas (gráfica VII) aparecen señales a 400,3700 (15.6%, $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$) y a 398,3572 (41.4%, $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$) observándose también la pérdida de agua, metilo y las rupturas típicas de la cadena del ergosterol, tanto para el compuesto $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$ como para el correspondiente dehidroderivado $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$.

El espectro de IR presenta una banda a 3602 cm^{-1} debida a grupos hidroxilos.

En el espectro de RMN se observa un multiplete centrado en 5,2 δ correspondiente a protones vinílicos y una señal difusa en torno a 3,7 δ del protón geminal al hidroxilo.

Por acetilación con anhídrido acético y piridina se obtuvo una mezcla de acetatos de p.f. = 177-180°C y $(\alpha)_D^{20} = -19^\circ$ (CHCl_3 , $c = 2.95$); cuyos espectros de masas y de RMN (gráfica VIII) son coincidentes con los de un monoacetato.

Analizada la mezcla de acetatos en GLC, se observan dos picos cuyas áreas nos delatan una relación cuantitativa 84,0 y 15,96 %.

Por hidrogenación de la mezcla de esteroides (100 mgr) con Pt-Adams (177) se obtuvo un compuesto puro (42 mgr) de p.f. = 145-146°C, que fue identificado como ergost-7-en-3β-ol (esquema I). Tratamiento de este alcohol con anhídrido acético en piridina rindió el correspondiente acetato (gráfica IX).

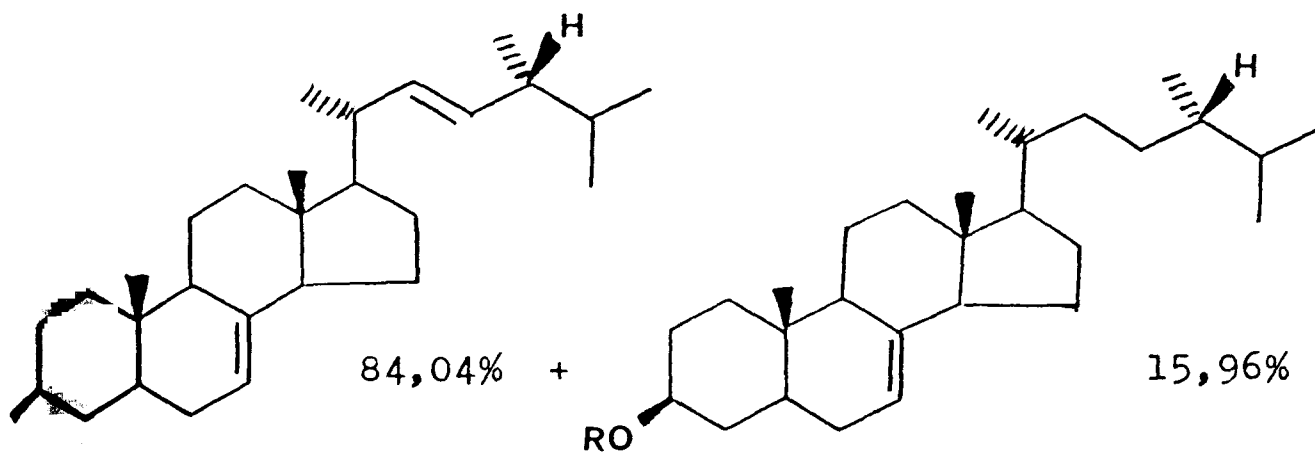
La inyección mixta en GLC del ergost-7-en-3β-acetoxi y del acetato del material natural, mostró que el producto minoritario de la mezcla G-5 era el ergost-7-en-3β-ol (15,96 %), identificándose el producto mayoritario como el ergosta-7,22-dien-3β-ol. (84,04 %).

La mezcla de acetatos (50 mgr) fue asimismo hidrogenada con Pd-C al 10%, dando un producto (15 mgr), homogéneo en GLC, que cristalizado en metanol dió un p.f. = 105-108°C, $(\alpha)_D^{20} = \pm 0$ (CHCl₃, c = 1,89).

Su espectro de masas (gráfica X) da un pico molecular a 442 (C₃₀H₅₀O₂) y en su espectro de RMN no se observan protones vinílicos, apareciendo el protón geminal al acetato en 4,72 δ y el acetato en 2,02 δ.

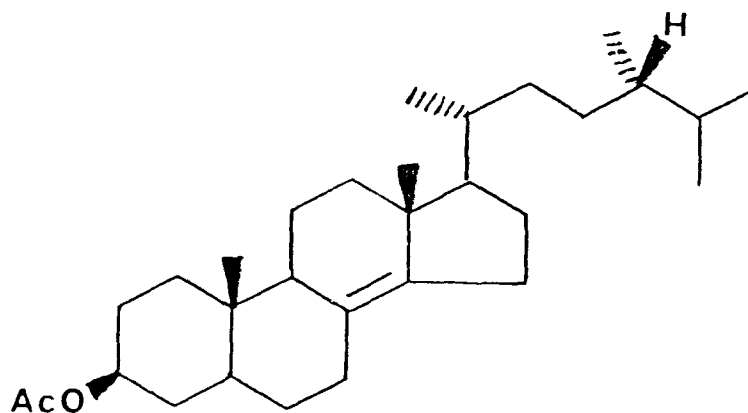
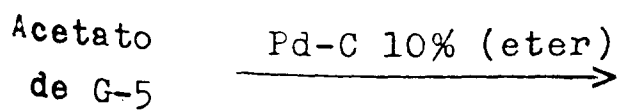
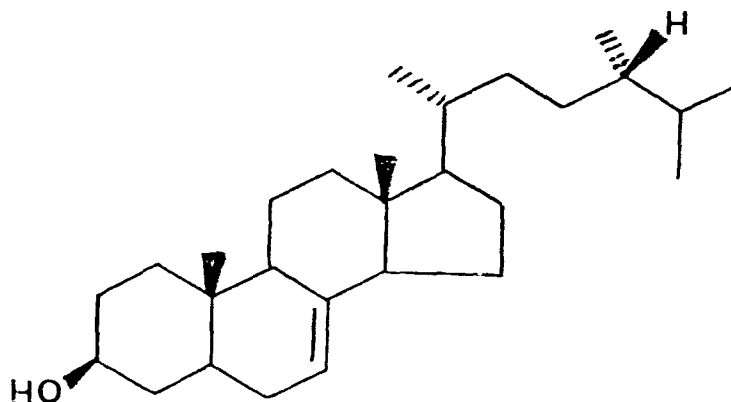
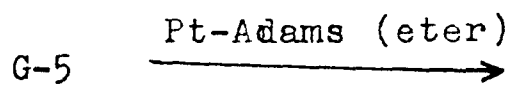
Este producto fue identificado en base a sus datos físicos y espectroscópicos como el ergost-8(14)-en-3β-acetoxi, mostrándose que en la hidrogenación se ha isomerizado el doble enlace endocíclico a la posición cuaternaria (esquema I).

Esquema I



R=H: G-5

R:Ac: Acetato de G-5



SUSTANCIA G-6

El producto (0,8 gr), homogéneo por capa fina, posee un p.f. = 172-176°C cristalizado de metanol, con $(\alpha)_D^{20} = -12,5$ (CHCl_3 , $c = 1,24$).

Su espectro de masas (gráfica XI) muestra un pico molecular a 428,3276 (4,8 %, $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$), acompañado de otra señal a 426,3091 (1,2 %, $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_3$). En este espectro se observan además las rupturas típicas de la cadena del ergosterol, la pérdida de oxígeno y agua, tanto para el compuesto $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ como para el correspondiente dehidrogenado $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_3$.

En el espectro de IR aparece una señal ancha entre 3600 y 3100 cm^{-1} correspondiente a grupos hidroxilo y otra en 965 cm^{-1} que junto con la pérdida de oxígeno en su espectro de masas, confirma la existencia de un puente peróxido.

El espectro de RMN muestra un multiplete en 5,2 δ característico de un doble enlace en posición 22 sobre la cadena lateral del ergosterol y dos sistemas AB, superpuestos y centrados en 6,41 y 6,48 δ respectivamente con $J = 8,7$ para ambos.

El tratamiento de G-6 con anhídrido acético en piridina, dió una mezcla de acetatos de p.f. = 192-195°C, $(\alpha)_D^{20} = -3^\circ$ (CHCl_3 , $c = 3,78$) (gráfica XII).

Consultada la bibliografía, identificamos G-6 como una mezcla del peróxido del ergosterol y su 9(11) dehidroderivado (181) (figura IV).

Esta mezcla no pudo ser estudiada por GLC, ya que se descompone en las columnas usuales (180,187).

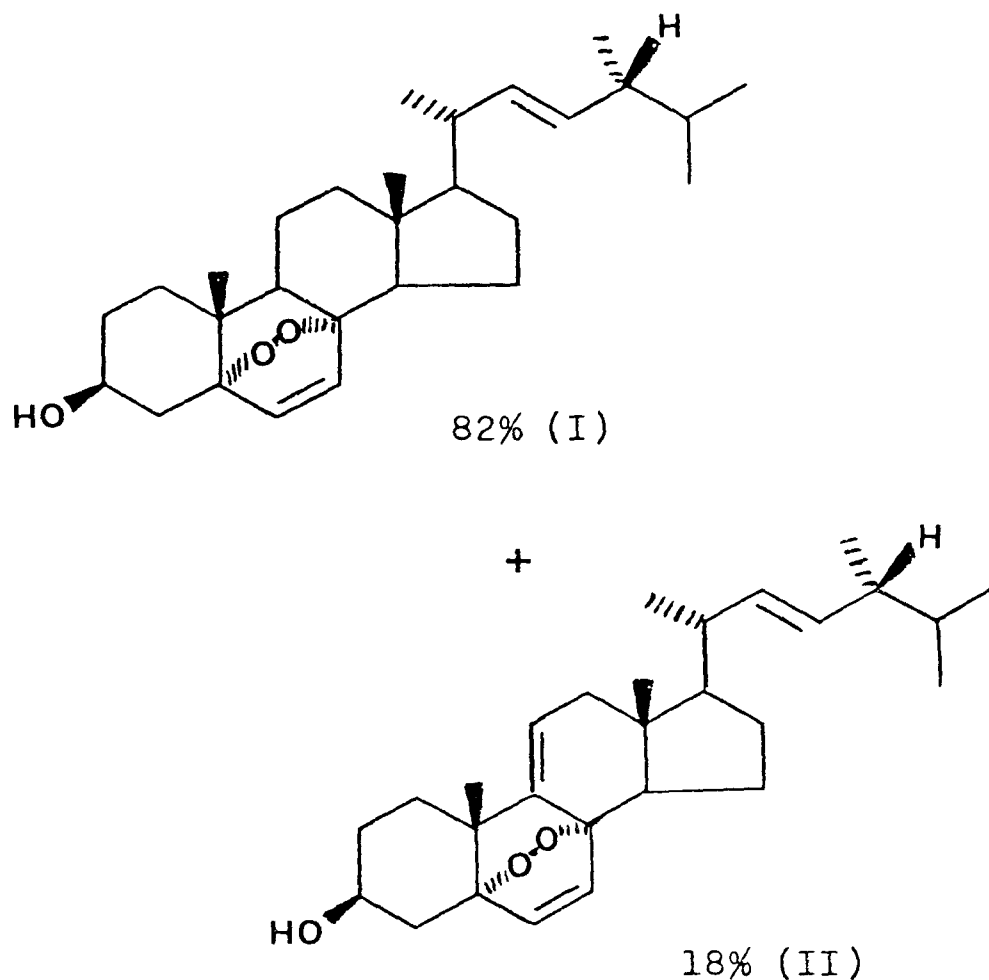
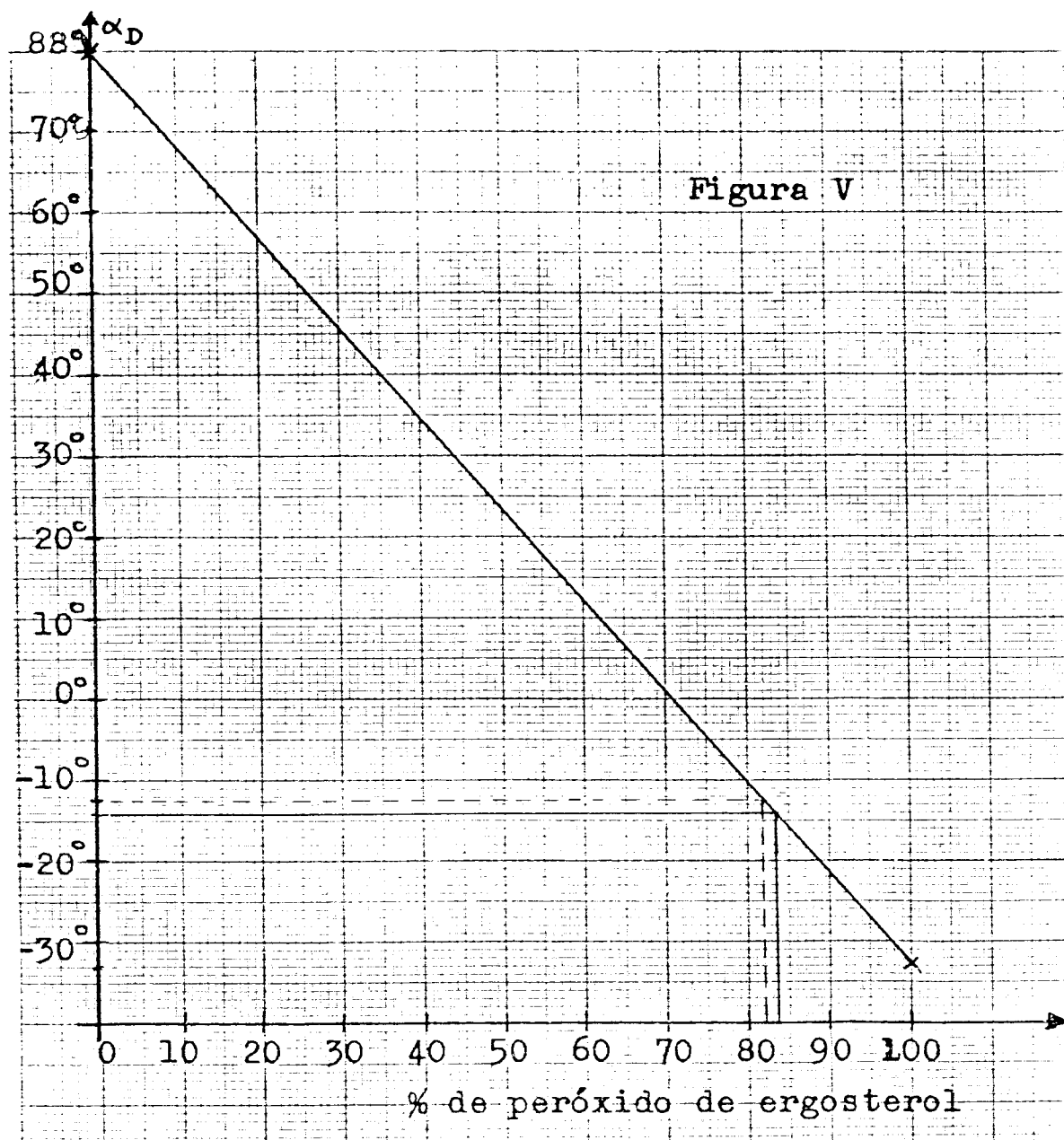


Figura IV

La relación cuantitativa de estos productos se obtuvo por integración de los protones vinílicos del sistema AB - en el espectro de RMN (90 MHz), resultando que G-6 es una mezcla 82:18 de peróxido de ergosterol(I) y de su 9(11)dehidroderivado(II).

Esta relación cuantitativa fue confirmada por el méto-

do de las rotaciones ópticas; según él, construimos una gráfica (figura V) donde representamos en ordenadas los valores de rotación óptica de la mezcla (I+II) y en abscisas el porcentaje de peróxido de ergosterol (I) en dicha mezcla.



Trasladando a esta gráfica los datos de rotación óptica aportados por Barton y col. (181) (tabla IV) se observa que existe una relación lineal entre el aumento del valor de α_D y la disminución del porcentaje de peróxido de ergosterol.

Tabla IV

Producto	peróxido de ergosterol (I)	mezcla 84:16 (I+II)	9(11)dehidroergosterolperóxido (II)
α_D	-32,9	-14,2	+80

En este caso la ecuación de la recta viene dada por:

$$x = 70 - y \operatorname{tg} \beta$$

donde: $\beta = 42,5^\circ$, $x = \%$ de peróxido de ergosterol, $y = [\alpha_D]$

Sustituyendo en esta ecuación el valor obtenido para la rotación óptica de nuestro producto $y = -12,5$, obtenemos un porcentaje del 81,5 % de peróxido de ergosterol en la mezcla. Como se observa en la figura V la lectura directa sobre la gráfica conduce al mismo resultado.

SINTESIS PARCIALES

Todos los esteroides encontrados en el hongo *Ganoderma australe*, fueron sintetizados según se muestra en los esquemas II, III y IV.

El material de partida para todas las transformaciones fue ergosterol comercial (gráfica XIV).

Síntesis de la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (esquema II)

Esta fue obtenida mediante la oxidación de Oppenauer del ergosterol (178).

El tratamiento de ergosterol con terbutóxido de aluminio y p-benzoquinona en tolueno a reflujo, condujo a una mezcla de dos productos:

a) Producto de p.f. = 113°C, cuyo espectro de RMN (gráfica XV) es superponible con el de la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (XI). La inyección mixta en GLC de los materiales natural y sintético condujo a una única señal.

b) Producto blanco cristalino, cuyo espectro de masas muestra un ión molecular a 394 ($C_{28}H_{42}O$) (gráfica XVI). En su espectro de RMN aparece un multiplete en 5,2 δ , con integral correspondiente a tres protones e idéntico al presentado por los $\Delta^{7,22}$ esteroides y otra señal en 5,8 δ que integra para un protón y la asignamos a un hidrógeno vinílico en α a una ceto

na. El producto fue identificado como ergosta-4,7,22-trien-3-ona (XII).

Formación del ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -acetoxi (esquema II).

Se obtuvo por adición de una disolución de acetato de mercurio II en ácido acético glacial a otra disolución de acetato de ergosterol en dioxano absoluto hirviendo (183,184)

Una vez separados los cristales de acetato de mercurio I se obtuvo un único producto de p.f.=142-144°C, $(\alpha)_D^{20} = +190^\circ$ (CHCl₃, c = 0,56). Su espectro UV (gráfica XVII) muestra una absorción a $\lambda_{\text{máx}} = 325$ nm.

Este producto se identificó como el ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -acetoxi (XIII).

Fotooxigenación del ergosterol y del acetato de 9(11) dehidro ergosterol.

La fotooxigenación se realizó independientemente sobre ambos productos, usando eosina como fotosensibilizador y según el procedimiento siguiente:

El producto disuelto en etanol, se irradió durante dos horas con lámparas de luz de día (2 x 100 W) bajo corriente de oxígeno (185,186).

a) La fotooxigenación del ergosterol condujo a un único producto de p.f.= 180°C, $(\alpha)_D^{20} = -30^\circ$ (CHCl₃, c = 0,98).

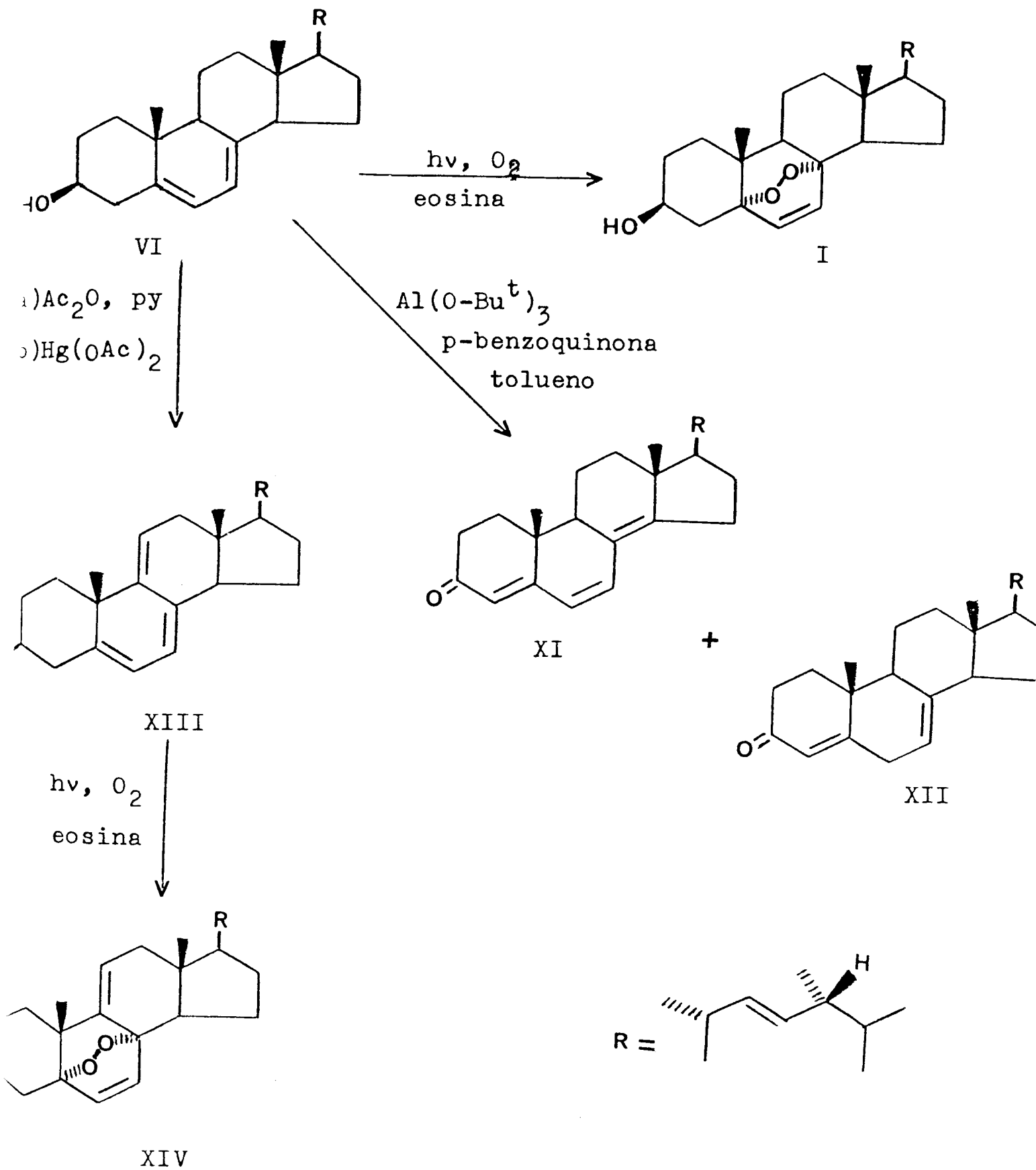
El espectro de RMN de este producto muestra: una señal difusa en torno a 4 δ asignable a un protón geminal a un grupo hidroxilo, un multiplete en 5,2 δ para los protones vinílicos del doble enlace en posición 22 y un sistema AB centrado en 6,41 δ característico de los protones vinílicos del anillo B del peróxido del ergosterol (gráfica XVIII). Su espectro de IR es también concordante con esta estructura, por lo que el producto fue identificado como peróxido de ergosterol (I).

La acetilación de este producto, condujo al correspondiente acetato de p.f.= 200- 202°C, cuyos espectros se muestran en la gráfica XIX.

b) La fotooxigenación del acetato de 9(11) dehidroergosterol (XIII), condujo al correspondiente peróxido (XIV)

Su espectro de masas (gráfica XX) da un pico molecular a 468 y las correspondientes pérdidas de oxígeno, metilo y acético. En su espectro de RMN se observa el sistema AB correspondiente a los protones vinílicos del anillo B, centrado en 6,48 δ .

Esquema II



REDUCCION DE ENDOPEROXIDOS

A- Reducción con Zn-NaOH (esquema III)

El peróxido del ergosterol fue sometido a reacción con cinc en álcali etanólico (183-184). Esta reducción moderada condujo a la fisión del puente peroxídico, pero no llegó a producir la hidrogenolisis de los alcoholes alílicos.

Se obtuvo un único producto que fue identificado como ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (III) en base a su espectro de masas. En este espectro (gráfica XXI) se observan: el pico molecular a 430 y pérdidas de una, dos y tres moléculas de agua. La posición de los grupos hidroxilo, queda claramente confirmada por la facilidad de ciertas rupturas en su espectro de masas (ver apéndice), mientras que la estereoquí mica se da en base al producto de partida.

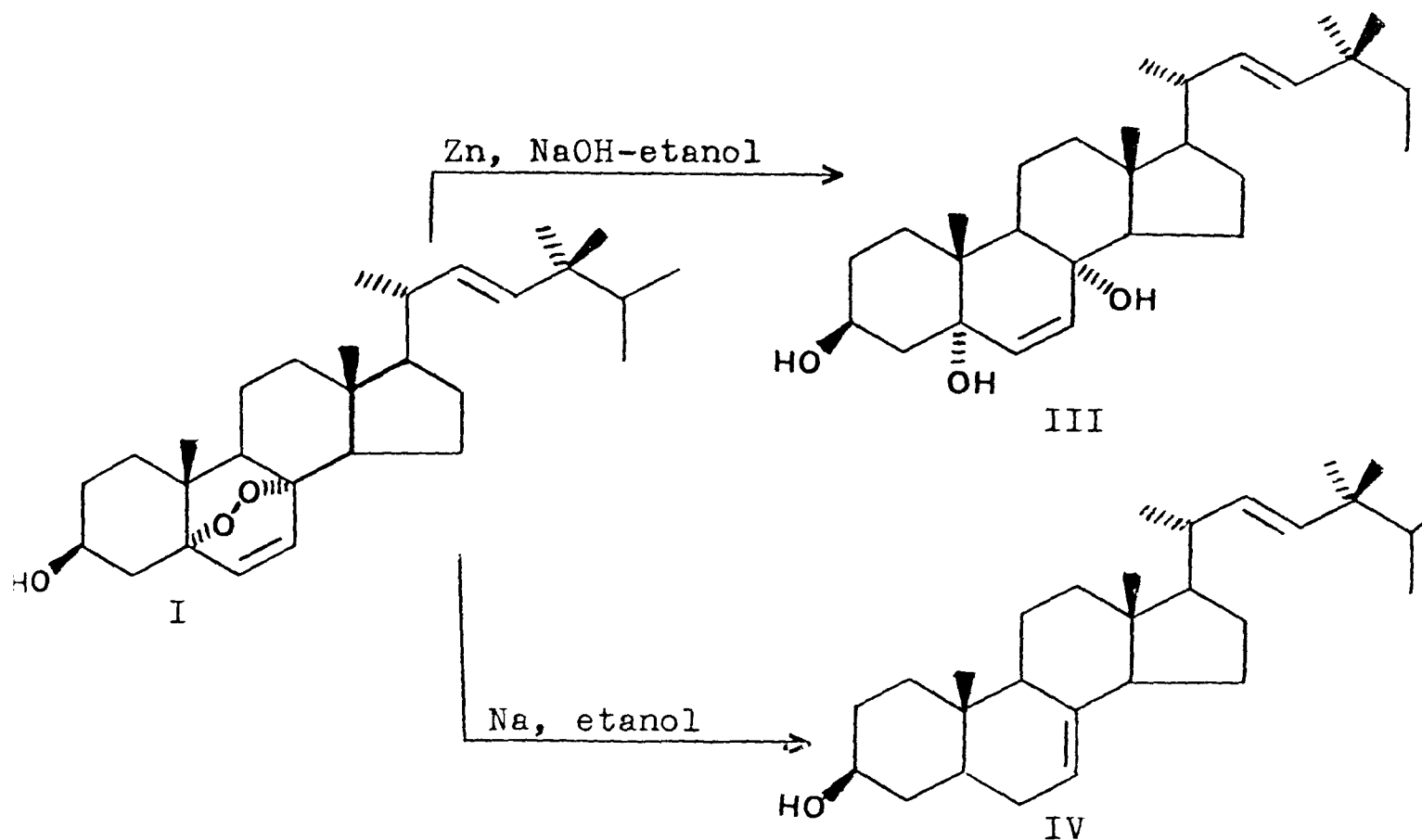
B- Reducción con sodio en etanol (esquema III)

En esta reducción con sodio etanólico, el puente peroxi dico es eliminado, al tiempo que se origina una migración -- del doble enlace de la posición 6 a la posición 7 (185).

El único producto de la reacción se identificó como er-gosta-7,22-dien-3 β -ol (IV) por comparación con una muestra - auténtica.

Este mismo producto, ha sido obtenido por hidrogenación selectiva del ergosterol, lo cual muestra que el doble enla- ce C₅-C₆ es más reactivo que los restantes dobles enlaces de la molécula.

Esquema III

C- Reducción de Birch (esquema IV)

La reducción con litio en amoníaco líquido no había sido aplicada hasta el momento en la reducción de endoperoxidos.

Con objeto de establecer el mecanismo de esta reducción, se realizaron cinco experiencias sobre diferentes sustratos (estas se resumen en la tabla V).

El procedimiento seguido para todas ellas fue el mismo: el esteroide (o mezcla de esteroides) disuelto en tetrahidrofurano seco y t-butanol, fue agitado durante dos horas en la disolución azul de litio en amoníaco líquido.

1- Reducción de la mezcla natural 82:18 de peróxido de ergosterol (I) y su 9(11) dehidroderivado (II) obtenida del hongo Ganoderma australe.

Se obtuvieron dos productos:

a) El producto mayoritario (80%) fue identificado a partir de sus espectros de masas, RMN e IR (gráfica XXII) como el ergosta-7,22-dien-3 β -ol (IV).

b) El producto minoritario (15%) se identificó como el ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol (V) en base a los siguientes datos espectroscópicos: Su espectro de masas (gráfica XXIII) muestra un pico molecular a 414 acompañado de las señales correspondientes a la pérdida de metilo y una y - dos moléculas de agua; la posición del grupo hidroxilo en 5, queda asimismo reflejada en este espectro (ver apéndice) En el espectro de RMN se observa el típico multiplete en 5,2 δ característico de los dobles enlaces en posición 7 y 22.

2- Reducción del ergosterol(VI)

El ergosterol fue reducido en las condiciones antes mencionadas para dar cuantitativamente el ergosta-7,22-dien-3 β -ol (IV).

Esta reducción selectiva del doble enlace en posición 5, confirma su mayor reactividad frente a los restantes dobles enlaces de la molécula.

3- Reducción de la mezcla 82:18 de ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (III) y de ergosta-6,9(11),22-trien-3 β ,5 α ,8 α -triol (VII).

La mezcla 82:18 de los trioles (III y VII) fue obtenida por reducción con Zn en KOH-dioxano de la mezcla natural de peróxidos (I+II).

La reducción de esta mezcla de trioles, condujo a una mezcla de ergosta-7,22-dien-3 β -ol (IV) y ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol (V) en una relación 80:15, similar a la obtenida por reducción de la mezcla natural de peróxidos (I+II)

4- Reducción de peróxido de ergosterol (I).

El peróxido de ergosterol puro, obtenido por foto--oxigenación del ergosterol, fue reducido en las condiciones de Birch para originar una mezcla del ergosta-7,22-dien-3 β -ol (85 %) y del ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol (7%)

Comparando esta experiencia con la "1" observamos que el rendimiento en el diol (V) ha disminuido desde un 15 a un 7 % cuando se pasa de una muestra que contiene un 18 % de 9(11) dehidroergosterol peróxido a otra que no contiene este compuesto.

Esto nos hizo pensar que el 9(11)dehidro peróxido de ergosterol es el precursor del ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol (V).

5- Reducción del 9(11) dehidro peróxido del ergosterol (II).

Este compuesto, preparado por fotooxigenación del 9(11) dehidro ergosterol, se redujo, dando un 75 % del ergosta-7, 22-dien-3 β ,5 α -diol (V)

Esta experiencia, prueba inequívocamente que el 9(11) dehidro peróxido del ergosterol (II) es el precursor del - diol (V) en la reducción de Birch.

En la tabla V se resumen estas cinco experiencias:

Tabla V

Sustrato sobre el que se realizó la reacción	Productos finales (%)
mezcla I + II (82:18)	mezcla IV + V (80:15)
VI	IV
mezcla III + VII (82:18)	mezcla IV + V (80:15)
I	mezcla IV + V (85:7)
II	V (75 %)

I: peróxido de ergosterol, II: 9(11)dehidro ergosterol peróxido, III: ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol, IV: ergosta-7, 22-dien-3 β -ol, V: ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol, VI: ergosterol, VII: ergosta-6,9(11),22-trien-3 β ,5 α ,8 α -triol.

Conclusiones sobre el mecanismo de la reducción.

En el esquema IV se expone el mecanismo por el cual suponemos que transcurre la reacción.

En un primer paso, se produce la ruptura del puente peroxídico, seguida de protonación para formar los trioles - III Y VII. Estos sufren una hidrogenolisis para formar los carbaniones diólicos intermedios VIII, IX y X.

La evolución de los carbaniones VIII y IX puede proseguir por eliminación de los grupos hidroxilo, hacia la formación del dieno VI.

Según el esquema expuesto, los carbaniones VIII, IX y X pueden ser protonados en C-6 y C-8, sin embargo la posición C-6 es mas facilmente accesible que C-8 en el medio de reacción, lo cual situa el doble enlace en posición 7-8 regioselectivamente.

El doble enlace adicional presente en X, disponible para la conjugación, rebaja la reactividad relativa de este carbanión lo suficiente, como para que la eliminación intramolecular del hidroxilo en C-5 sea lenta respecto a la protonación en C-6.

Oxidación del ergosta-7,22-dien-3 β -ol.

La oxidación de este estero β l se llevó a cabo con reactivo Jones y con dicromato de piridinio (222), ambas reacciones dieron origen con rendimientos semejantes a un único producto, que fue identificado como la ergosta-7,22-dien-3-

ona, cuyos espectros de RMN, IR y masas coincidieron con los del producto natural.

El peróxido del ergosterol: ¿ Es un artefacto fúngico ?

El peróxido de ergosterol se ha citado como un intermedio que se forma a partir del lanosterol durante el proceso de introducción del doble enlace en la posición C-5 del ergosterol.

El proceso biogénico, de introducción del doble enlace en la posición 5 de esteroides, ha sido ampliamente estudiado.

Se ha demostrado que en la biosíntesis del colesterol, se requieren oxígeno (191) y piridín nucleótido (194) para este paso de reacción y que la formación del doble enlace ocurre de forma cis, con eliminación del hidrogeno α de los átomos de carbono 5 y 6 (195-198).

Akhtar y Parvez (199), usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* confirman que existe una oxígeno-dependencia en la formación del doble enlace en la posición C-5 del ergosterol. Ellos demuestran que las células de levadura son capaces de transformar el ergosta-7,22-dien-3 β -ol en condiciones aerobias, pero no en condiciones anaerobias.

Bimpson y col. (200), trabajando con el hongo *Aspergillus fumigatus*, demuestran que la estereoquímica de la eliminación para la formación del ergosterol es la misma que la descrita para el colesterol. En estos trabajos, se afirma además, que la conversión del ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol a ergosterol, solo se produce en condiciones aerobias.

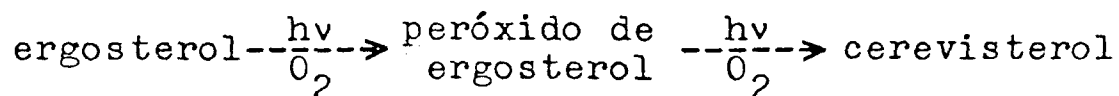
Contradictoriamente, Topham y Gaylor (201-203) describen una enzima: la 5 α -hidroxi-esterol-dehidrasa, obtenida de membrana de levadura, que cataliza la conversión anaerobia del ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol a ergosterol.

Esta misma enzima fue usada por Hamilton y Castrejon (204) para realizar la conversión del peróxido de ergosterol a ergosterol.

A pesar de esto y aunque el peróxido de ergosterol se ha encontrado con frecuencia en hongos, existen pruebas que hacen dudar de su autenticidad como producto natural.

Adam y col. (188) afirman que este compuesto es un artefacto de los procedimientos experimentales, puesto que solo se detecta, en los extractos de Piptoporus betulinus y Daedalea quercina, cuando estos han sido expuestos a la luz durante algunos días y no se encuentra en el extracto fresco.

Resultados similares obtienen Vacheron y Michel (21), que identifican el peróxido del ergosterol junto con el cerevisterol como productos formados en el proceso de extracción; ellos sugieren que la formación de estos compuestos se realiza a partir de ergosterol, mediante la secuencia de fotoreacción:



Sin embargo, para que se efectue esta conversión de ergosterol a su peróxido, en presencia de oxígeno y luz, es -

esencial la existencia de un fotosensibilizador, por ejemplo eosina.

Adam y col. (188) asumen, que esta capacidad fotosensibilizadora (que exhiben gran cantidad de productos coloreados) se presenta también en antraquinonas y otros pigmentos fúngicos. Como en los extractos de hongos existen estos pigmentos, es fácil, cuando las condiciones de oxígeno y luz lo permiten, que se produzca la fotooxigenación del ergosterol a peróxido de ergosterol.

Nosotros, comprobamos la capacidad fotosensibilizadora del extracto de *Ganoderma australe*. Para ello, se trató en corriente de oxígeno y bajo un conjunto de lámparas de luz de día, ergosterol comercial disuelto en etanol, con extracto bruto de nuestro hongo. Observamos que todo el ergosterol se había transformado en su peróxido, cuyos espectros (gráfica XIII) son superponibles con los del material natural.

Sin embargo, el hongo fue extraído en ausencia de luz y bajo atmosfera de nitrógeno, por lo que no es posible -- que se haya producido la fotooxigenación en este periodo.

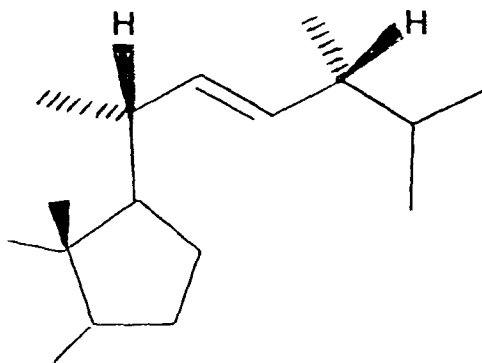
Configuración absoluta en C-20 y C-24 del ergosterol

Como parte de la determinación estructural de esteroides, la configuración de los carbonos 20 y 24, ha sido objeto de amplios estudios (205).

Aunque inicialmente (206) se asignó la estereoquímica β a los grupos 24-metil y 24-etil de ergosterol y estigmasterol, estos resultados fueron parcialmente corregidos por Tsuda y col. (207) que asignaron la estereoquímica α al grupo 24 etilo del estigmasterol.

Más recientemente (208-210) usando la espectroscopia de RMN (220 MHz) se ha demostrado, que en plantas se pueden originar tanto los 24 α metil como los 24 β metil esteroides y que contrariamente a lo que se creía, en Tracheophytas pueden coexistir también ambos isómeros.

La situación en hongos parece ser diferente, Adler y col. (53) usando muestras de ergosterol procedentes de Ascomycetes y de Basidiomycetes, demuestran por espectroscopia de RMN (220MHz) que el ergosterol procedente de hongos posee los grupos metilo sobre C-20 y C-24 en posición α (figura VI):



PARTE EXPERIMENTAL

ESTUDIO DEL HONGO GANODERMA AUSTRALE

El hongo *G. australe* es un hongo perenne de consistencia leñosa perteneciente a la familia de las Polyporaceas (clase Basidiomycetes) que se encuentra parasitando troncos y tocones de planifolios.

El hongo fue recogido en el bosque de los Tilos y en el Cubo de la Galga de la isla de la Palma en julio de --- 1982.

EXTRACCION

Tres kilos de hongo reducido a serrín se extrajeron con acetona en un sohxlet, previamente desoxigenado mediante la disolución de Fieser, en corriente de nitrógeno y -- ausencia total de luz.

El extracto fue concentrado, extraído con cloruro de metileno y secado con sulfato sódico. Una vez seco se concentró y percoló a través de alúmina neutra de actividad - II-III. El percolado se concentró para dar 30 gr de extracto que se cromatografió a través de 1 kgr de gel de sílice eluyendo con nhexano y mezclas de n-hexano - acetato de etilo.

Sustancia G-1: linoleato de etilo

Aceite homogéneo (2,5 gr) obtenido de las primeras -
fracciones de la cromatografía general, $n_D^{20}=1,4593$, p.eb.
= 190-192°C a 6 mm de Hg (gráfica I).

IR (cm^{-1}): 1720 (éster), 700 (cadena larga).

RMN (δ): 5.3 (t, J=6, 4H, RHC=CHR), 4.06 (c, J=7, 2H, RCO₂-
CH₂CH₃), 2.71 (t, J=6, 2H, CH₂-CO₂Et).

Sustancia G-2: ergosta-7,22-dien-3-ona.

Sólido (45 mgr) que cristaliza de metanol como agujas
de p.f.= 178°C, $(\alpha)_D^{20} = +9^\circ$ (CHCl₃, c = 2,44). (gráfica II).
2,4-dinitro fenil hidrazona p.f.= 85°C.

MS; m/z (%): 396, 3400 (19.3, C₂₈H₄₄O), 353 (12.3, M⁺-C₃H₇),
297 (23.5, M⁺-C₇H₁₅), 271 (50.4, M⁺-C₉H₁₇), -
269 (100, M⁺-C₉H₁₇-2H).

IR (cm^{-1}): 1700 (C=O).

RMN (δ): 5.2 (m, 3H, Δ^7 y Δ^{22}).

Sustancia G-3: ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.

Cristaliza como placas amarillas (200 mgr) de p.f.=
112-114°C.

MS m/z (%): 392, 3074 (26.3, C₂₈H₄₀O), 268 (97.5, M⁺-C₉H₁₆)
267 (69.3, M⁺-C₉H₁₇), 253 (19.9 M⁺-C₉H₁₆-CH₃)

UV, $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 350 (4.18).

IR (cm^{-1}): 1640 (C=O), 1585, 975, 830.

RMN (δ): 6.25 (AB, J=10, 2H, Δ^6), 5.64 (s, 1H, O=CRCH=CR₂)
5.2 (m, 2H, Δ^{22}).

Sustancia G-4: mezcla de ácidos docosanoico (9.7%), trico-
sanoico (24 %), tetracosanoico (53 %), pentacosanoico (6.8
%) y hexacosanoico (5.5 %).

Se presentó como un aceite viscoso (300 mgr) que fue purificado por capa gruesa a partir de sus ésteres metílicos.

En la gráfica IV se observan los siguientes datos para el material ácido:

MS m/z (%) : 396.3975 (9.6 , C₂₆H₅₂O₂), 382.3831 (10.6 ,
C₂₅H₅₀O₂), 368.3655 (37.4 , C₂₄H₄₈O₂),
354.3516 (13.6 , C₂₃H₄₆O₂), 340.3422 (.4.7 ,
C₂₂H₄₄O₂).

IR (cm^{-1}): 3500-2300, 1700 (ácido) 735 y 725 (cadena larga)

El tratamiento de G-4 con diazometano en eter a 0°C, condujo a una mezcla de ésteres metílicos (gráfica V). El análisis de GLC [OV-1(1 %), T_f=200°C, flujo 30 ml de helio por minuto] mostró que esta mezcla estaba formada por cinco productos, cuyas intensidades relativas: 9.7, 24, 53, - 6.8 y 5.5 % corresponden a tiempos de retención de 6.14, 8.37, 11.83, 16.79 y 23.49 min.

Al efectuar una inyección mixta en GLC de la mezcla de ésteres metílicos con tricosenato de metilo se observó

un aumento en el area del segundo pico (que en el análisis de GLC inicial mostraba una intensidad del 24 % y un tiempo de retención de 8.37 min).

Se realizó una segunda inyección mixta de la mezcla con estearato de metilo.

La representación gráfica del número de átomos de carbono frente al logaritmo de los tiempos de retención (gráfica V) condujo por extrapolación al resultado indicado en la tabla VI.

Tabla VI

T.r.	log T.r. 10^3	nº de C	nº de C obtenido gráficamente	% en la mezcla G-4
1.50	176.1	18		-
5.51	741.1		22	9.7
7.51	875.6	23		24
10.41	1017.4		24	53
15.08	1178.4		25	6.8
21.14	1325.1		26	5.5

La etilación de una muestra del material ácido con etanol y ácido sulfúrico rindió la correspondiente mezcla de ésteres etílicos (gráfica VI).

La inyección mixta en GLC de la muestra etilada con palmitato de etilo confirmó los resultados anteriores.

85

Sustancia G-5: mezcla de ergosta-7,22-dien-3 β -ol y ergost-7-en-3 β -ol.

Cristaliza de metanol como agujas (180 mgr) de p.f.= 168-170°C, $(\alpha)_D^{20} = -21^\circ$ (CHCl₃, c = 1.78) (gráfica VII).
MS; m/z (%): 400.3700 (15.6 , C₂₈H₄₈O), 398.3572 (41.4 , C₂₈H₄₆O).

IR (cm⁻¹): 3602 (hidroxilo), 1040, 976.

RMN (δ): 5.2 (m, Δ^7 , Δ^{22}), 2.92 (s, R₂CHOH).

La acetilación de G-5 con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente durante 24 horas condujo a -- una mezcla de acetatos de p.f.= 177-180°C, $(\alpha)_D^{20} = -19^\circ$ (CHCl₃, c = 2.95) (gráfica VIII).

MS; m/z (%): 442.3773 (14.5 , C₃₀H₅₀O₂), 440.3645 (28.4 C₃₀H₄₈O₂).

IR (cm⁻¹): 1725, 1260 (acetato), 1035, 979, 906.

RMN (δ): 5.2 (m, Δ^7 , Δ^{22}), 4.71 (m, R₂HCOAc), 2.02 (s, R₃COCOCH₃).

El análisis de la mezcla de acetatos en GLC [OV-1 (1%) T_i=200°C, T_f=300°C, flujo = 30 ml de helio por minuto] mostró que se trataba de una mezcla de dos productos cuyas intensidades relativas 84.04 y 15.96 correspondían a tiempos de retención de 13,16 y 13.99 minutos.

Hidrogenación de la mezcla G-4.

El producto (100 mgr) se disolvió en 20 ml de eter seco con 20 mgr de platino Adams y se dejó con agitación du-

rante 4 horas en atmosfera de hidrógeno.

La mezcla de reacción se filtró a través de gel de sílice obteniéndose un único producto (42 mgr) de p.f.=145-146°C.

El tratamiento de este alcohol con anhídrido acético en piridina rindió el correspondiente acetato, que fue -- identificado como ergost-7-en-3 β -acetoxi (gráfica IX).

MS; m/z (%): 442 (73 , C₃₀H₅₀O₂) , 315 (18.5 , M⁺- C₉H₁₉)
313 (53.2 , M⁺- AcOH- CH₃ + C₄H₆).

donde el ión a 315 corresponde a la fragmentación simple de cadena mientras que el ión a 313 se origina por eliminación de acético y metilo seguida de retro Diels Alder en el anillo A con ruptura de los enlaces C₁+ C₁₀ y C₄-C₅
RMN (δ): 5.2 (m, 1H, Δ^7), 5.03 (1H, R₂HCOAc), 2.02 (s, 3H, R₃COCOCH₃).

La inyección mixta en GLC [OV-1 (1%), T_i=200°C, T_f=300°C, flujo= 30 ml de helio por minuto] del ergost-7-en-3 β -acetoxi y del acetato de G-5, mostró que el producto minoritario de la mezcla de acetatos G-5 era el ergost-7-en-3 β -acetoxi (15.96 %). El producto mayoritario de esta mezcla se identificó como el ergosta-7,22-dien-3 β -acetoxi.

Hidrogenación del acetato de G-5.

50 mgr de la mezcla de acetatos de G-5 disueltos en 10 ml de eter se hidrogenaron usando Pd-C al 10 % como catalizador (12 mgr).

El producto de reacción se filtró a través de gel de sílice obteniéndose un único compuesto de p.f.= 105-108°C (α)_D²⁰ = 0° (CHCl₃, c = 1.89) que fue identificado como ergost-8(14)-en-3 β -acetoxi (gráfica X).

MS; m/z (%): 442 (57.6 , C₃₀H₅₀O₂), 427 (53 , M⁺ -CH₃),
367 (7.3 , M⁺ - CH₃-AcOH), 315 (6.3 , M⁺ -C₉H₁₉)
255 (11.6 , M⁺ - C₉H₁₉- AcOH)

IR (cm⁻¹): 1723, 1260 (acetato), 1032.

RMN (δ): 4.72 (m, 1H, R₂HCOAc), 2.02 (s, 3H, R₃COCOCH₃).

Sustancia G-6: mezcla de peróxido de ergosterol y 9(11)dehidro peróxido de ergosterol.

El producto (0.8 gr) posee un p.f.=172-176°C, (α)_D²⁰ = -12.5° (CHCl₃, c = 1.24). (gráfica XI).

MS; m/z (%): 428.3276 (4.8 , M₁⁺ = C₂₈H₄₄O₃), 426.3091 (1.2, M₂⁺ = C₂₈H₄₂O₃), 396 (78, M₁⁺ - O₂), 394 (16 , M₂⁺ - O₂).

IR (cm⁻¹): 3690, 3610 (hidroxilo), 965 (peróxido).

RMN (δ): 6.48 (AB, J=8.7, Δ^6 del 9(11)dehidro peróxido de ergosterol), 6.41 (AB, J=8.7, Δ^6 del peróxido de ergosterol), 5.2 (m, Δ^{22}).

La relación cuantitativa de estos productos se obtuvo por integración en su espectro de RMN (90 MHz) de los protones vinílicos del sistema AB y por el método de las rotaciones ópticas (ver parte teórica); resultando que -- G-6 es una mezcla 82:18 del peróxido del ergosterol y de

su 9(11)dehidro derivado.

La acetilación de la mezcla G-6 (Ac_2O , py, 20°C , 24 h) condujo a una mezcla de acetatos de p.f.= $192-195^\circ\text{C}$, $(\alpha)_D^{20} = -3^\circ$ (CHCl_3 , $c = 3.78$). (gráfica XII).

MS; m/z (%): 470 (5.4 , $M_1^+ = \text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$), 468 (2 , $M_2^+ = \text{C}_{30}\text{H}_{44}$,
410 (15 , $M_1^+ - \text{AcOH}$), 408 (3.6 , $M_2^+ - \text{AcOH}$), 378
(100 , $M_1^+ - \text{AcOH} - \text{O}_2$), 376 (40 , $M_2^+ - \text{AcOH} - \text{O}_2$)

IR (cm^{-1}): 1730, 1250 (acetato).

RMN (δ): 6.48 (AB, $J=8.7$, Δ^6 del acetato del 9(11) dehidro peróxido de ergosterol), 6.41 (AB , $J=8.7$, Δ^6 del acetato del peróxido de ergosterol), 5.2 (m, Δ^{22})
5.0 (R_2HCOAc), 2.01 (s, $\text{R}_2\text{HCOCOCH}_3$).

Fotooxigenación de ergosterol comercial con extracto bruto del hongo Ganoderma australe.

100 mgr de ergosterol comercial disuelto en etanol se irradió durante dos horas con lámparas de luz de día (2 X 100 W) bajo corriente de oxígeno, utilizando extracto bruto del hongo G. australe como fotosensibilizador.

La mezcla de reacción se filtró a través de gel de sílice obteniéndose un único producto de p.f.= $178-180^\circ\text{C}$, $(\alpha) = -25^\circ$ (gráfica XIII) que se identificó como peróxido de ergosterol.

MS; m/z (%): 428 (10.5 , $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$), 410 (17.6 , $M^+ - \text{H}_2\text{O}$),
396 (68.5 , $M^+ - \text{O}_2$), 363 (72, $M^+ - \text{O}_2 - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$)

IR (cm^{-1}): 3605 (hidroxilo), 970 (peróxido).

RMN (δ): 6.42 (AB, $J=8.7$, 2H, Δ^6), 5.2 (m, 2H, Δ^{22}).

SINTESIS PARCIALES

Oxidación de Oppenauer del ergosterol.

Una disolución de 1 gr de ergosterol y 2 gr de p-benzoquinona en 22 ml de tolueno, fue evaporada a presión reducida, hasta recoger 3 ml de destilado. Se añadió 1 gr de terbutóxido de aluminio y la mezcla se mantuvo a reflujo durante 1 hora (178).

Una vez fría la disolución se filtró y el sólido negro se lavó varias veces con benceno caliente. El líquido resultante se extrajo con una disolución acuosa diluida de Na(OH) y la capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 .

Se obtuvieron dos compuestos que fueron separados -- por cromatografía en gel de sílice.

a) compuesto de p.f.=113°C que se identificó como ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona en base a sus datos espectroscópicos (gráfica XV). La inyección mixta en GLC -- [OV-1 (1%), $T_i=200^\circ\text{C}$, $T_f=300^\circ\text{C}$, flujo= 30 ml de helio/min] de este producto sintético con la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona obtenida del hongo Ganoderma australe condujo a una única señal (gráfica XV).

b) Este producto fue identificado como ergosta-4,7,22-trien-3-ona (gráfica XVI).

MS; m/z (%): 394 (9 , $C_{28}H_{42}O$), 379 (4.8 , $M^+ - CH_3$),
269 (8.2 , $M^+ - C_9H_{17}$), 267 (13 , $M^+ - C_9H_{17} - 2H$)

RMN (δ): 5.8 (s, 1H, $OCR-CH=CR_2$), 5.2 (m, 3H, Δ^7 y Δ^{22})

Síntesis del ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -acetoxi.

Se obtuvo por adición de una disolución de 1.5 grs de acetato de mercurio II en 8.5 ml de ácido acético glacial a otra disolución de 0.5 gr de acetato de ergosterol en 7.5 ml de dioxano absoluto hirviente (183,184).

La ebullición se mantuvo durante 9 minutos con agitación y luego se enfrió el matraz en un baño de agua hielo. Cuando el líquido alcanzó los 15°C se filtraron los cristales amarillos de acetato de mercurio I que se formaron en el transcurso de la reacción.

Al filtrado se le añadieron sin agitación 20 ml de metanol al 20 % y se dejó cristalizar a -10°C. El precipitado cristalino se filtró y secó y el producto resultante -- (0,23 gr) se liberó de las sales de mercurio por filtración a través de alúmina de actividad III, eluyendo con benceno. El filtrado se concentró y cristalizó en metanol obteniéndose un único producto (0.183 gr) de p.f.=142-144°C, $(\alpha)_D^{20} = +190^\circ$ ($CHCl_3$, c = 0.56) que se identificó como ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -acetoxi. (gráfica XVII).

UV $\lambda_{m\acute{a}x}$ (log ϵ): 325 (4.08).

Formación del acetato del 9(11)dehidro peróxido del ergosterol.

Todo el material anterior, (0.183 gr) de acetato de -- 9(11) dehidro ergosterol, disuelto en 50 ml de etanol con 0.15 mgr de eosina se irradió durante dos horas con dos -- lámparas de luz de día (2X 100 W) bajo corriente de oxígeno (185,186).

El producto de reacción se percoló a través de gel de sílice, se obtuvo un único producto que se identificó como el acetato del 9(11)dehidro peróxido del ergosterol (gráfi ca XX).

MS; m/\bar{z} (%): 468 (12.8 , $C_{30}H_{44}O_4$), 408 (24 ; $M^+ - AcOH$)
376 (96.4 , $M^+ - AcOH - O_2$), 251 (43.2 , $M^+ - C_9H_{17} - AcOH - O_2$).

IR (cm^{-1}): 1730, 1250 (acetato).

RMN (δ): 6.48 (AB, $J=8.7$, 2H, Δ^6), 5.4 (m, 1H, $\Delta^{9(11)}$),
5.2 (m, 2H, Δ^{22}), 4.9 (m, 1H, $R_2\text{HCOAc}$), 2 (s, 3H, $R_2\text{HCOCOCH}_3$).

Formación del peróxido del ergosterol.

0.1 gr de ergosterol comercial disuelto en 50 ml de etanol con 0.15 mgr de eosina se irradió durante dos horas con dos lámparas de (2X 100 W) bajo corriente de oxígeno - (185,186).

El producto de reacción se percoló a través de gel de sílice obteniéndose un único producto de p.f.=180°C, $(\alpha)_D^{20}$

= -30° (CHCl_3 , $c = 0.98$) (gráfica XVIII) que se identificó como peróxido de ergosterol.

IR (cm^{-1}): 3605, 3450 (hidroxilo), 970 (peróxido).

RMN (δ): 6.41 (AB, $J=8.7$, 2H, Δ^6), 5.2 (m, 2H, Δ^{22}), 3.9 - (m, 1H, R_2HCOH).

La acetilación de este peróxido (Ac_2O , py, 20°C , 24 horas) condujo al correspondiente acetato de p.f.= $200-202^{\circ}\text{C}$ (gráfica XIX).

MS; m/z (%): 470 (9.8 , $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$), 410 (22 , $\text{M}^+ - \text{AcOH}$),
392 (35.5 , $\text{M}^+ - \text{AcOH} - \text{H}_2\text{O}$), 378 (100 , $\text{M}^+ - \text{AcOH} - \text{O}_2$), 285 (37.2 , $\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{17} - \text{AcOH}$).

IR (cm^{-1}): 1730, 1255 (acetato), 975 (peróxido).

RMN (δ): 6.41 (AB, $J=8.7$, 2H, Δ^6), 5.2 (m, 2H, Δ^{22}), 2 (s, 3H, $\text{R}_2\text{HCOCOCH}_3$).

REDUCCION DE ENDOPEROXIDOS

A- Reducción con Zn.

El peróxido de ergosterol se disolvió en una disolución $\text{Na}(\text{OH})$ en etanol y se trató con cinc, la reacción se realizó con agitación y se siguió por capa fina (183,184).

La mezcla de reacción se filtró a través de gel de sílice obteniéndose un único producto que se identificó como ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (gráfica XXI).

MS; m.z (%): 430 (3.8, $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3$), 412 (86 , $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 394 (72.1 , $\text{M}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$), 379 (57.2 , $\text{M}^+ - 2\text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$

376 (36 , $M^+ - 3H_2O$).

B- Reducción con sodio en etanol.

El peróxido de ergosterol se trató con Na en etanol - (185) para originar un único producto que se identificó como ergosta-7,22-dien-3 β -ol.

C- Reducción de Birch.

Se realizaron cinco experiencias sobre cinco sustratos distintos, según el procedimiento siguiente:

El esterol (o mezcla de esteroides) (1.0 mmol) disuelto en 2 ml de THF seco con 0.5 ml de t-butanol fue agitado en la disolución azul de Li (5.0 mmol) en amoníaco líquido (75 ml) durante dos horas. Pasado este tiempo se añadió -- una disolución saturada de cloruro amónico (50 ml) y se -- evaporó el amoníaco sobrante. Extracción con eter y cromatografía en gel de sílice dió los productos descritos a -- continuación.

1- Reducción de la mezcla 82:18 del peróxido del ergosterol y de su 9(11)dehidro derivado, obtenida del hongo Ganoderma australe.

Se obtuvieron dos productos:

a) ergosta-7,22-dien-3 β -ol (80 %) de $(\alpha)_D^{20} = -36^\circ$ (gráfica XXII).

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 214 (3.34), 255 (2.67) y 296 (2.73).

IR (cm^{-1}): 3600 (hidroxilo).

RMN (δ): 5.2 (m, 3H, Δ^7 y Δ^{22}), 3.5 (m, R_2HCOH)

b) ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol (15 %) (gráfica XXIII)

MS; m/z (%): 414 (0.7 , $C_{28}H_{46}O_2$), 396 (61.5 ; $M^+ - H_2O$)

381 (18.2 , $M^+ - H_2O - CH_3$), 378 (3.0 , $M^+ - 2H_2O$)

363 (58.5 , $M^+ - 2H_2O - CH_3$).

2- Reducción del ergosterol.

Se obtuvo un único producto identificado como ergosta-7,22-dien-3 β -ol.

3- Reducción de la mezcla 82:18 de ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol y de ergosta-6,9(11),22-trien-3 β ,5 α ,8 α -triol.

Esta mezcla de trioles se obtuvo a partir de la mezcla natural 82:18 del peróxido del ergosterol y de su 9(11)dehidro derivado por reducción con cinc en KOH-dioxano.

La reducción de la mezcla de trioles en las condiciones de Birch condujo a una mezcla del ergosta-7,22-dien-3 β -ol y ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol en una relación similar 80:15 a la obtenida por reducción de Birch de la mezcla natural de peróxidos.

4- Reducción del peróxido del ergosterol.

La reducción de este peróxido puro condujo a una mezcla 85:7 de ergosta-7,22-dien-3 β -ol y de ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol.

5- Reducción del 9(11)dehidro peróxido del ergosterol.

Este compuesto puro originó por reducción de Birch un 75% de ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol.

Oxidación del ergosta-7,22-dien-3 β -ol.

Esta oxidación se realizó con reactivo Jones y con dicromato de piridinio, obteniéndose por ambos métodos rendimientos semejantes.

A- Oxidación con reactivo Jones

a) la preparación del reactivo se realizó por mezcla directa de 27 gr de trióxido de cromo con 23 ml de sulfúrico concentrado y 77 ml de agua.

b) Sobre el compuesto (50 mgr) disueltos en 20 ml de acetona a 0°C se fue añadiendo gota a gota el reactivo, hasta que la disolución tomó persistentemente un color naranja. La reacción fue seguida por capa fina y una vez concluida se destruyó el exceso de reactivo con metanol.

La mezcla de reacción fue purificada por cromatografía obteniéndose un producto de p.f.= 177-180°C que fue identificado como el ergosta-7,22-dien-3-ona.

E- Oxidación con dicromato de piridinio

a) El reactivo se obtuvo añadiendo gradualmente 40 ml de piridina a una disolución de 50 gr de trióxido de cromo en 50 ml de agua a 25°C, posteriormente se añadieron 200 ml de acetona y se dejó enfriar a -30°C durante 12 horas. Pasa

do este tiempo se separaron los cristales naranjas de PDC por filtración a vacío (222).

b) La oxidación se realizó en frío, por tratamiento de 50 mgr de ergosta-7,22-dien-3 β -ol con 70 mgr de PDC en diclorometano durante 8 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de celita con objeto de separar las sales de cromo.

Se obtuvo un producto de p.f.=175-176°C que se identificó como ergosta-7,22-dien-3-ona.

CAPITULO II

PHELLINUS POMACEUS

Este hongo fue estudiado en tres ocasiones.

En el primer y segundo estudio el hongo fue recogido en el bosque de los Tilos de la isla de la Palma en los meses de Enero y Agosto, siendo identificados el ergosta-7, 22-dien -3-ona, el ergosta-7,22-dien-3 β -ol y un nuevo triterpeno tetracíclico del tipo del lanosterol lactonizado en la cadena y de fórmula empírica $C_{30}H_{42}O_3$.

En el tercer estudio el hongo fue recogido en el Bailadero en la isla de Tenerife y en el mes de Agosto, ya desde el principio el aspecto del percolado y de la cromatografía general diferían mucho del primer y segundo estudio por lo que se comprobó de nuevo que ambos ejemplares, el recogido en la Palma y el recogido en Tenerife, eran iguales botánicamente. En este tercer caso se identificaron -- además del ergosta-7,22-dien-3-ona, cuatro triterpenos pentacíclicos y dos nuevos productos de degradación del lanosterol.

Desde hace tiempo, se sabe que los metabolitos aislados de hongos varían en cantidad e incluso en grados de -- oxidación con las condiciones ambientales, época del año, medios de cultivo, etc, sin embargo en nuestro caso no solo han variado las cantidades relativas, sino que además se han originado diferentes esqueletos.

Hemos encontrado casos semejantes para otros Basidiomycetes tales como: *Ganoderma applanatum*, *Fomes officinalis*

F.pinícola, Poria cocos, Trametes odorata, etc. Cada uno de estos hongos han sido estudiados por distintos autores y en distintos lugares, obteniéndose en cada caso productos diferentes.

Todos estos hongos tienen una característica común: - son parásitos de árboles (1)

Este interesante hecho, lo hemos podido racionalizar basándonos en tres puntos fundamentales del metabolismo de los hongos:

1) El hongo por medio de su micelio absorbe indiscriminadamente la materia orgánica existente en el medio sobre el que se desarrolla.

2) Los hongos al igual que las plantas no poseen sistemas excretores, por lo que las sustancias absorbidas por el micelio pueden ser transformadas o acumuladas, pero nunca expulsadas.

3) Una sustancia es transformada únicamente si existen las enzimas apropiadas para la degradación. Estas enzimas involucradas en las rutas metabólicas están codificadas directamente por los genes, que son característicos de cada especie.

La información genética regula además la formación de proteínas y de ciertos metabolitos "típicos" de cada especie, por ejemplo la muscarina de la Amanita pantherina. Las condiciones ambientales pueden hacer variar las proporciones relativas de estos metabolitos "típicos", pero siempre

estarán presentes en el hongo.

La materia orgánica sobre la cual se desarrolla el hongo, aporta materiales que a veces no pueden ser metabolizados y que por tanto se acumulan. Al variar el medio de cultivo, las sustancias aportadas son distintas y por tanto - dentro de una misma especie podremos encontrar distintos - productos, dependiendo del medio que parasiten. Este efecto acumulativo de metabolitos "no típicos" puede hacer que una sustancia de este tipo sea el producto mayoritario del extracto.

Es decir, se suman dos efectos, la información genética que regula la formación de proteínas y es la causante de los metabolitos "típicos" y la materia orgánica, necesaria para el desarrollo de los hongos, que aporta metabolitos "no típicos" de la especie.

Todo lo anterior lleva a que la Quimiotaxonomía en hongos no es aplicable a nivel de metabolitos secundarios, solo cuando hablemos de metabolitos "típicos" o de proteínas podremos agrupar las especies quimiotaxonomicamente.

En la actualidad, se utiliza el análisis de polisacáridos para diferenciar entre especies taxonómicas muy próximas (225).

TERCER ESTUDIO DEL HONGO PHELLINUS POMACEUS

Del extracto del hongo y tal como se muestra en la parte experimental, se aislaron dos ácidos grasos, un esteroide, cuatro triterpenos pentacíclicos y dos nuevos productos de degradación del lanosterol, cuya identificación se describe a continuación.

SUSTANCIA F-1

Fue obtenida del material insaponificable de las primeras fracciones de la cromatografía general.

El producto (220 mgr) cristaliza como agujas de p.f.= 258°C, $(\alpha)_D^{20} = -35^\circ$ (CHCl_3 , $c = 2,26$).

Su espectro de masas (gráfica XXIV) muestra un pico molecular a 426,3855 correspondiente a la fórmula empírica $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$.

El producto, que forma una 2,4 dinitrofenil hidrazona de p.f.= 278-280°C, presenta en su espectro de IR una banda a 1700 cm^{-1} que asignamos a una cetona saturada.

Su espectro de RMN no presenta señales vinílicas.

El compuesto F-1 se identificó como friedelina [lit. (211): p.f.=262-263°C, $(\alpha)_D = -21^\circ$].

La reducción de 100 mgr de friedelina (esquema V) con LiAlH_4 en eter condujo a dos productos epiméricos, cuyos espectros de masas (gráfica XXV) coinciden con los de un monoalcohol triterpénico. Estos productos se identificaron

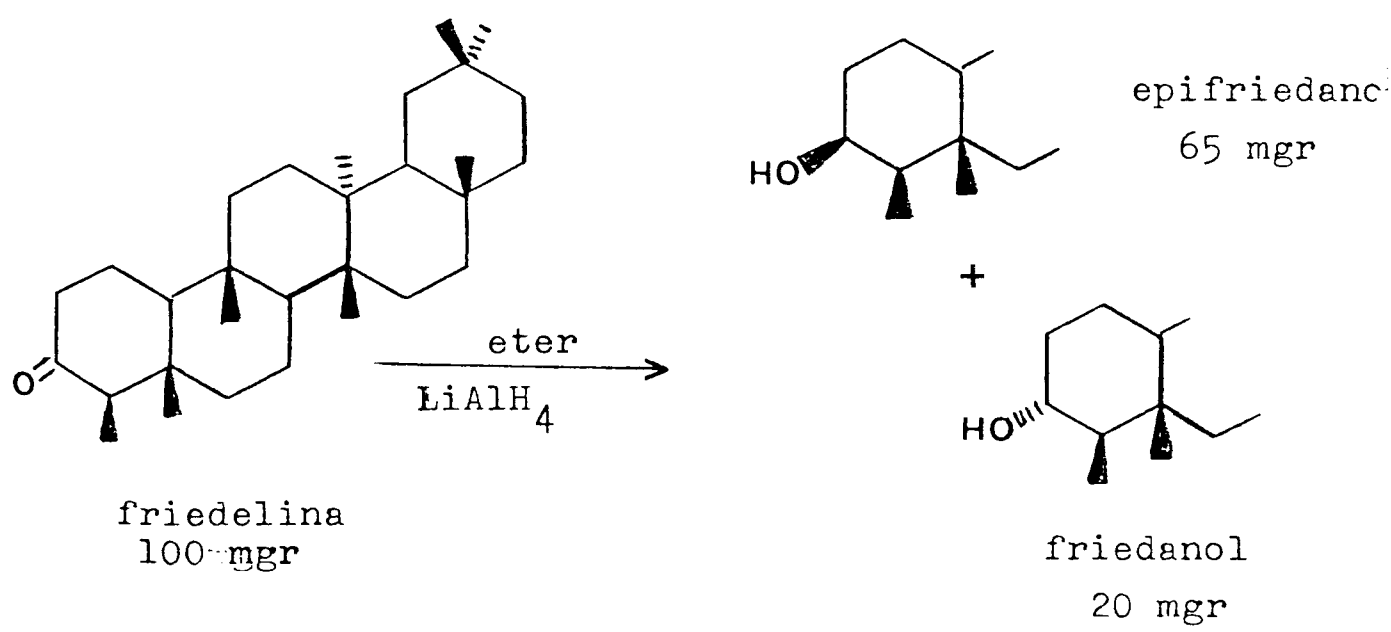
en base a sus constantes físicas como:

a) epifriedanol (β -OH): se obtuvieron 65 mgr de producto de p.f.= 278-279°C, $(\alpha)_D^{20} = +20^\circ$ (Cl_4C , $c = 0,3$) [lit. (211) p.f.= 275-276°C, $(\alpha)_D = +12$].

b) friedanol (α -OH): se obtuvieron 20 mgr de producto - de p.f.=305°C, $(\alpha)_D^{20} = +14^\circ$ (Cl_4C , $c = 0,2$) [lit.(212): p.f. = 304°C, $(\alpha)_D = +18$].

Comparando los porcentajes obtenidos de friedanol y epifriedanol, se observa el claro impedimento estérico que ejercen los grupos 4β -metilo (ecuatorial) y 5β -metilo (axial) a la entrada del hidruro por la cara β .

Esquema V



SUSTANCIA F-2

Fue obtenida al igual que F-1 del material insaponificable de las primeras fracciones de la cromatografía general.

El producto (86 mgr) cristalizó en forma de placas hexagonales de p.f.=278-282°C, $(\alpha)_D^{20} = +14^\circ$ (CHCl_3 , c = 0,6)

Su espectro de masas (gráfica XXVI). muestra un pico molecular a 426,3856 correspondiente a $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, acompañado de pérdida de agua y metilo.

Su espectro IR presenta una banda a 3600 cm^{-1} correspondiente a un grupo hidroxilo.

En el espectro de RMN aparece un multiplete en 5,54 δ que integra para un protón y otra señal en 3,2 δ asignable al protón geminal al hidroxilo.

La acetilación del producto con anhídrido acético y piridina condujo a un sólido cristalino de p.f.=295°C, $(\alpha)_D^{20} = +15^\circ$ (CHCl_3 , c = 1,1) cuyos espectros de masas y RMN coinciden con los de un monoacetato (gráfica XXVII).

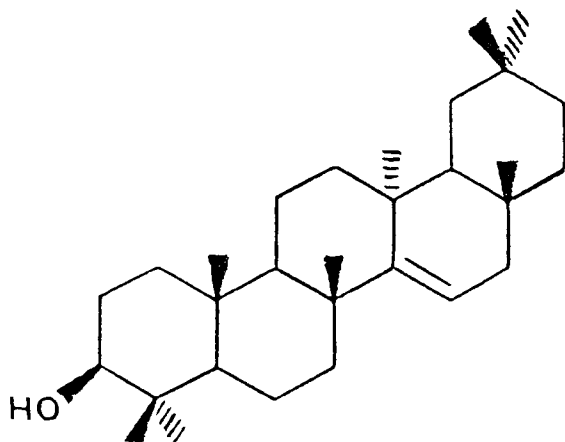


Figura VII

El producto fue identificado como taraxerol (figura VII [lit. (213): taraxerol p.f.=279-281°C, $(\alpha)_D = +3$, acetato de taraxerol p.f.=298-299°C, $(\alpha)_D = +13,8$].

Es la primera vez que se describe el taraxerol como producto fúngico.

SUSTANCIA F-3

Se obtuvo como un sólido blanco (140 mgr) que cristalizó de metanol como placas de p.f.=179-180°C, $(\alpha)_D^{20} = +9^\circ$ (CHCl_3 , $c = 2,44$).

Sus espectros de masas, RMN e IR fueron superponibles con los del producto G-2 obtenido del hongo *Ganoderma australe* por lo que identificamos este producto como ergosta-7,22-dien-3-ona.

SUSTANCIA F-4

Se obtuvo como un aceite (70 mgr).

En su espectro IR (gráfica XXVIII) se observan bandas ácido en $3600-2500 \text{ cm}^{-1}$ y 1700 cm^{-1} y una señal intensa en 725 cm^{-1} asignada a una cadena larga.

Su espectro de RMN muestra un triplete centrado en 5,3 δ y es característico de ácidos grasos.

La metilación de F-4 con diazometano en éter condujo a una mezcla de ésteres metílicos, que por análisis de GLC, mostró estar formada por dos productos (gráfica XXIX).

La inyección mixta en GLC de la muestra metilada con palmitato de metilo y con oleato de metilo, mostró que la

mezcla estaba compuesta por palmitato de metilo (12,51 %) y por oleato de metilo (87,49 %) (gráfica XXIX).

SUSTANCIA F-5

Fue purificada a partir de su acetil metil ester. Se obtuvieron 32 mgr de producto que cristalizado de metanol - dió un p.f.=189-192°C, $(\alpha)_D^{20} = +68^\circ$ (CHCl_3 , c = 0,3).

Su espectro de masas (gráfica XXX) presenta un pico molecular a 512 ($\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_4$) acompañado de pérdidas de acético y metilo.

En su espectro de IR se observan bandas en 1725 y 1265 cm^{-1} correspondientes a ester - acetato.

El espectro de RMN muestra dos singletes en 2 y 3,7 δ que integran para tres protones y que asignamos a un acetato y a un ester metílico respectivamente; en este espectro se observa además una señal centrada en 4,88 δ correspondiente a un protón vinílico.

Por hidrólisis alcalina de este acetil metil ester, se obtuvieron dos productos:

a) Sustancia cuyo espectro de masas (gráfica XXXI) da un peso molecular de 456 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$) correspondiente a un ácido triterpénico con un único grupo hidroxilo.

b) Producto de p.f.=192-194°C, $(\alpha)_D^{20} = +100^\circ$ (CHCl_3 , c = 0,2).

Su espectro de masas (gráfica XXXII) muestra un peso molecular de 470 ($\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$).

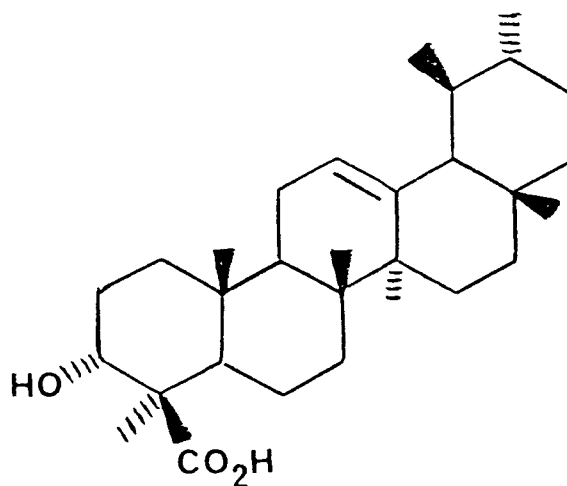
En su espectro IR aparecen bandas de absorción en 3520

y 1715 cm^{-1} correspondientes a un alcohol y a un éster metílico respectivamente.

La sustancia F-5 se identificó como el ácido β -boswéllico (figura VIII) [lit. (214,216a): acetil metil éster - del ácido β -boswéllico p.f.=189-198°C, $(\alpha)_D = +72^\circ$, éster - metílico del ácido β -boswéllico p.f.=195-196°C, $(\alpha)_D = +111^\circ$]

Es la primera vez que se describe el ácido β -boswéllico como metabolito fúngico.

Figura VIII



SUSTANCIA F-6

Se separó y purificó a partir de su acetyl metil ester, este cristalizó de metanol dando un p.f.=245-247°C, $(\alpha)_D^{20} = +56^\circ$ (CHCl_3 , $c = 4,88$).

Su espectro de masas (gráfica XXXIII) mostró un pico molecular a 512 ($\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_3$) seguido de las pérdidas de acético y metilo.

En su espectro de IR aparecen señales en 1715 y 1250 cm^{-1} características de ester acetato.

Su espectro de RMN muestra dos singletes en 2,05 y 3,62 δ que asignamos al acetato y al ester metílico, un triplete en 4,53 δ del protón geminal al acetato y otro triplete en 5,27 δ correspondiente a un protón vinílico.

Por hidrólisis alcalina se obtuvieron dos productos -- que se identificaron como el hidroxiaácido (gráfica XXXIV) y el ester metílico de F-6.

El tratamiento de este ester metílico con cloruro de benzoilo en piridina, condujo al correspondiente benzoil metil ester de F-6 (gráfica XXXV) que cristalizado de metanol dió un p.f.= 211-213°C; $(\alpha)_D^{20} = +76^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0,44$).

El producto F-6 se identificó como el ácido ursólico (figura IX) [lit. (215,216b): acetyl-ursolato de metilo p.f. = 244-247°C, $(\alpha)_D = +58^\circ$, benzoil ursolato de metilo p.f. = 212-213°C, $(\alpha)_D = +70^\circ$].

El ácido ursólico no había sido encontrado hasta el momento en hongos.

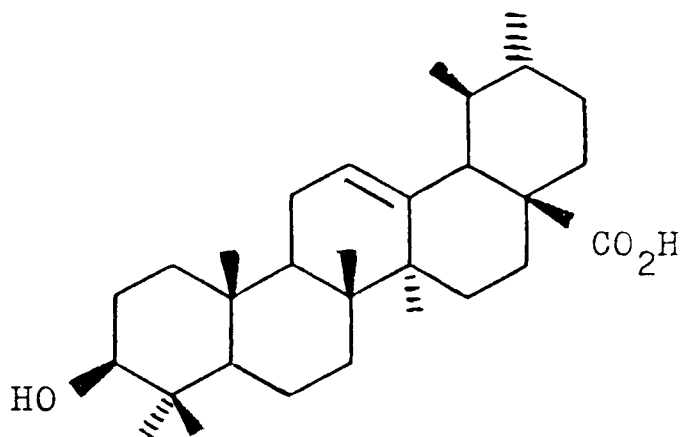


Figura IX

SUSTANCIA F-7.

El producto aparece en forma de ácido (220 mgrs.) y se purificó por cromatografía en alúmina a partir de su ester metílico.

Por cristalización en metanol, se obtuvieron agujas de p.f. = 125 - 126° C, $(\alpha)_{D}^{20} = 101^{\circ}$ (CHCl₃, c = 3.61).

El compuesto que no precipita con 2,4 dinitrofenilhidracina presenta en su espectro I.R. (gráfica XXXVI) una banda de absorción a 1725 cm⁻¹ que se asignó a ésteres metílicos.

En su espectro de RMN aparecen las siguientes señales: un singlete en 3.7 δ que integra para seis protones y se -

asignó a los metoxilos de dos ésteras metílicos, un single te en 1.25 δ con integral para seis protones correspondiente a dos metilos geminales a grupos carboxílicos y otras tres señales a 1.00, 0.97 y 0.78 δ para tres metilos.

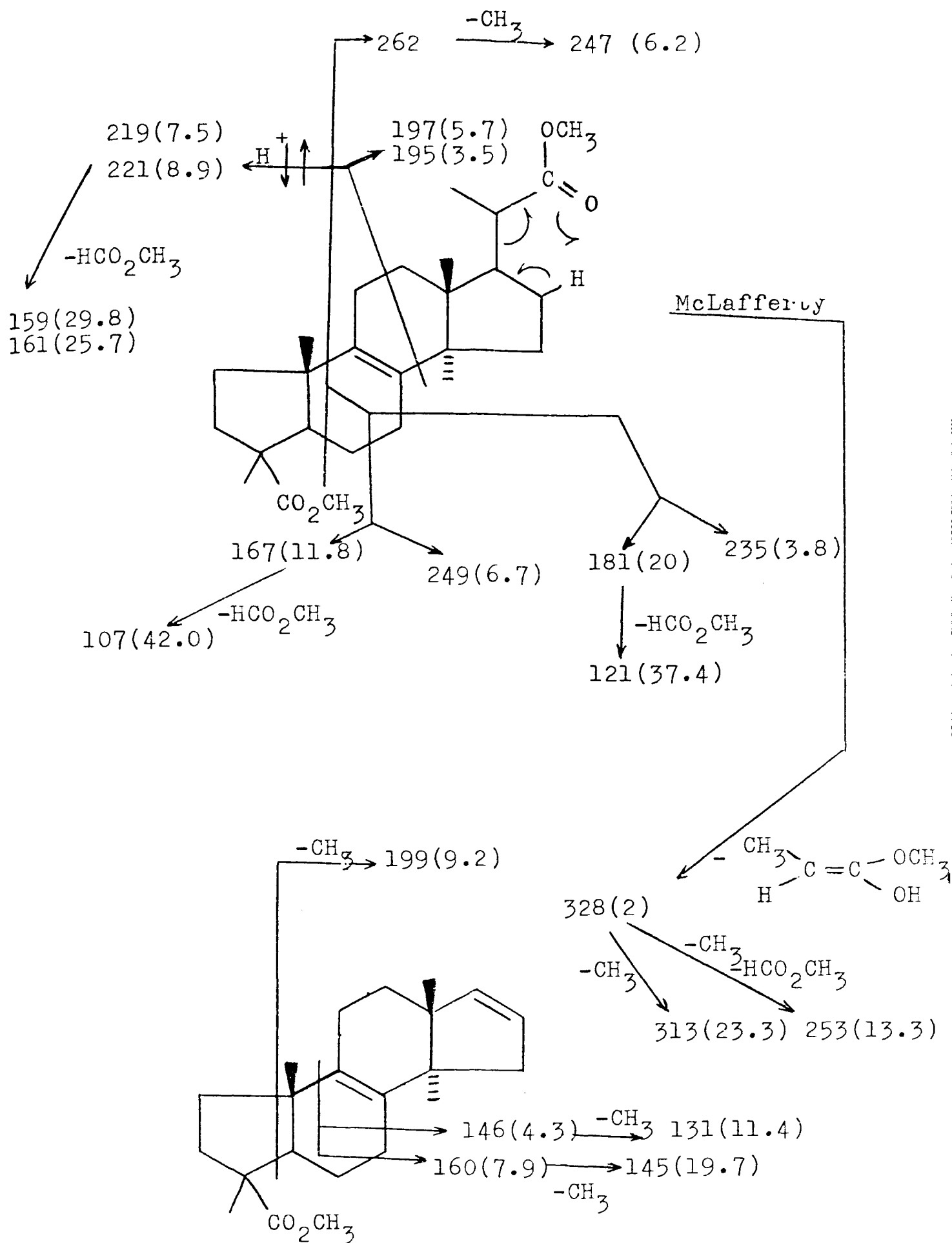
Su espectro de masas muestra las siguientes señales :
m/z (%): 416 (20.9 , $C_{26}H_{40}O_4$), 401 (67.5 , $M^+ - CH_3$), 369 (9.7 , $M^+ - CH_3 - HOCH_3$), 357 (12.1 , $M^+ - CO_2CH_3$), 341 (100 $M^+ - HCO_2CH_3 - CH_3$), 309 (20.2 , $M^+ - HOCH_3 - HCO_2CH_3 - CH_3$), 281 (10.3 , $M^+ - 2 HCO_2CH_3 - CH_3$).

El estudio del espectro de masas de este producto (figura X) da inequívocamente la posición de los grupos ester sobre el anillo A y sobre el carbono 20, este último da un claro y característico reagrupamiento de McLafferty (218 a)

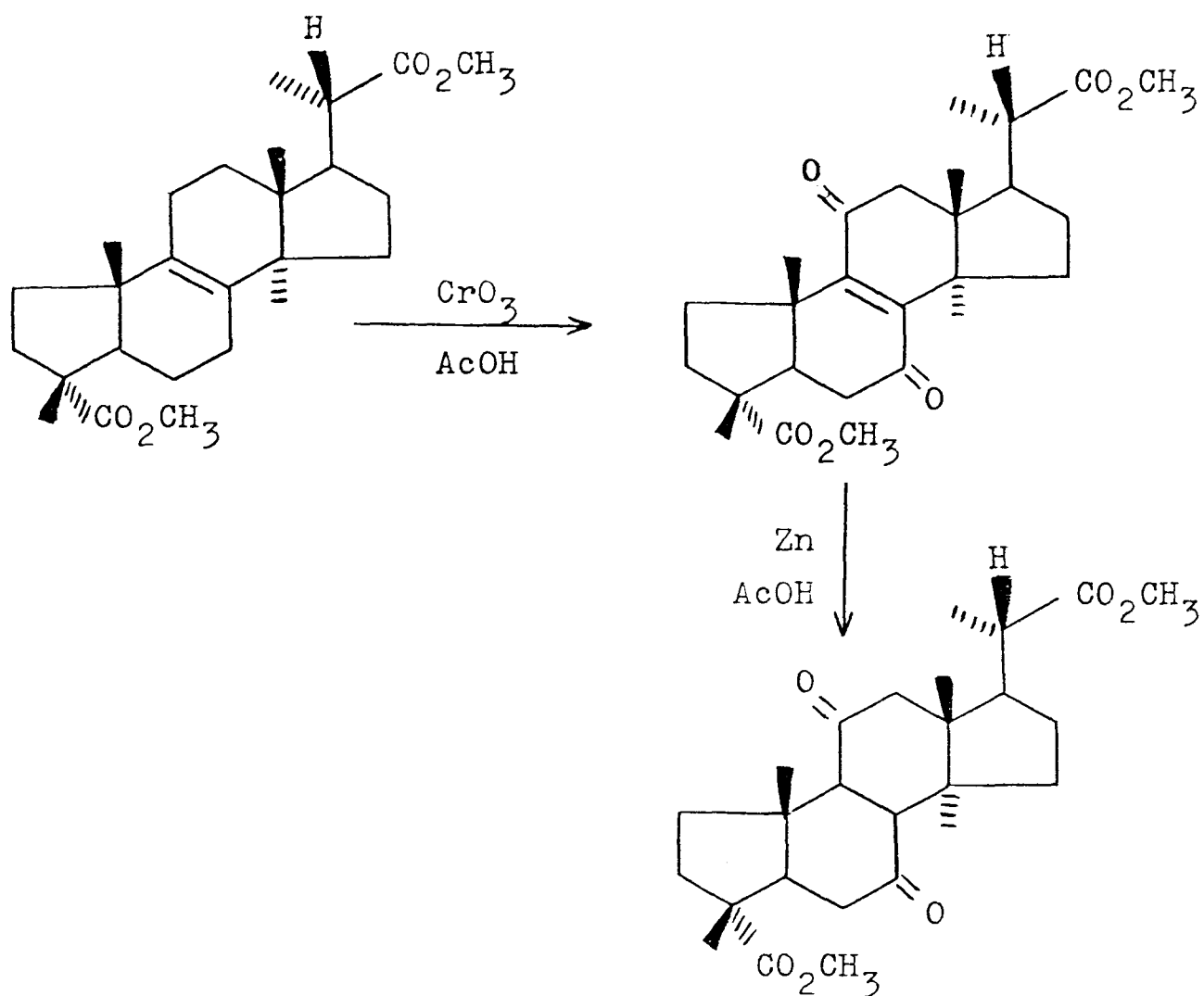
La existencia de un doble enlace cuaternario en C-8 , se comprobó al someter el producto a una oxidación alílica con trióxido de cromo en ácido acético y benceno (219) (esquema VI), se obtuvo una dicetona amarilla que se comporta como una especie químicamente pura en cromatografía de capa fina.

El espectro de IR (gráfica XXXVII) de este producto - presenta bandas de absorción a 1725 y 1668 cm^{-1} asignables a ésteres metílicos y al sistema $O=C-C=C-C=O$ respectivamente, la absorción a 1668 cm^{-1} está de acuerdo con la mostra

Figura 7.



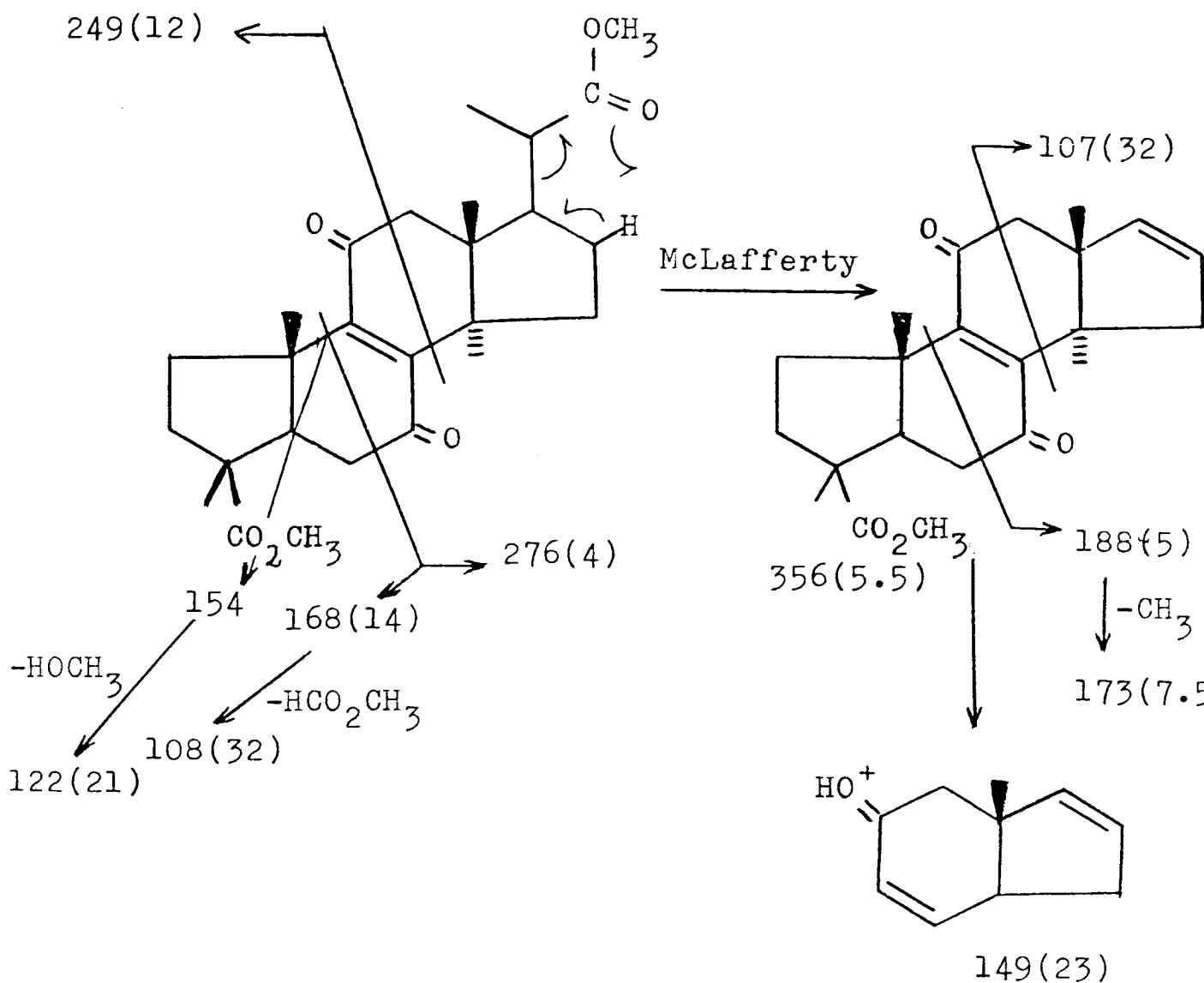
Esquema VI



da en la literatura para agrupamientos dicetónicos 7,11-dioxo-8-en en otros compuestos esteroidales (220).

Su espectro de masas muestra el ión molecular a 444 (6, $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6$), acompañado de los fragmentos: m/z (%): 429 (3, $\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 385 (2.9, $\text{M}^+ - \text{CO}_2\text{CH}_3$), 370 (2.5, $\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}_2\text{CH}_3$). Un estudio mas detallado del espectro de

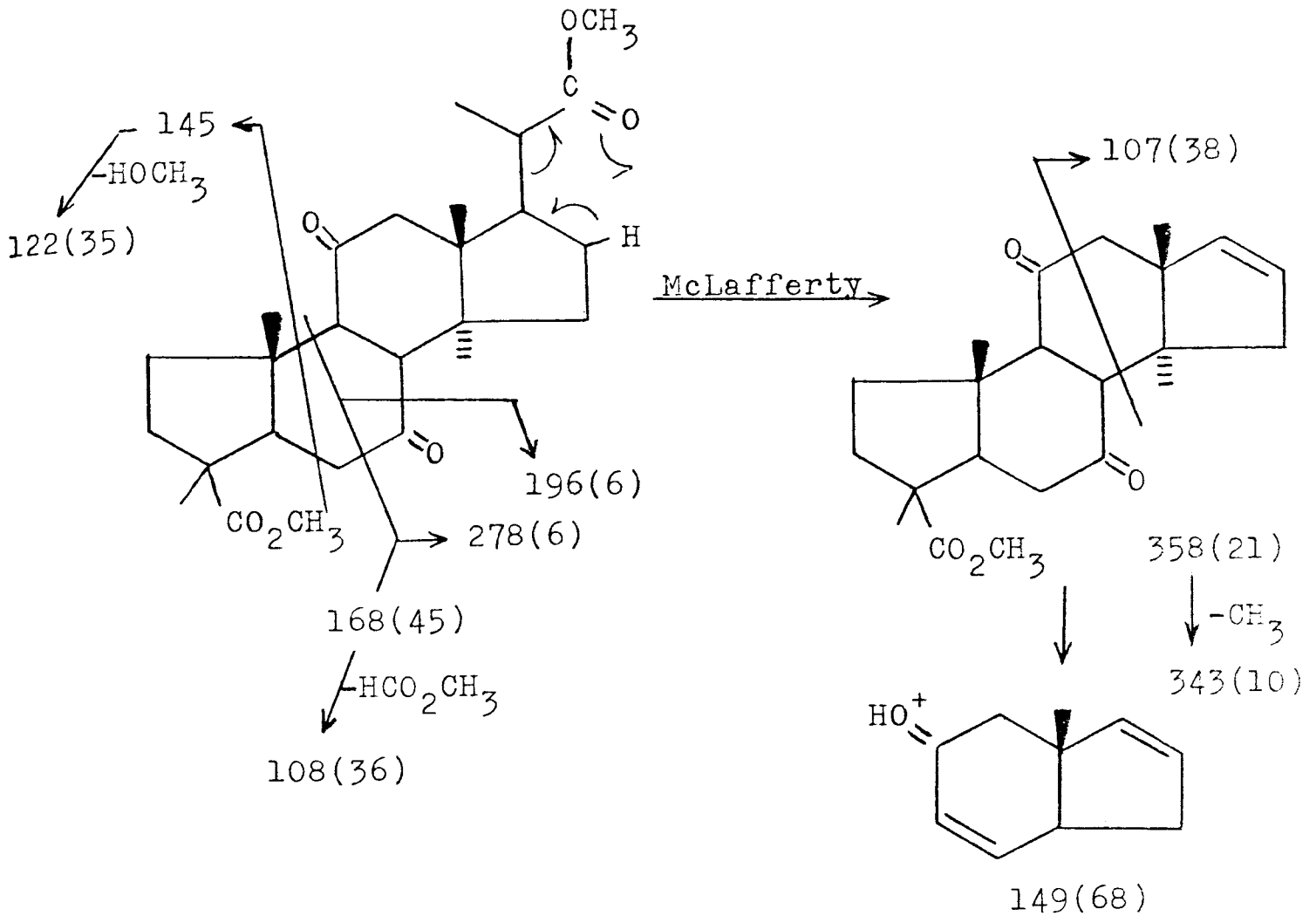
Figura XI



esta dicetona se muestra en la figura XI y coincide perfectamente con las rupturas presentadas por los 7-ceto y los 11-ceto esteroides (218 b).

Por reducción de esta dicetona con cinc en ácido acético (221) se obtuvo un producto cristalino de p.f.=185-188°C en donde se pudo observar a través del estudio de su espectro de masas (gráfica XXXVIII) la desaparición del doble en

Figura XII



lace cuaternario. Así, se observa el ión molecular a 446 (12.1, C₂₆H₃₈O₆), acompañado de las pérdidas de metilo y metanol. Un estudio más detallado de este espectro se muestra en la figura XII.

Del estudio químico y espectroscópico del producto que nos ocupa podemos sacar las siguientes conclusiones:

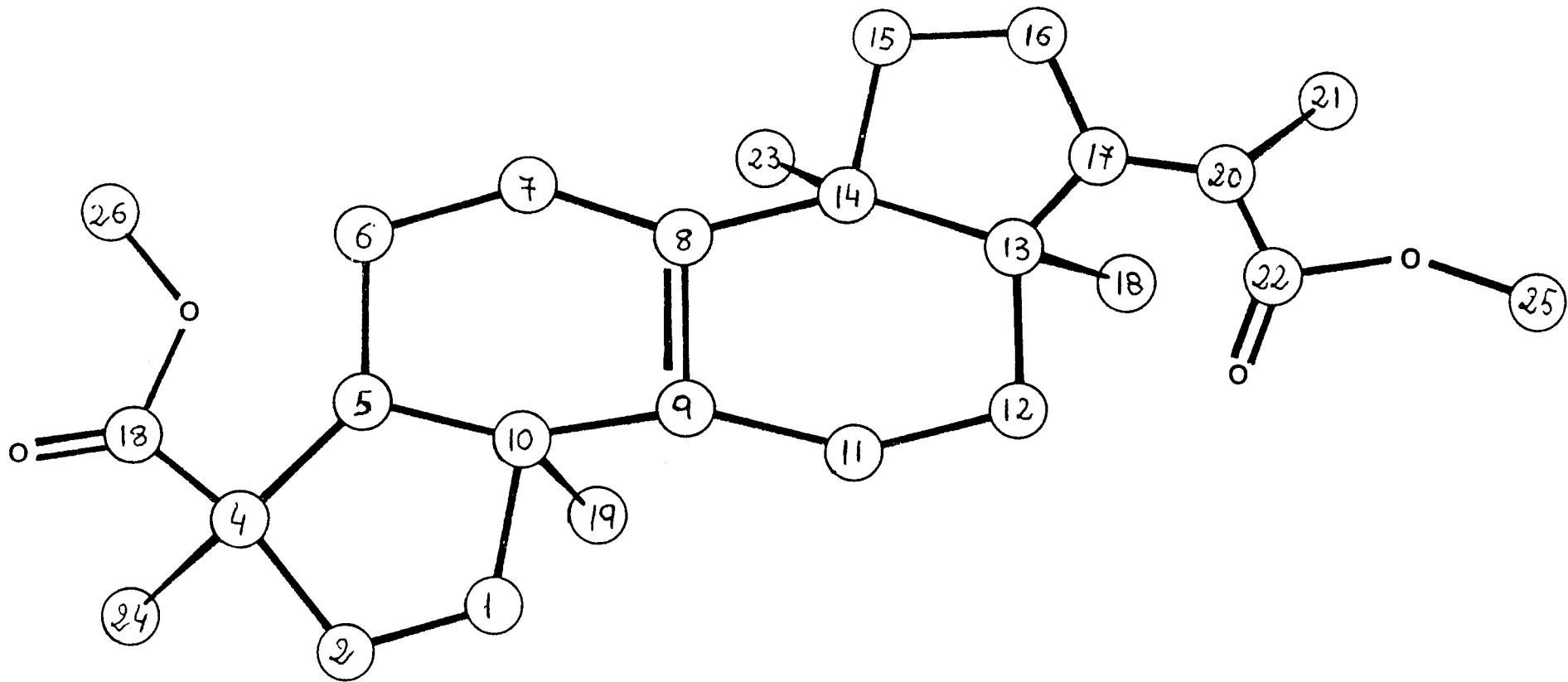
- a) Se trata de un terpenoide tetracíclico de fórmula empírica $C_{26}H_{40}O_4$.
- b) Los cuatro oxígenos de la molécula se encuentran en forma de ésteres metílicos sobre el anillo A y sobre el carbono 20.
- c) Posee un doble enlace en posición 8-9
- d) Suponemos que se trata de un producto de degradación del lanosterol.

Todo esto se confirmó mediante un estudio de difracción de rayos X. Nos encontramos ante un nuevo esqueleto carbonado derivado del lanosterol, como puede observarse en la figura XIII, la formación de este nuevo producto implica la degradación de la cadena lateral del lanosterol y la pérdida de un metileno del anillo A.

En base a todos los datos anteriores asignamos al producto F-7 la estructura $4\beta,14\alpha$ -dimetil-A-nor- 5α -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi, dándole el nombre trivial de éster dimetílico del ácido javieroico.

De lo expuesto asignamos a los derivados formados a partir del ácido javieroico las estructuras del 7,11-dioxo- $4\beta,14\alpha$ -dimetil-A-nor- 5α -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi para el producto de oxidación y la de 7,11-dioxo- $4\beta,14\alpha$ -dimetil-A-nor- 5α -pregnan-4,20-dicarbometoxi para el de reducción.

FIGURA XIII



SUSTANCIA F-8

Este producto (30 mgrs), cristaliza de n-hexano-acetona dando un p.f. = 218 - 222° C, da positiva la reacción de Liebermann-Burchard.

Su fórmula empírica $C_{23}H_{34}O_3$ fué confirmada por análisis carbono-hidrógeno (requerido C: 77,05 %, H: 9,56 % mostrado C: 76,76 %, H: 9,85 %).

El compuesto, que forma un precipitado anaranjado con 2,4 dinitrofenilhidracina, presenta en su espectro de IR (gráfica XXXIX) señales a 3500 - 2400 y a 1680 - 1700 cm^{-1} que se asignan a un ácido y a una cetona.

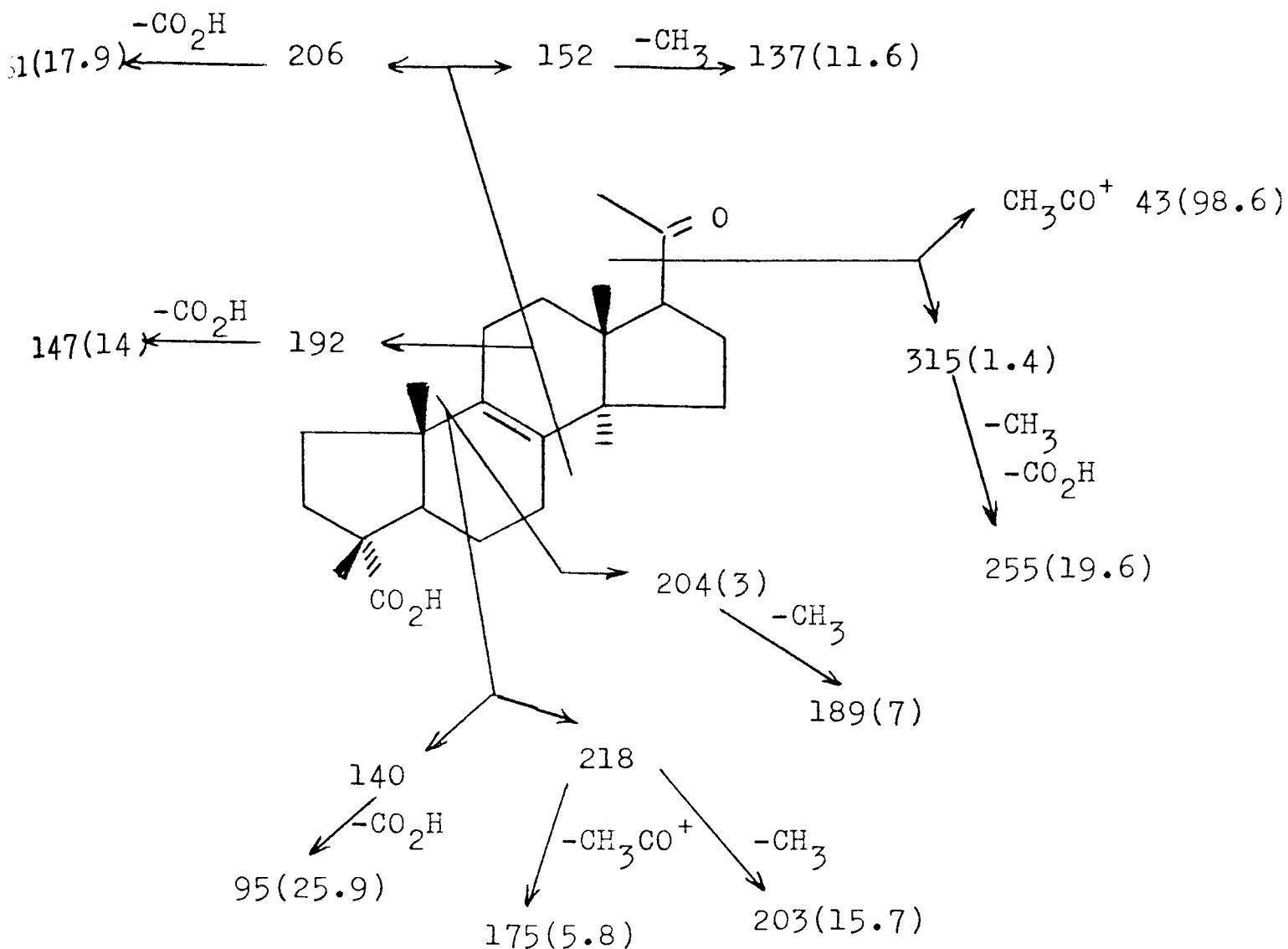
Su espectro UV presenta tres máximos de absorción a 236, 243 y 296 nm de log ϵ de 3.25, 3.26 y 3.1 respectivamente.

Su espectro de RMN, recuerda en parte el producto anterior, en él, aparecen tres singletes a 2.15, 1.25 y 0.66 δ con integral correspondiente a un metilo para cada uno de ellos y otra señal a 1.00 δ con integral para dos metilos.

La señal a 1.25 δ se asignó a un metilo geminal a un grupo carboxílico, mientras que el singlete en 2.15 δ se asignó a una metilcetona.

Su espectro de masas presenta las siguientes señales -- m/z (%): 358.2501 (19.1, $C_{23}H_{34}O_3$), 343.2299 (16, $M^+ - CH_3$), 298.2256 (22.4, $M^+ - CH_3 - CO_2H$) y 297.2218 (95.9, $M^+ - CH_3 - CO_2H$).

Figura XIV



El espectro de masas de nuestro producto fué comparado con el del 5α -pregnan-20-ona y con el de su 17α isómero (217), - - coincidiendo con ellos en las rupturas de la metilcetona y de los anillos C y D.

En la figura XIV se muestra un estudio de este espectro

(todas las rupturas han sido confirmadas por espectrometría de masas de alta resolución), las fragmentaciones observadas hacen situar la metilcetona en posición 20 y el grupo carboxi sobre el anillo A del ciclo esteroideal.

A esta sustancia le hemos asignado la estructura del ácido 20-oxo-4 β ,14 α -dimetil-A-nor-5 α -pregnen-8-en-4-oico (ácido phellínico) por analogía con el compuesto 4 β ,14 α -dimetil-A-nor-5 α -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi estudiado anteriormente y por razones biogénicas.

PARTE EXPERIMENTAL

ESTUDIO DEL HONGO PHELLINUS POMACEUS

El hongo *Phellinus pomaceus* es un hongo perenne de consistencia leñosa perteneciente a la familia de las Polyporaceas, clase Basidiomycetes, que se encuentra parásito sobre troncos de planifolios.

El hongo fue recogido en el Bailadero (isla de Tenerife) en el mes de agosto.

EXTRACCION

15 kgr de hongo reducido a serrín se dejaron en maceración durante un mes en etanol, pasado este tiempo se extrajo con etanol en caliente.

El extracto se concentró y se extrajo de agua con cloroformo, la fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se percoló a través de alúmina de actividad III. El filtrado se concentró para dar 151 grs de extracto que se cromatografiaron a través de 5 kgr de gel de sílice eluyendo con n-hexano y mezclas de n-hexano y acetato de etilo.

Sustancia F-1: friedelina

La separación de los productos F-1 y F-2, obtenidos del material insaponificable de las primeras fracciones de la cromatografía general, se realizó por cromatografía en columna de gel de sílice impregnada en nitrato de plata.

El producto F-1 (220 mgr) cristalizó como agujas de p.f.= 258°C, $(\alpha)_D^{20} = -35^\circ$ (CHCl_3 , $c = 2.26$) (gráfica --- XXIV).

MS, m/z (%): 426.3855 (21.2 , $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$), 411 (20.8 , $\text{M}^+ - \text{CH}_3$)

IR (cm^{-1}): 1700 (cetona), 1455, 1390.

Reducción de friedelina

100 mgr friedelina disueltos en 30 ml de eter con 100 mgr de LiAlH_4 se calentaron a reflujo durante dos horas. El exceso de reactivo se destruyó con acetato de etilo, se añadió agua y se extrajo con eter.

Se obtuvieron dos productos que se separaron por cromatografía en columna de gel de sílice impregnada en nitrato de plata.

a) epifriedanol (β -OH), se obtuvieron 65 mgr de producto de p.f.= 278-279°C, $(\alpha)_D^{20} = +20^\circ$ (Cl_4C , $c = 0.3$) - (gráfica XXV).

MS, m/z (%): 428 (9.7 , $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}$), 413 (15.3 , $\text{M}^+ - \text{CH}_3$),
395 (9.5 , $\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$).

b) friedanol (α -OH) se obtuvieron 20 mgr de producto de p.f.= 305°C, $(\alpha)_D^{20} = +14^\circ$ (Cl_4C , $c = 0.2$) (gráfica XXV).

MS, m/z (%): 428 (13.8 , $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}$), 413 (37.5 , $\text{M}^+ - \text{CH}_3$),
395 (11.2 , $\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$)

Sustancia F-2: taraxerol

Cristalizó en forma de placas de p.f.= 278-282°C, -
 $(\alpha)_D^{20} = +14^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.6$) (gráfica XXVI).

MS, m/z (%): 426.3856 (42.3 , $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$), 411 (24.8 , $\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 302 (98 , $\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{16}$), 287 (63.6 , $\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{16} - \text{CH}_3$), 269 (24.9 , $\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{16} - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$)
204 (100 , $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$), 189 (16.7 , $\text{M}^+ - \text{C}_{15}\text{H}_{25} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$).

donde los fragmentos de masa 302, 287 y 269 son consecuencia de una RDA en el anillo D y los picos a 204 y 189 corresponden a las rupturas de los enlaces $\text{C}_8 - \text{C}_{14}$ y $\text{C}_{11} - \text{C}_{12}$.

IR (cm^{-1}): 3605-3460 (hidroxilo).

RMN (δ): 5.54 (m , 1H, Δ^{14}), 3.2 (1H, R_2CHOH).

La acetilación del producto (Ac_2O , piridina, 20°C, - 24 horas) condujo a un monoacetato de p.f.= 295°C, $(\alpha)_D^{20} = +15^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1.1$) (gráfica XXVII).

MS, m/z (%): 468 (39.8 , $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$), 453 (21.2 , $\text{M}^+ - \text{CH}_3$),
393 (7.8 , $\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{AcOH}$), 344 (95 , $\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{16}$), 329 (39.7 , $\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{16} - \text{CH}_3$), 269 (33.4 , $\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{16} - \text{CH}_3 - \text{AcOH}$), 204 (100 , $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$).

IR (cm^{-1}): 1725, 1265 (acetato).

RMN (δ): 5.54 (m, 1H, Δ^{14}), 4.48 (1H, R_2CHOAc), 2.02 (s, 3H, $\text{R}_2\text{HCOCOCH}_3$).

Sustancia F-3: ergosta-7,22-dien-3-ona

Sólido blanco (140 mgr) que cristalizó de metanol - como placas de p.f. = 179-180°C, $(\alpha)_D^{20} = +9$ (CHCl_3 , $c=2.44$)

Sustancia F-4: mezcla de ácidos palmítico (12.51) y oleico (87.49)

Se obtuvo como un aceite (70 mgr) (gráfica XXVIII).

MS, m/z (%): 282 (14.3, $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$) ácido oleico y 256 (63.2, $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$) ácido palmítico.

IR (cm^{-1}): 3600-2500 y 1700 (ácido), 725 (cadena larga).

RMN (δ): 5.3 (t, $J=6$, RHC=CHR), 1.2 (s, CH_2).

La metilación de F-4 (diazometano, eter, 0°C) condujo a una mezcla que por análisis de GLC [OV-1 (1%), $T_f=200^\circ\text{C}$, flujo = 30 ml de helio/min.] mostró estar formada por dos productos, cuyas intensidades relativas 12.51 y 87.49 correspondían a tiempos de retención de 6.86 y 9.31 min. (gráfica XXIX).

Los dos productos fueron identificados en GLC por comparación con muestras comerciales como palmitato y oleato de metilo.

MS, m/z (%): 296 (2.2, $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$), 270 (4.1, $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$).

IR (cm^{-1}): 1730, 1260 (ester).

RMN (δ): 5.3 (t, $J=6$, $\text{RHC}=\text{CHR}$), 3.61 (s, RCO_2CH_3), 2.33 (c, $J=8$, $\text{RCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$).

Sustancia F-5: ácido β -boswéllico

El producto se purificó a partir de su acetyl metil ester por cromatografía en gel de sílice impregnada en nitrato de plata, la separación se siguió por GLC, se obtuvieron 32 mgr de producto de p.f.=189-192°C, $(\alpha)_D^{20} = +68^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.3$) (gráfica XXX).

MS, m/z (%): 512 (8.3, $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_4$), 452 (12.1, $\text{M}^+ - \text{AcOH}$)
437 (100, $\text{M}^+ - \text{AcOH} - \text{CH}_3$), 377 (23.2, $\text{M}^+ - \text{AcOH} - \text{CH}_3 - \text{HCO}_2\text{CH}_3$), 353 (13.6, $\text{M}^+ - \text{AcOH} - \text{CH}_3 - \text{C}_6\text{H}_{12}$).

donde la pérdida de C_6H_{12} proviene de la eliminación del anillo E.

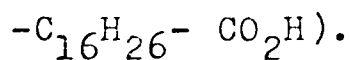
IR (cm^{-1}): 1725, 1265 (ester y acetato).

RMN (δ): 4.88 (m, 1H, Δ^{12}), 3.7 (s, 3H, RCO_2CH_3), 2 (s, 3H $\text{R}_2\text{H}-\text{COCOCH}_3$).

Por hidrólisis alcalina con NaOH metanólica al 10 % se obtuvieron dos productos.

a) ácido β -boswéllico (gráfica XXXI).

MS, m/z (%): 456 (32, $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$), 441 (16.4, $\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 423 (15.9, $\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$), 357 (92.3, $\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{C}_6\text{H}_{12}$), 311 (78.1, $\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{C}_6\text{H}_{12} - \text{H}_2\text{CO}_2$), 203 (11.1, $\text{C}_{16}\text{H}_{26} - \text{CH}_3$), 193 (14.9, $\text{M}^+ - \text{CH}_3$).



donde las fragmentaciones a 357 y 311 u.m. corresponden a la eliminación del anillo E y los iones a 203 y 193 u. m. a una retro Diels Alder producida a partir del doble enlace en posición 12, con ruptura de los enlaces C_9-C_{11} y C_8-C_{14} . (La pérdida de ácido como CO_2H_2 , poco frecuente en ácidos normales, se presenta con asiduidad en tri-terpenos que poseen el agrupamiento 4-metil-4-carboxi).

b) metil ester del ácido β -boswéllico, p.f.=192-194°
 $(\alpha)_D^{20} = +100^\circ$ ($CHCl_3$, c = 0.2) (gráfica XXXII).

MS, m/z (%): 470 (15.9, $C_{31}H_{50}O_3$), 455 (7.8, $M^+ - CH_3$),
 437 (6.7, $M^+ - CH_3 - OH$).

IR (cm^{-1}): 3520 (hidroxilo), 1715 (ester).

RMN (δ): 4.88 (m, 1H, Δ^{12}), 3.69 (s, 3H, RCO_2CH_3), 1.25
 (s, 3H, $CH_3CR_2CO_2CH_3$).

Sustancia F-6: ácido ursólico

Se purificó a partir de su acetil metil ester, se -
 obtuvo un producto de p.f.=245-247°C, $(\alpha)_D^{20} = +56^\circ$ ($CHCl_3$
 c = 4.88) (gráfica XXXIII).

MS, m/z (%): 512 (3.2, $C_{33}H_{52}O_4$), 452 (15.1, $M^+ - AcOH$)
 437 (2.8, $M^+ - AcOH - CH_3$).

IR (cm^{-1}): 1715 y 1250 (ester acetato).

RMN (δ): 5.27 (t, J=4.5, 1H, Δ^{12}), 4.53 (t, J=9, 1H,
 R_2HCOAc), 3.62 (s, 3H, RCO_2CH_3), 2.05 (s, 3H,
 $R_3COCOCH_3$)

Por hidrólisis alcalina con NaOH metanólico al 10% se obtuvieron dos productos:

a) ácido ursólico (gráfica XXXIV)

MS, m/z (%): 456 (2.7 , C₃₀H₄₈O₃), 248 (100 , C₁₆H₂₄O₂) ,
208 (10.7 , C₁₄H₂₄O), 203 (63.7 , C₁₆H₂₄O₂ -
CO₂H), 190 (14.9 , C₁₄H₂₄O - H₂O).

donde los iones a 248 y 208 u.m. se originan por retro-Diels Alder a partir del doble enlace en posición 12, con ruptura de los enlaces C₉-C₁₁ y C₈-C₁₄.

b) éster metílico del ácido ursólico, este se trató con cloruro de benzoilo en piridina a temperatura ambiente durante 24 horas, para dar el benzoil ursolato de metilo de p.f.= 211-213°C, (α)_D²⁰ = +76° (CHCl₃, c = 0.44) (gráfica XXXV).
IR (cm⁻¹): 1715 (éster), 1600 (arilo), 1280 (benzoato).
RMN (δ): 7.2 (5H, arilo), 5.28 (t, J=4.5, 1H, Δ¹²), 4.75 (t, J=9, 1H, R₂HCOBz), 3.62 (s, 3H, RCO₂CH₃).

Sustancia F-7: éster dimetílico del ácido javieroico: 4β,14α dimetil-A-nor-5α-pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi.

Se purificó por cromatografía en alúmina a partir de su éster metílico, se obtuvieron 220 mgrs de producto, que cristalizó de metanol como agujas de p.f.= 125-126°C, (α)_D²⁰ = 101° (CHCl₃, c = 3.61) (gráfica XXXVI).

MS, m/z (%): 416 (20.9 , C₂₆H₄₀O₄), 401 (67.5 , M⁺ - CH₃) ,
 357 (12.1 , M⁺ - CO₂CH₃), 341 (100 , M⁺ - HCO₂CH₃ -
 -CH₃), 313 (23.3 , M⁺ - CH₃-CH₃CH = C-OCH₃)
_|
_{OH}
 281 (10.3 , M⁺ - 2 HCO₂CH₃-CH₃).

IR (cm⁻¹): 1725 (ester metílico).

RMN (δ): 3.7 (s, 6H, 2 RCOCH₃), 2.8 (m, 1H, C₅-H), 2.5 (m,
 R₂CHCO₂CH₃), 1.25 (s, 6H, 2 CH₃CR₂CO₂R'), 1.00 (s,
 3H, CH₃), 0.97 (s, 3H, CH₃), 0.78 (s, 3H, CH₃).

Oxidación alílica del ester dimetílico del ácido javieroico.

Como reactivo para la oxidación se utilizó una disolución saturada de trióxido de cromo en ácido acético:agua (90:10).

120 mgrs del producto F-7 se disolvieron en benceno y se añadió el reactivo, la mezcla se dejó reaccionar con agitación a temperatura ambiente durante 24 horas (219), pasado este tiempo se neutralizó con una disolución saturada de bicarbonato sódico y se extrajo con benceno, la fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se filtró a través de alúmina.

Se obtuvo un único producto (110 mgrs) que fué identificado como el 7,11-dioxo-4β,14α-dimetil-A-nor-5α-pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi (gráfica XXXVII).

MS, m/z (%): 444 (6 , $C_{26}H_{36}O_6$), 429 (3 , $M^+ - CH_3$), 385
(2.9 , $M^+ - CO_2CH_3$), 370 (2.5 , $M^+ - CH_3 - CO_2CH_3$).

IR (cm^{-1}): 1725 (ester), 1668(dicetona).

RMN (δ): 3.68 (s, 6H, 2 RCO_2CH_3), 2.5 (m, $R_2CHCO_2CH_3$), 1.25
1.21 y 1.18 (15H, 5 CH_3).

Hidrogenación del 7,11-dioxo-4 β ,14 α -dimetil-A-nor-5 α -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi.

110 mgrs de producto se trataron con 10 ml de ácido acético y 0.7 grs de cinc en polvo durante una hora (221). El ácido acético se eliminó a vacío y el producto de reacción se filtró a través de gel de sílice.

Se obtuvo un único compuesto que se identificó a partir de sus datos espectroscópicos como el 7,11-dioxo-4 β ,14 α -dimetil-A-nor-5 α -pregnen-4,20-dicarbometoxi (gráfica - - XXXVIII).

MS, m/z (%): 446 (12.1 , $C_{26}H_{38}O_6$), 431 (9 , $M^+ - CH_3$), 415
(19.2 , $M^+ - CH_3O$), 386 (25.3 , $M^+ - HCO_2CH_3$),
358 (21 , $M^+ - CH_3CH=C(OH)OCH_3$)

RMN (δ): 3.68 (s, 6H, 2 RCO_2CH_3), 1.25 y 1.20 (15 H, 5 CH_3)

Sustancia F-8: ácido phellínico: ácido 20-oxo-4 β ,14 α -dimetil-
A-nor-5 α -pregnen-8-en-4-oico.

El producto (30 mgrs) dió un p.f.= 218-222°C (gráfica
XXXIX).

MS, m/z (%): 358.2501 (19.1 , C₂₃H₃₄O₃), 343.2299 (16 , M⁺-
CH₃), 298.2256 (22.4 , M⁺- CH₃- CO₂H), 297.2218
(95.9 , M⁺- CH₃- CO₂H₂), 255 (19.6 , M⁺- CH₃CO-
- CH₃- CO₂H).

Análisis:

Hallado.....C=76.76 H=9.85

Calculado para C₂₃H₃₄O₃:C=77.05 H=9.56

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ): 236 (3.25), 243 (3.26), 296 (3.1).

IR (cm⁻¹): 3500-2400, 1680-1700 (ácido y cetona).

RMN (δ): 2.9 (t, J=9, C₅-H), 2.15 (s, 3H, CH₃COR), 1.25 (s,
3H, CH₃), 1.00 (s, 6H, 2 CH₃) y 0.66 (s, 3H, CH₃).

ESPECTROS

INDICE DE ESPECTROS

- Grafica I: linoleato de etilo.
- Gráfica II: ergosta-7,22-dien-3-ona
- Gráfica III: ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.
- Gráfica IV: mezcla de ácidos docosanoico, tricosanoico, tetracosanoico, pentacosanoico y hexacosanoico.
- Gráfica V: mezcla de docosanoato de metilo, tricosanoato de metilo, tetracosanoato de metilo, pentacosanoato de metilo y hexacosanoato de metilo.
- Gráfica VI: mezcla de docosanoato de etilo, tricosanoato de etilo, tetracosanoato de etilo, pentacosanoato de etilo y hexacosanoato de etilo.
- Gráfica VII: mezcla de ergosta-7,22-dien-3 β -ol y ergosta-7-en-3 β -ol.
- Gráfica VIII: mezcla de ergosta-7,22-dien-3 β -acetoxi y ergosta-7-en-3 β -acetoxi.
- Gráfica IX: ergosta-7-en-3 β -acetoxi.
- Gráfica X: ergosta-8(14)-en-3 β -acetoxi.
- Gráfica XI: mezcla de peróxido de ergosterol y de su 9(11)dehidroderivado.
- Gráfica XII: mezcla de acetatos del peróxido del ergosterol y de su 9(11)dehidro derivado.
- Gráfica XIII: peróxido de ergosterol procedente de la fotooxidación del ergosterol con extracto del hongo G. australe.
- Gráfica XIV: ergosterol.

Gráfica XV: ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona sintética.

Gráfica XVI: ergosta-4,7,22-trien-3-ona.

Gráfica XVII: ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -acetoxi.

Gráfica XVIII: peróxido del ergosterol sintético.

Gráfica XIX: acetato del peróxido del ergosterol.

Gráfica XX: acetato del 9(11) dehidro peróxido del ergosterol

Gráfica XXI: ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.

Gráfica XXII: ergosta-7,22-dien-3 β -ol sintético

Gráfica XXIII: ergosta-7,22-dien-3 β ,5 α -diol.

Gráfica XXIV: friedelina.

Gráfica XXV: friedanol y epifriedanol.

Gráfica XXVI: taraxerol.

Gráfica XXVII: acetato del taraxerol.

Gráfica XXVIII: mezclas de ácidos palmitico y oleico.

Gráfica XXIX: mezcla de palmitato de metilo y de oleato de me
tilo.

Gráfica XXX: acetyl metil ester del ácido β -boswéllico.

Gráfica XXXI: ácido β -boswéllico.

Gráfica XXXII: ester metílico del ácido β -boswéllico.

Gráfica XXXIII: acetyl ursolato de metilo.

Gráfica XXXIV: ácido ursólico.

Gráfica XXXV: benzoil ursolato de metilo.

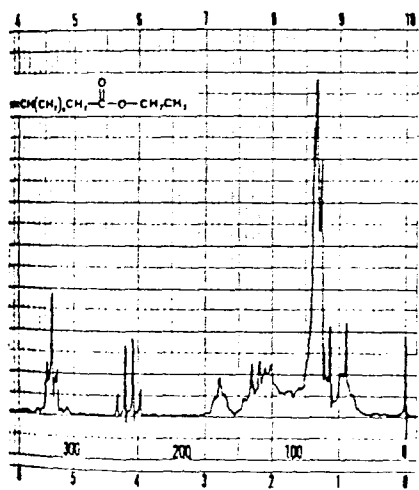
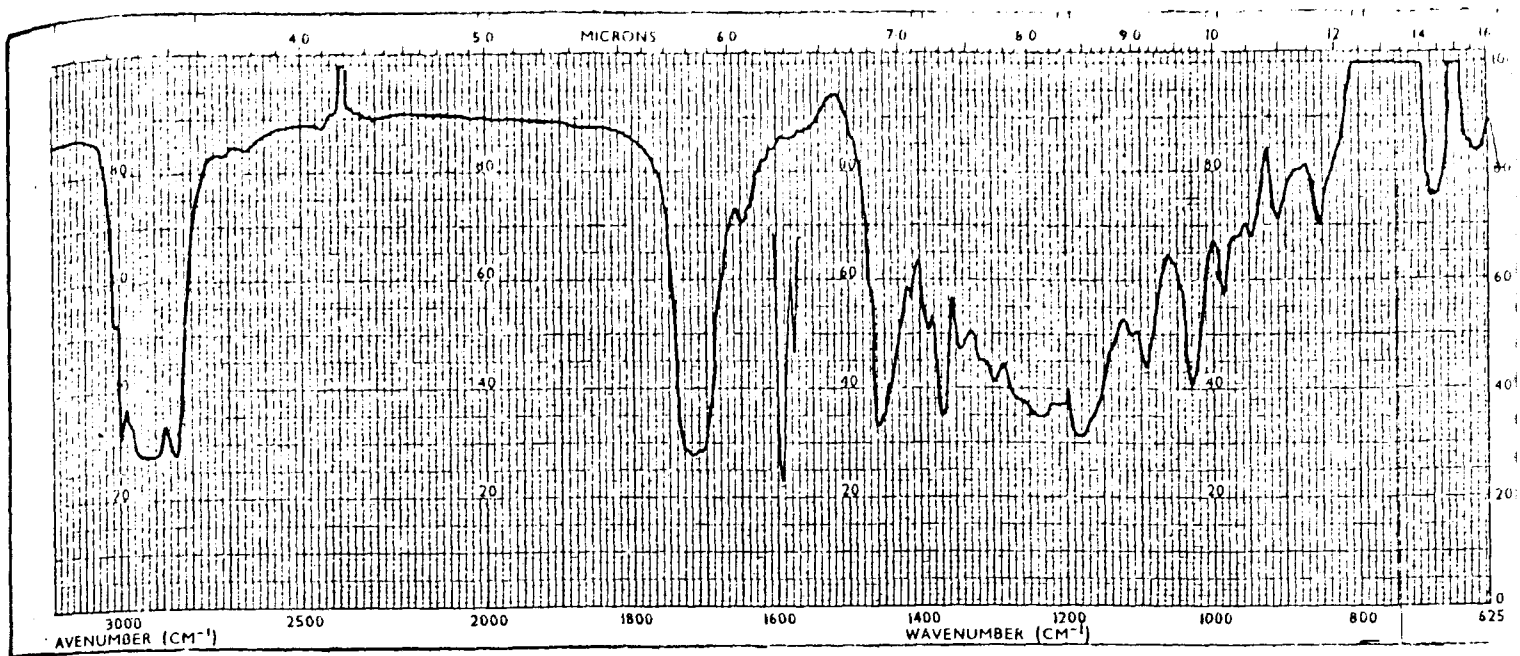
Gráfica XXXVI: ester dimetílico del ácido javieroico: 4 β ,14 α -
dimetil-A-nor-5 α -pregnen-8-en-4,20-dicarbome-
toxi.

Gráfica XXXVII: 7,11-dioxo-4 β ,14 α -dimetil-A-nor-5 α -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi.

Gráfica XXXVIII: 7,11-dioxo-4 β ,14 α -dimetil-A-nor-5 α -pregnan-4,20-dicarbometoxi.

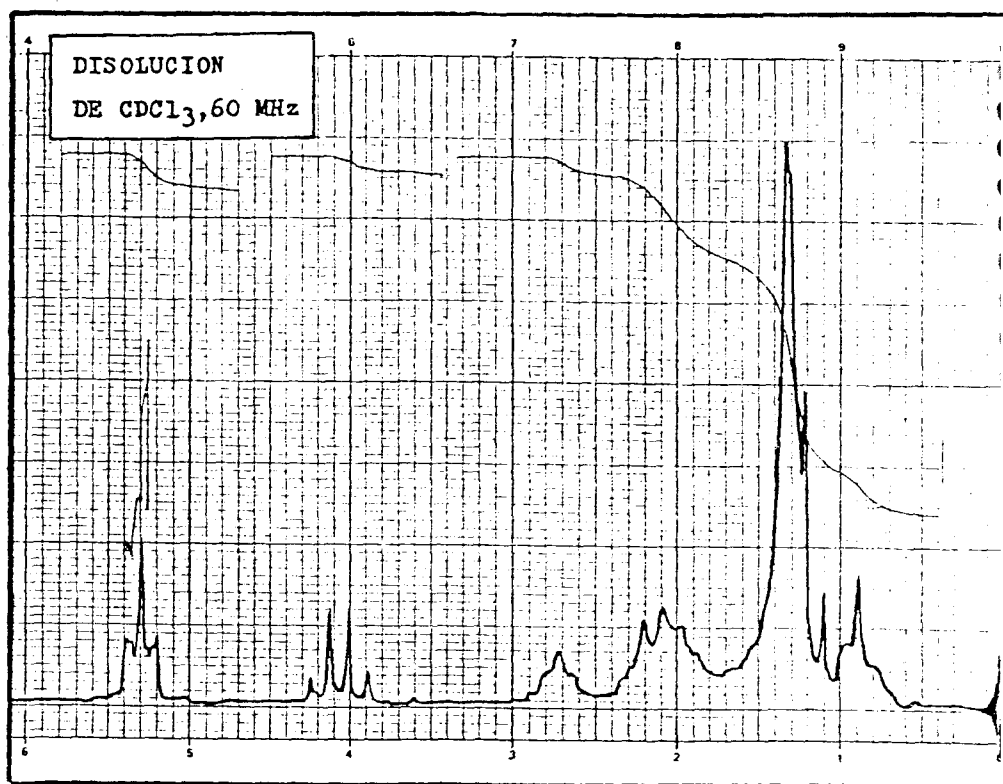
Gráfica XXXIX: ácido phellínico: 20-oxo-4 β ,14 α -dimetil-A-nor-5 α -pregnen-8-en-4-oico.

Gráfica XL: estigmastenona y α -estigmasterol.



LINOLEATO DE ETILO(98%)
 $n_D^{20} = 1.4600$

(COLECCION ALDRICH)

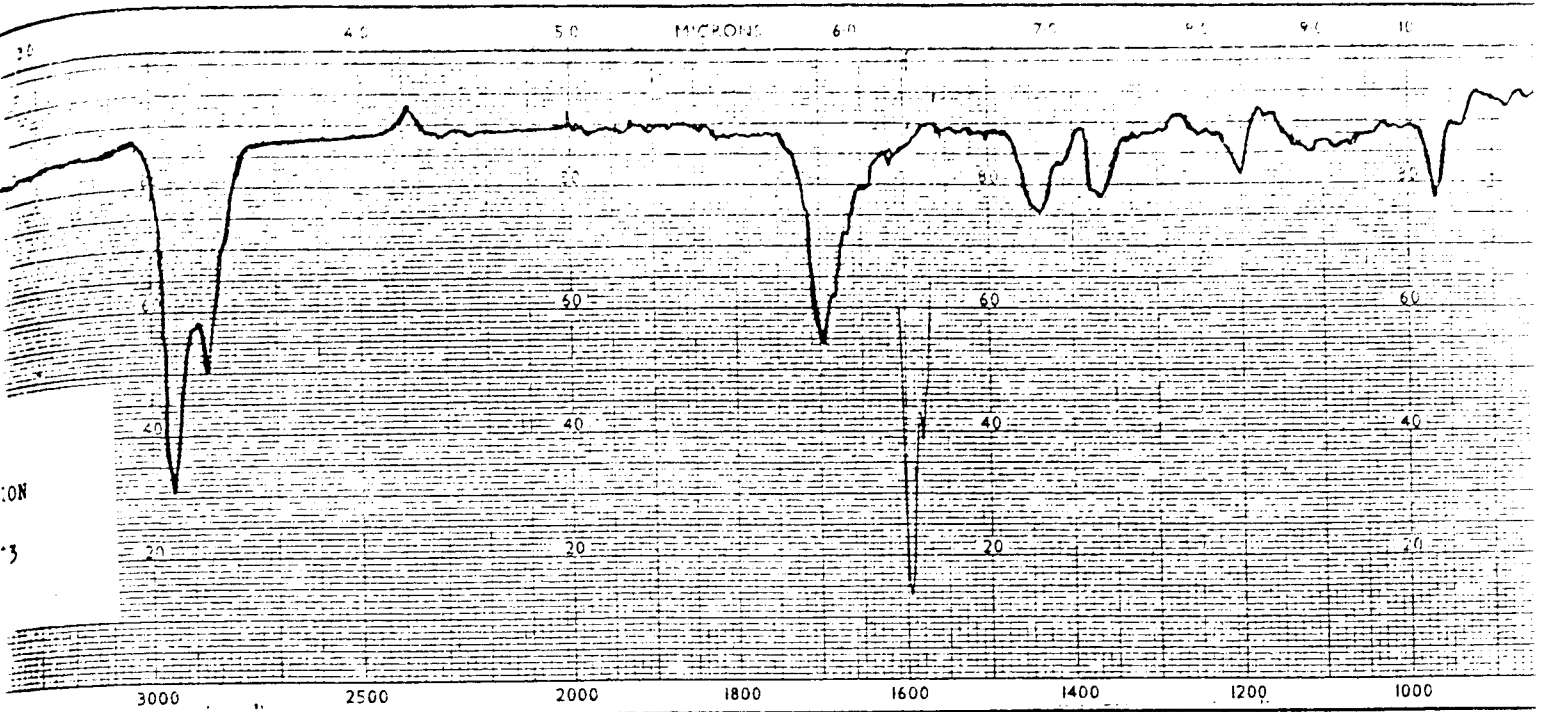


LINOLEATO DE ETILO(95%)(NUESTRO PRODUCTO)

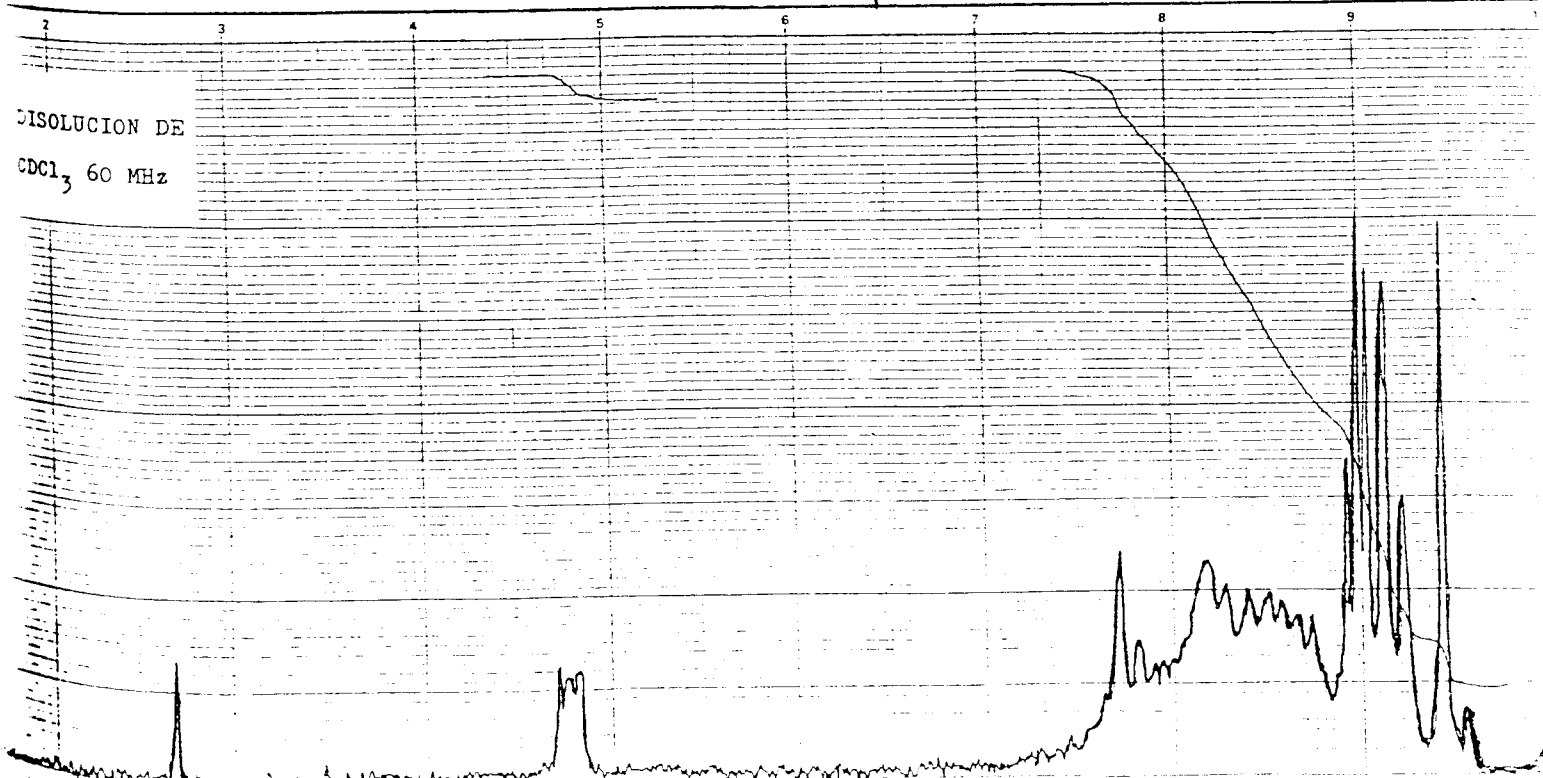
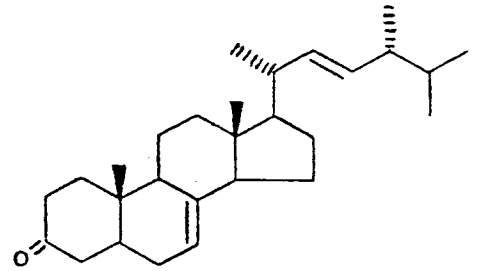
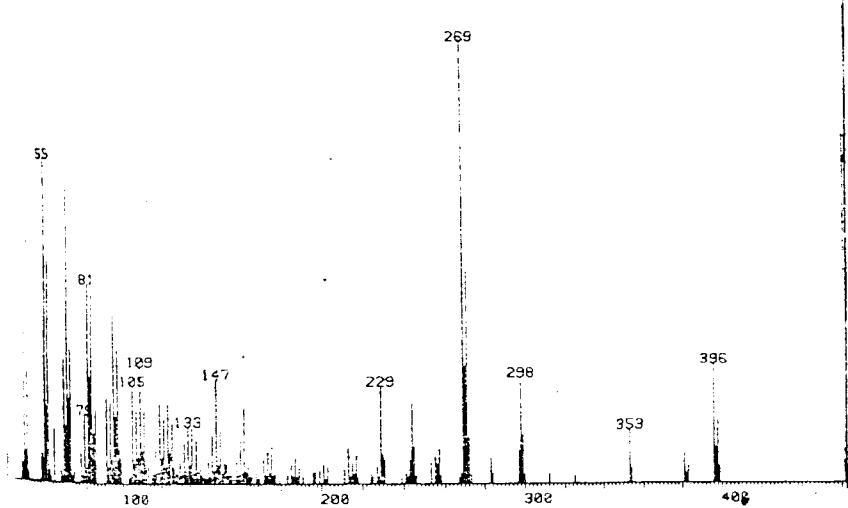
$n_D^{20} = 1.4593$ P.eb.190-192°/6mm Hg



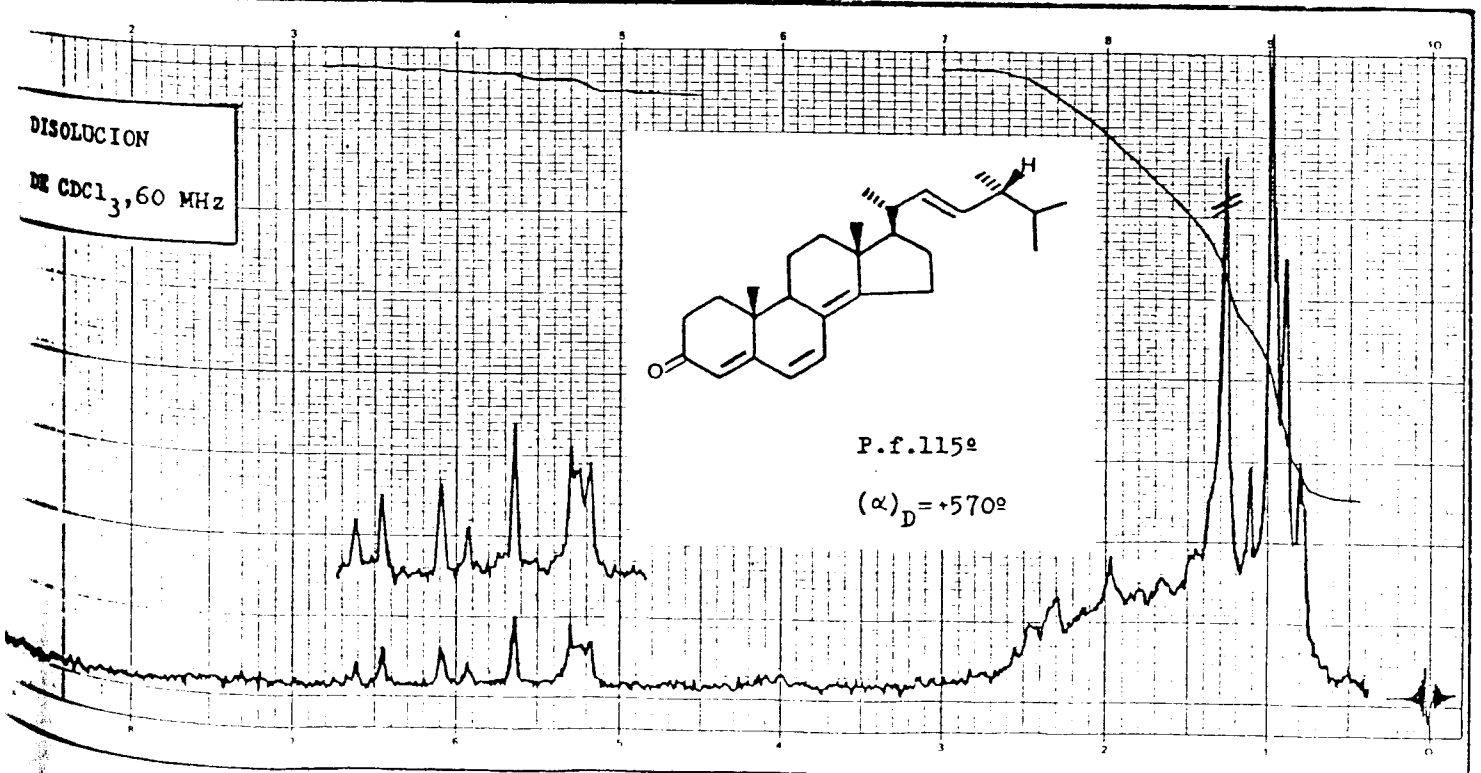
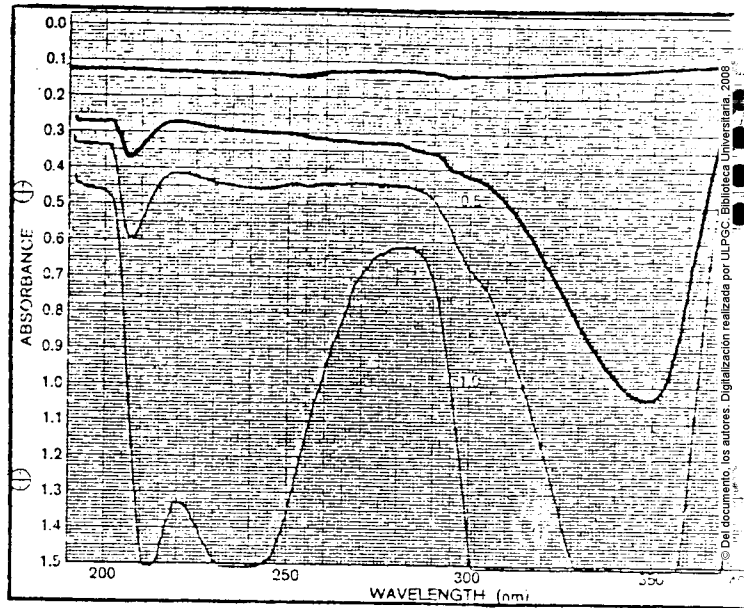
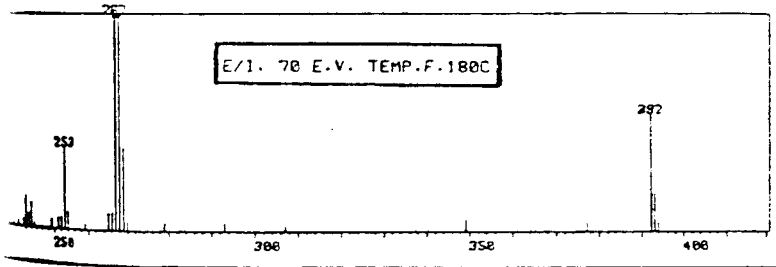
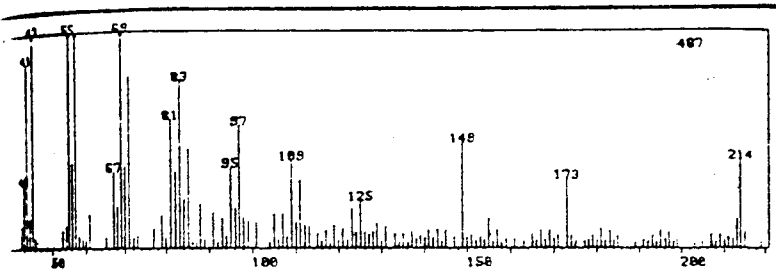
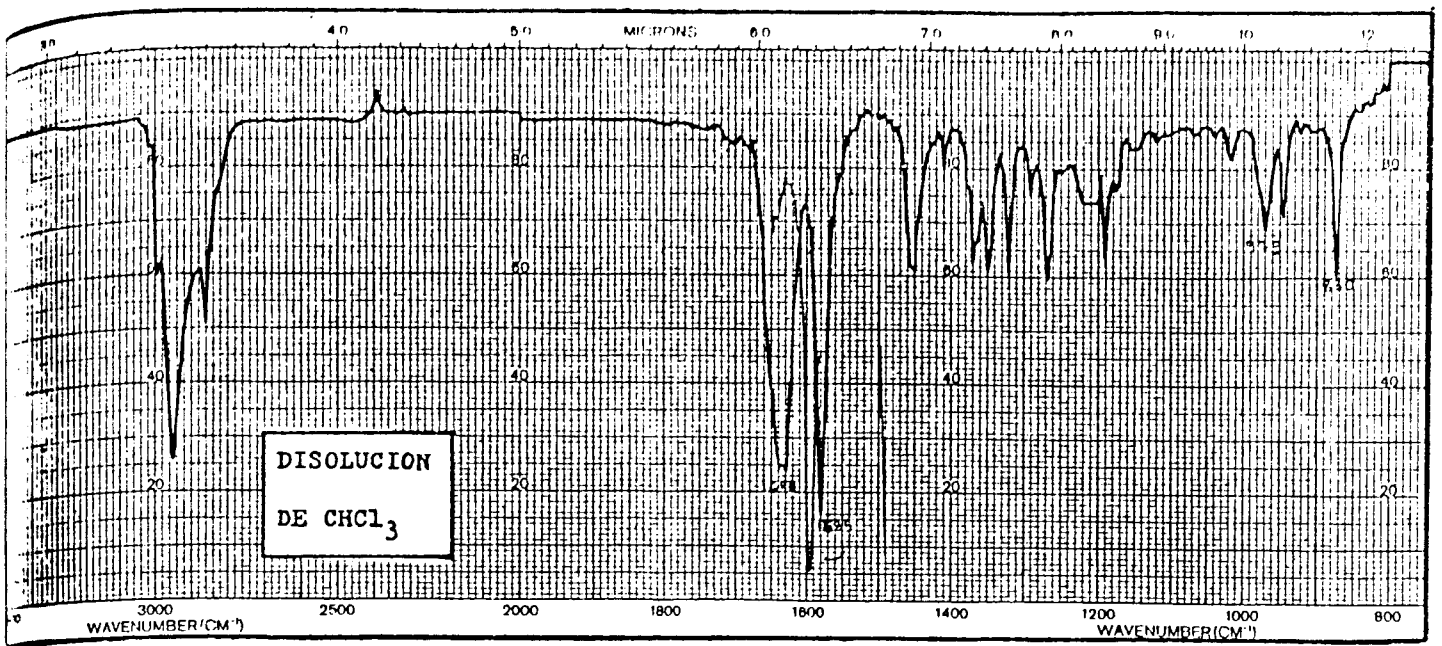
GRAFICA II

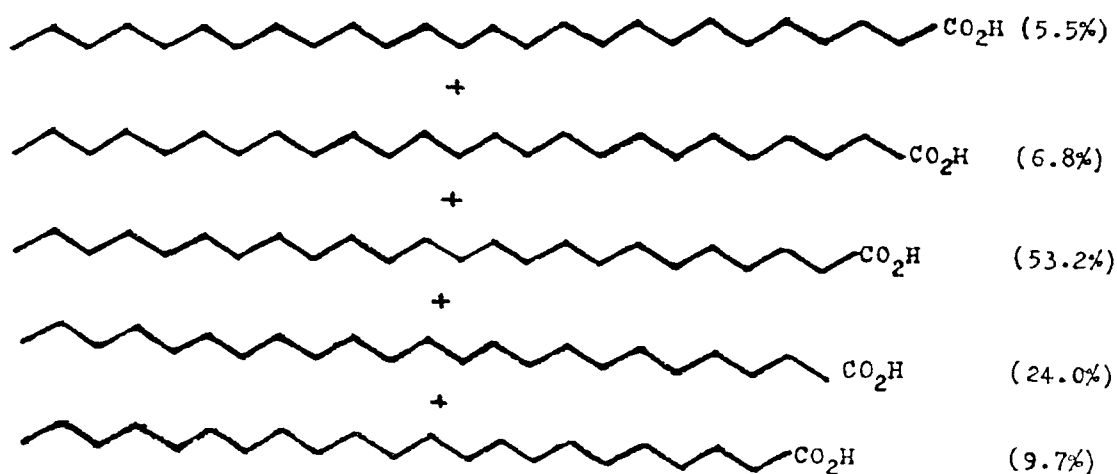
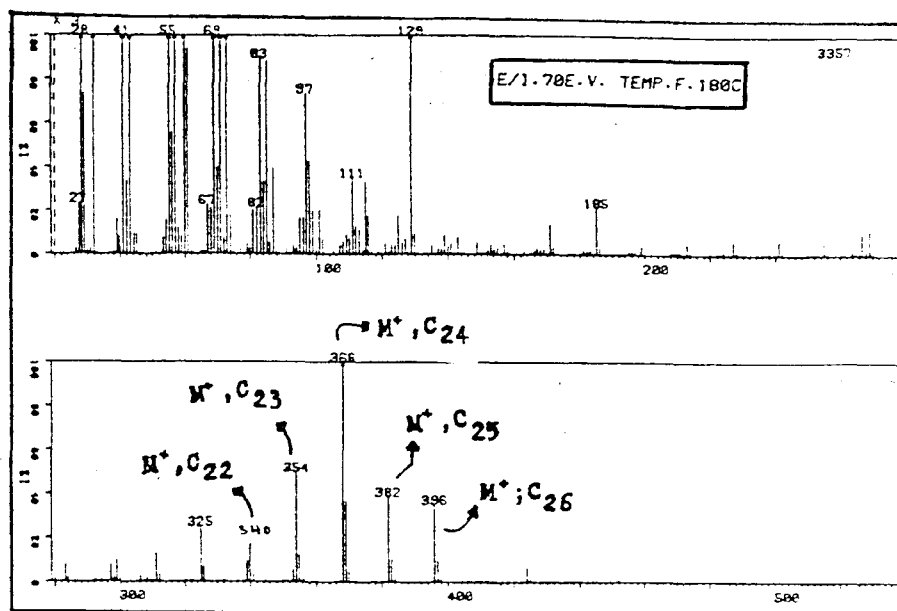
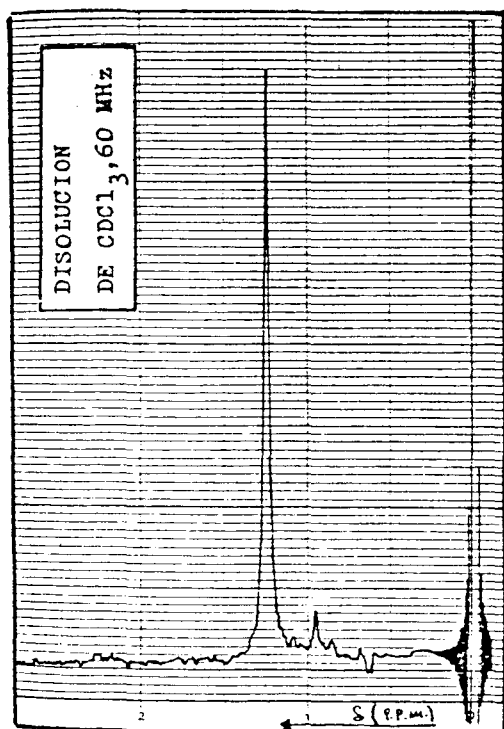
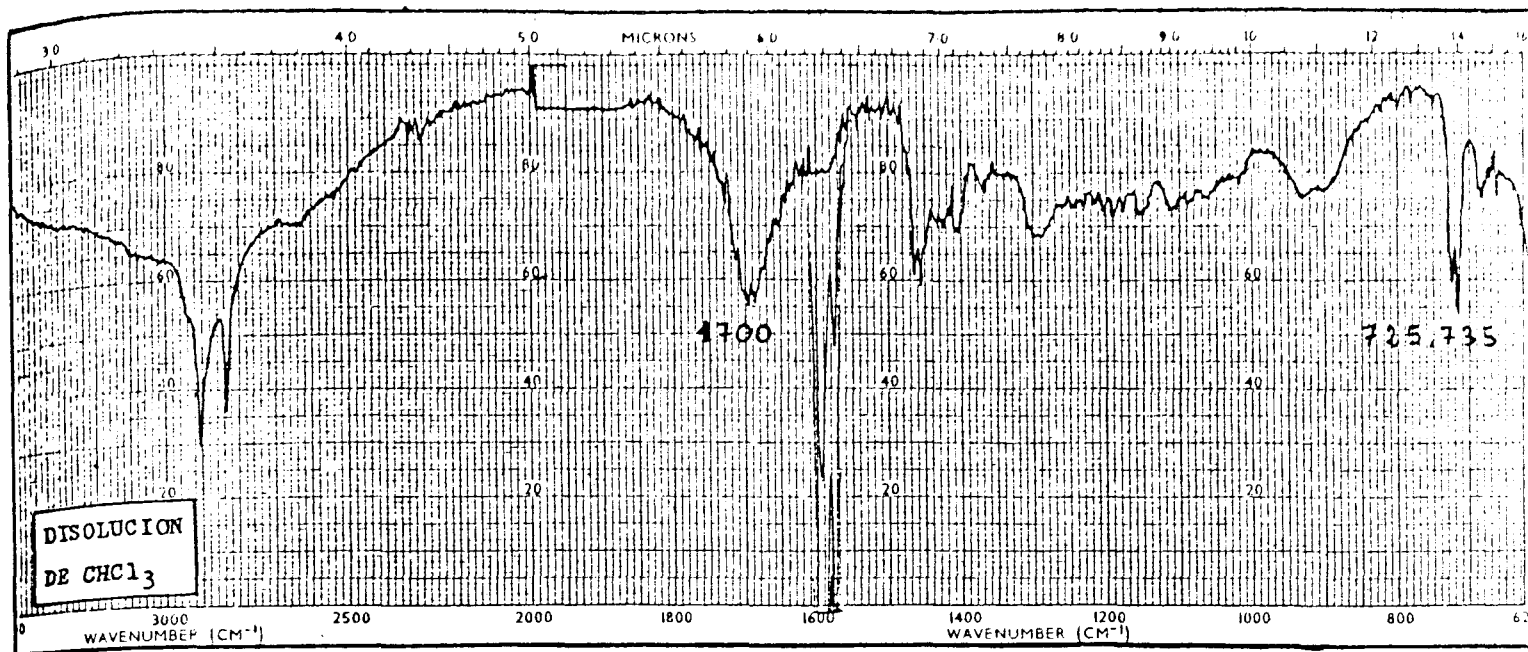


E/I 70 E.V. Temp. F = 180

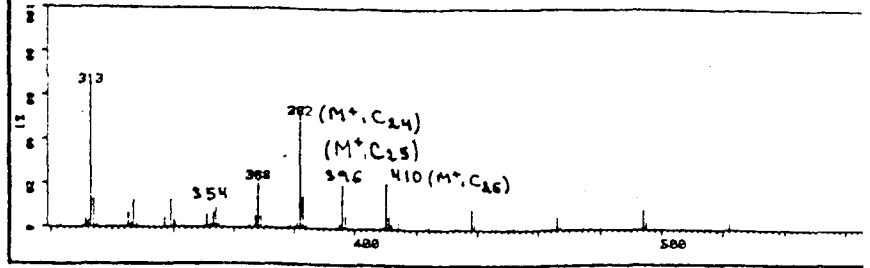
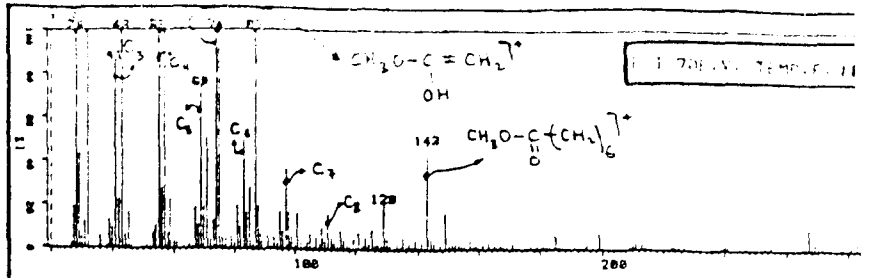
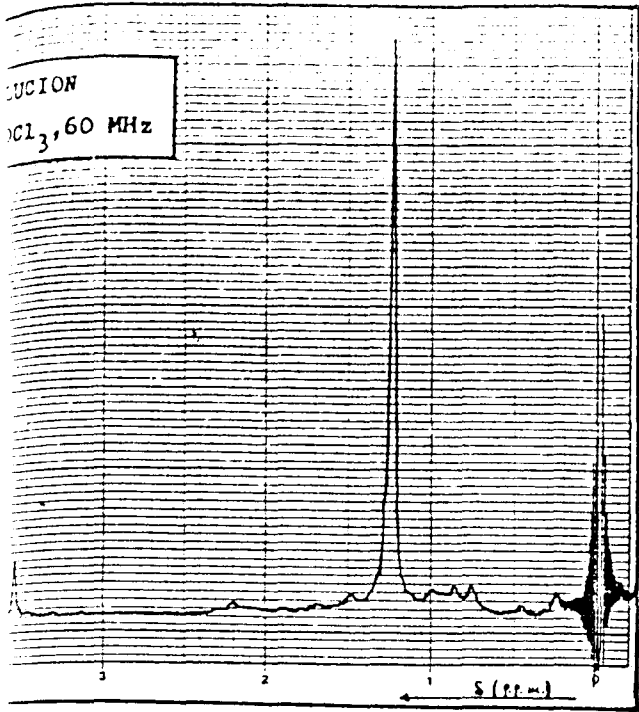


DISOLUCION DE
CDCl₃ 60 MHz

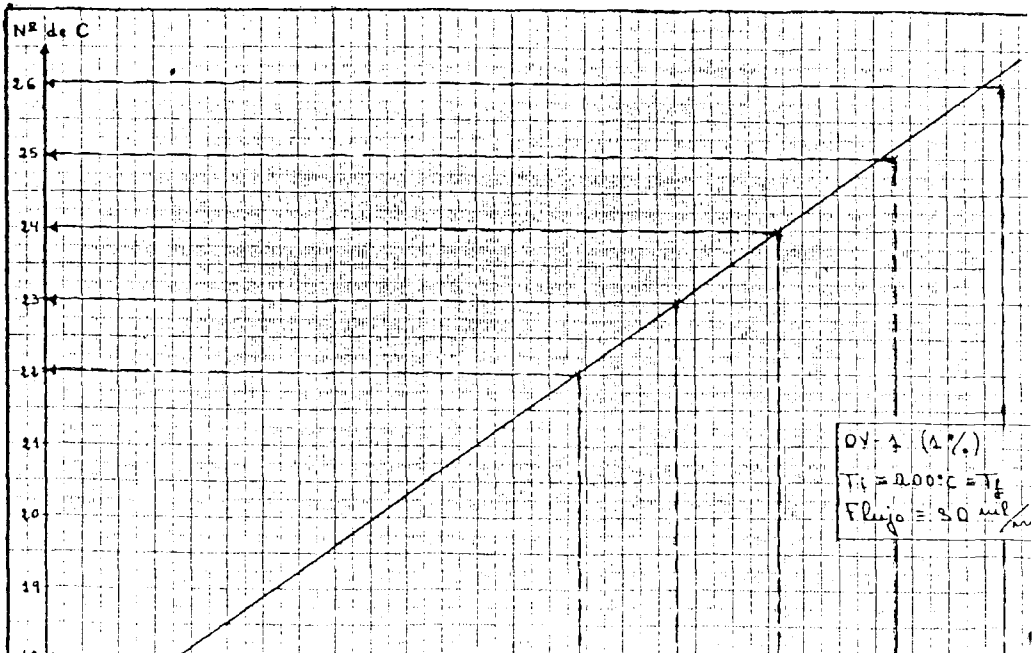
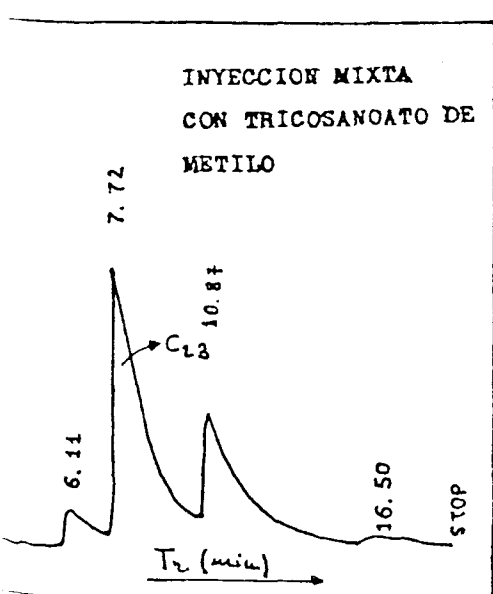
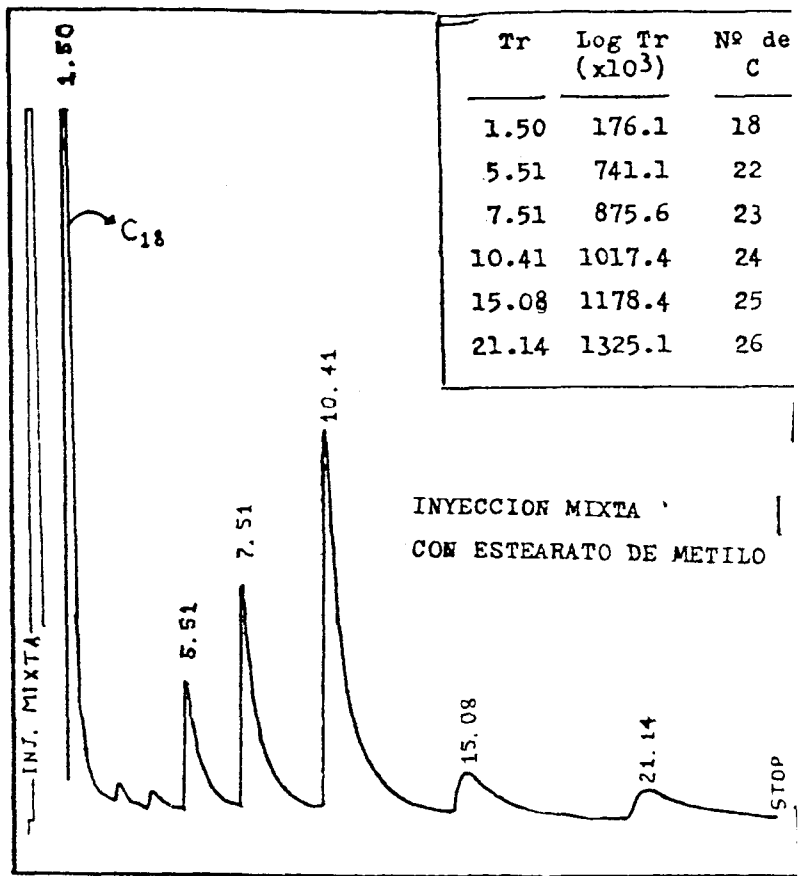
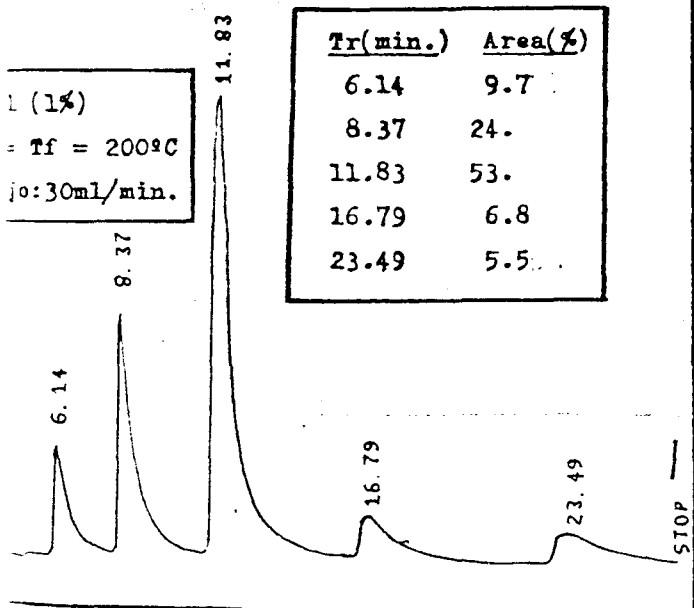




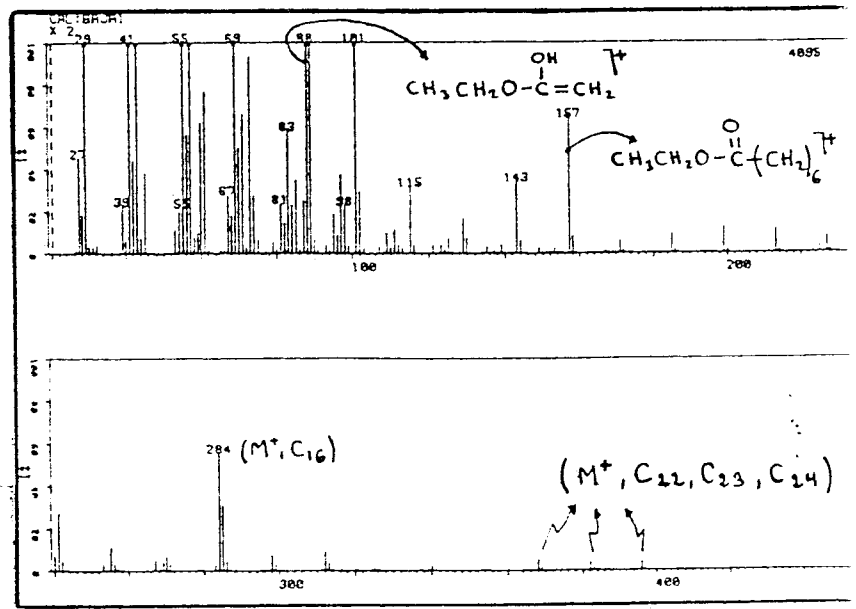
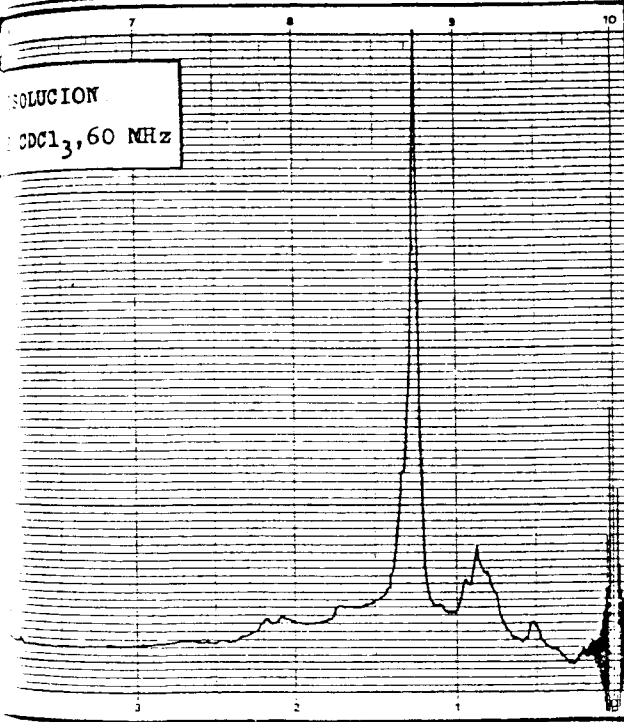
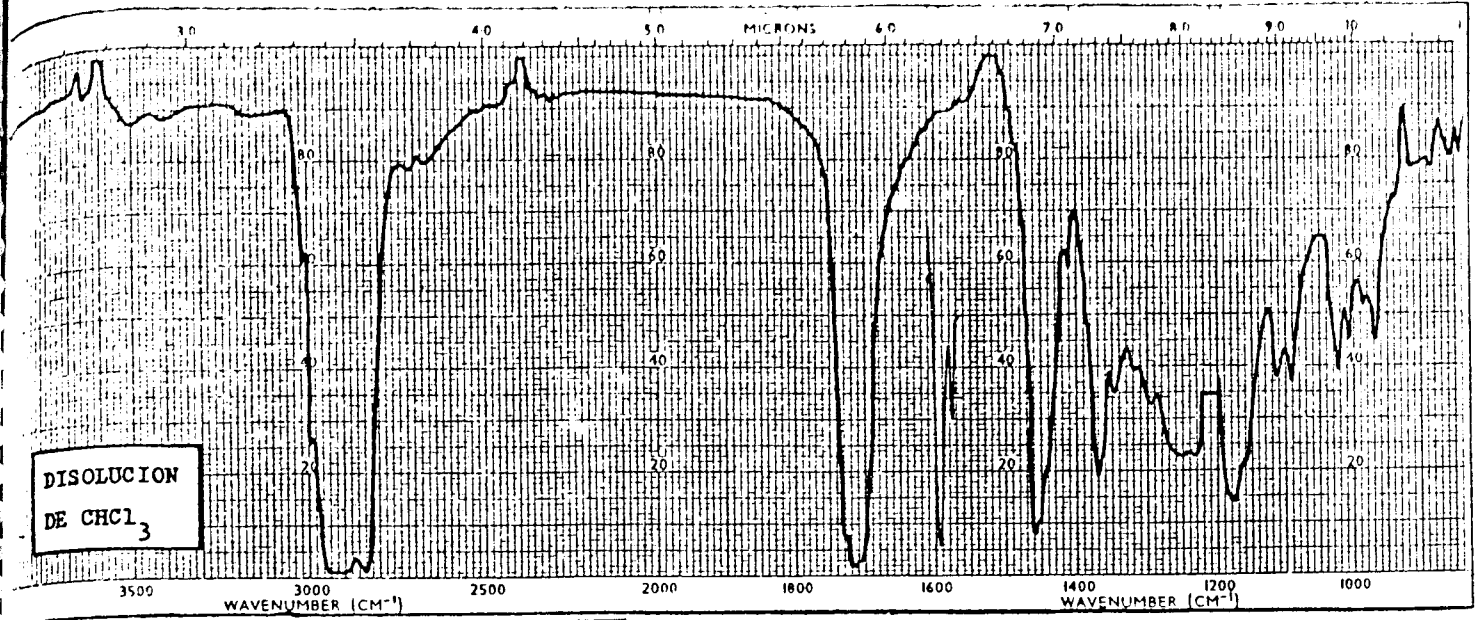
ACIDOS DO-, TRI-, TETRA-, PENTA-, Y HEXACOSANICOS



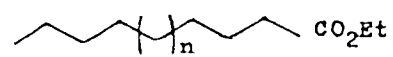
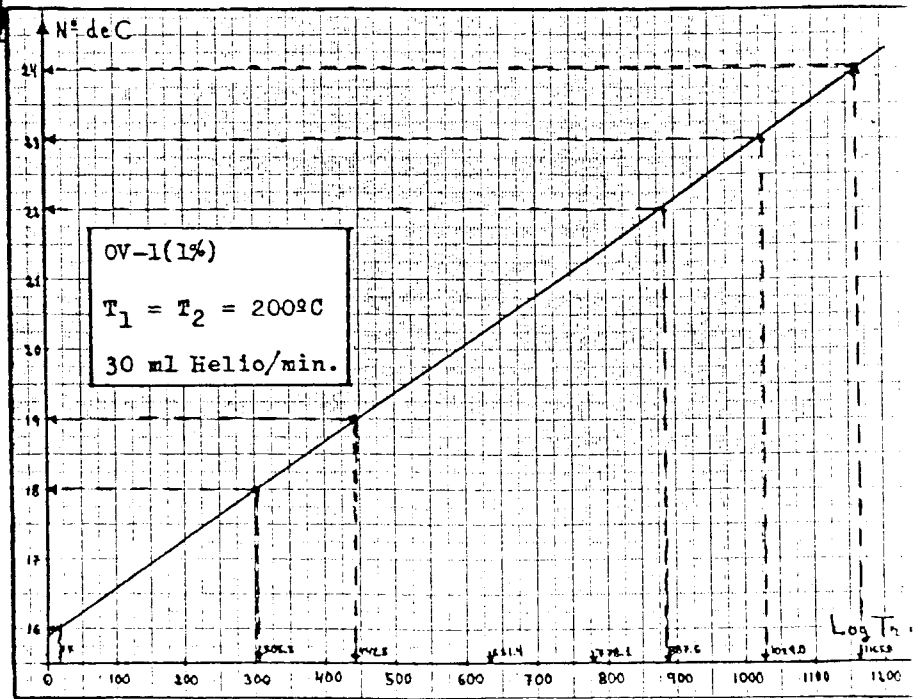
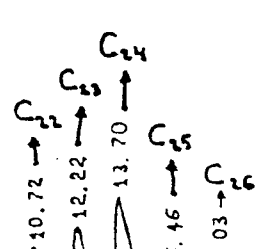
00 ATTN 64



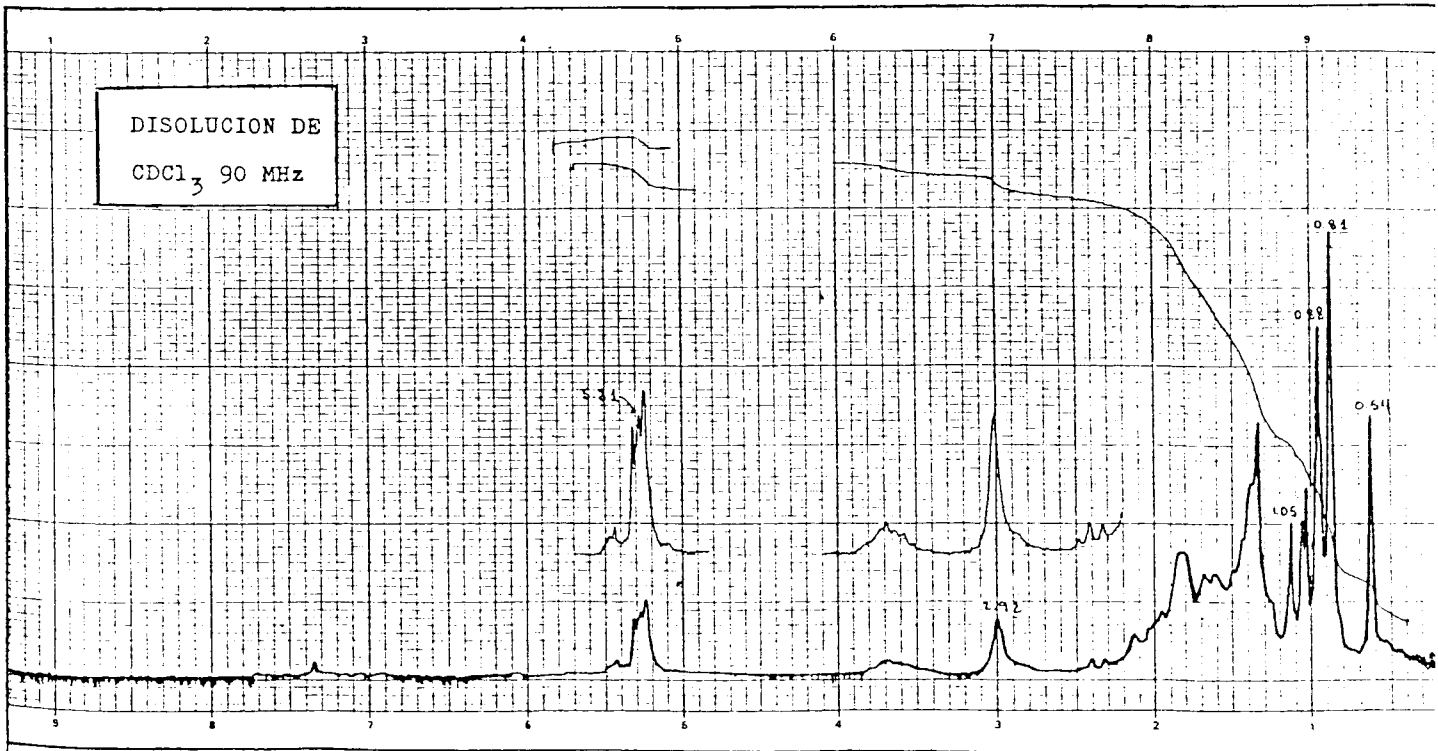
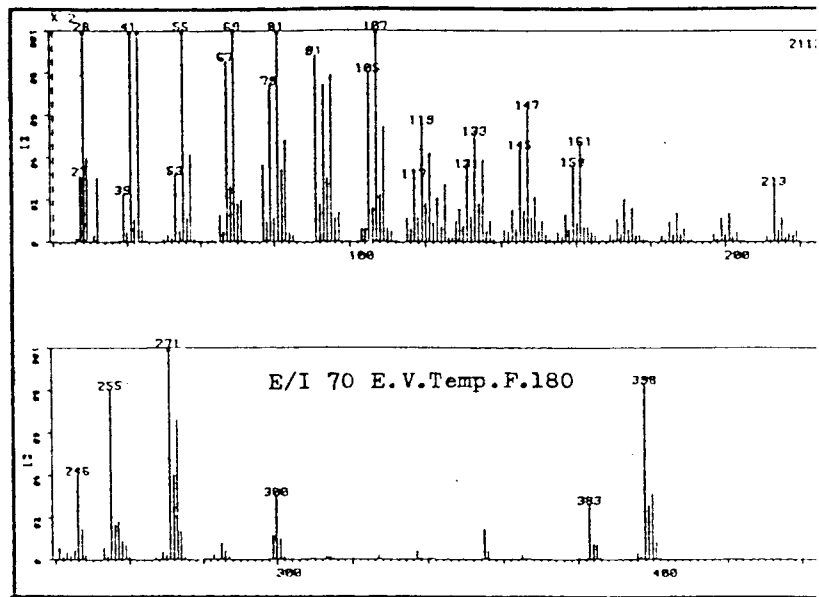
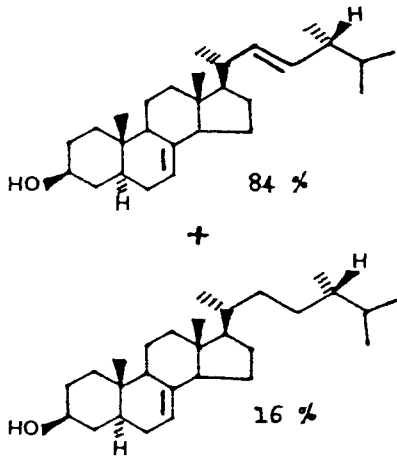
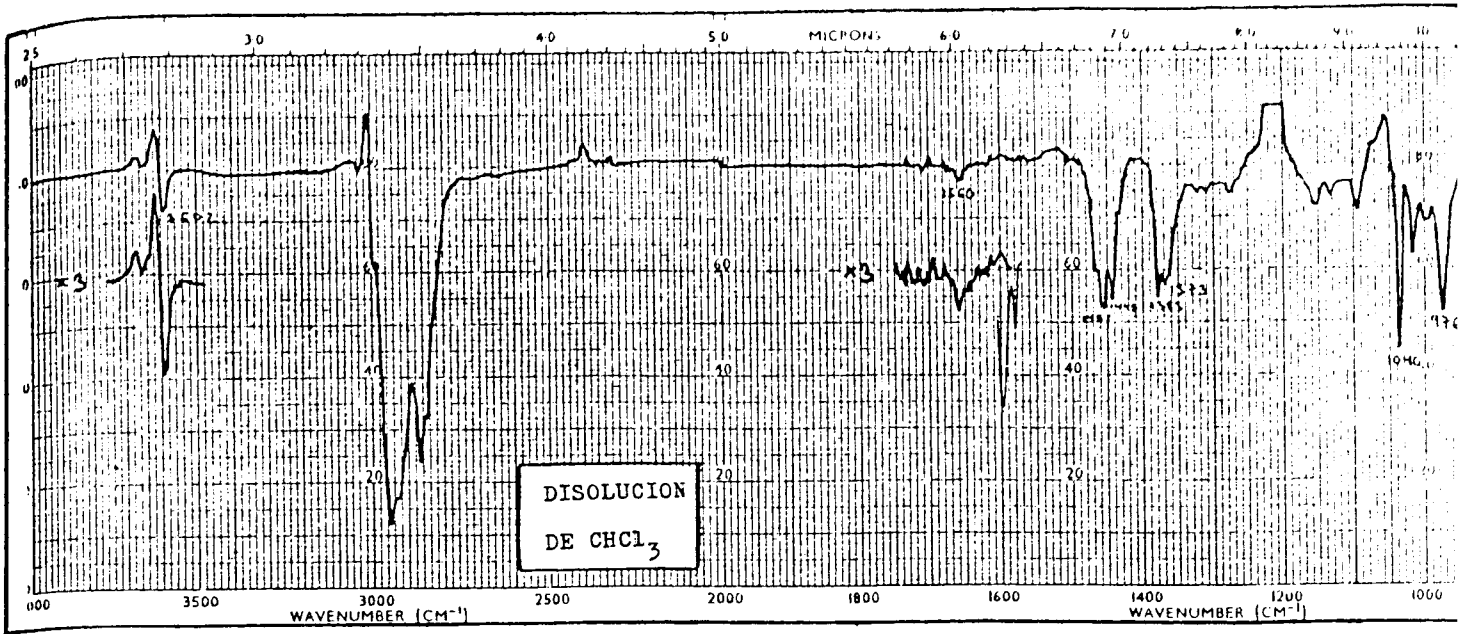
GRAFICA VI



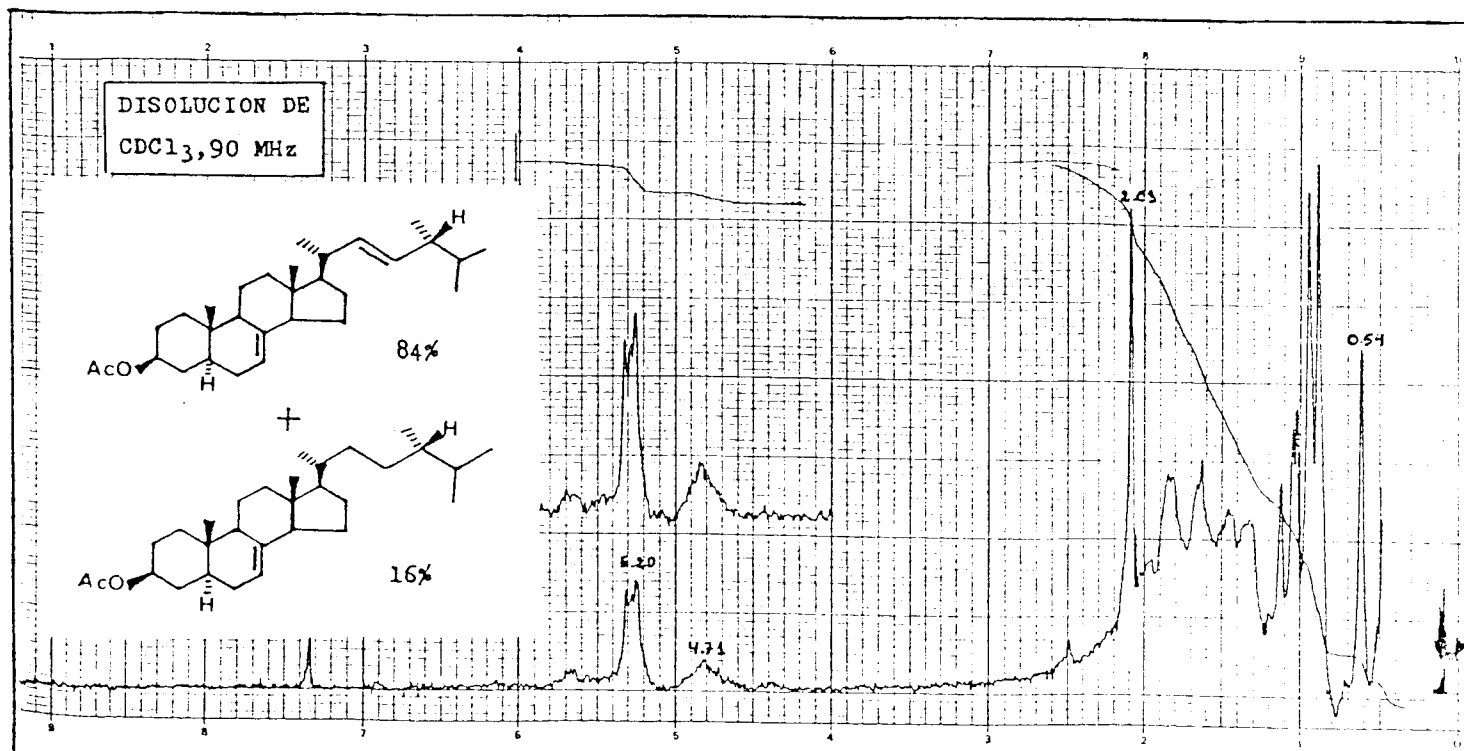
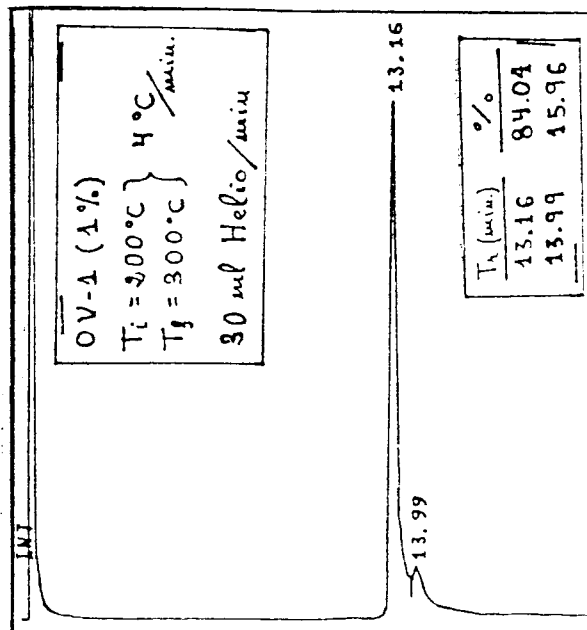
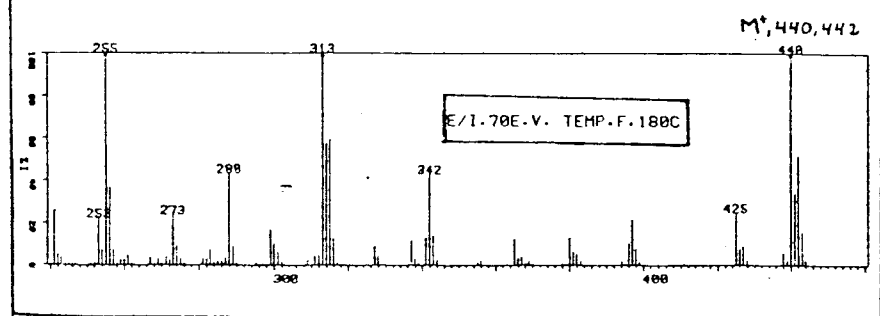
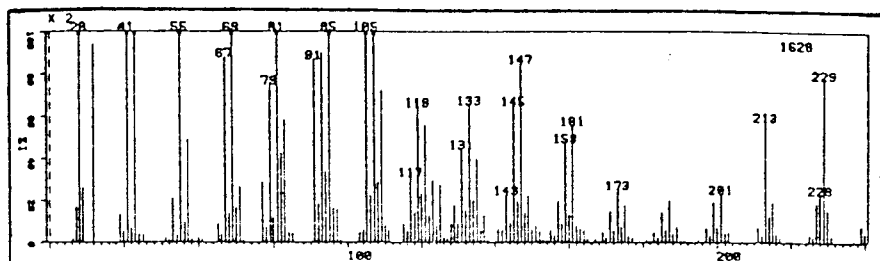
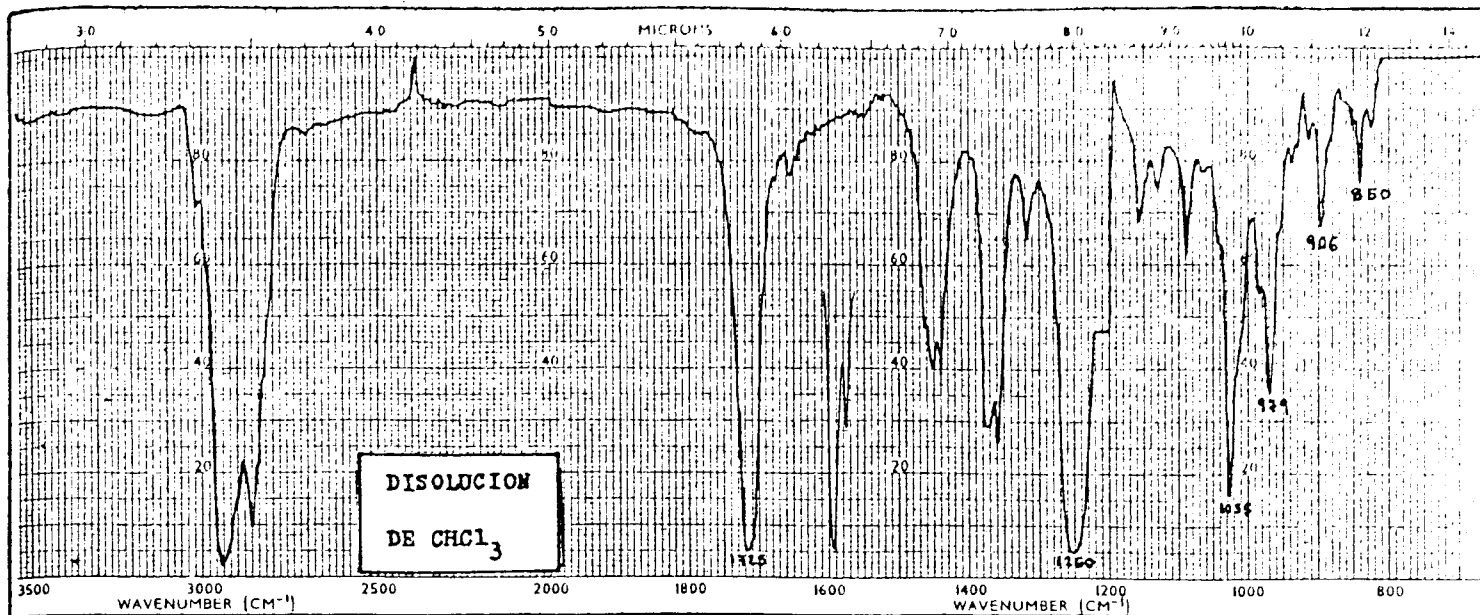
OV-1 (1%)
 T₁ = 170°C
 T₂ = 250°C } 4°C/min.
 30 ml Helio/min.



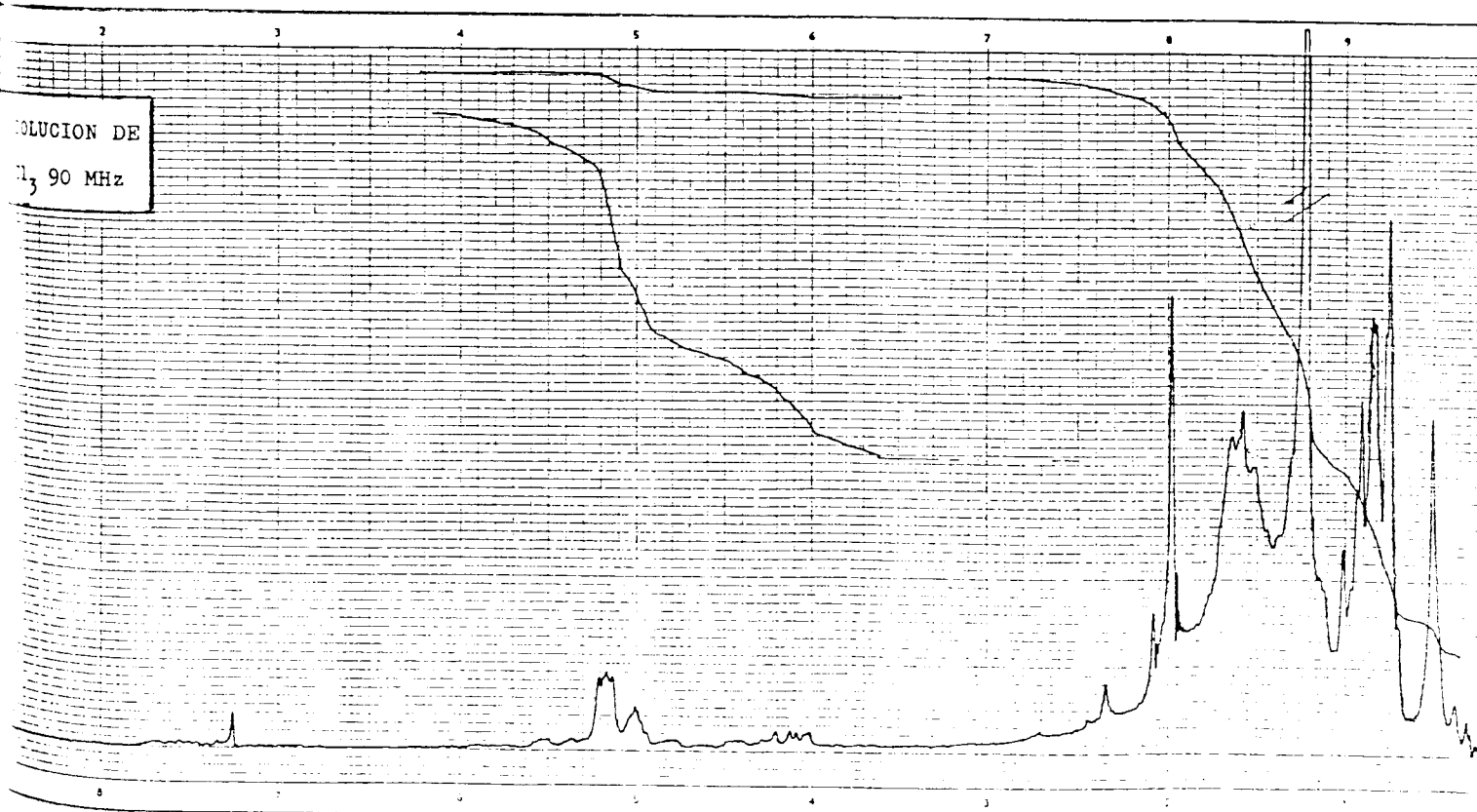
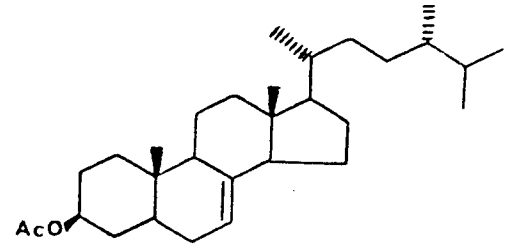
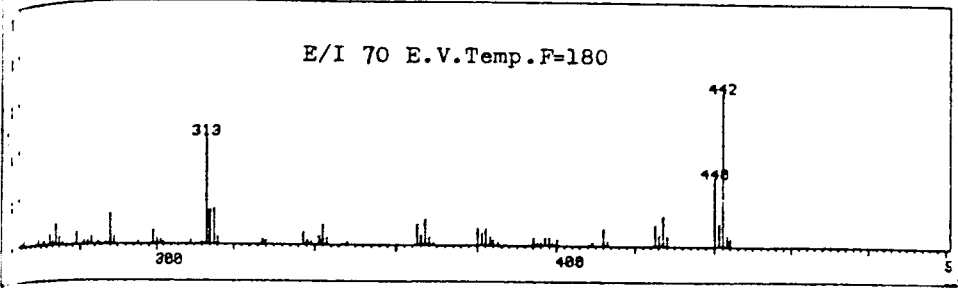
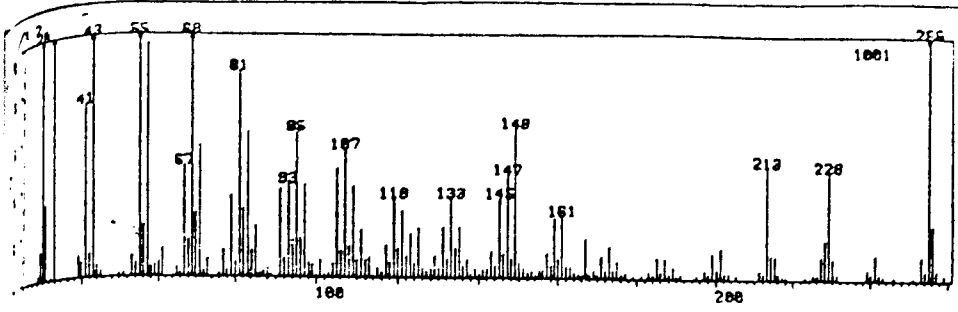
GRAFICA VII



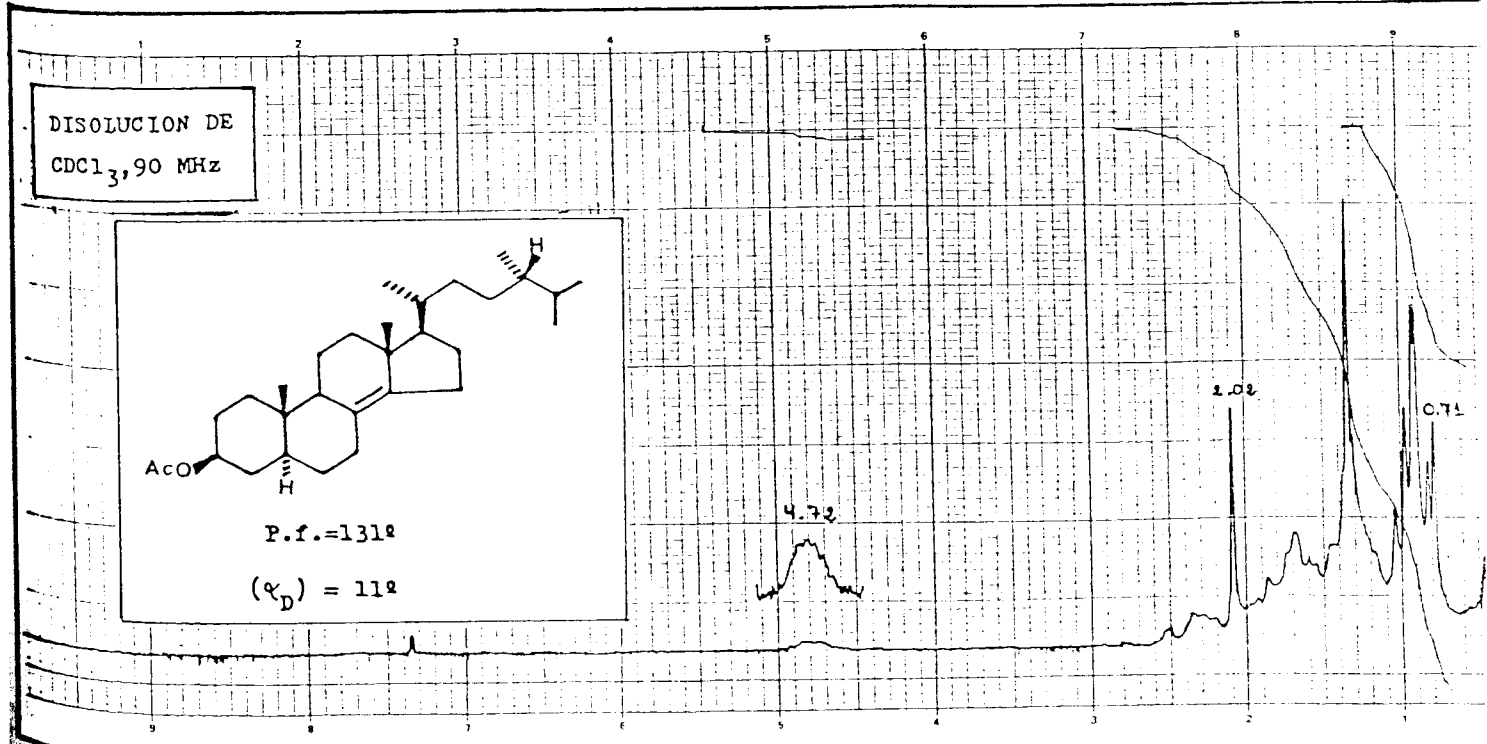
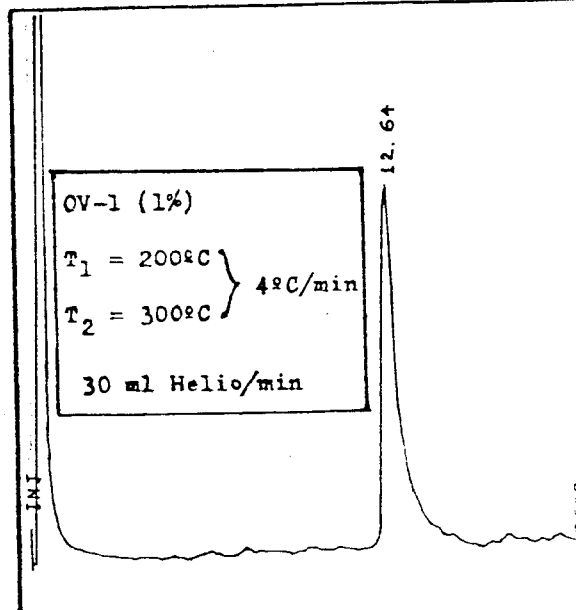
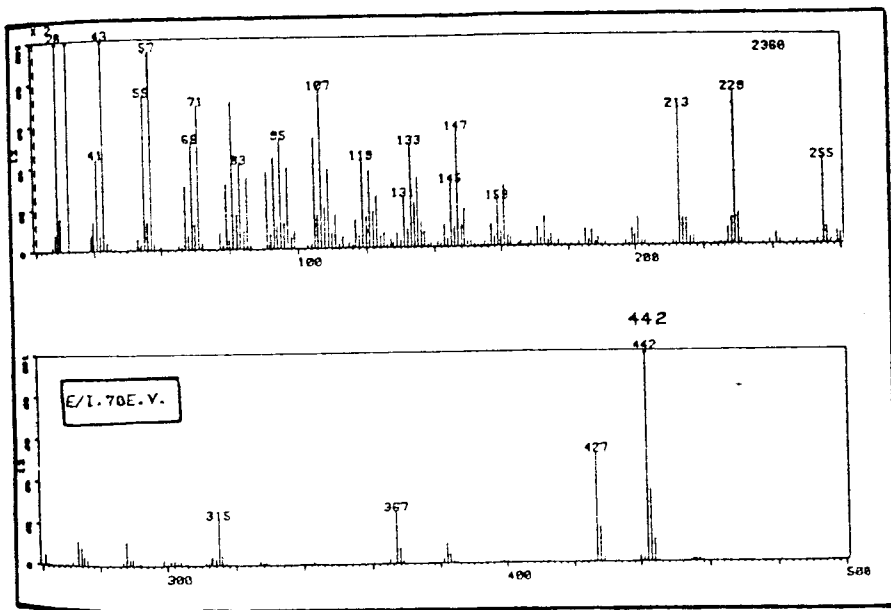
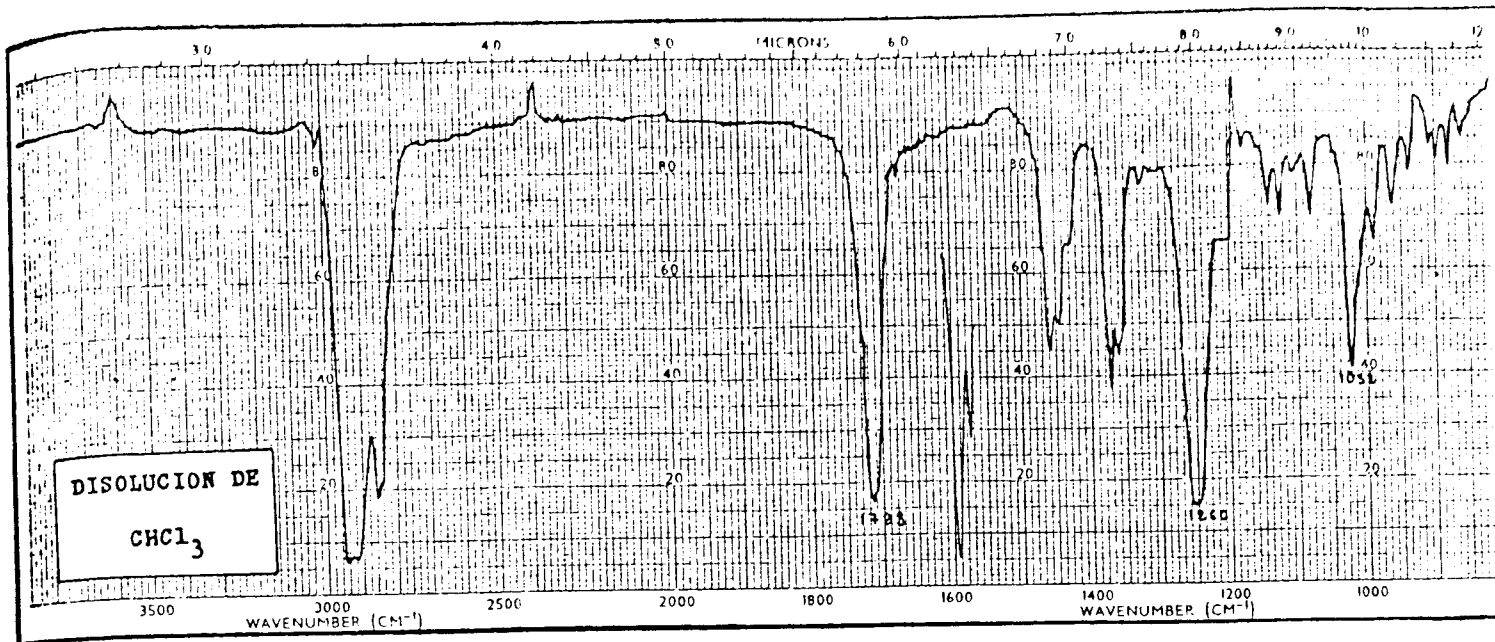
GRAFICA VIII



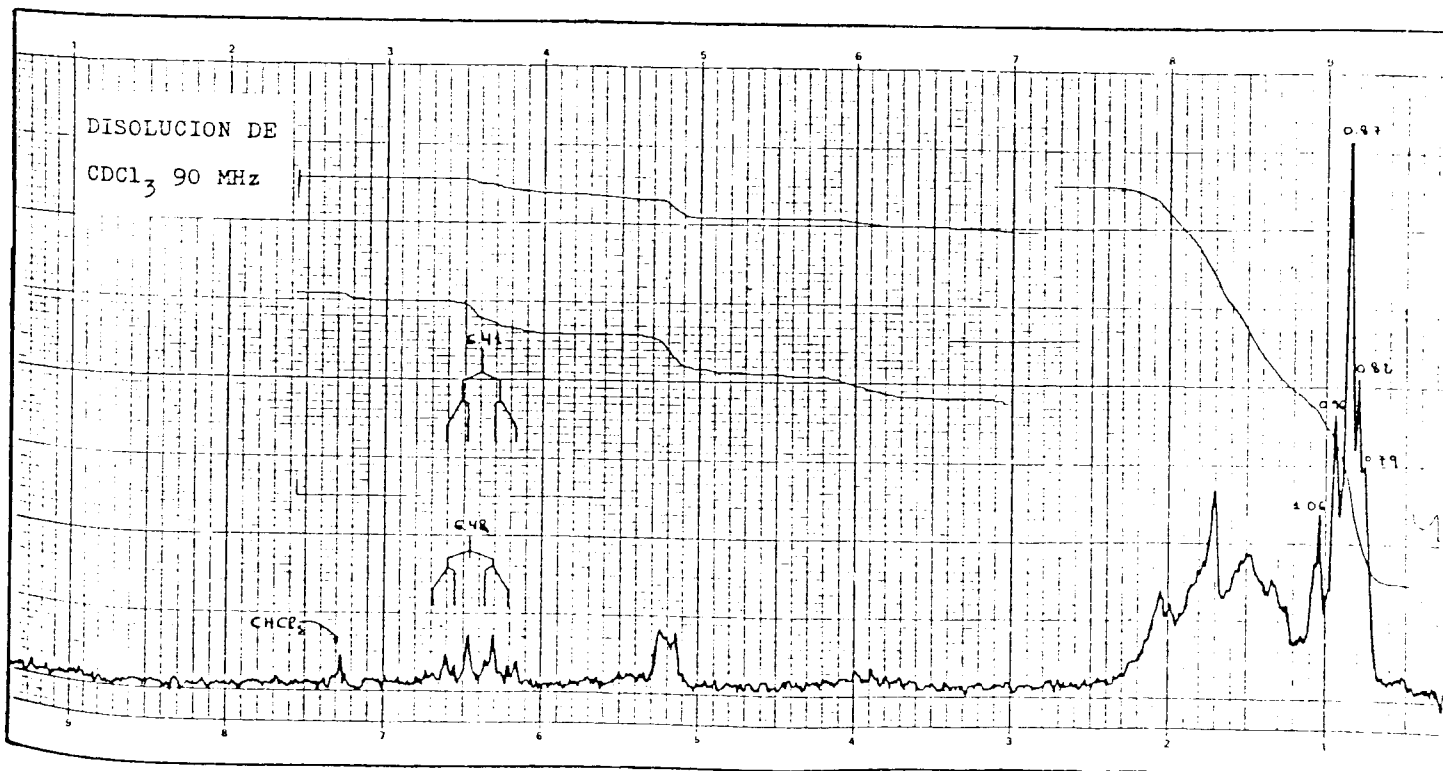
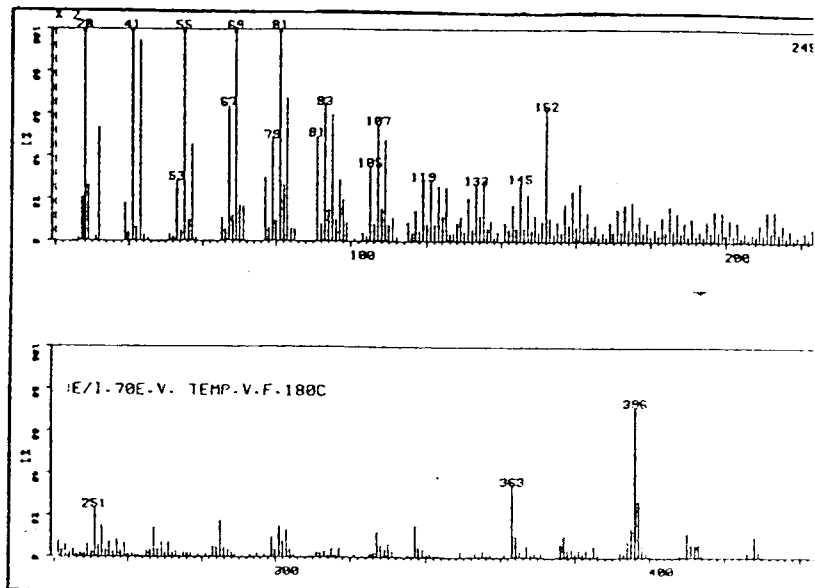
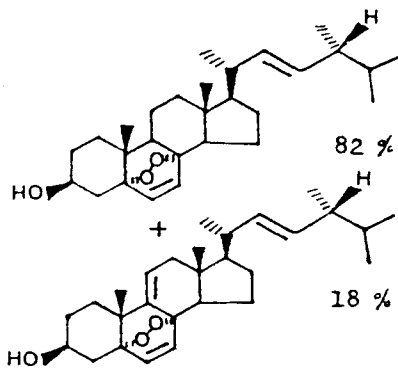
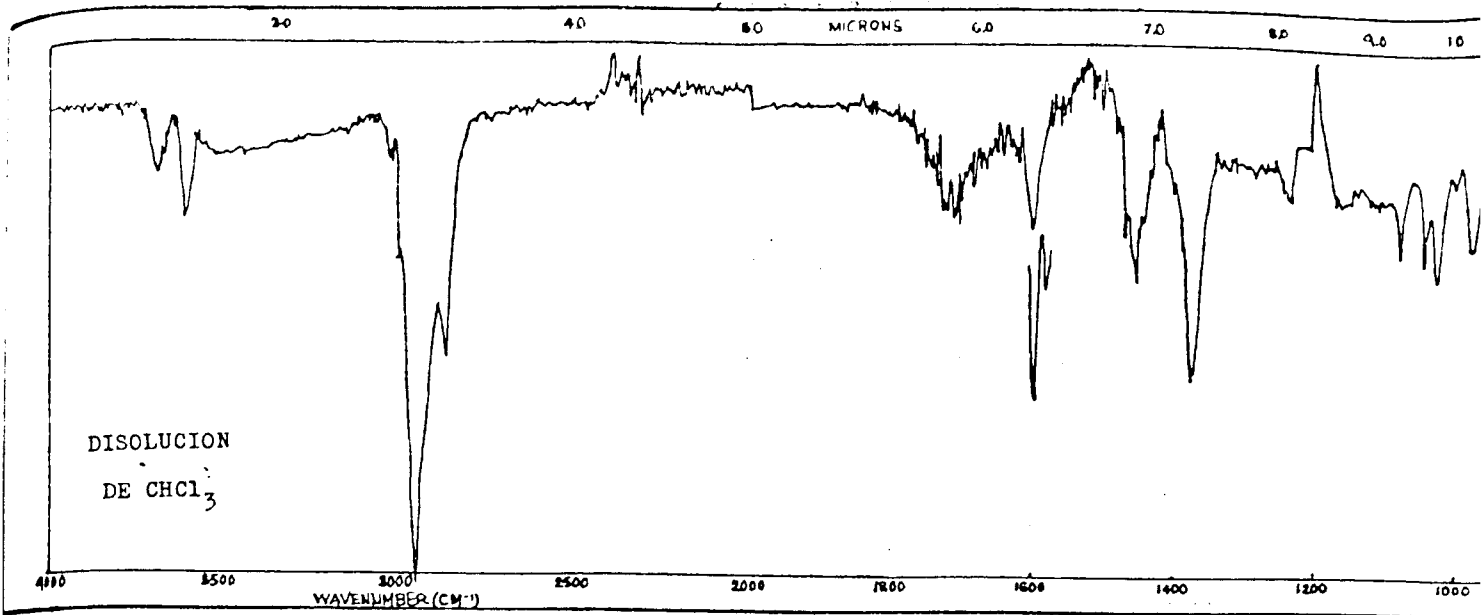
GRAFICA IX.



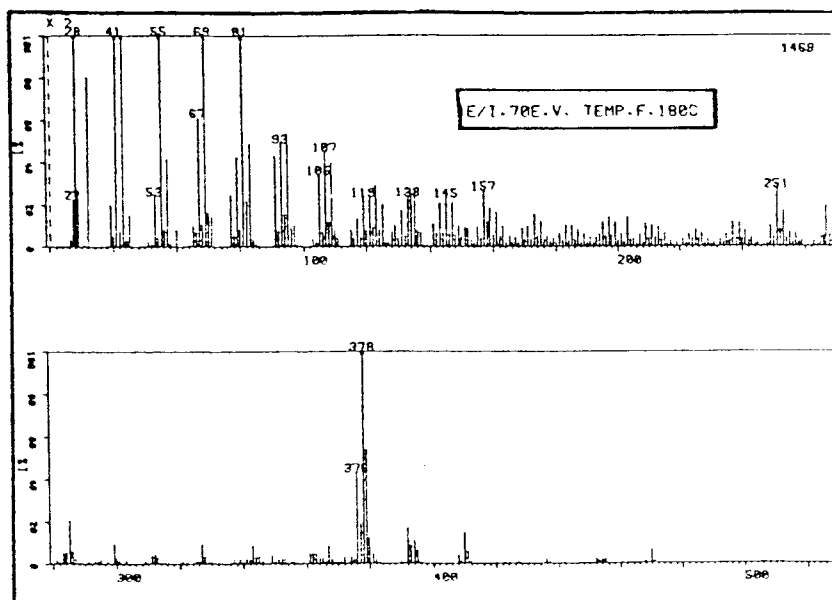
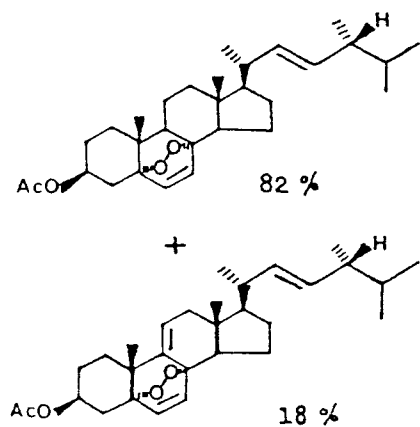
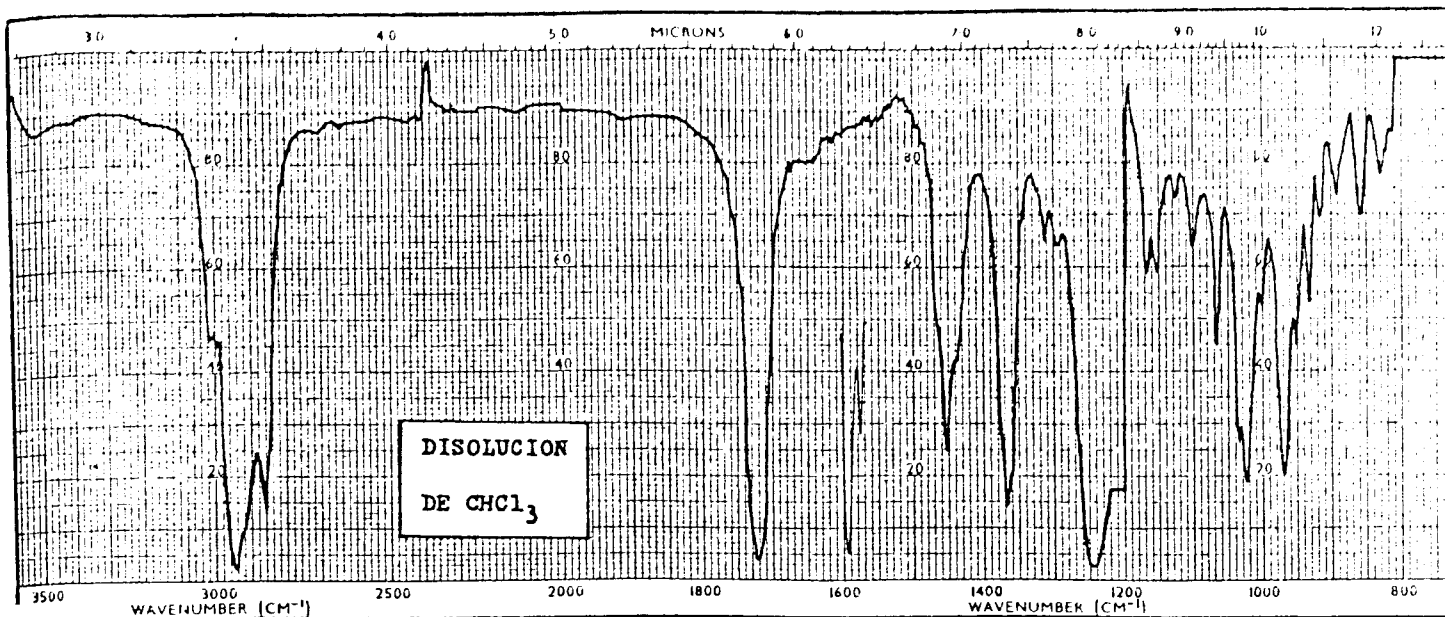
GRAFICA X

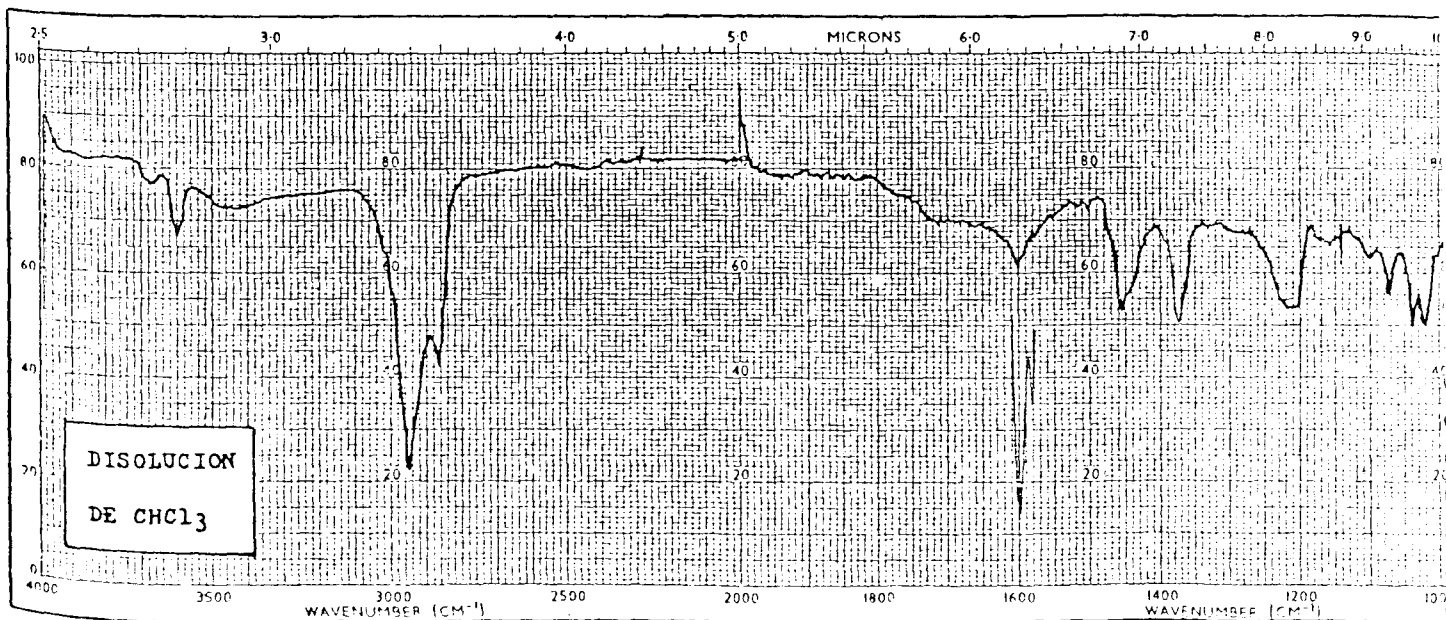
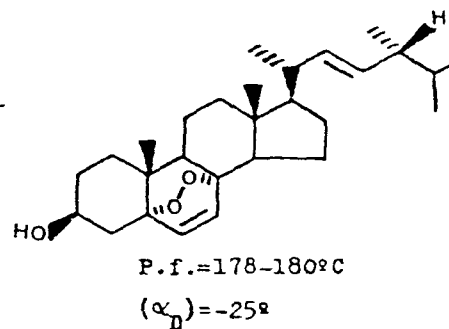
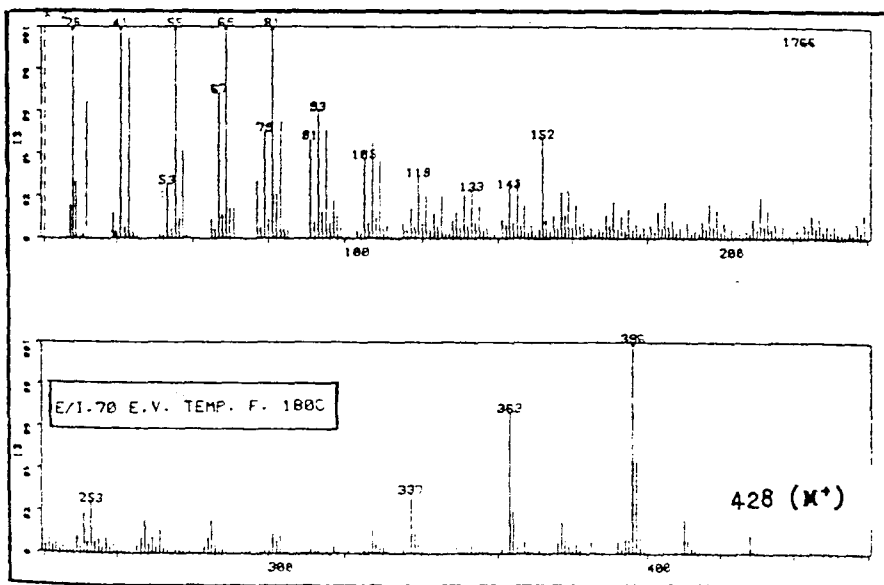
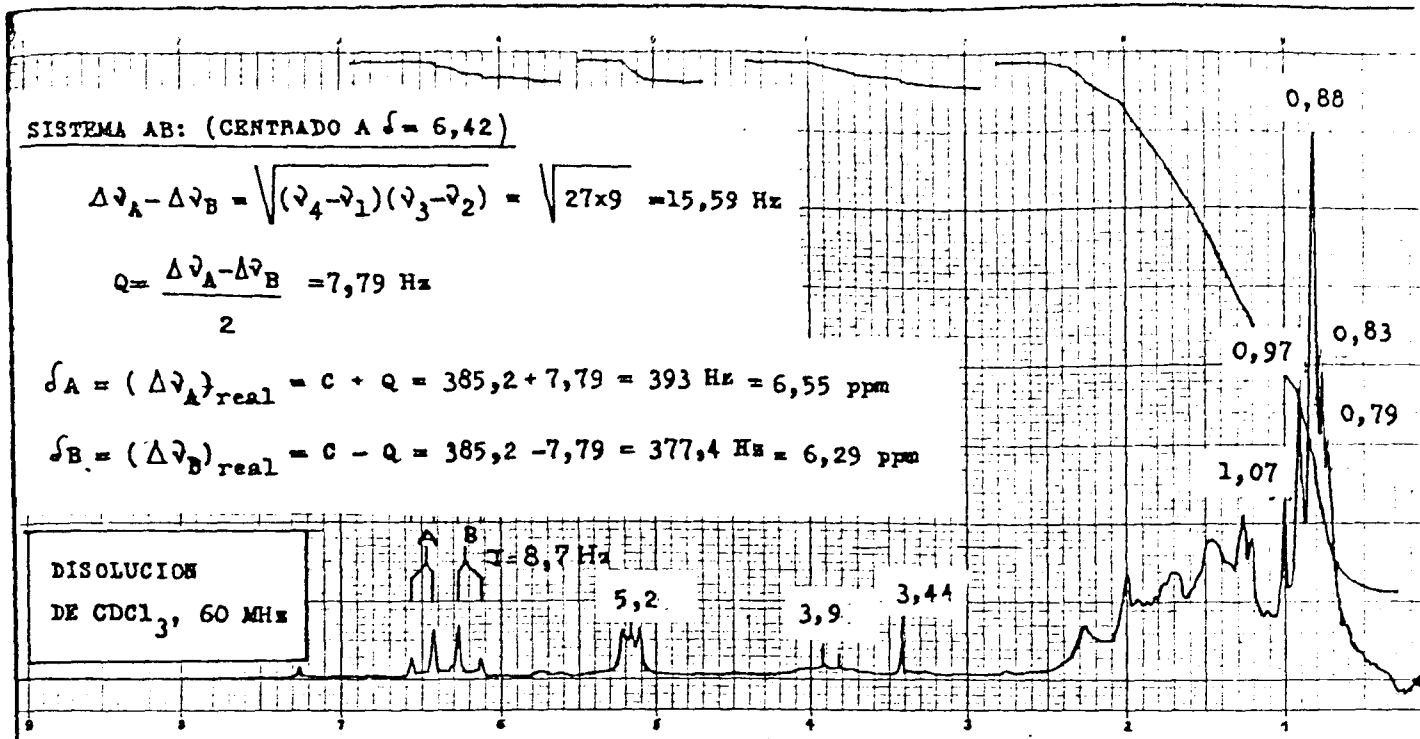


GRAFICA XI

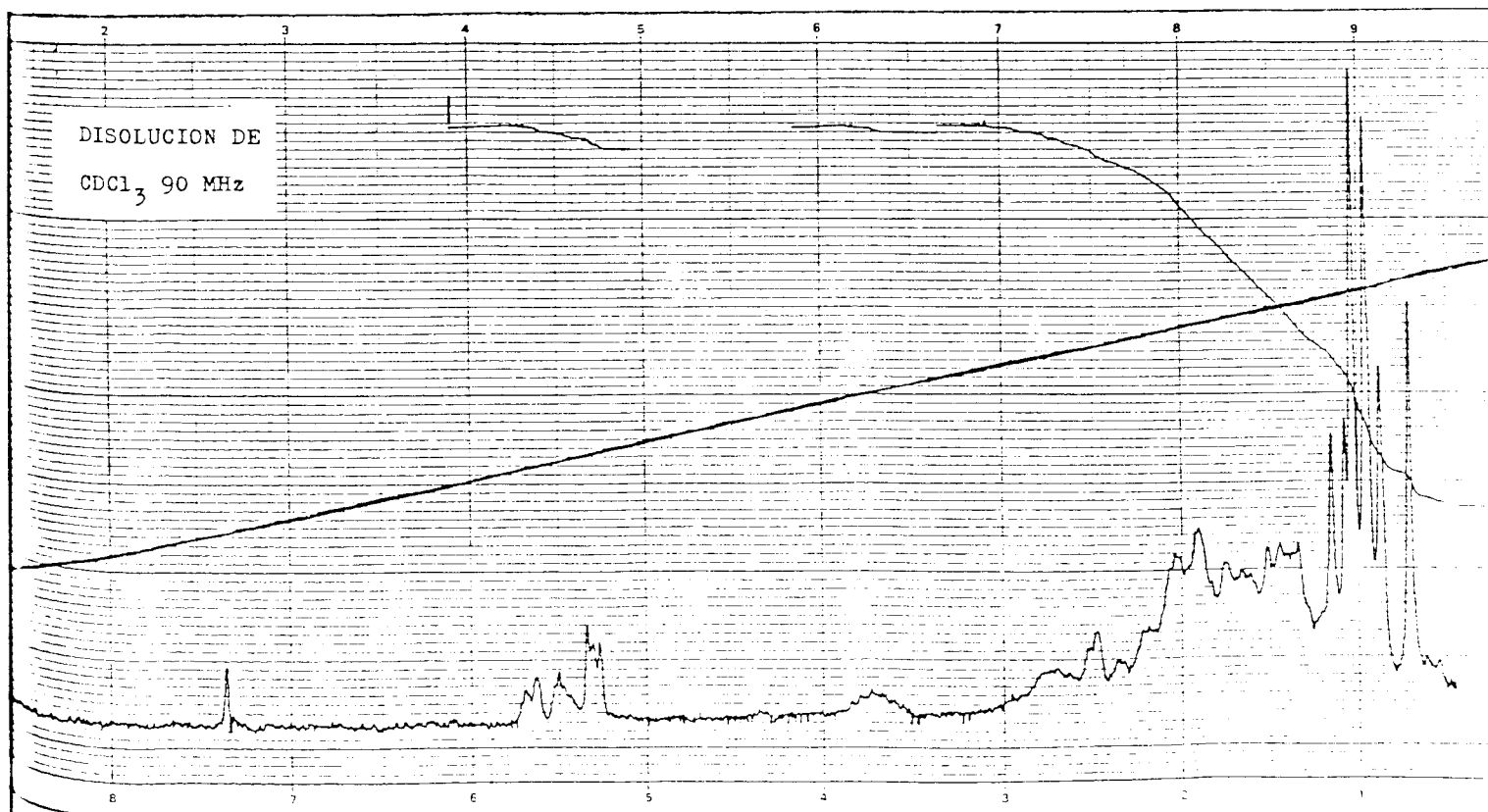
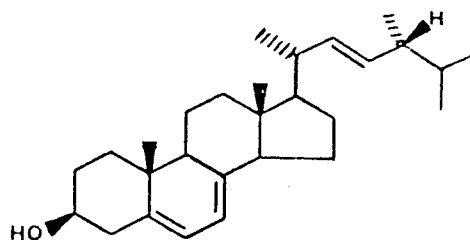
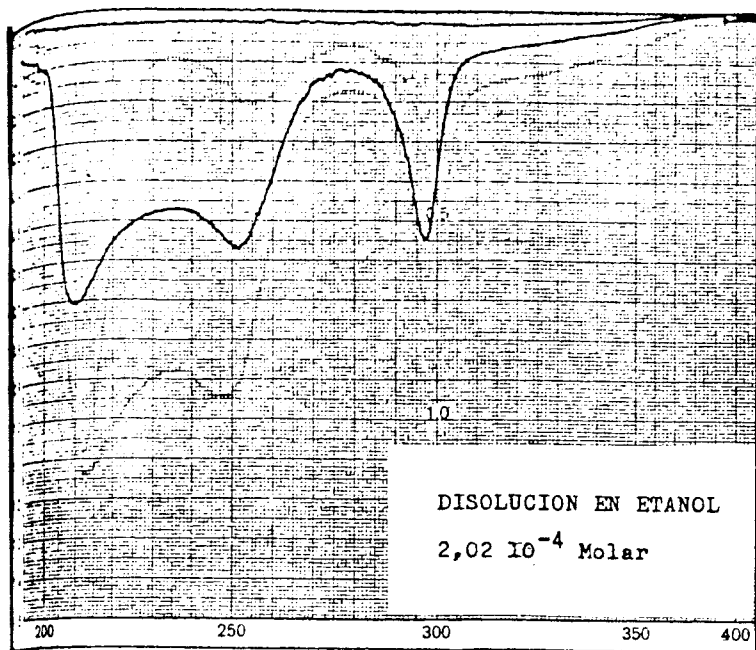


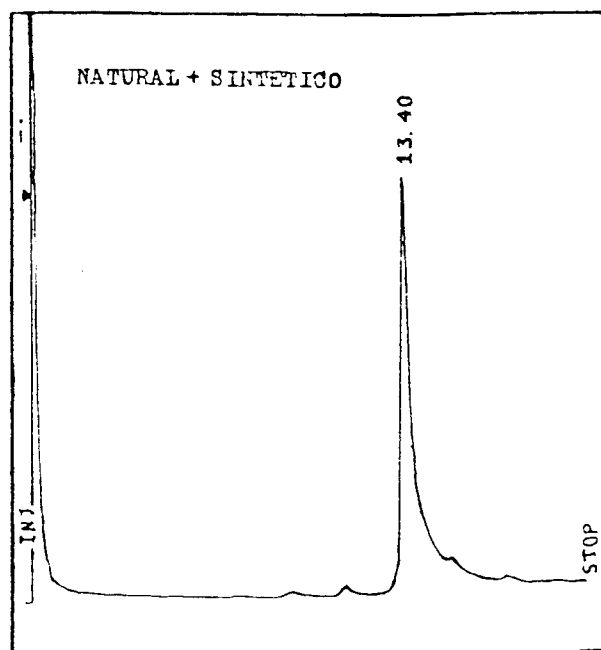
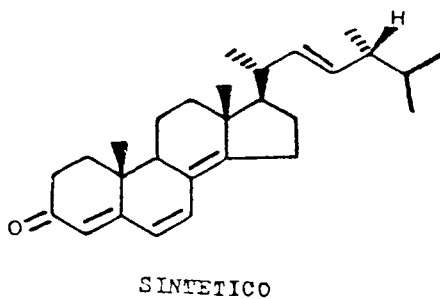
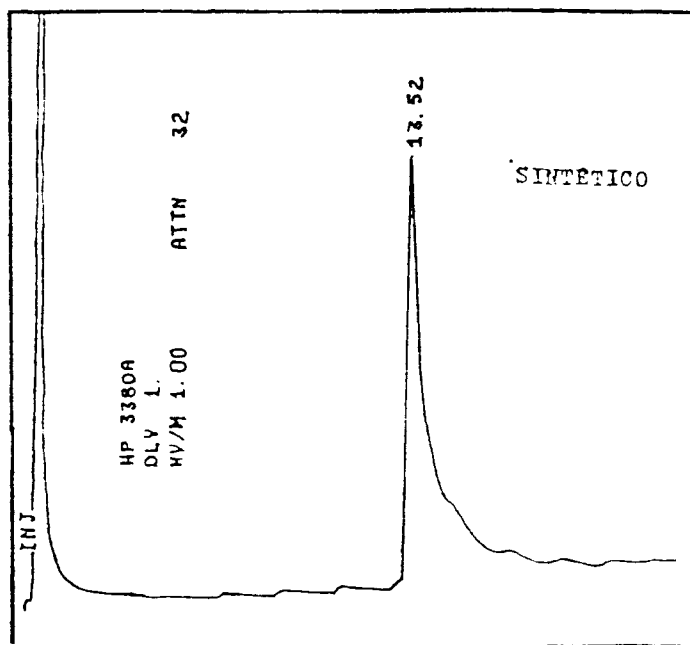
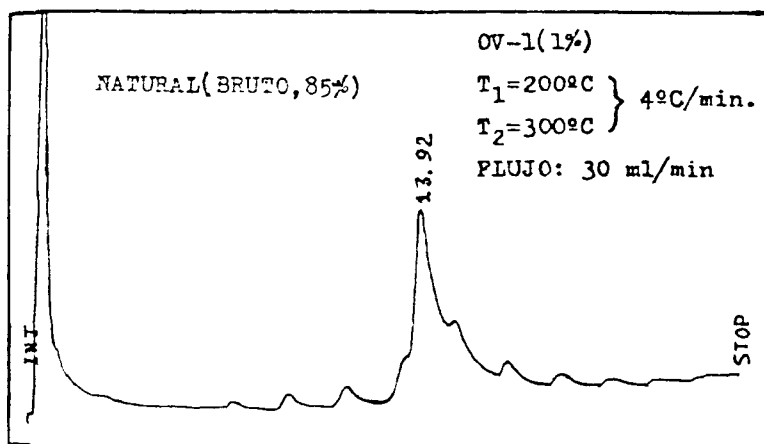
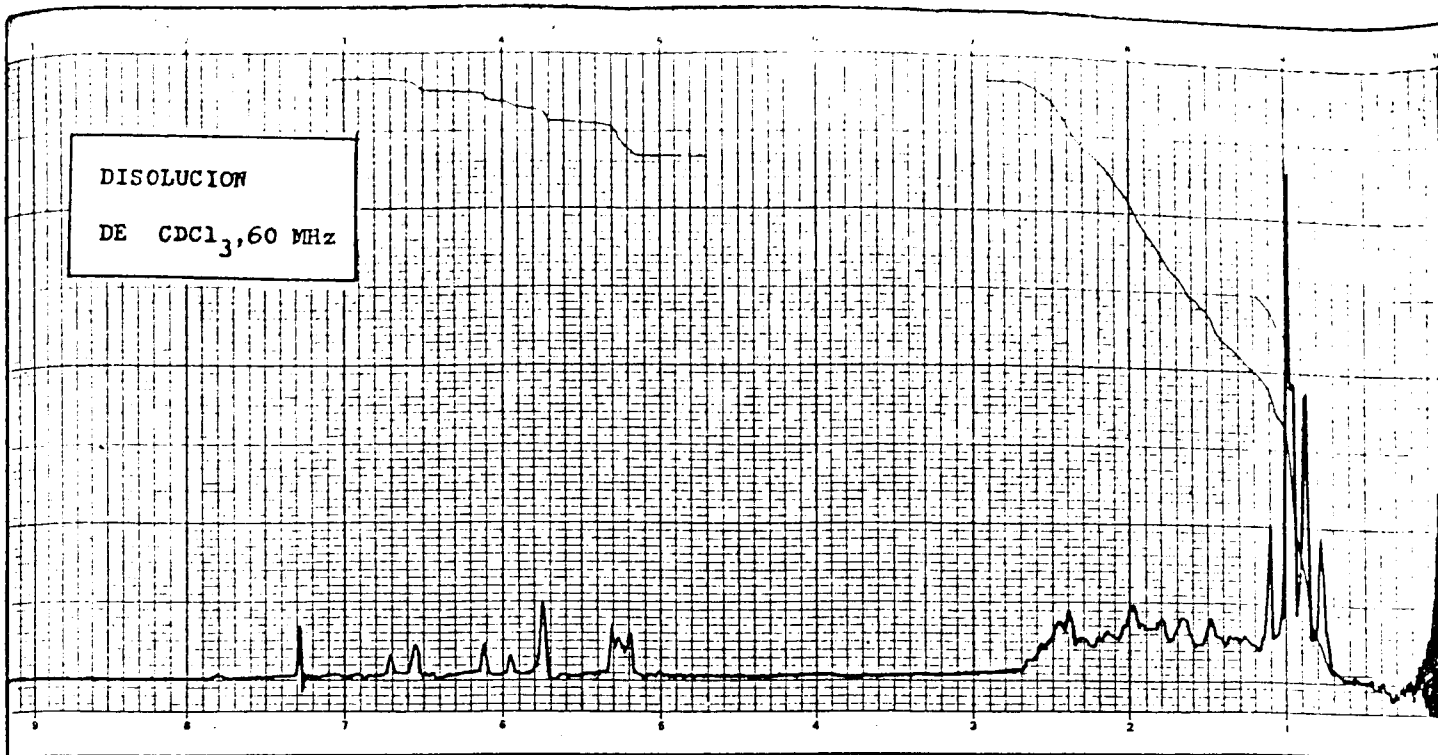
GRAFICA XII



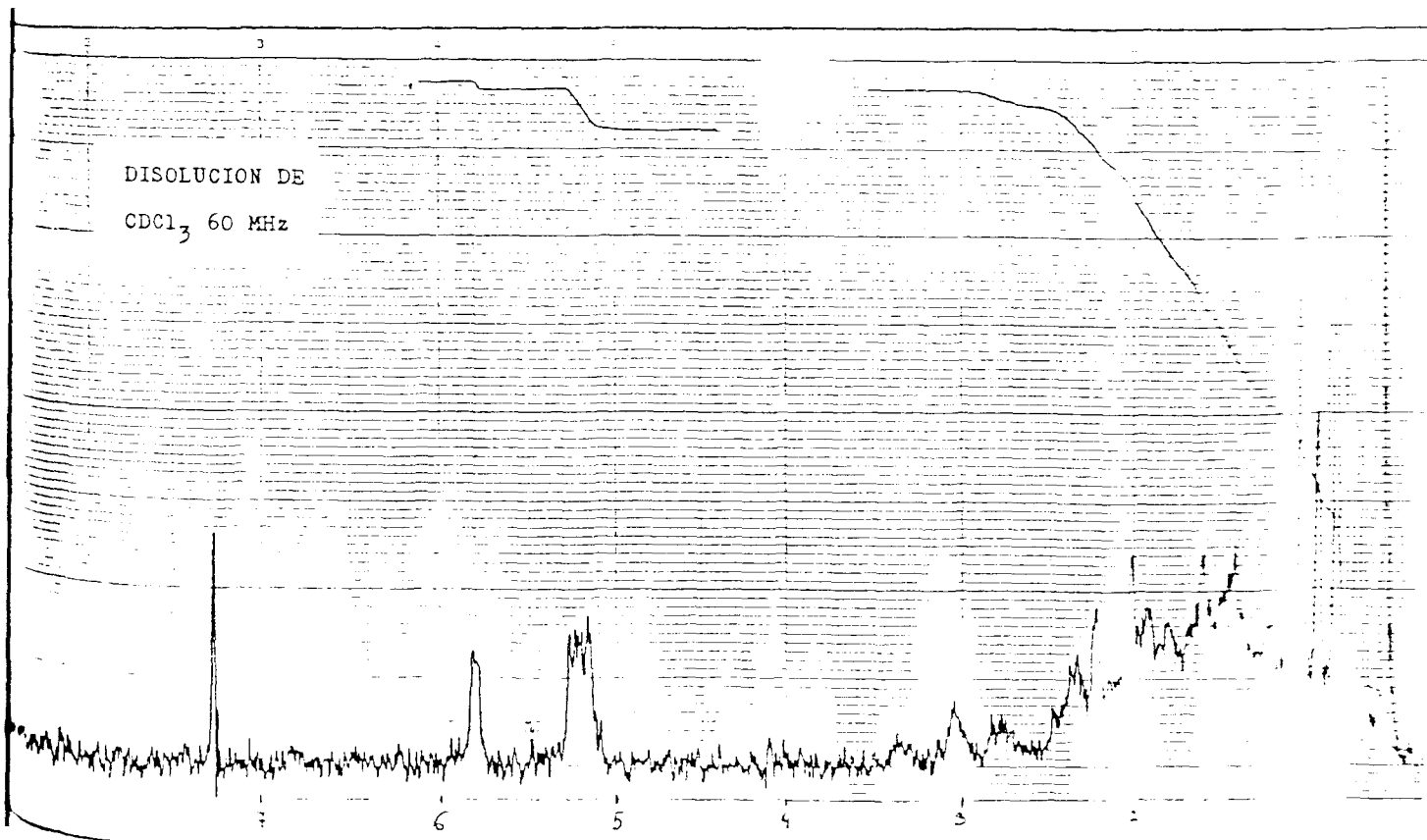
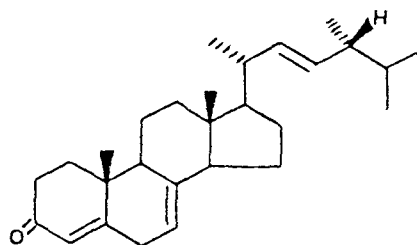
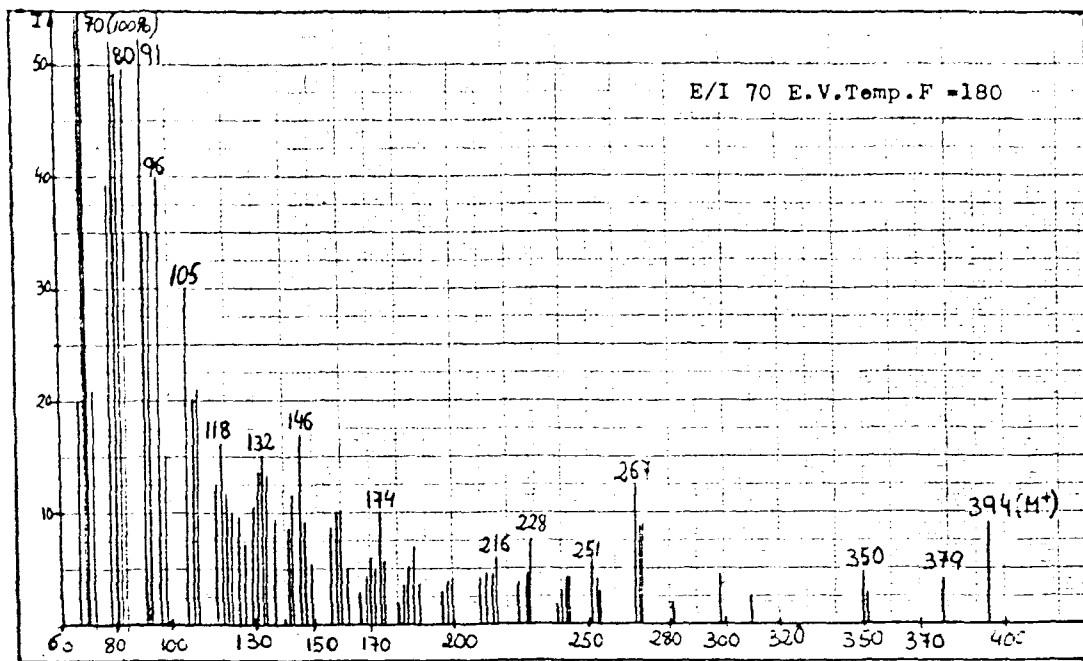


GRAFICA XIV

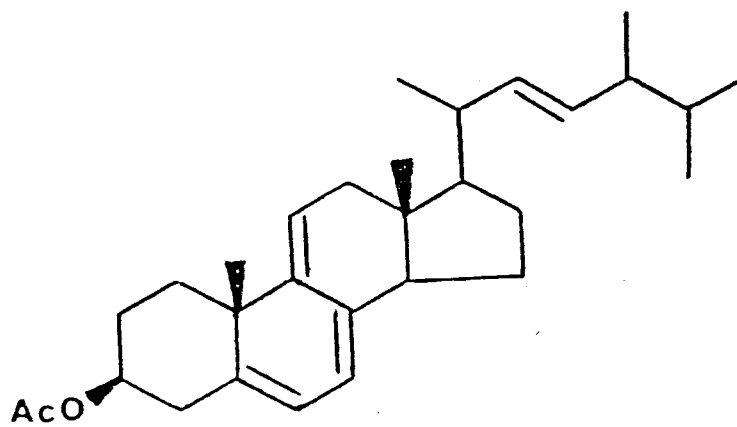
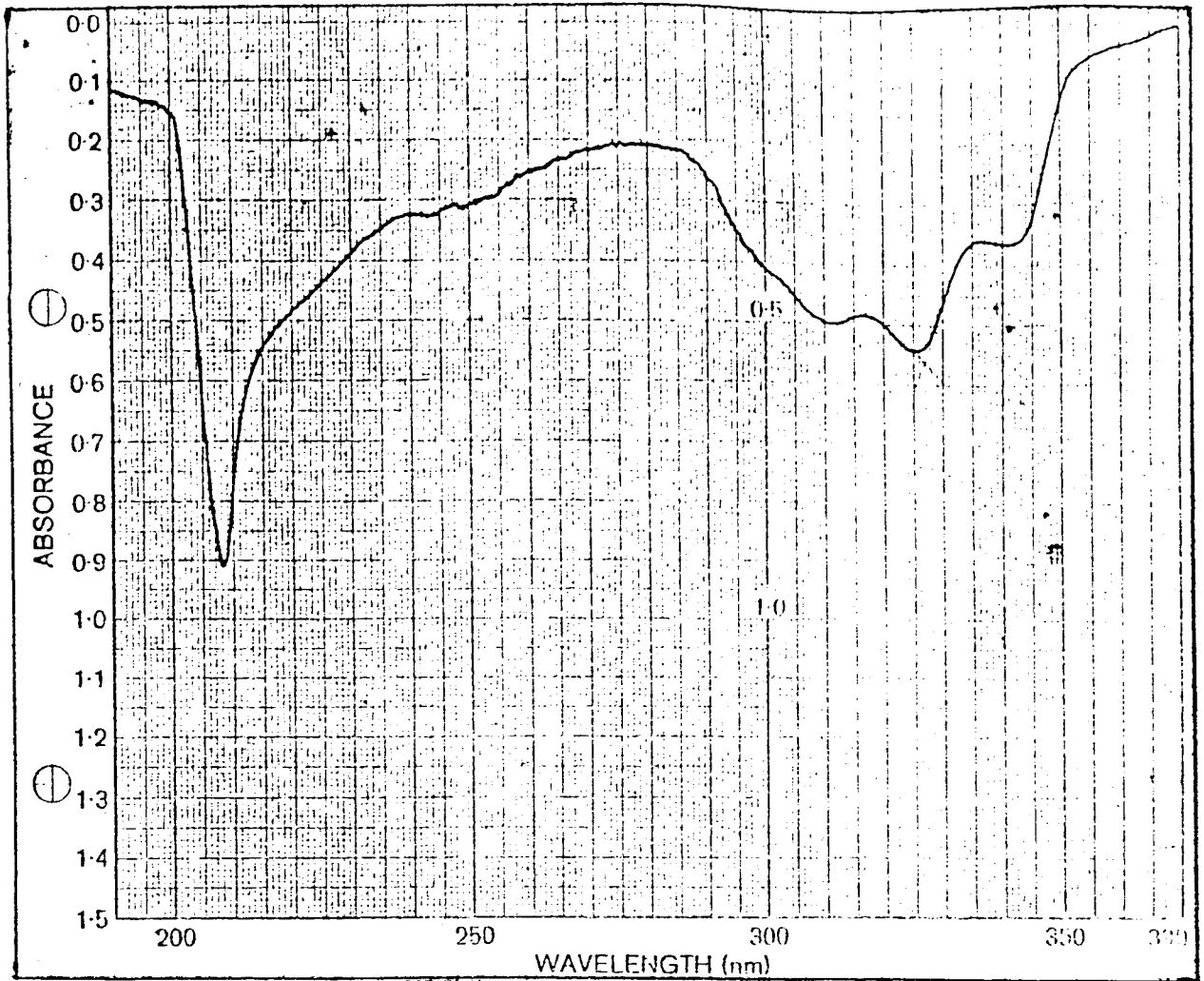




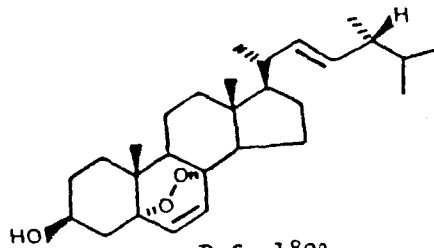
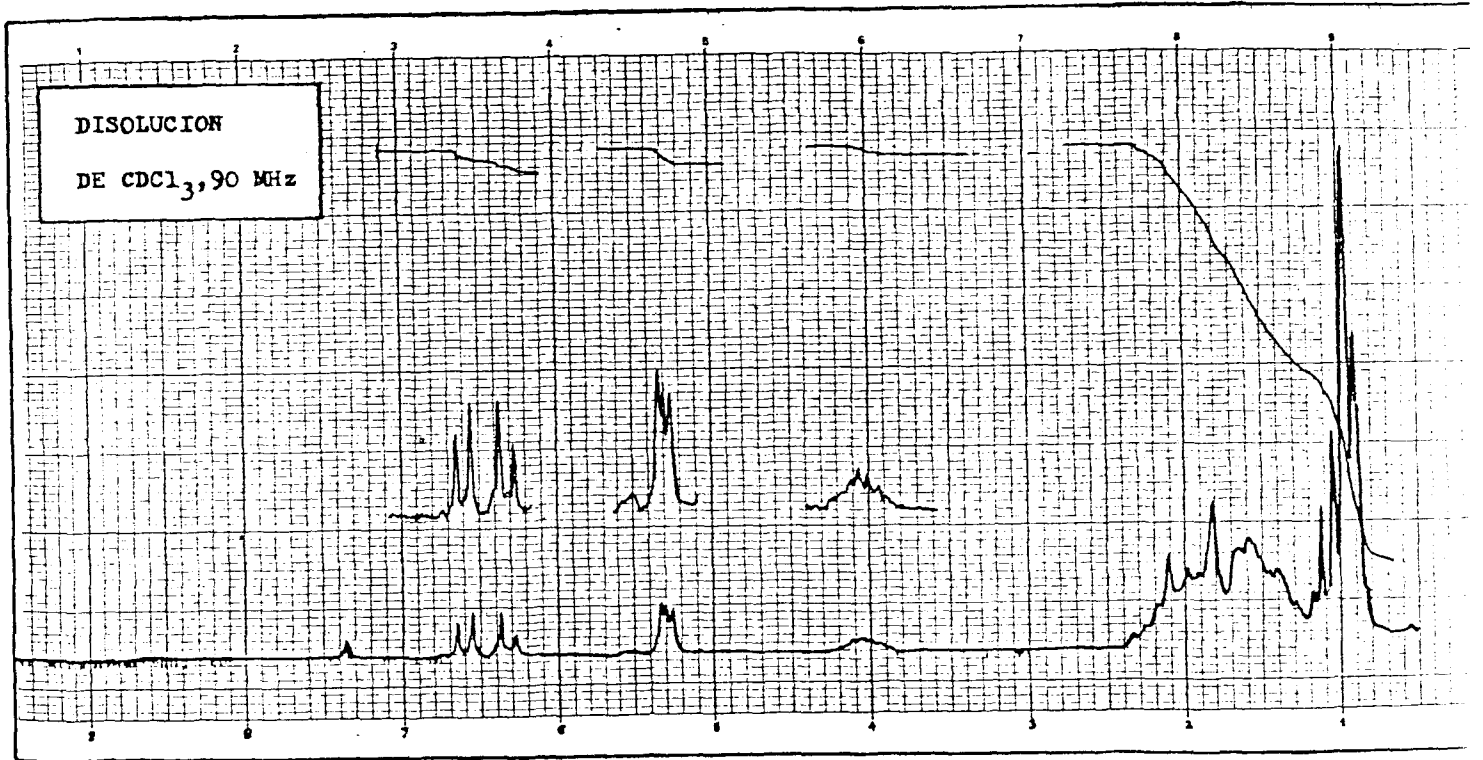
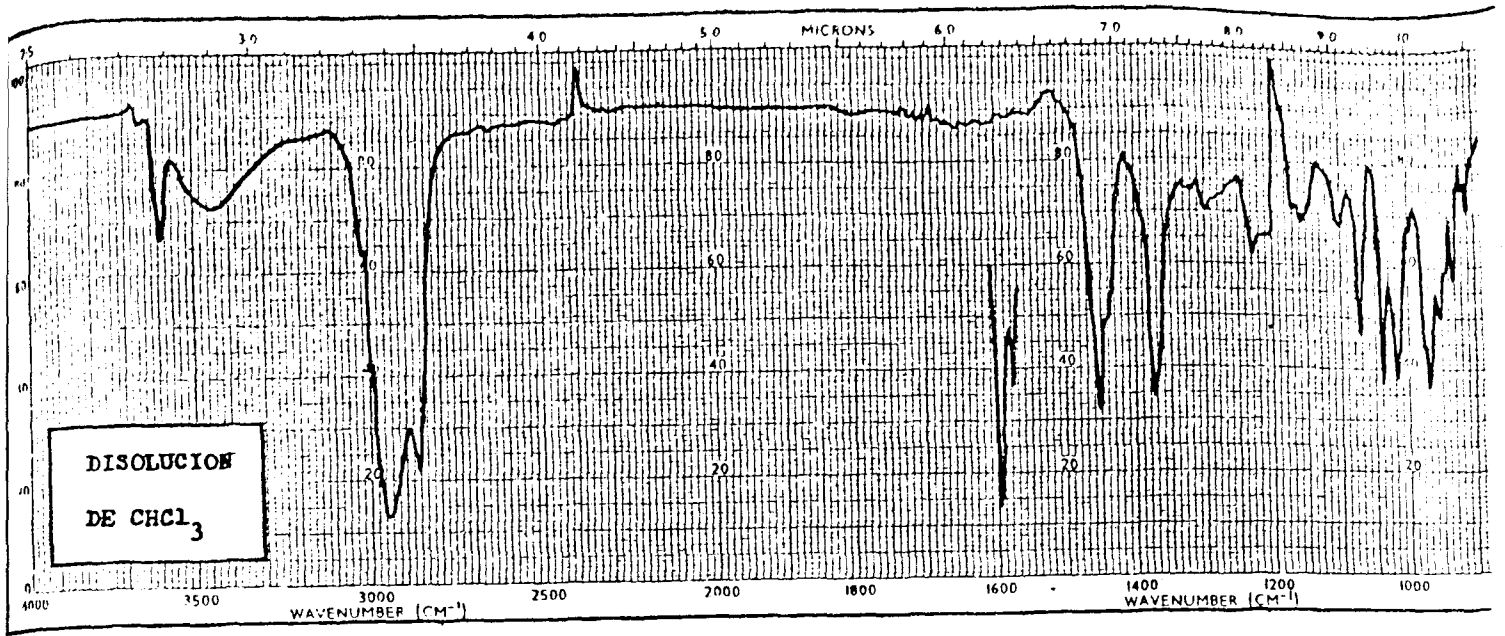
GRAFICA XVI



GRAFICA XVII



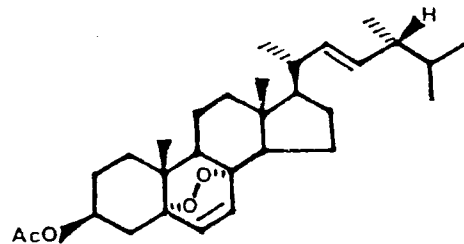
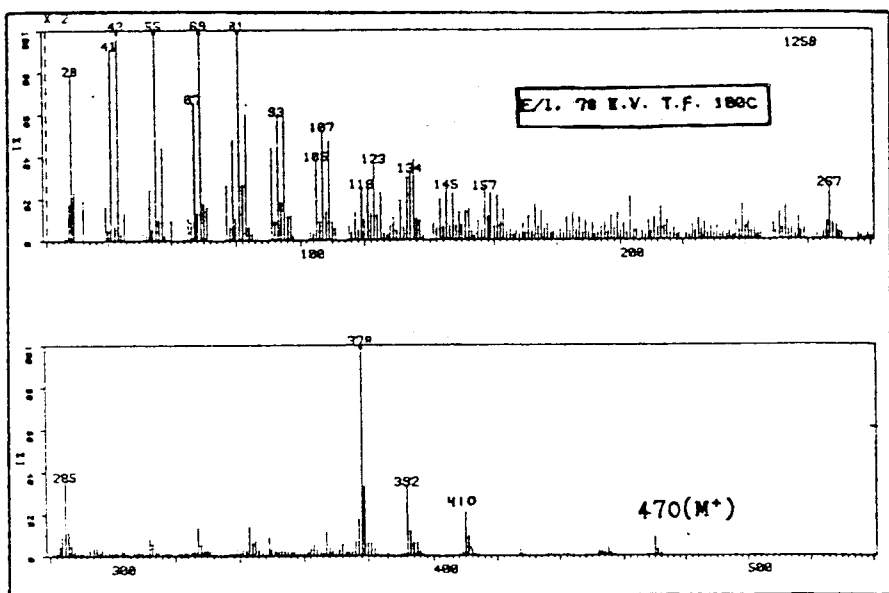
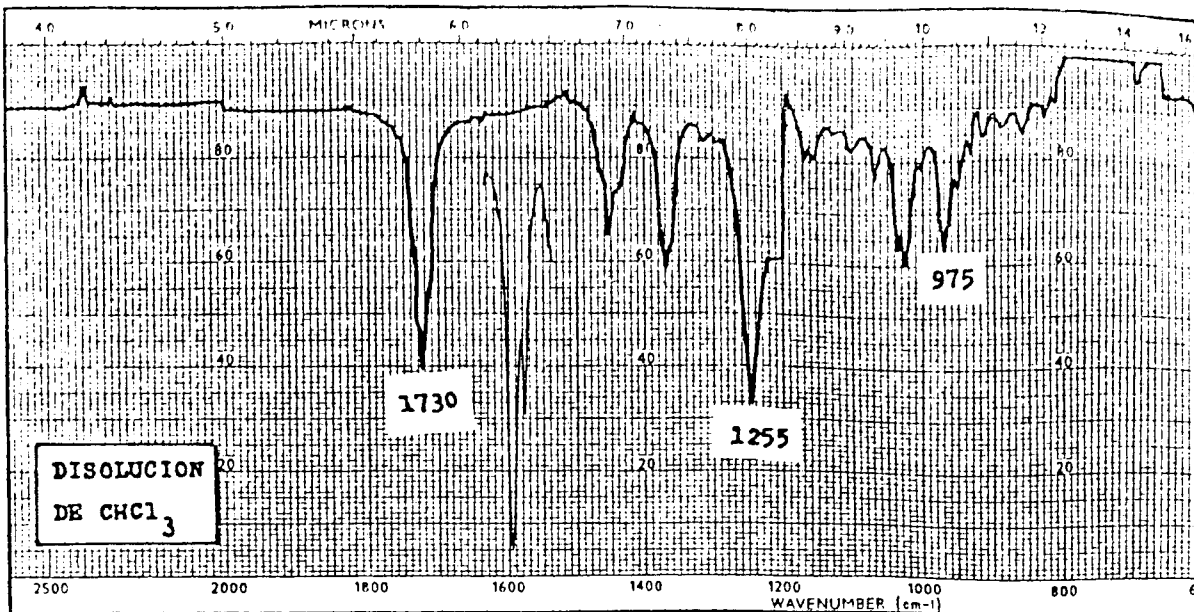
GRAFICA XVIII



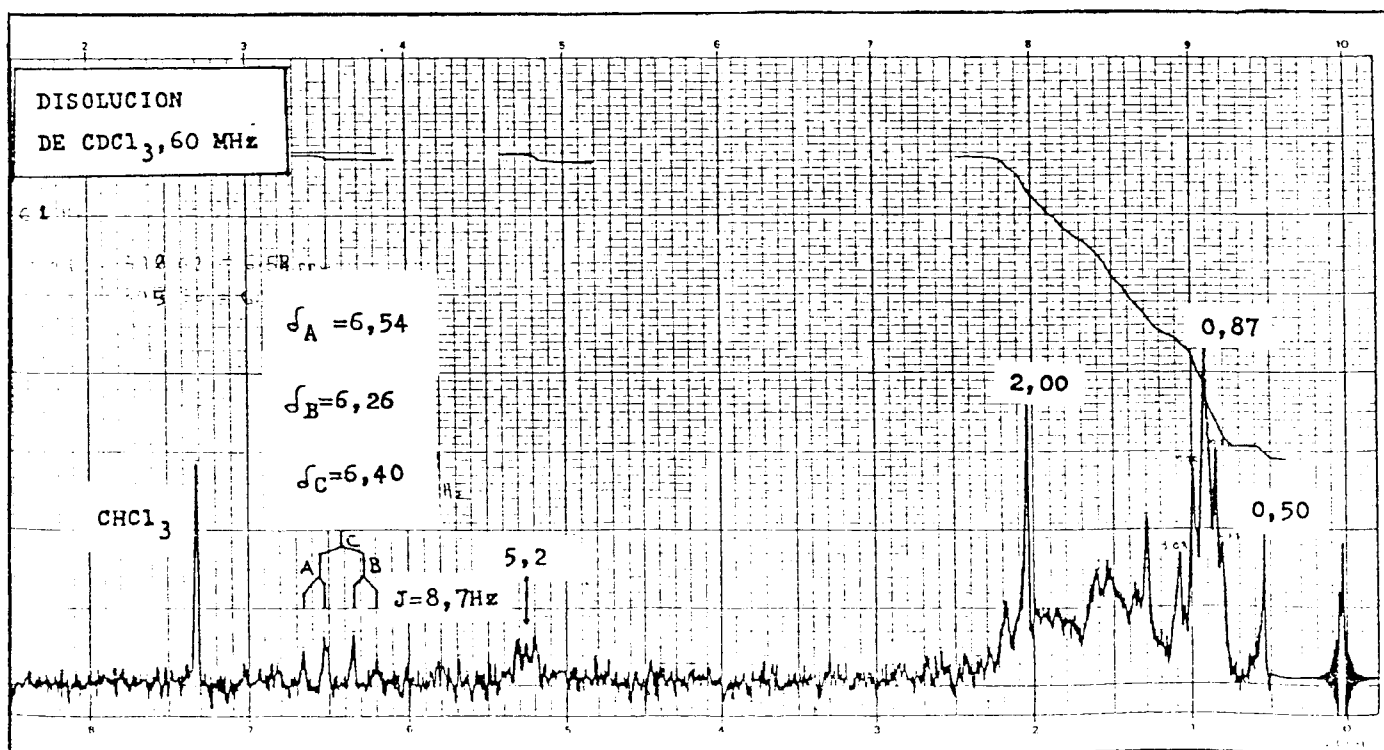
P.f. = 180°

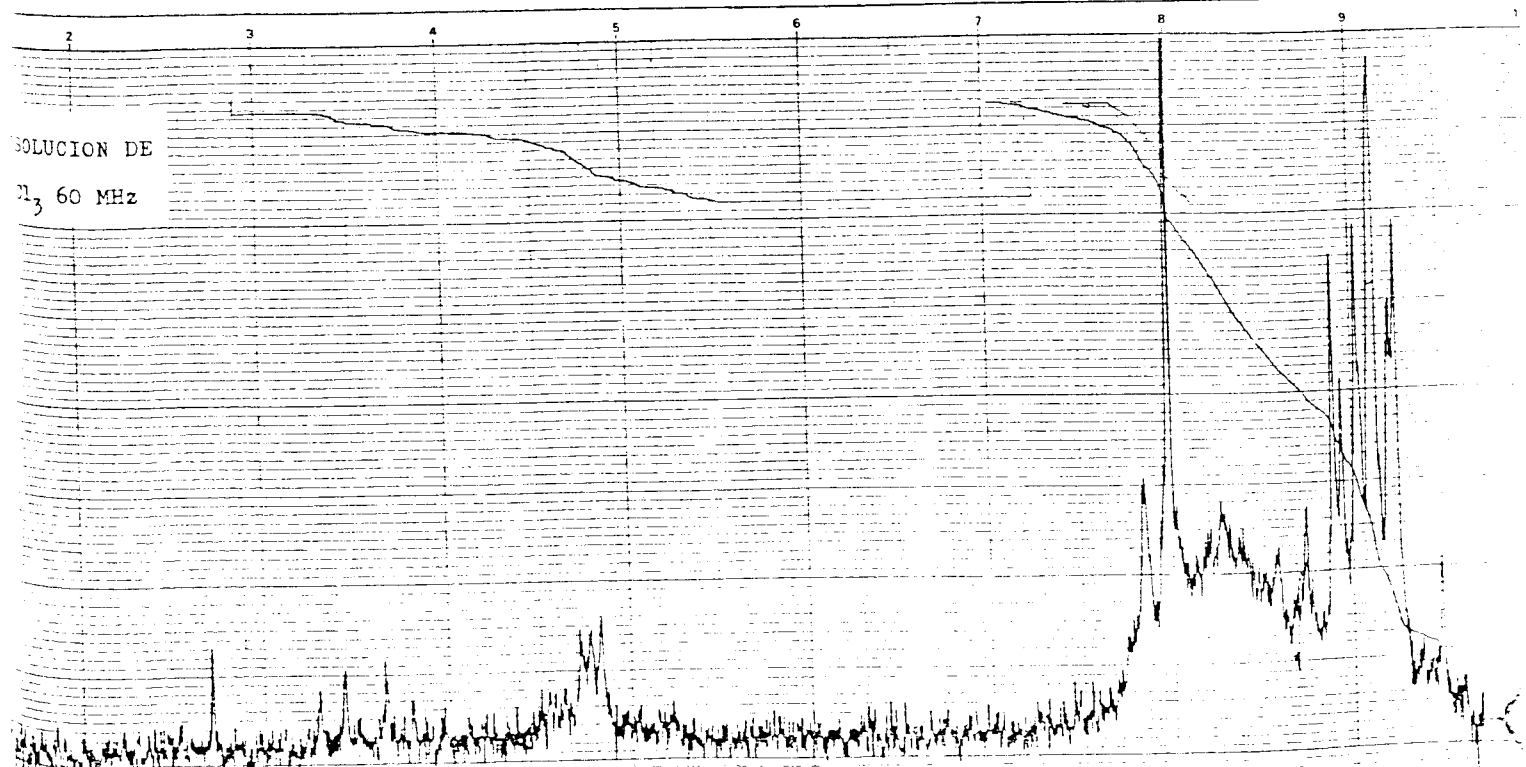
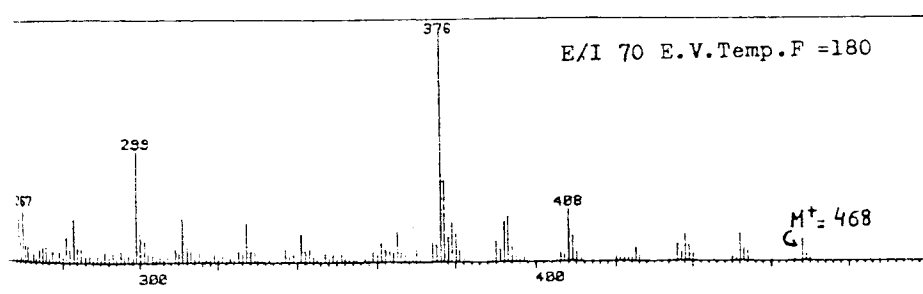
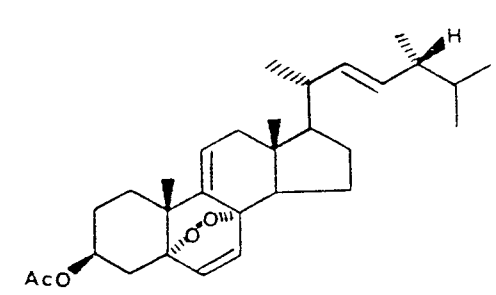
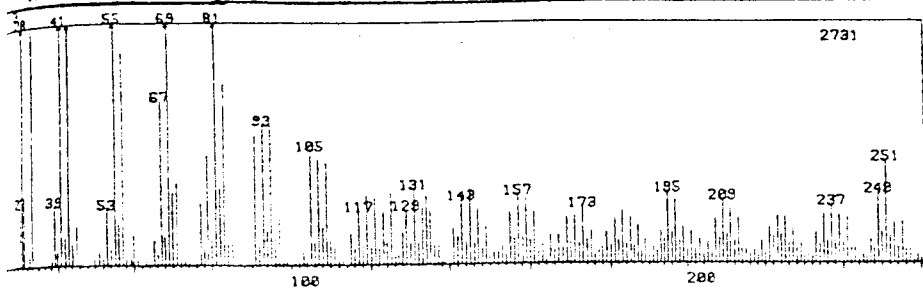
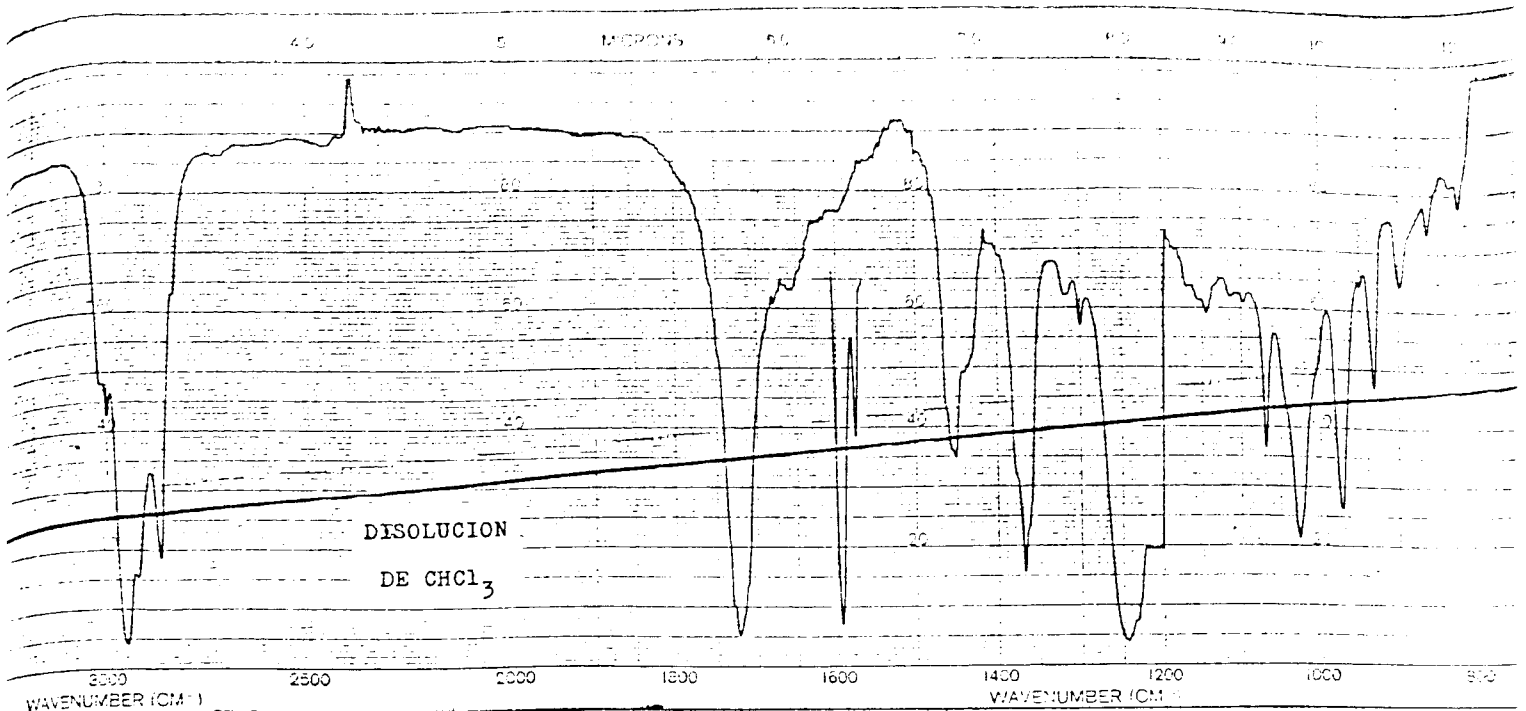
$(\alpha)_D = -30^\circ$

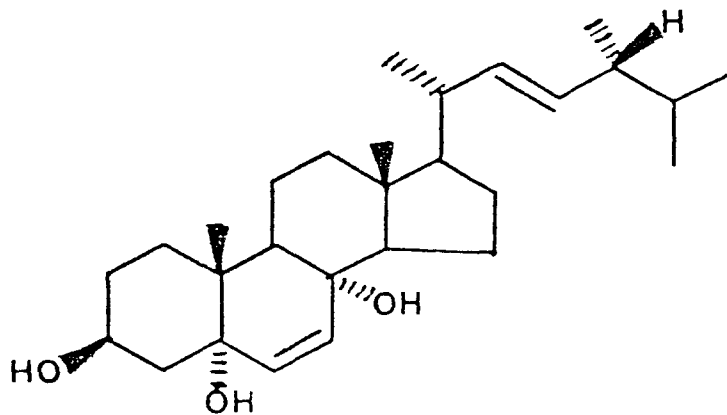
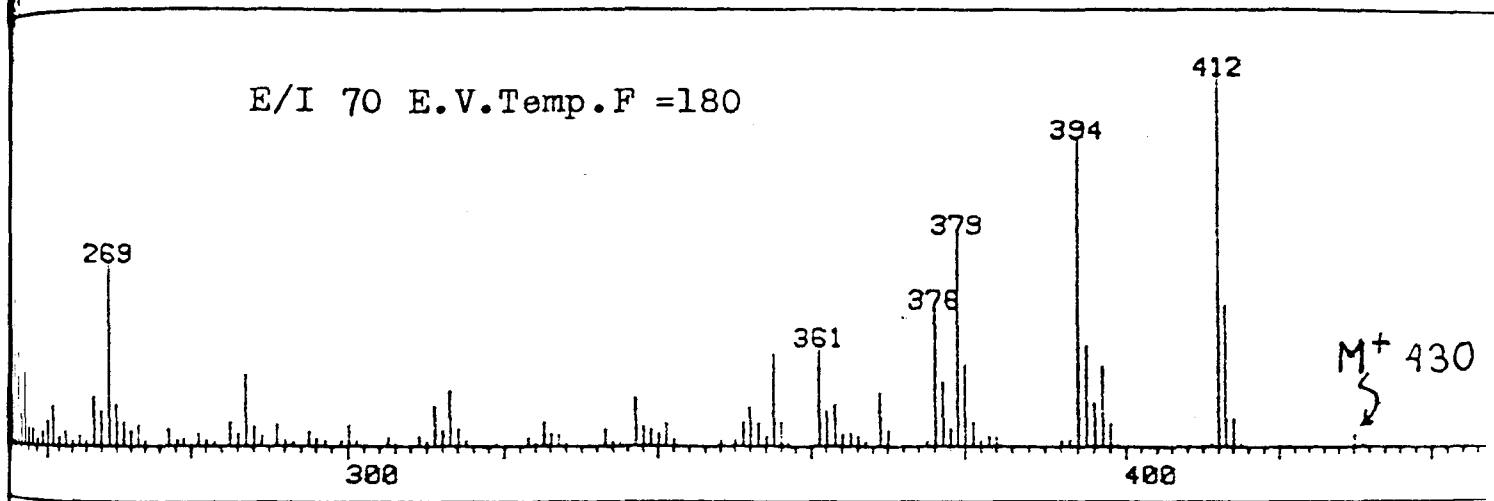
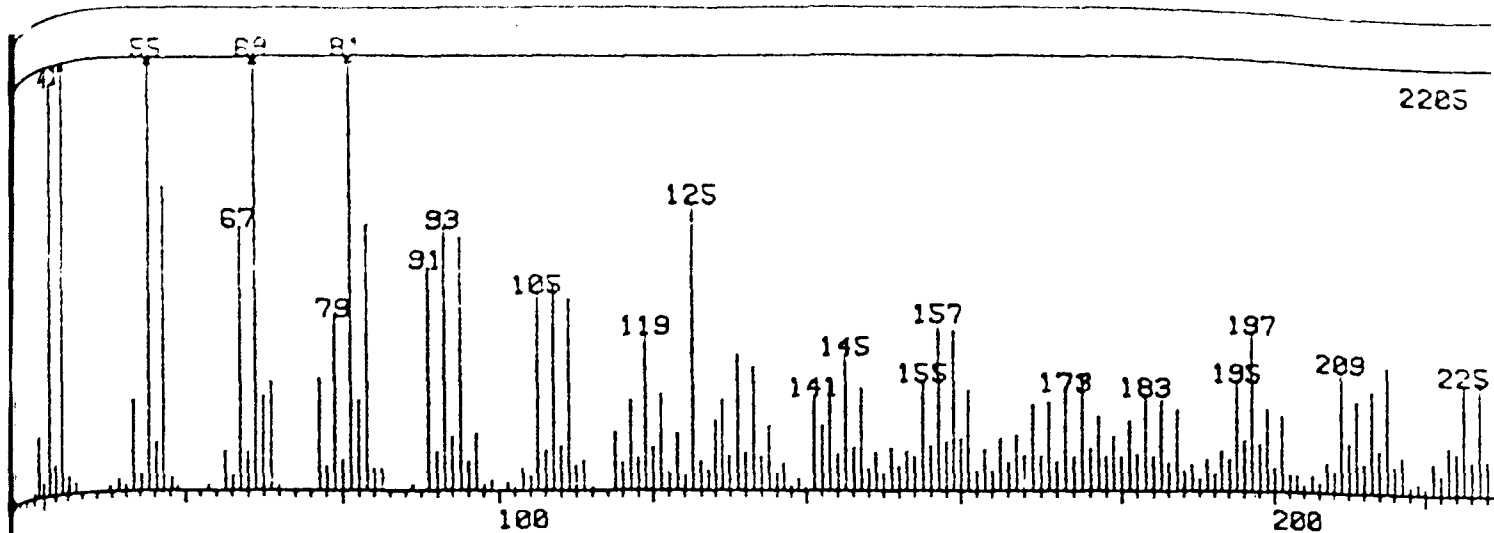
SINTETICO (FOTOOXIGENACION)
DEL ERGOSTEROL



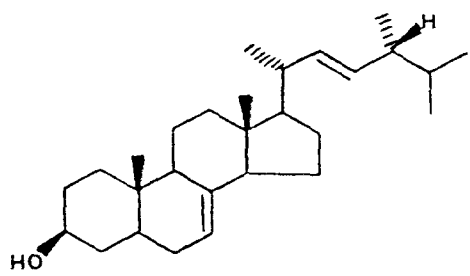
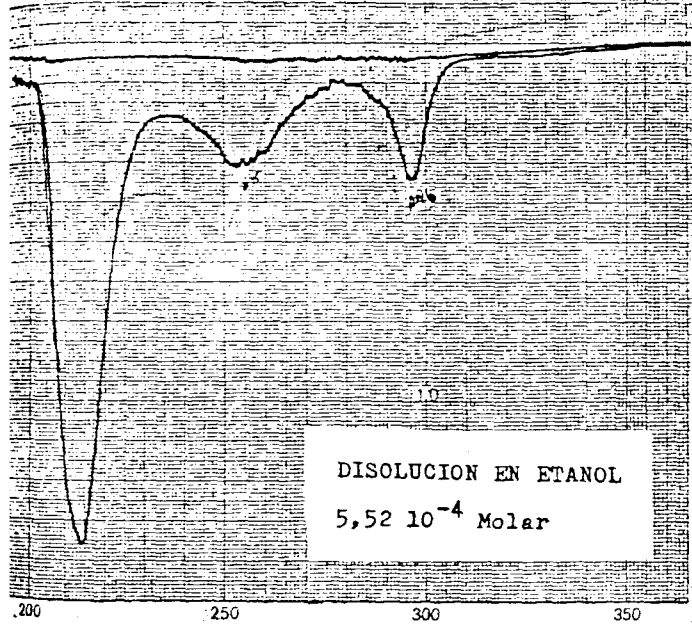
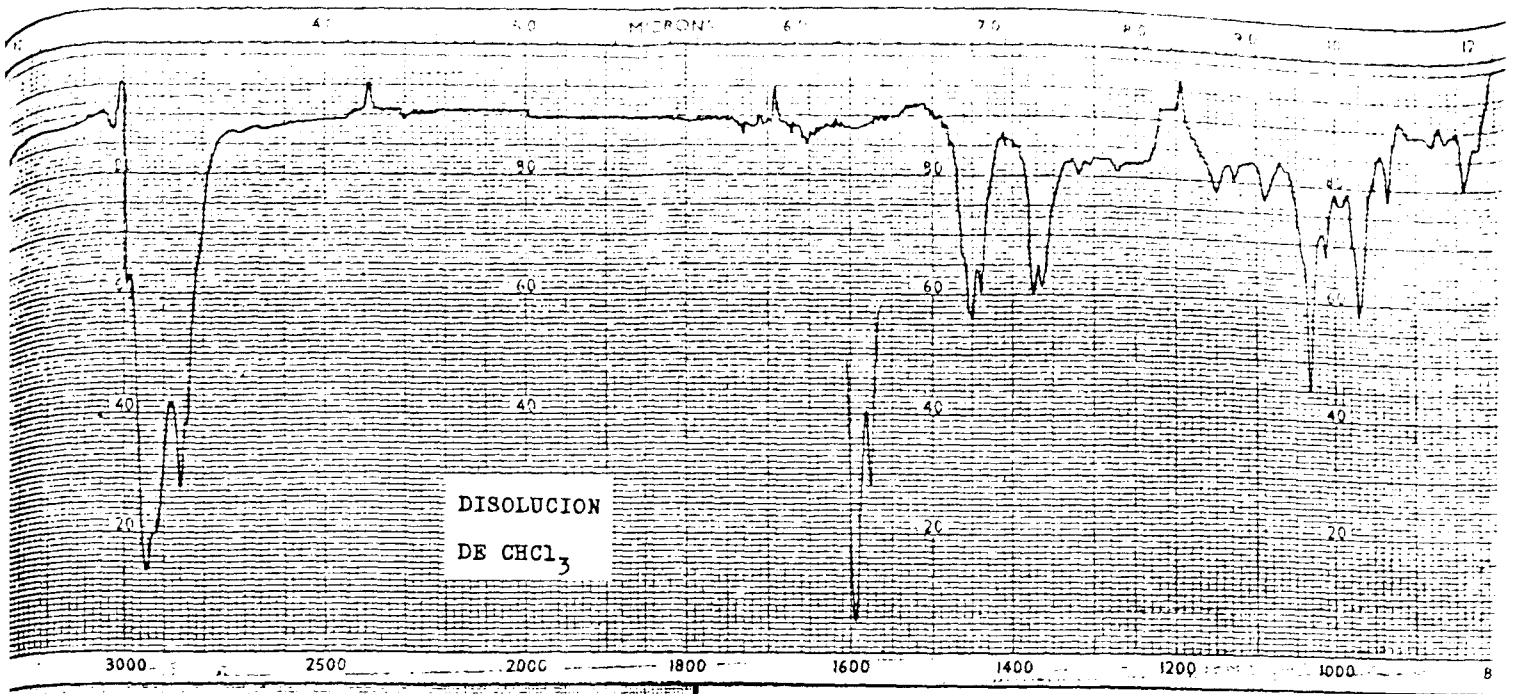
P.f. = 200-202 °C



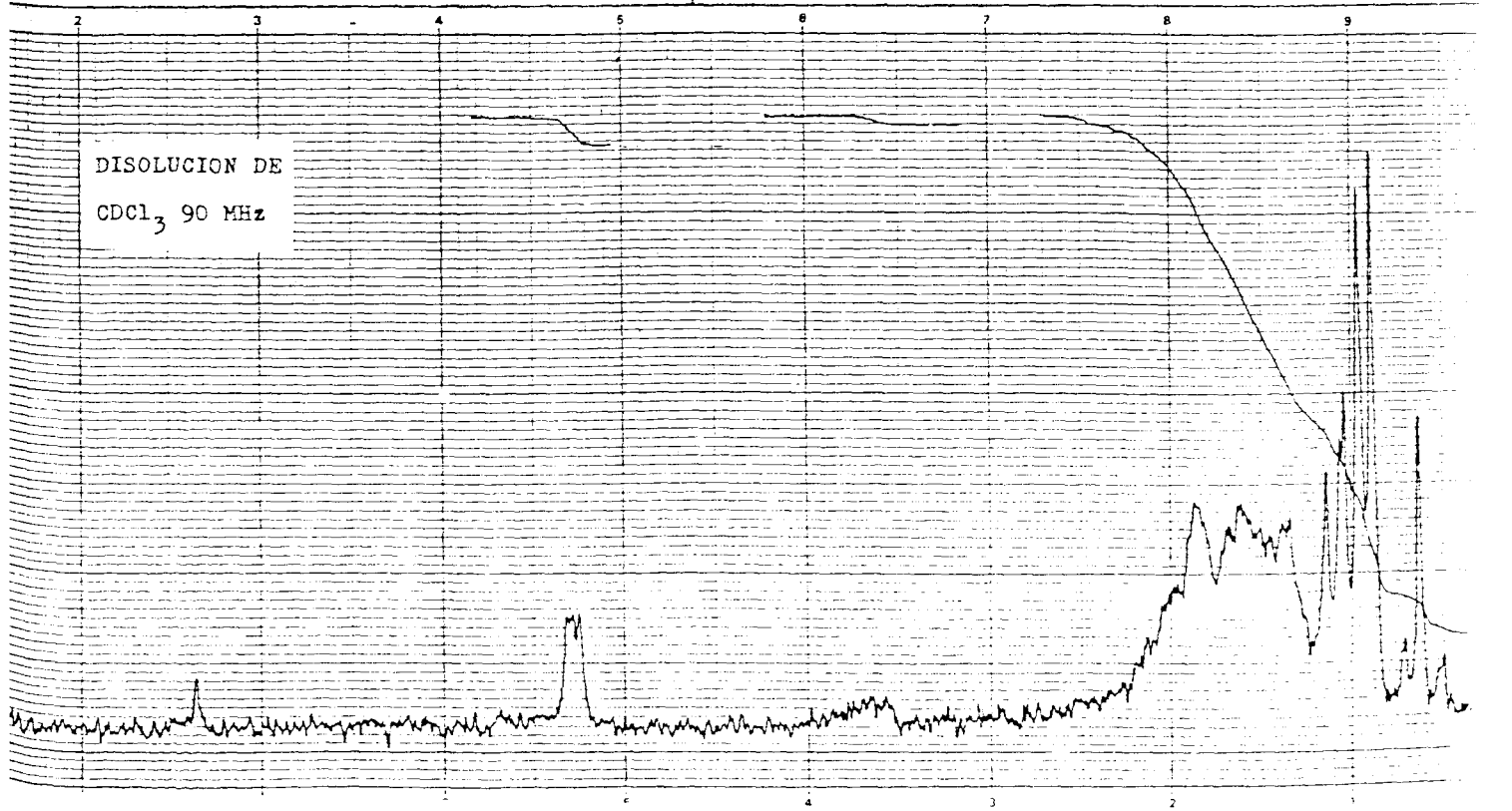


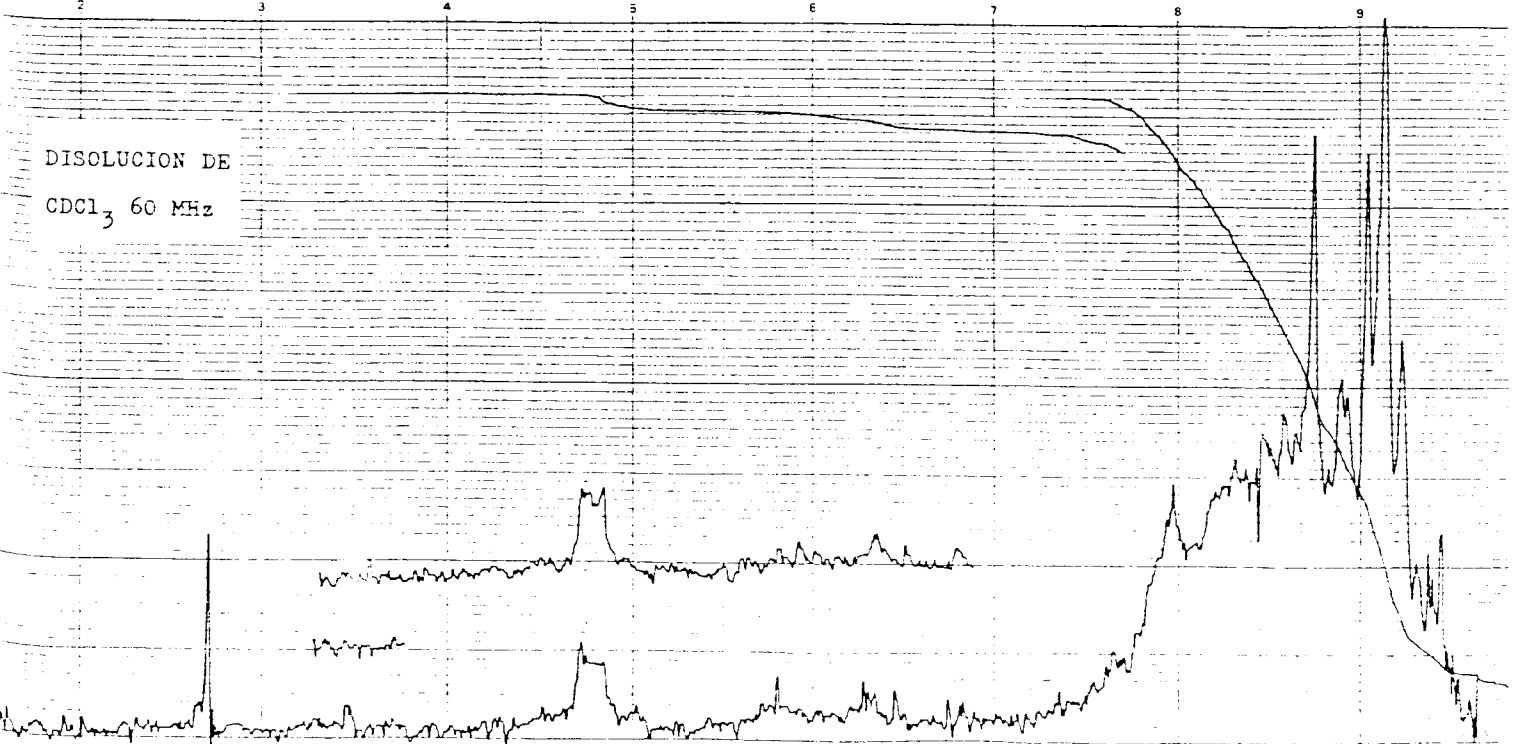
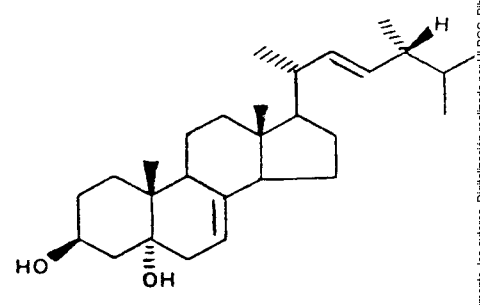
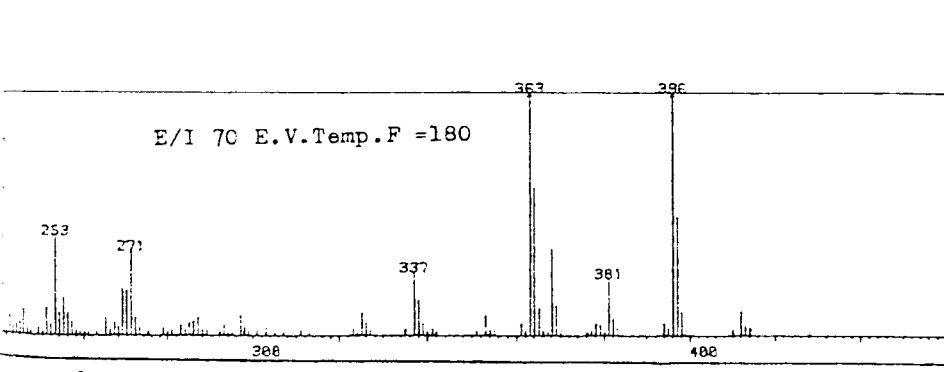
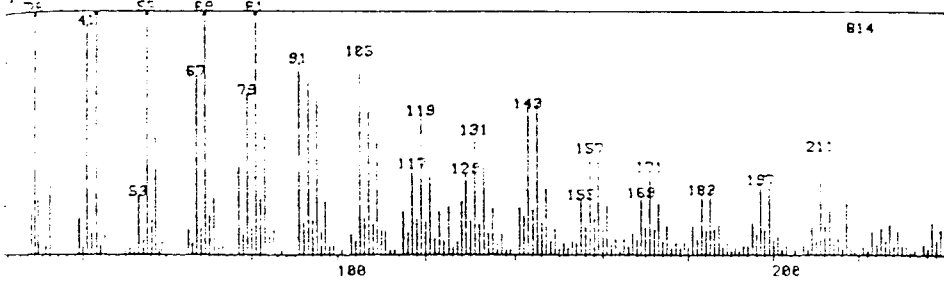
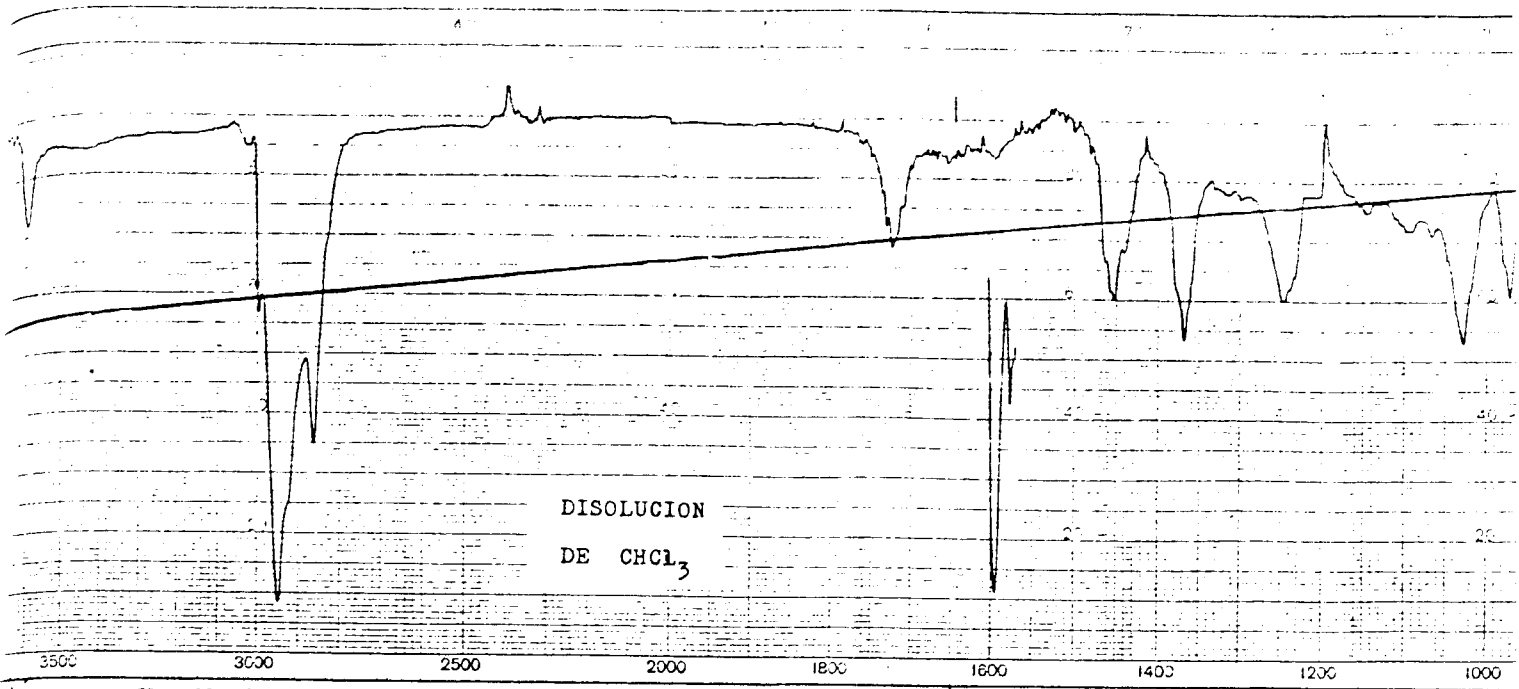


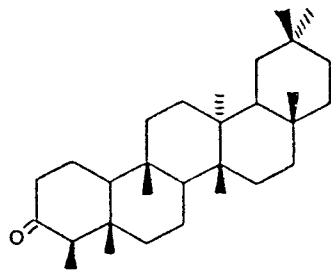
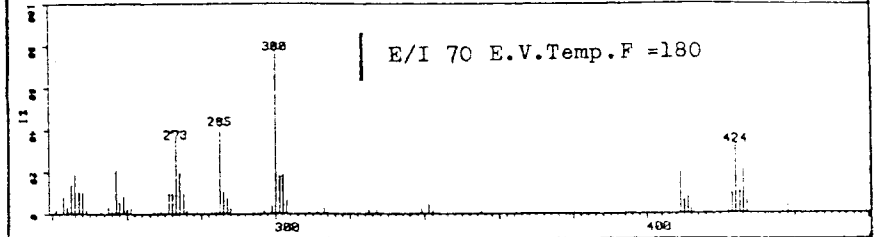
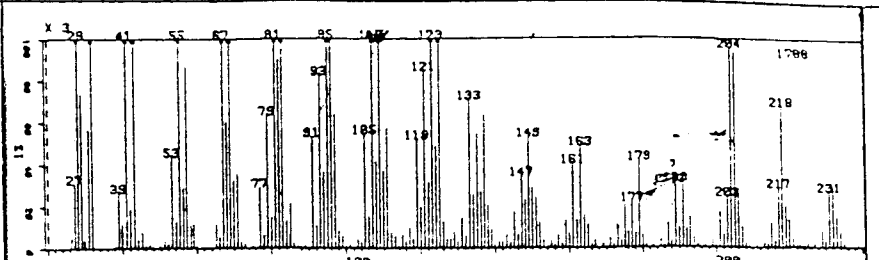
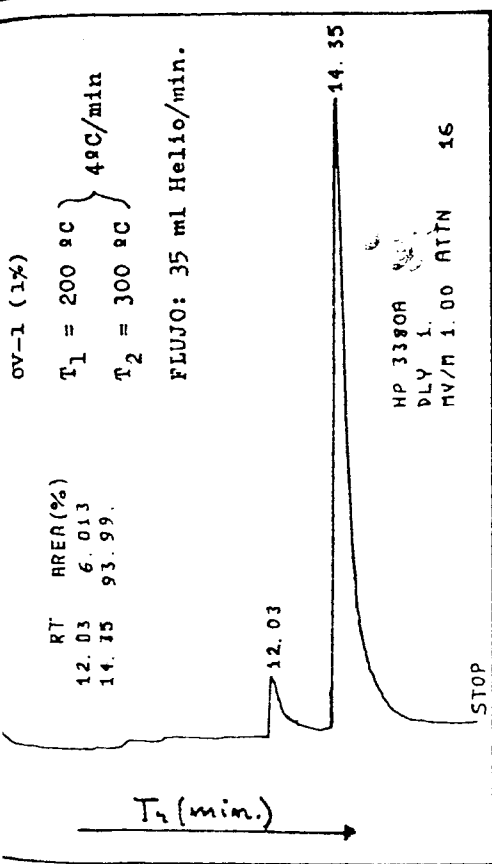
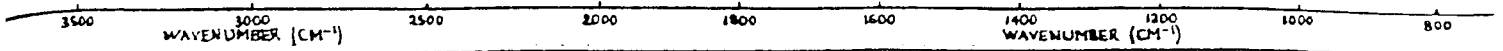
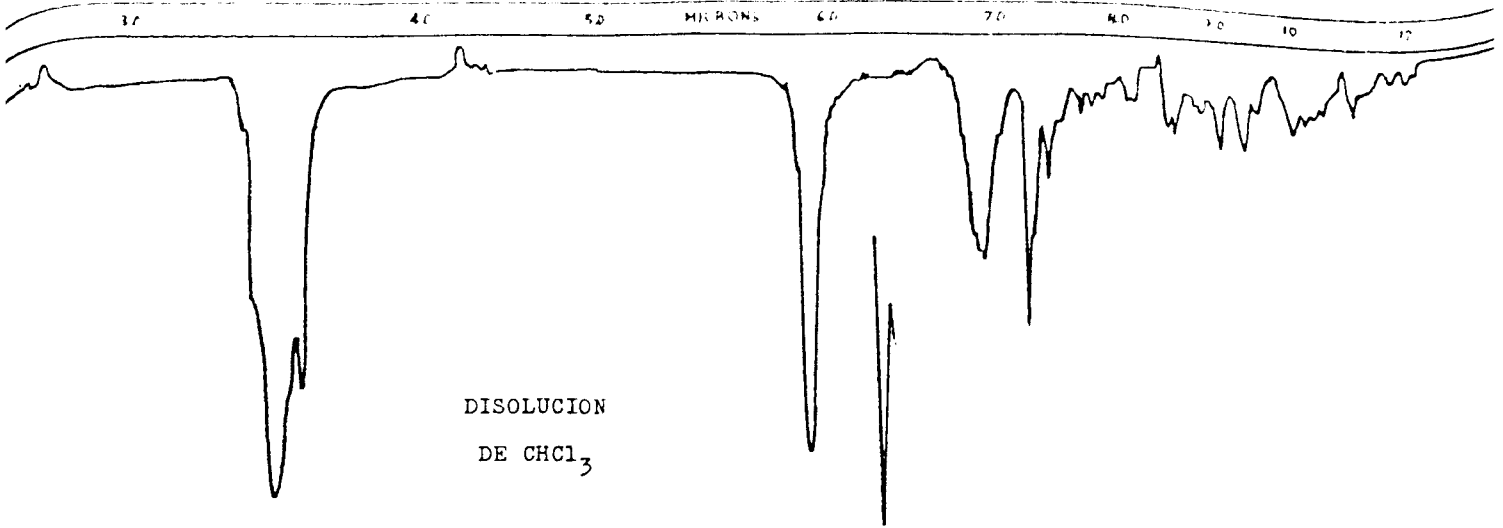
GRAFICA XXII



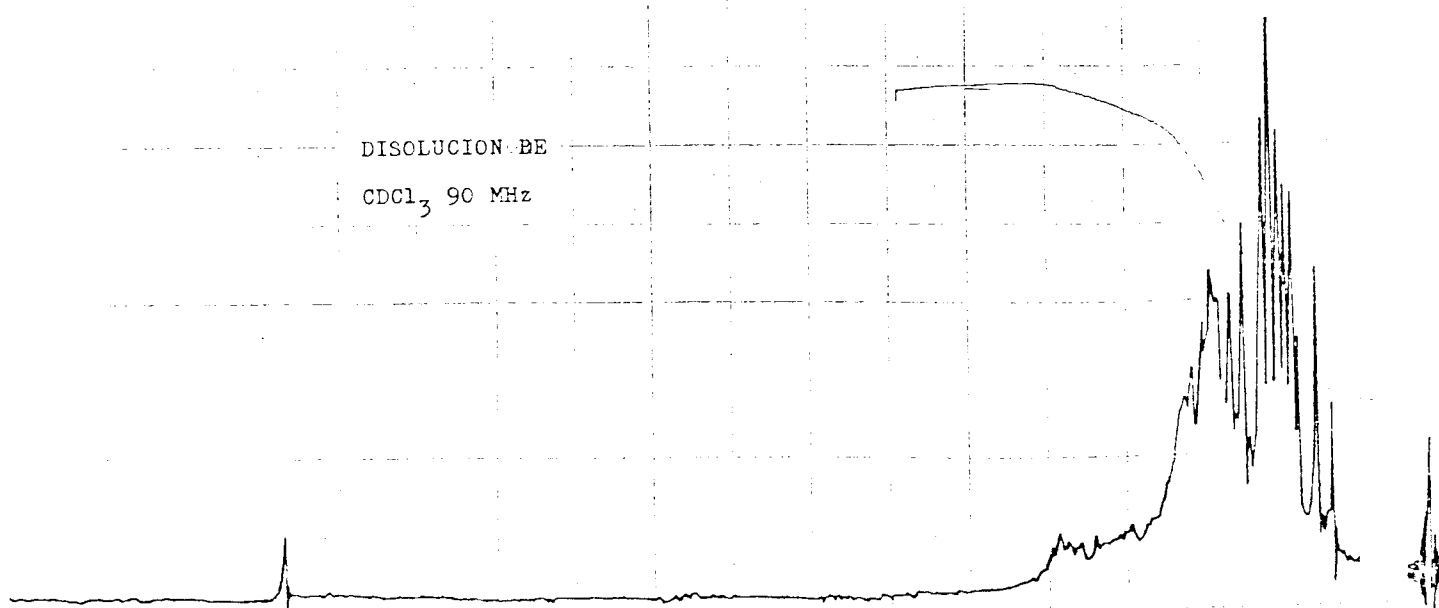
$(\alpha)_D^{20} = -36$



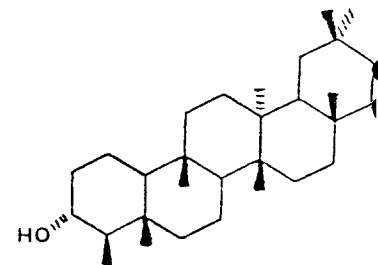
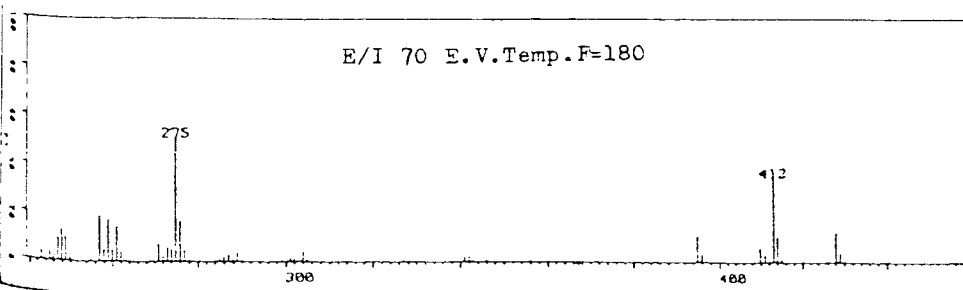
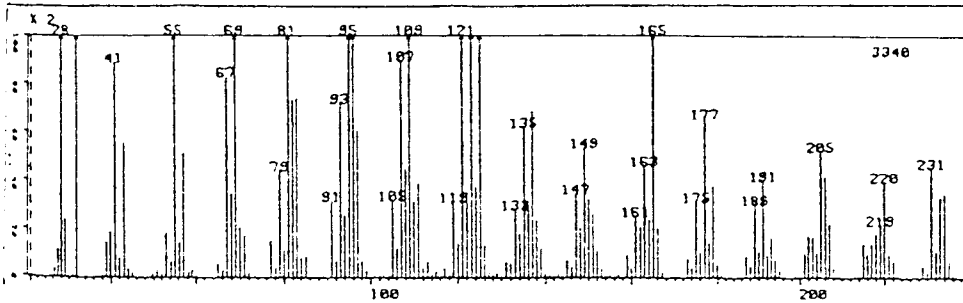
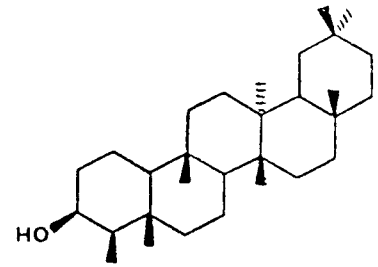
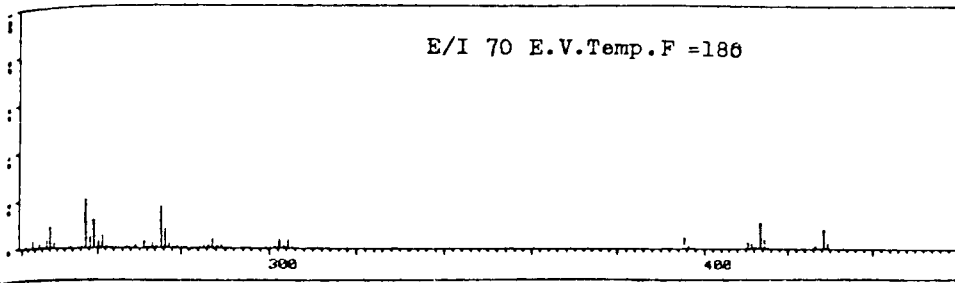
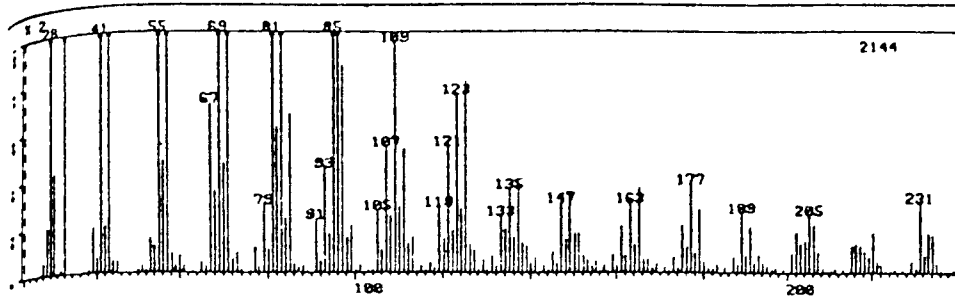


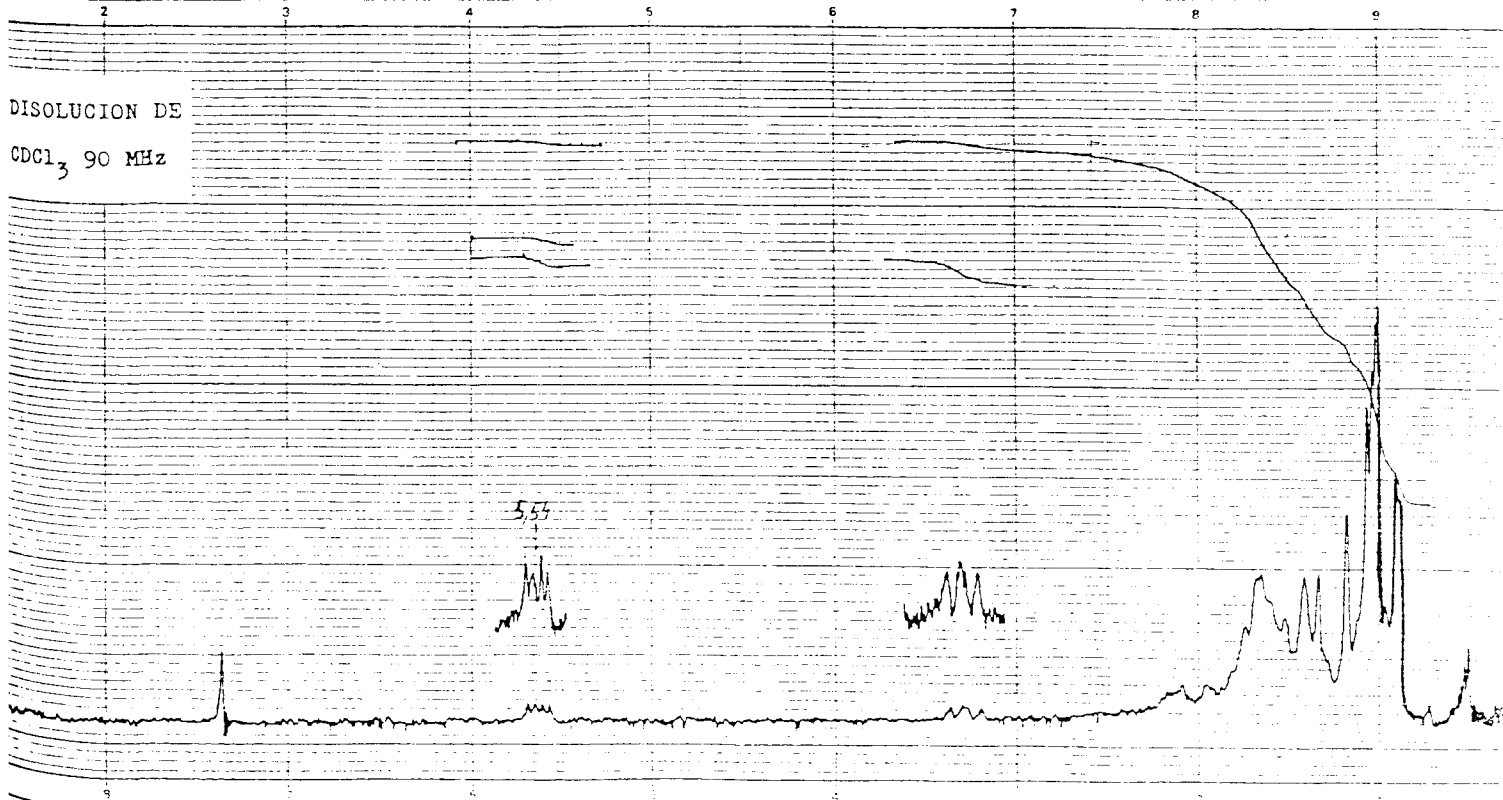
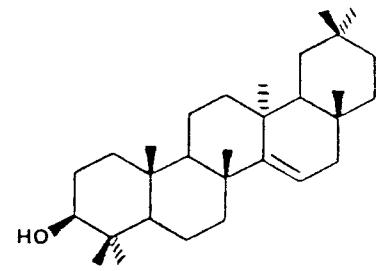
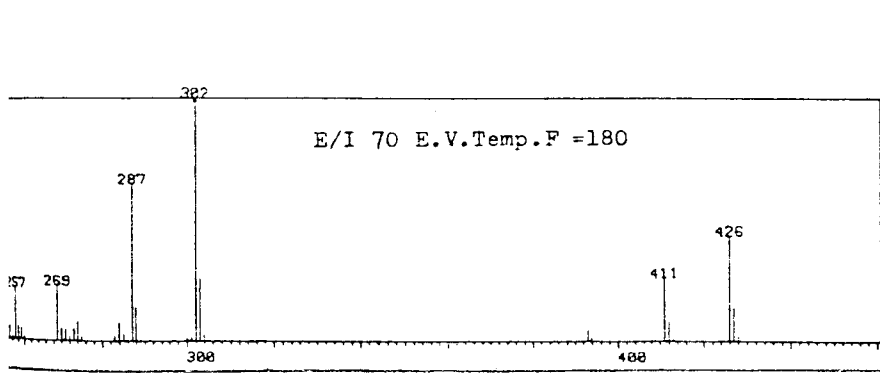
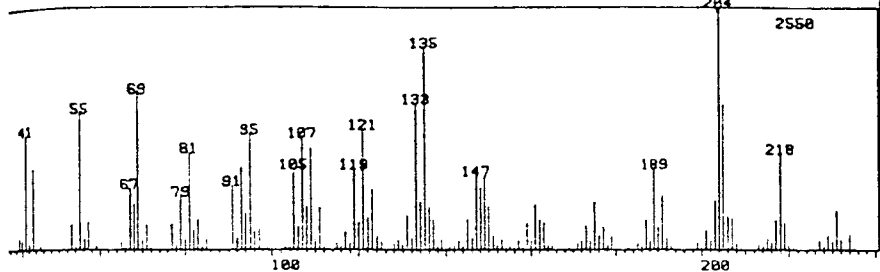
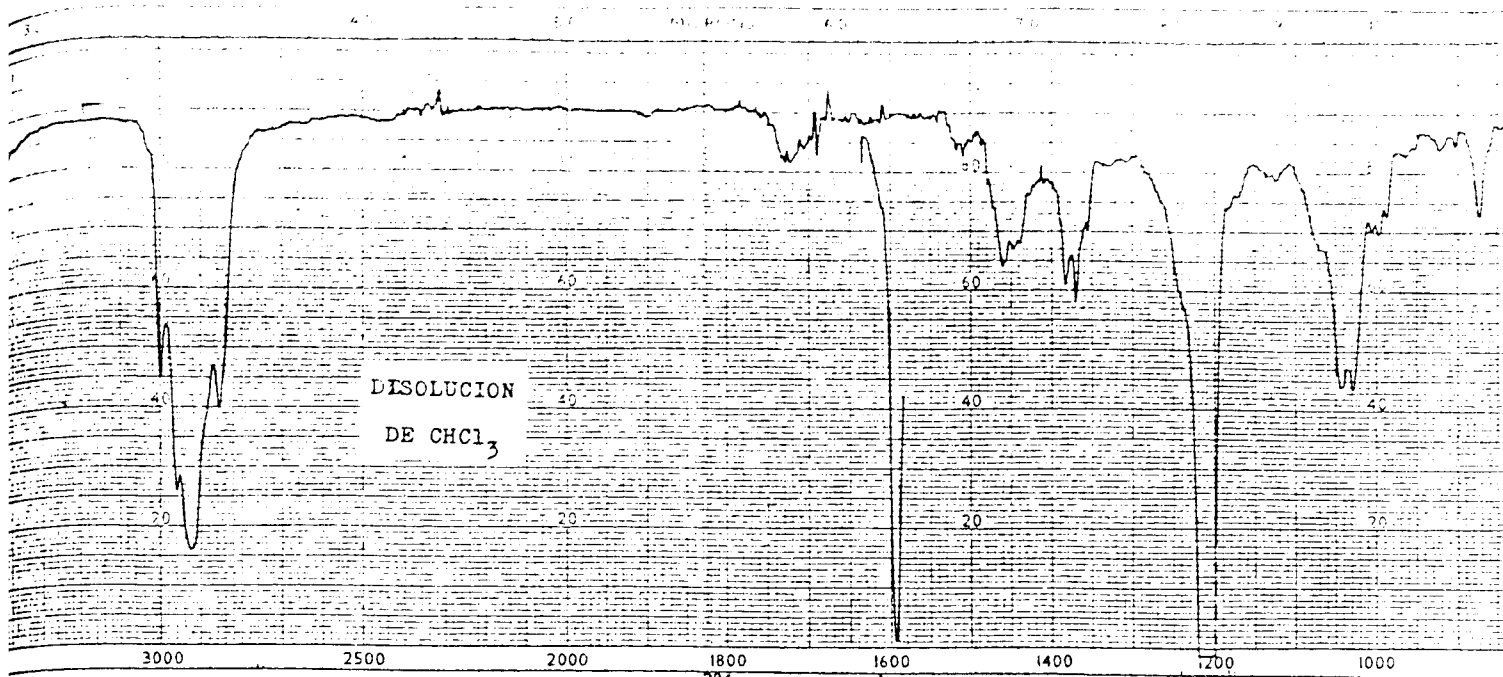


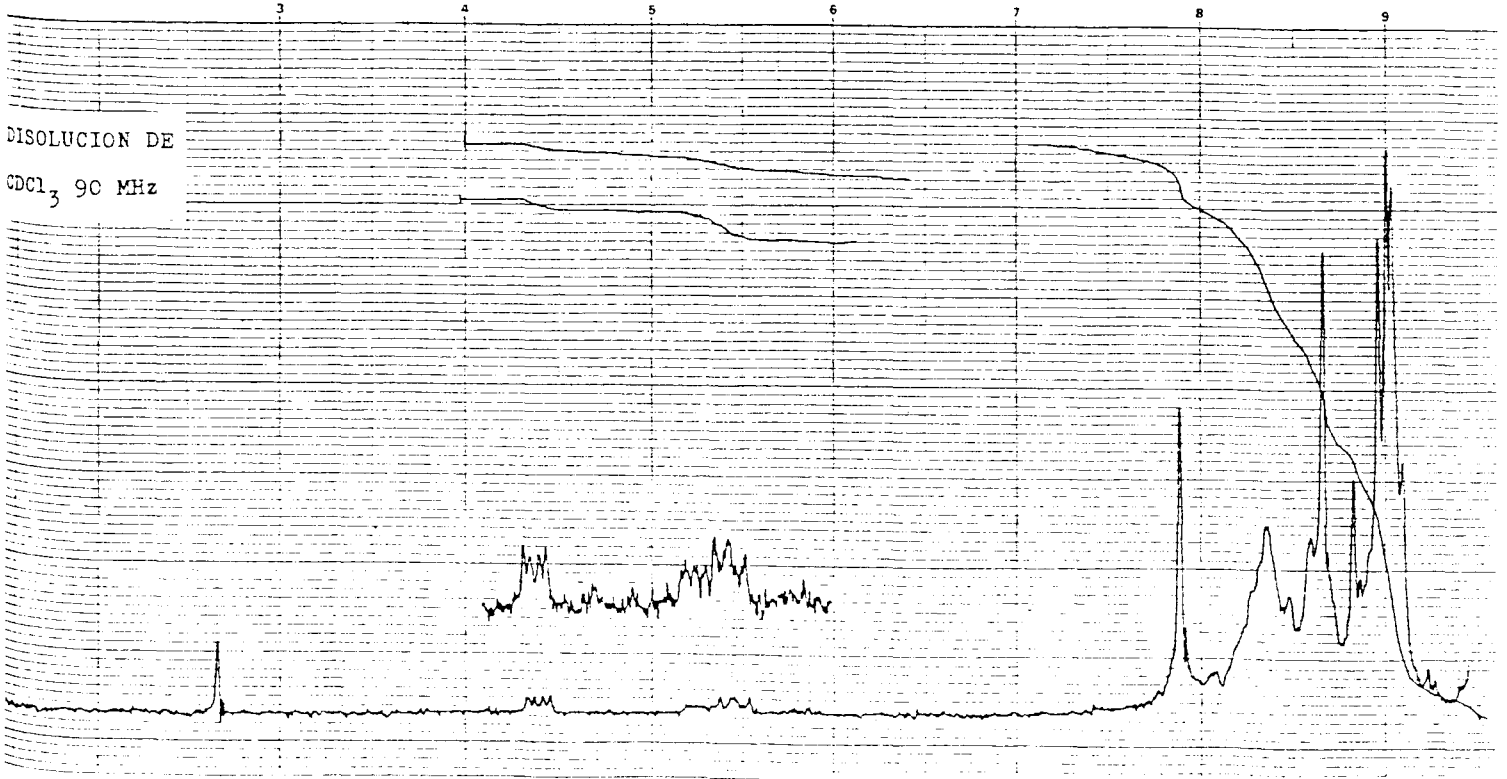
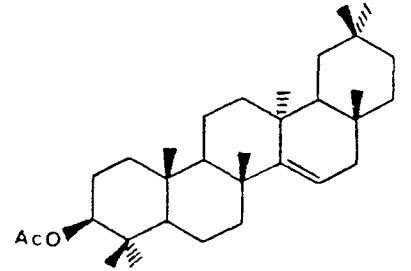
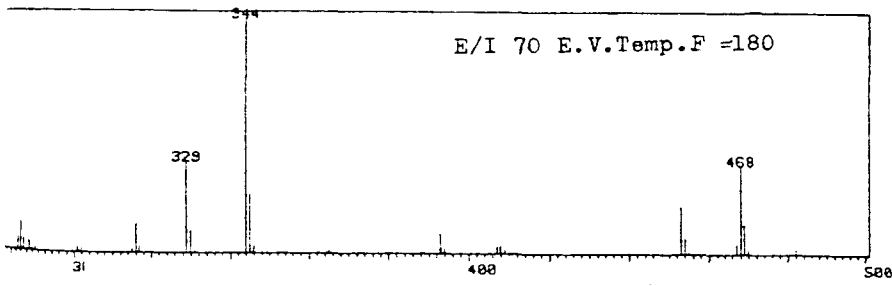
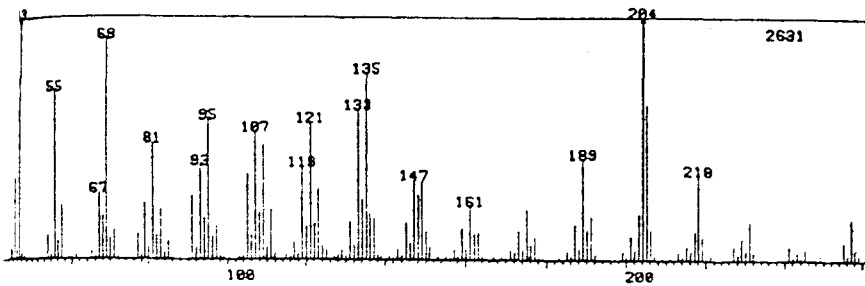
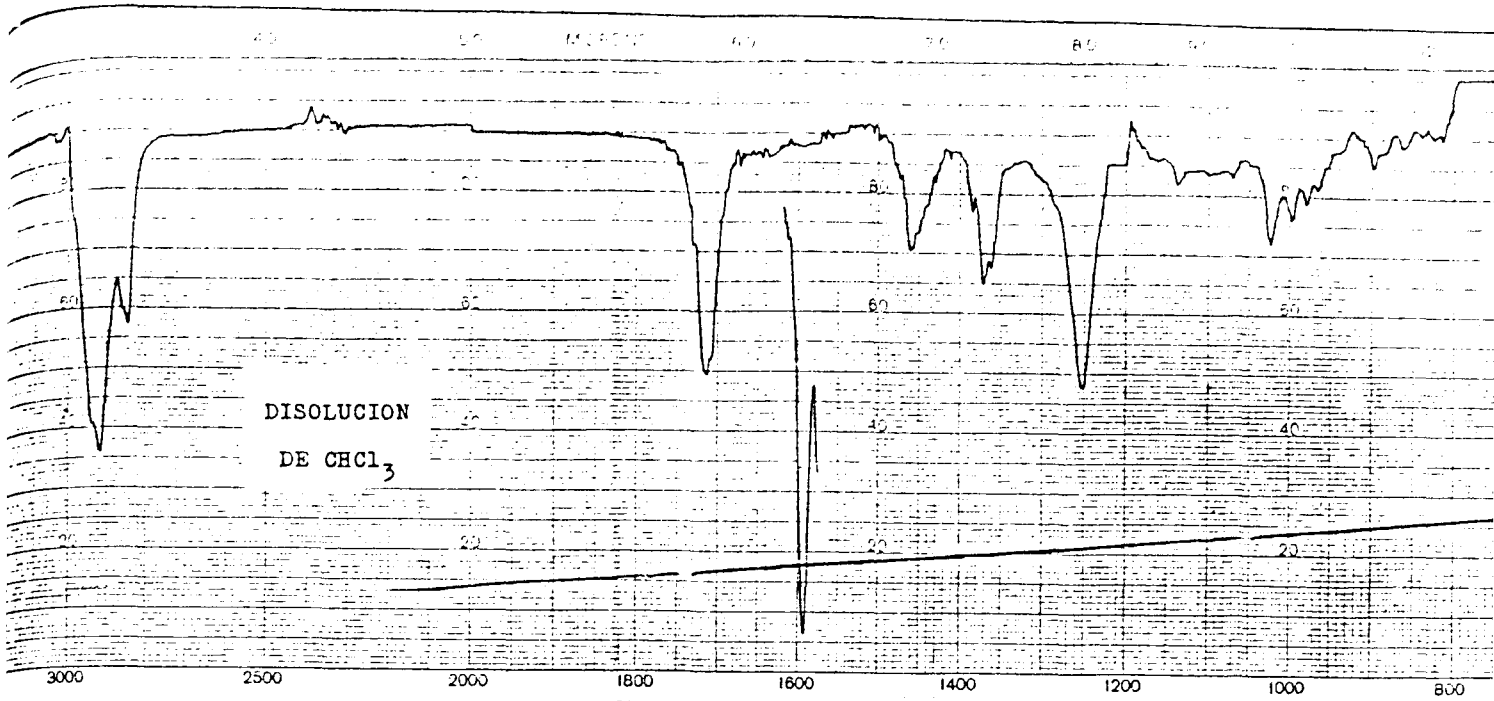
DISOLUCION: BE
 CDCl₃ 90 MHz



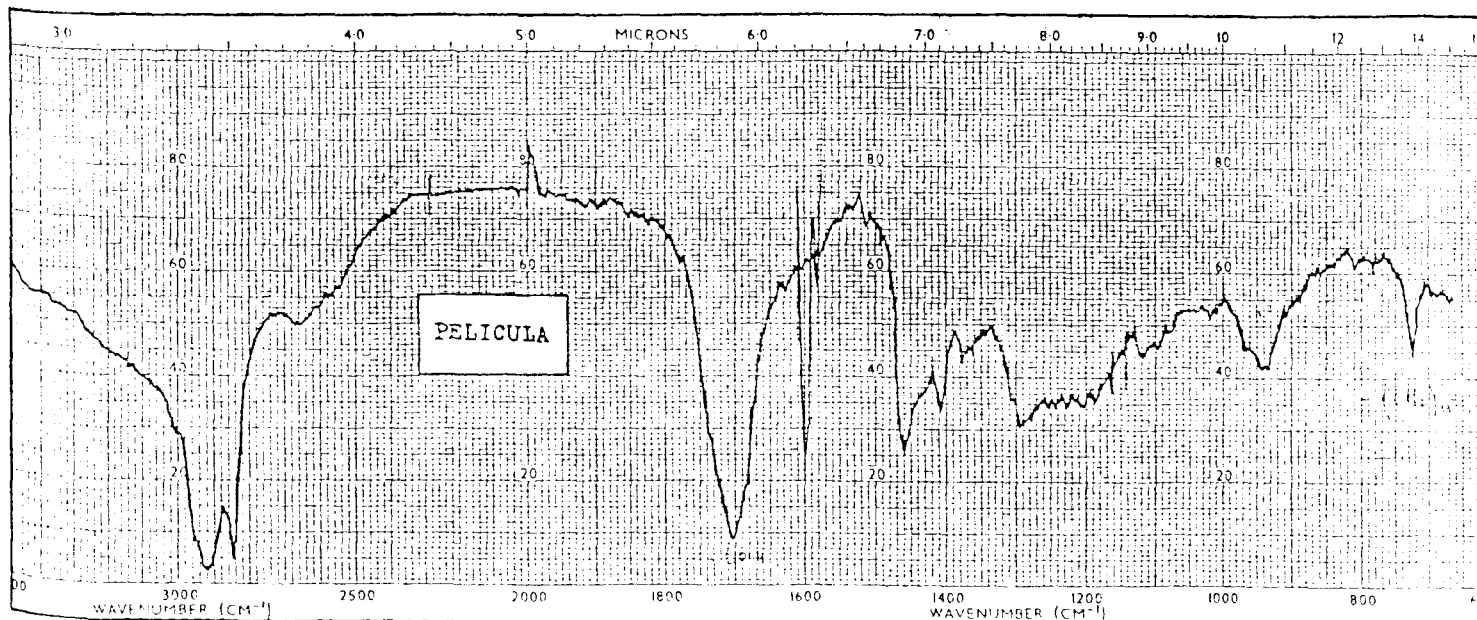
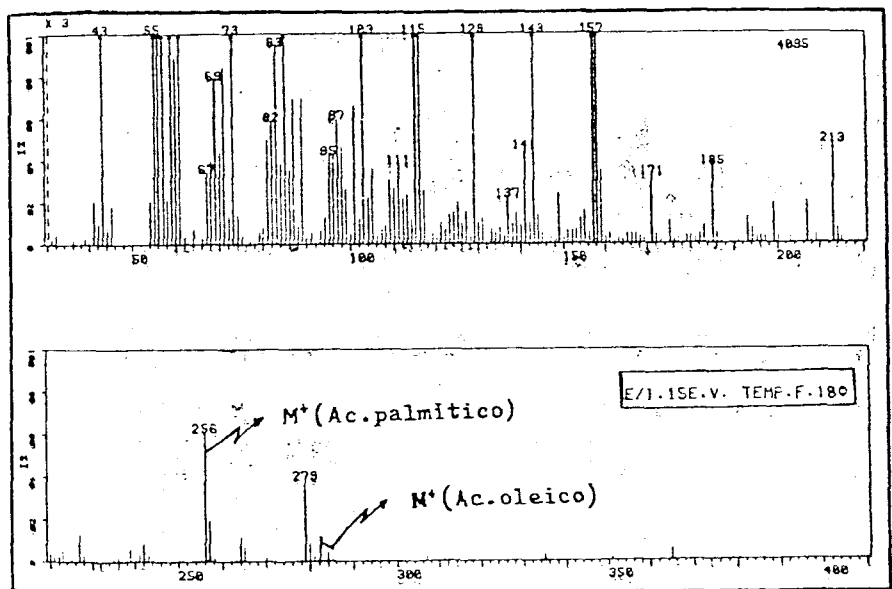
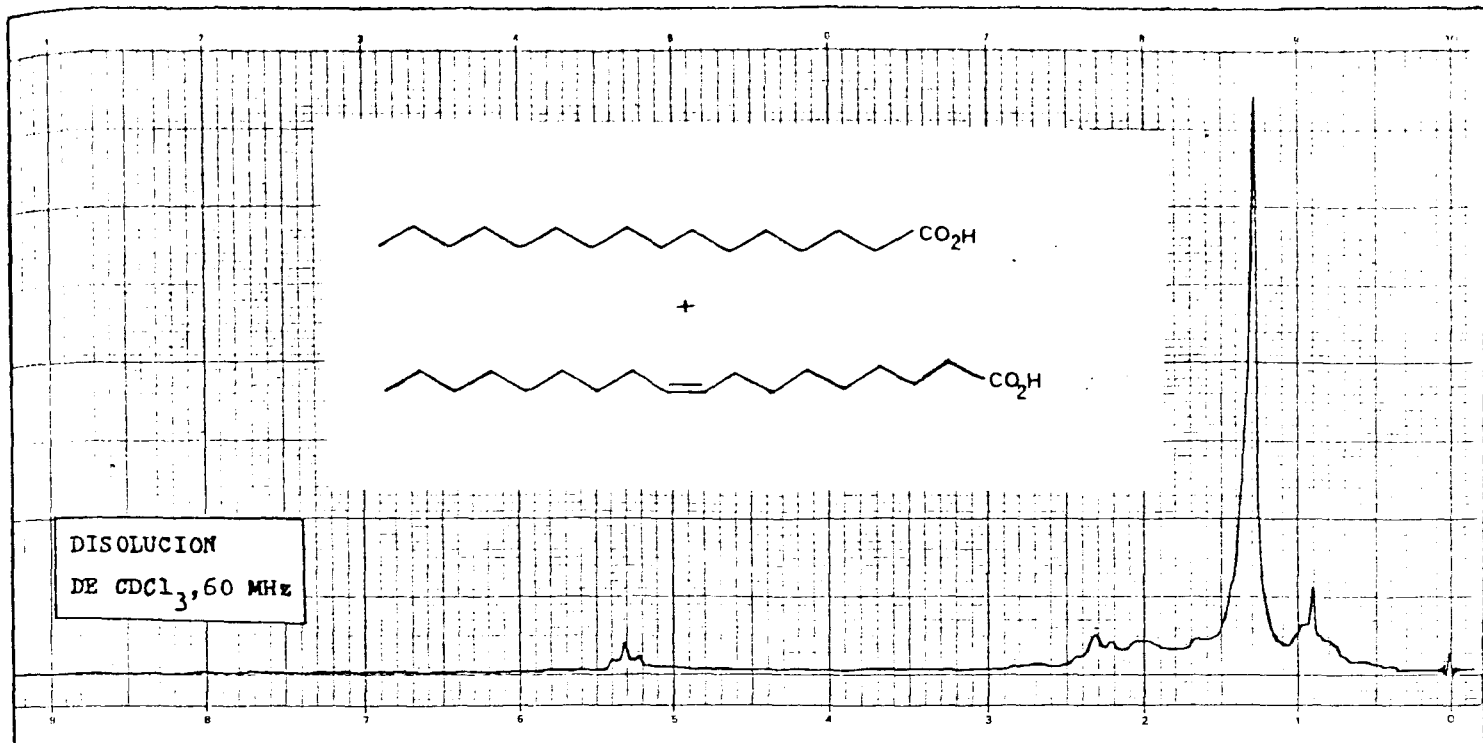
GRAFICA XXV

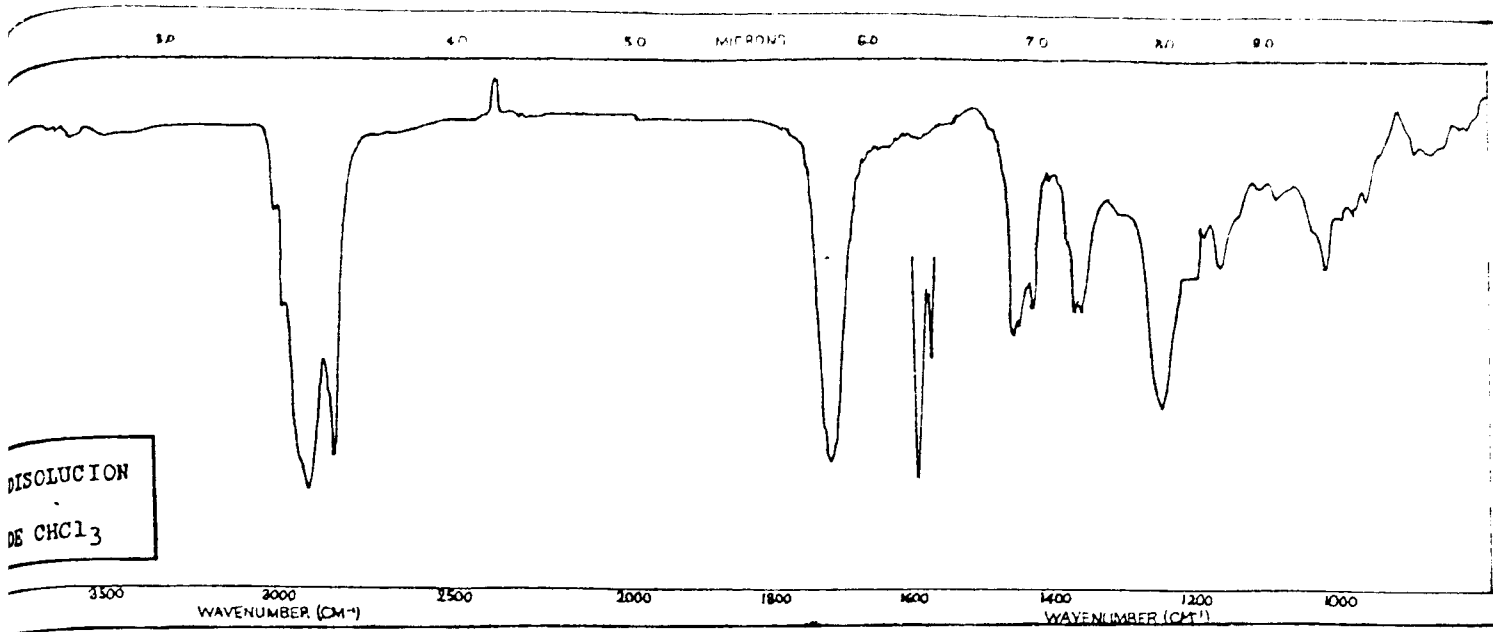






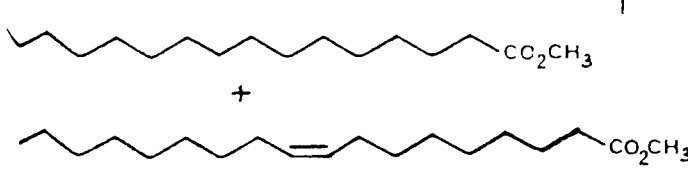
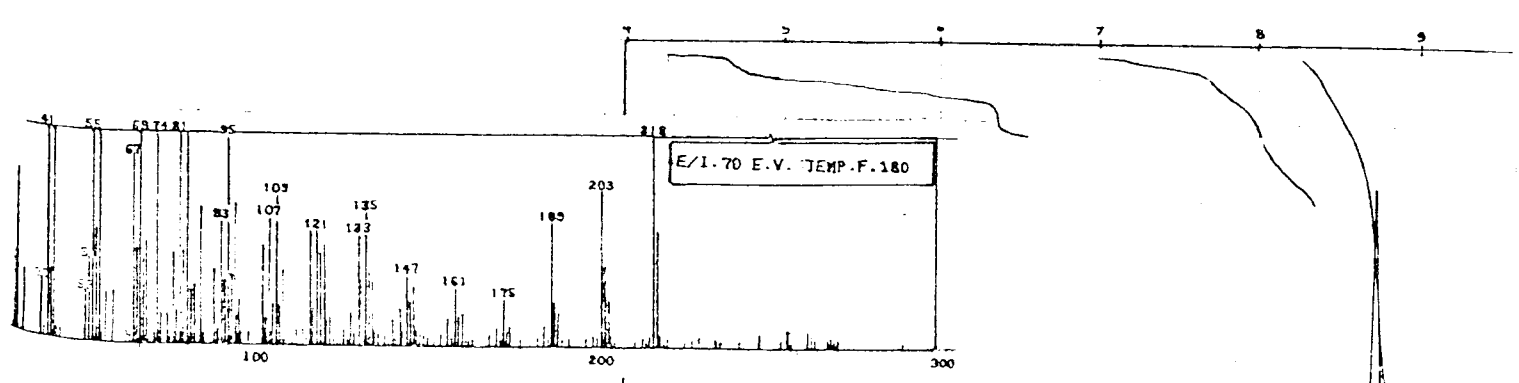
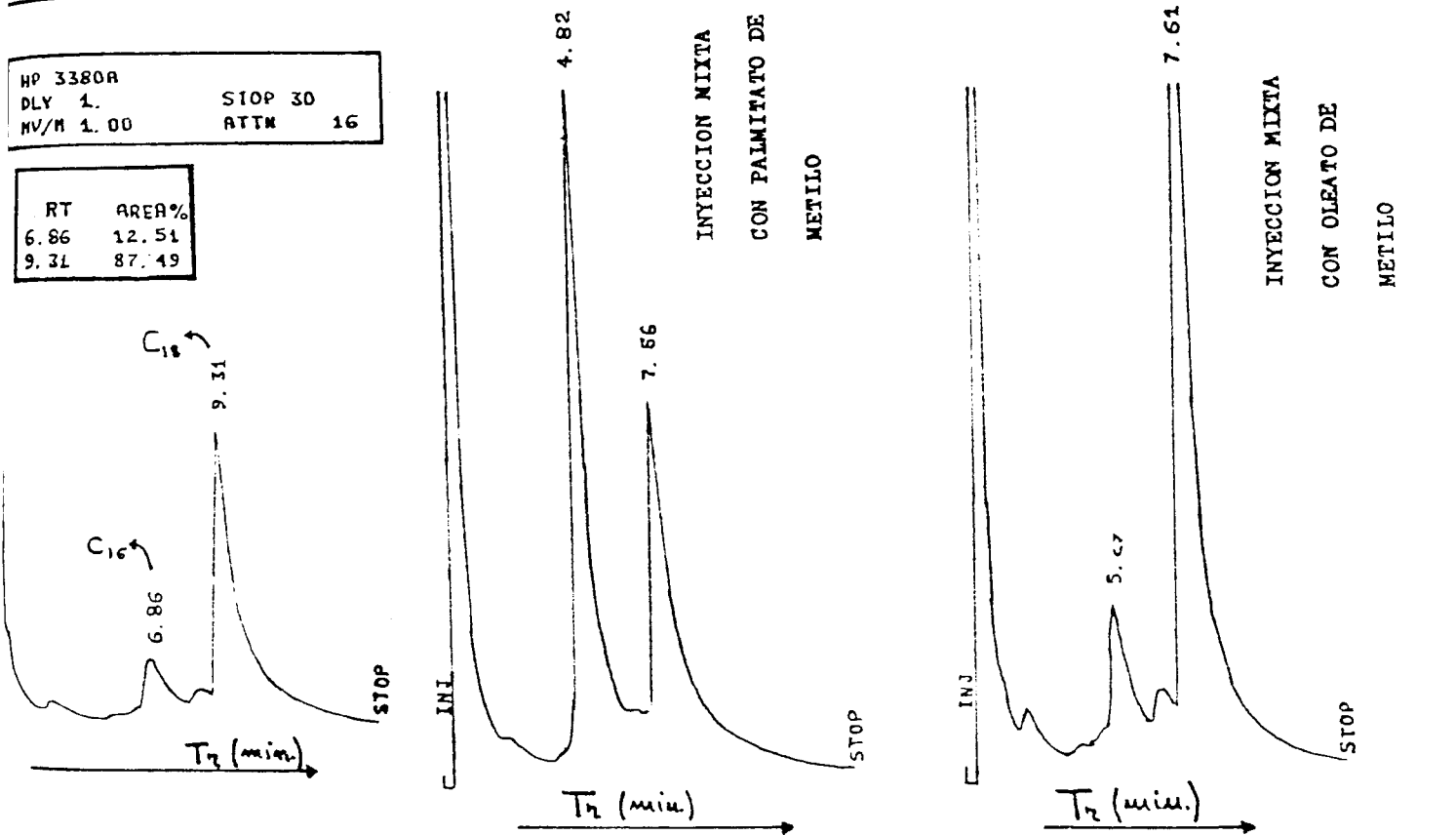
GRAFICA XXVIII



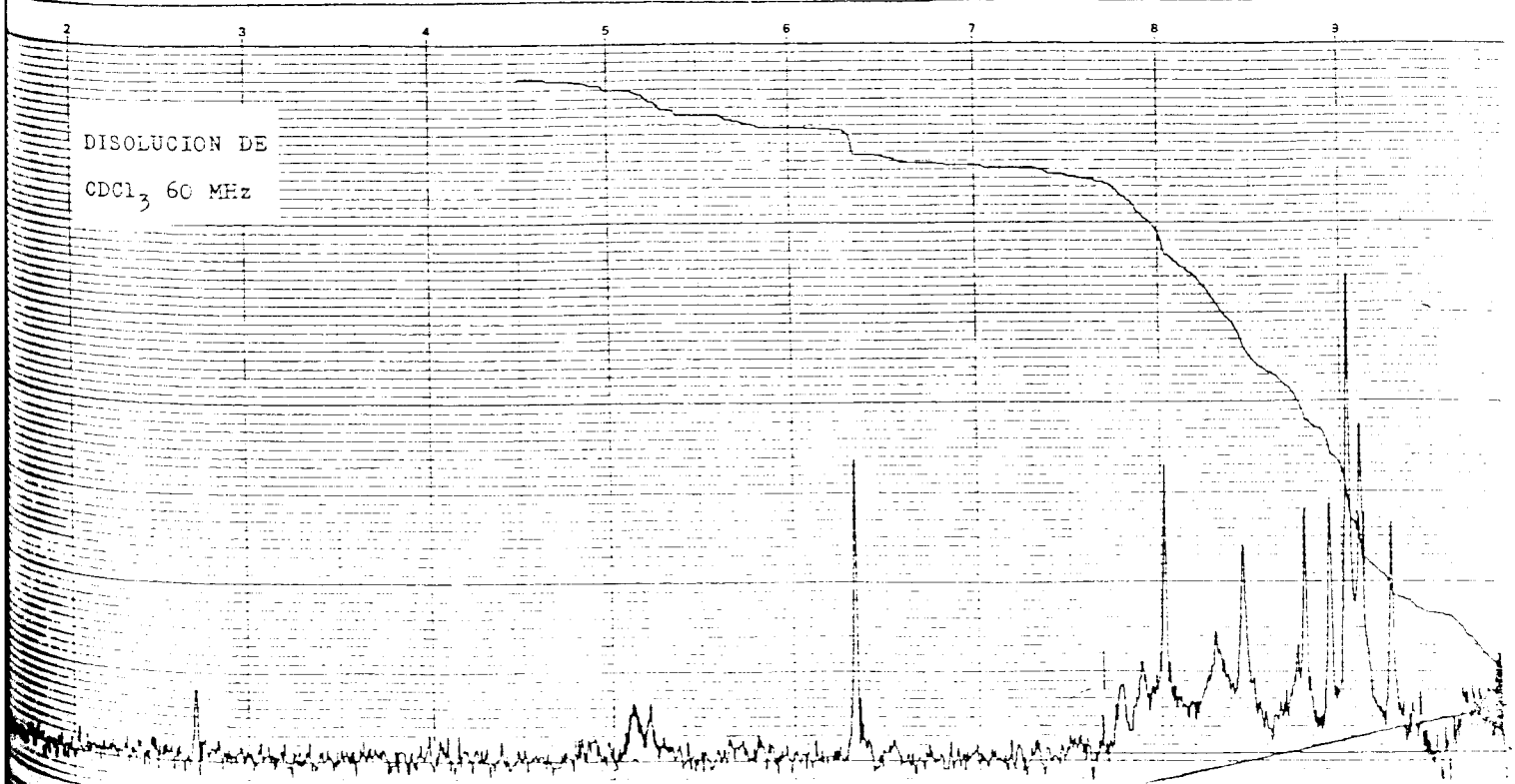
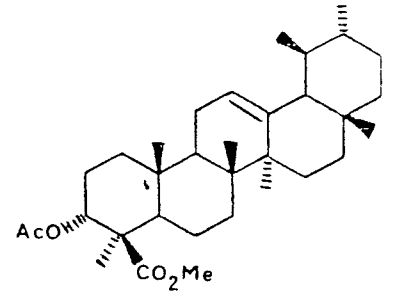
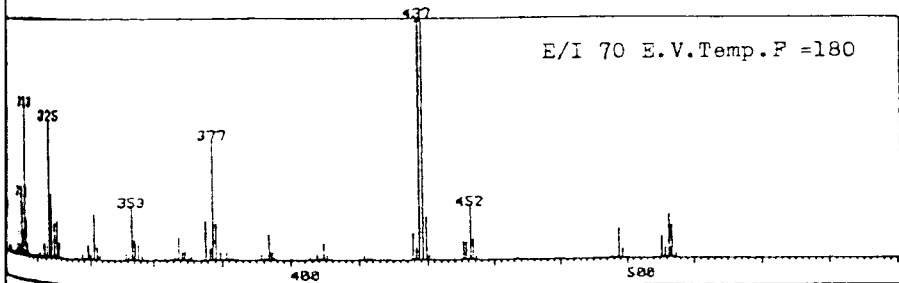
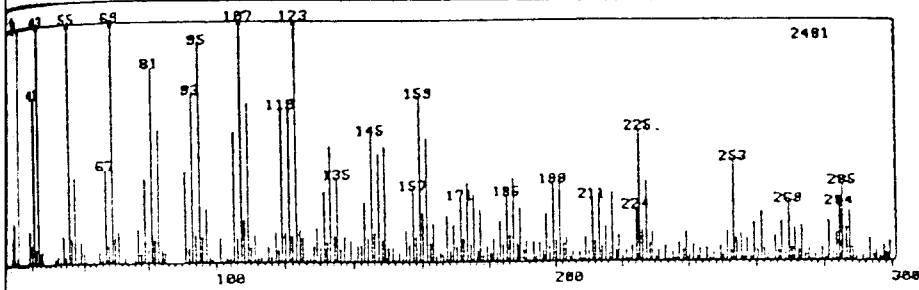
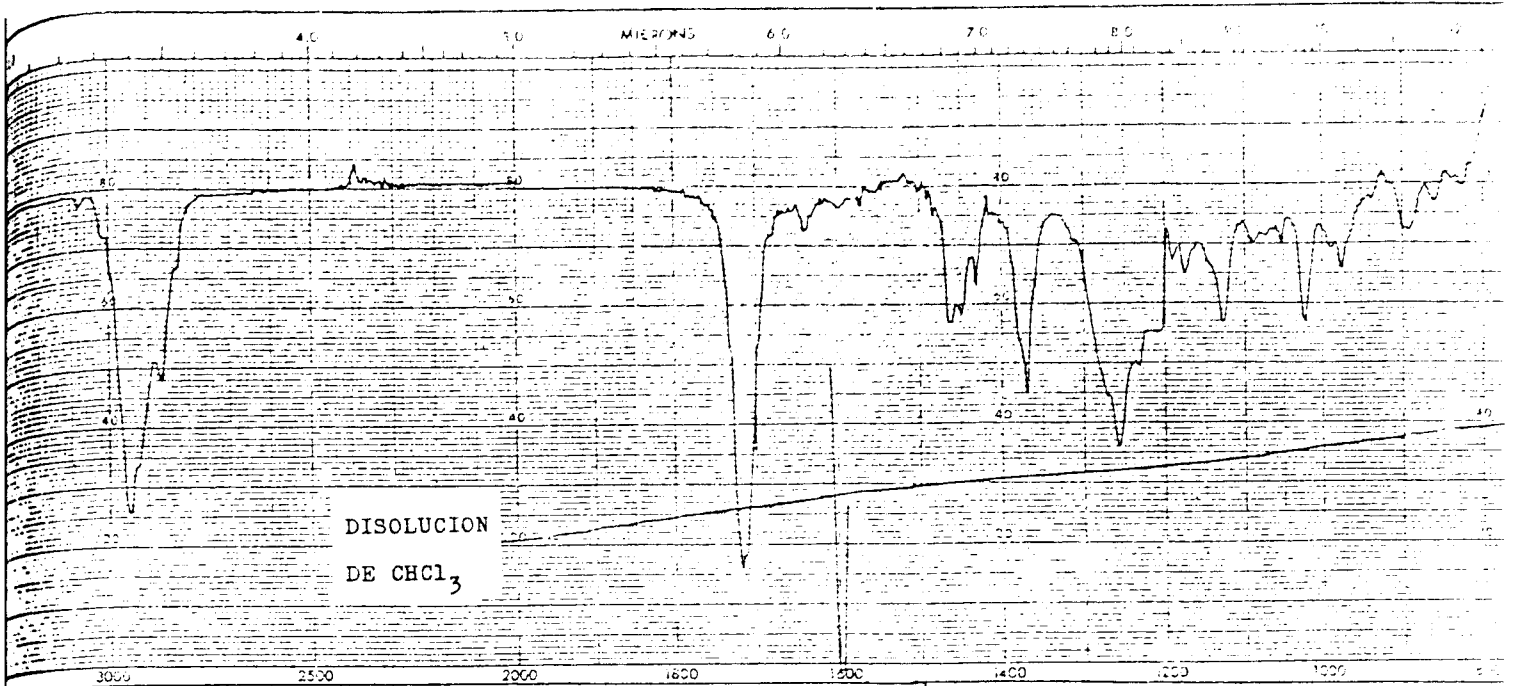


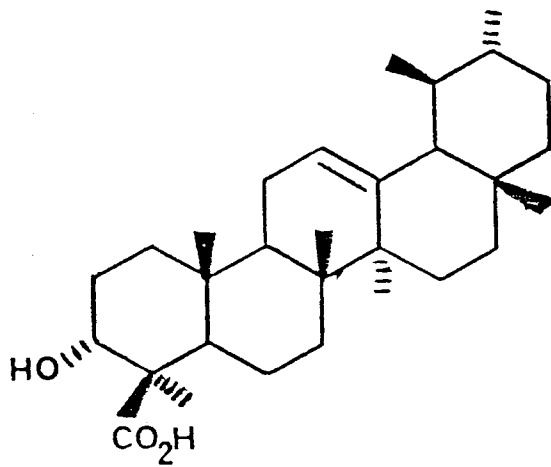
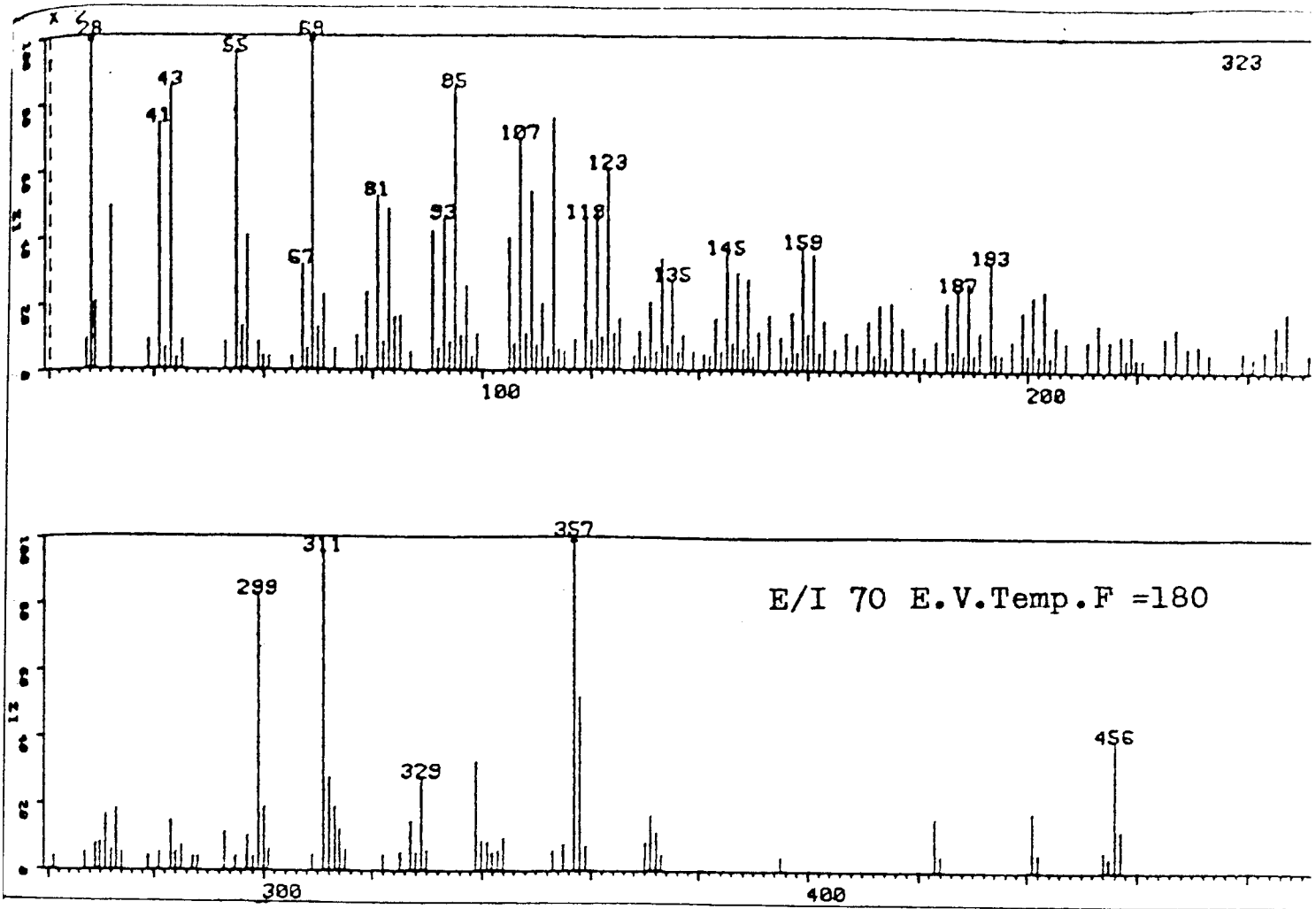
HP 3380A
 DLY 1. STOP 30
 MV/M 1.00 ATTN 16

RT	AREA%
6.86	12.51
9.31	87.49

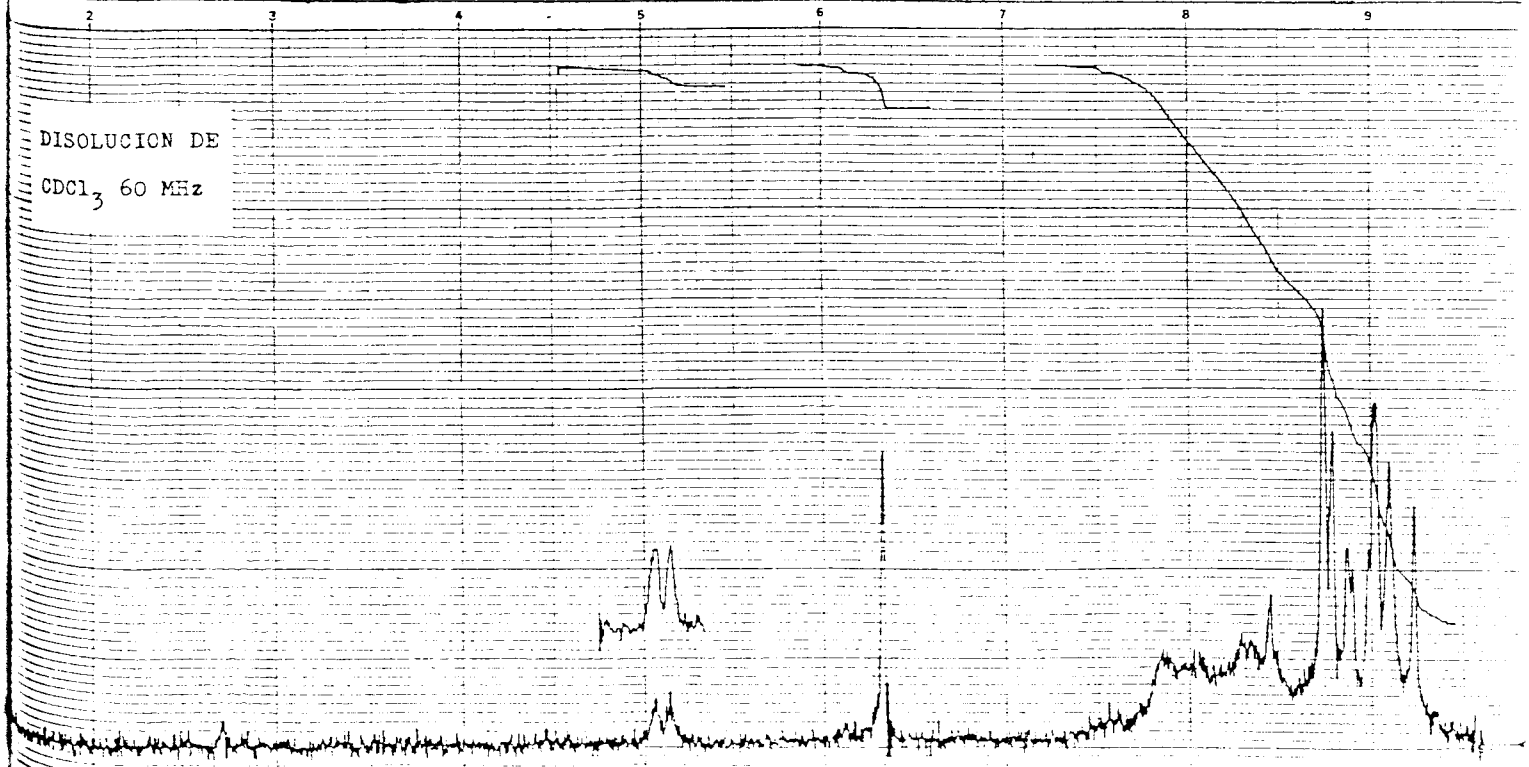
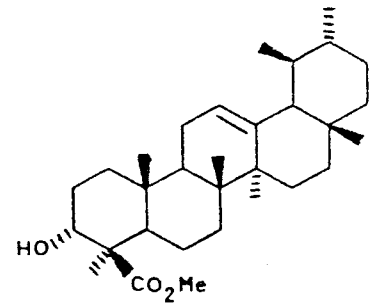
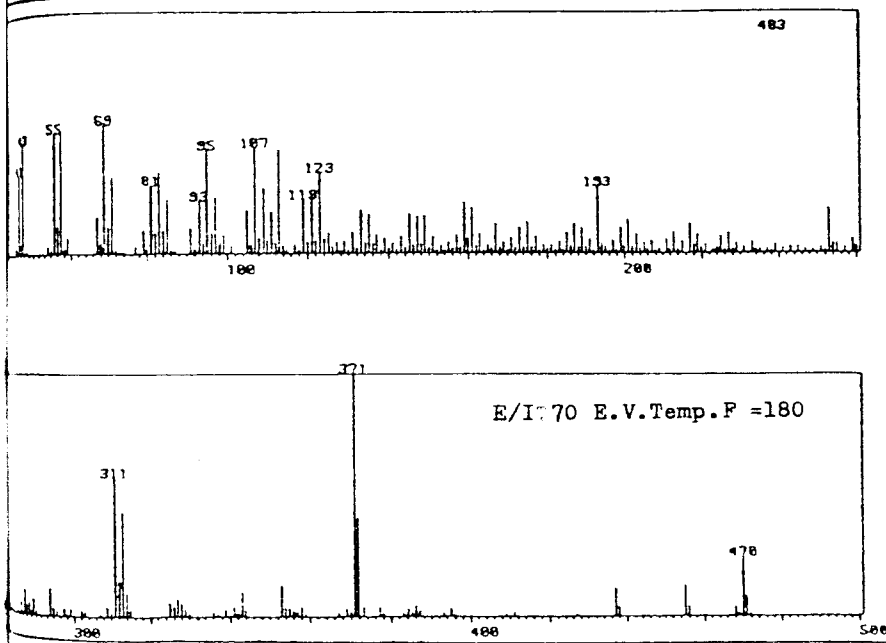
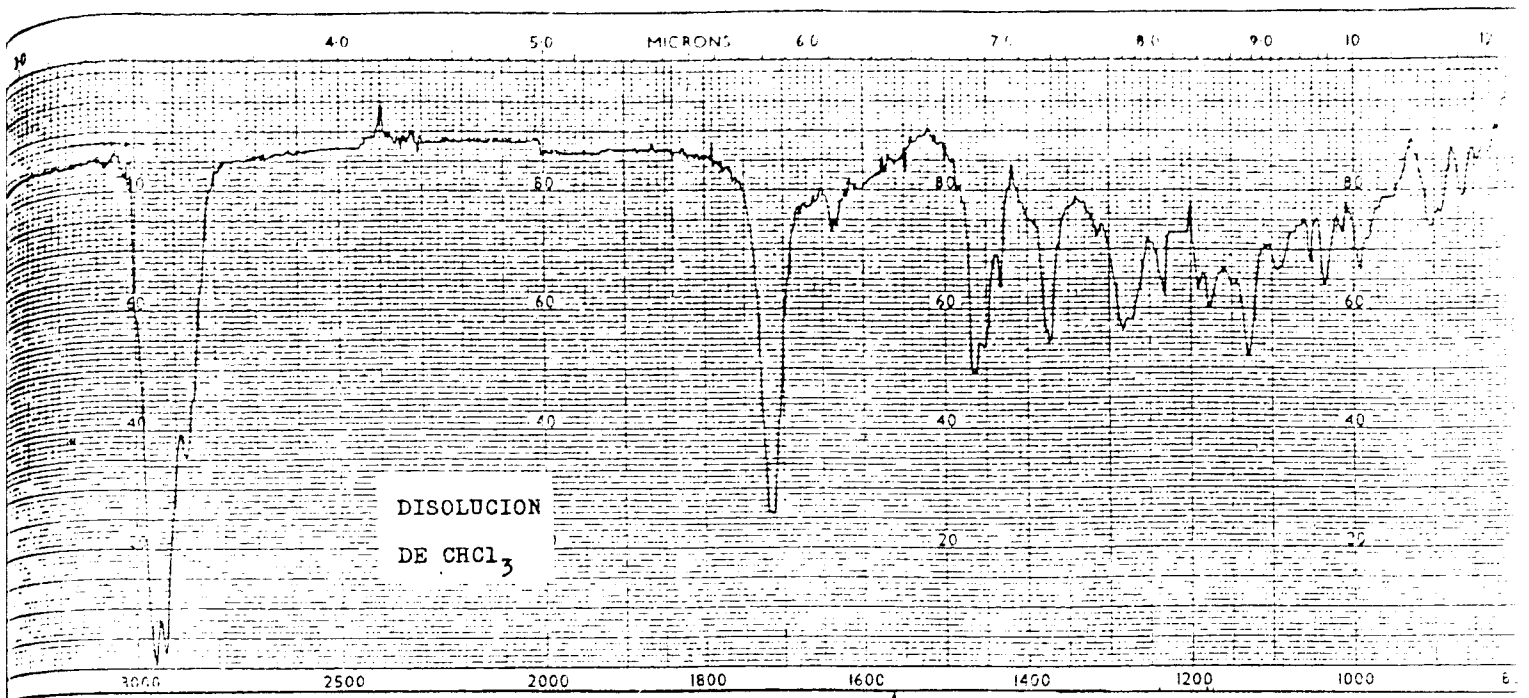


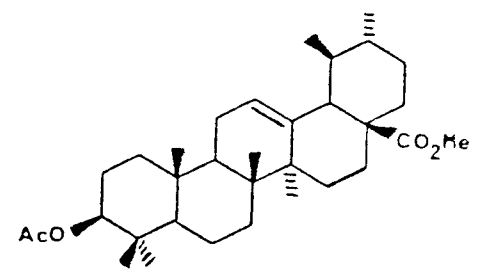
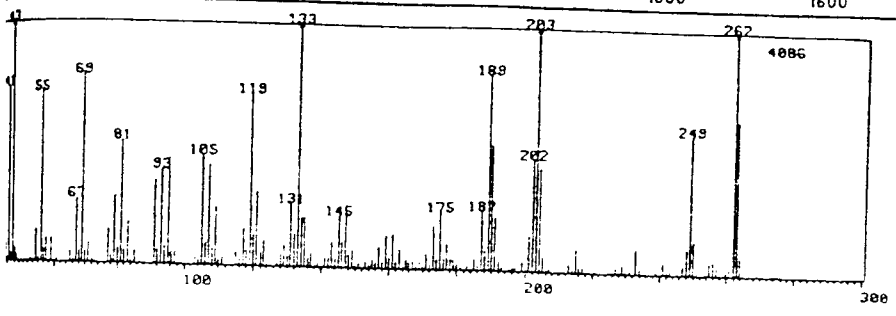
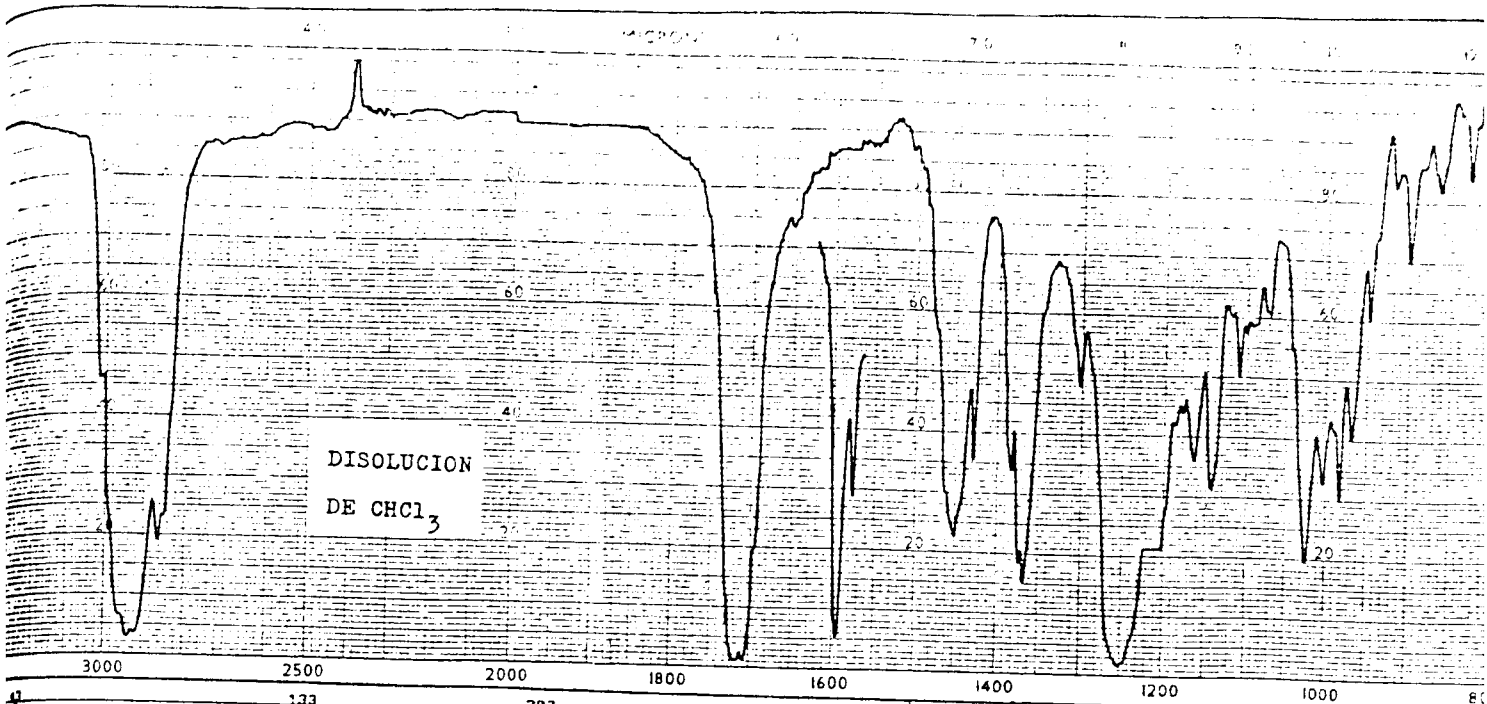
DISOLUCION
 DE CDCl₃, 90 MHz



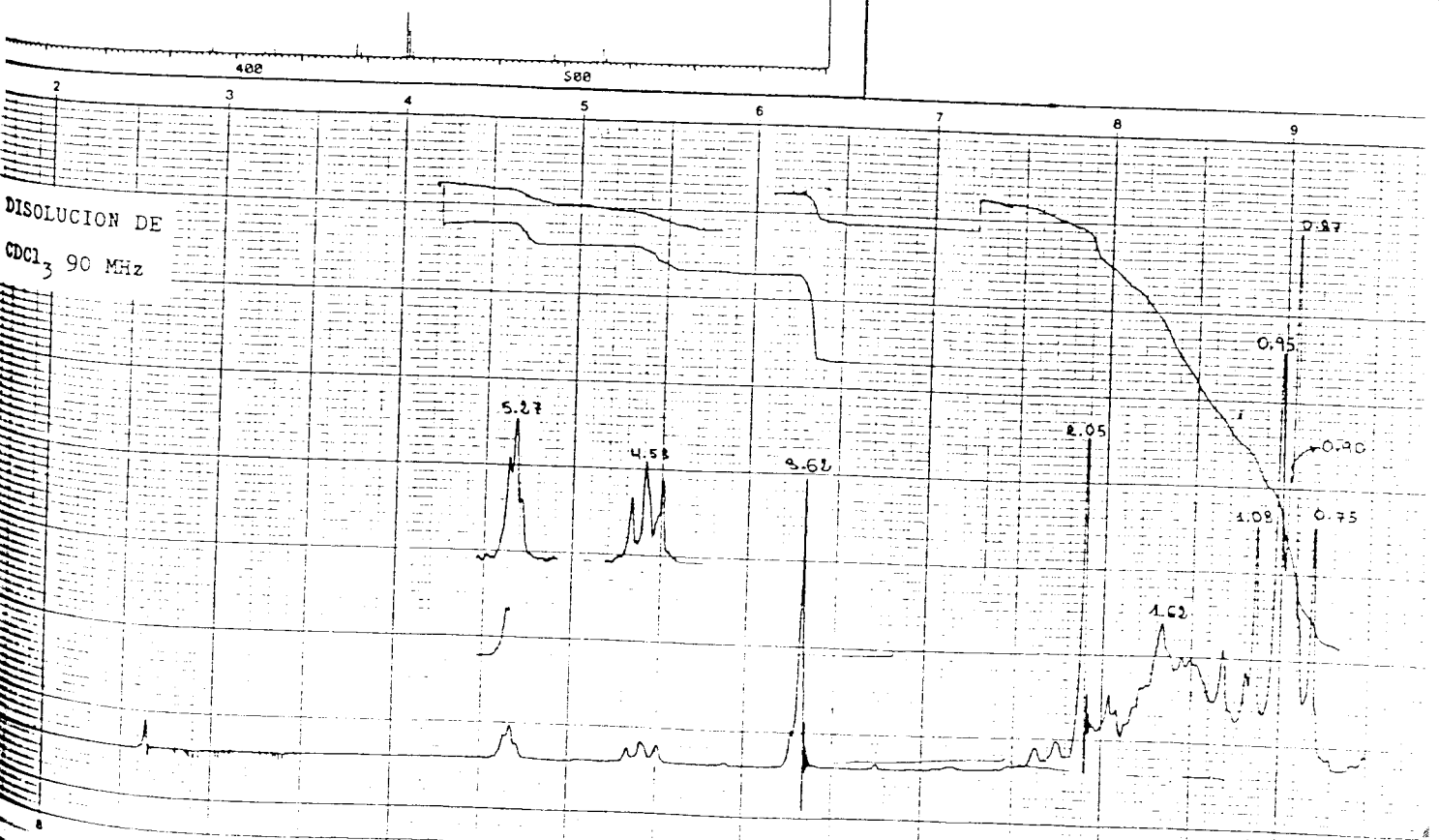


GRAFICA 7777

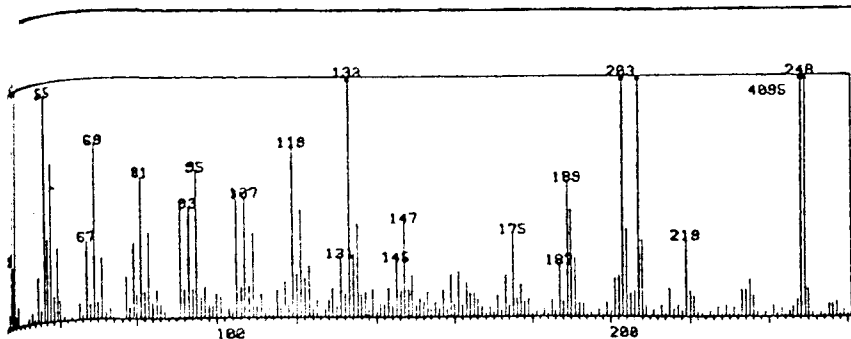




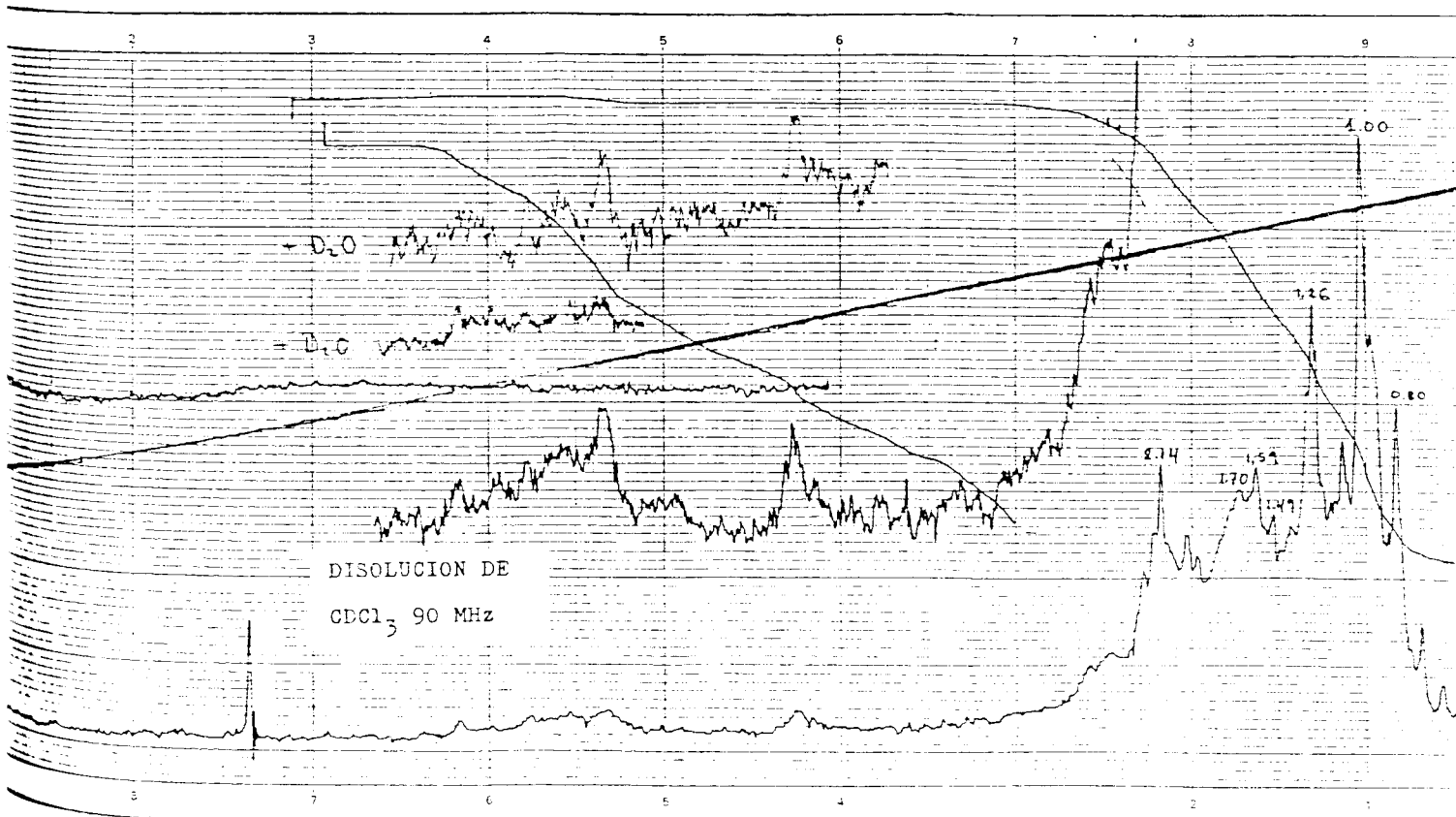
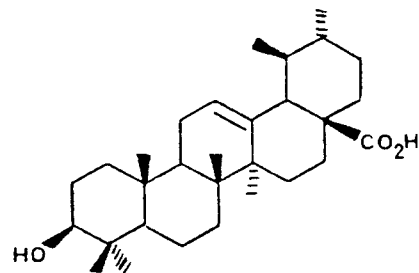
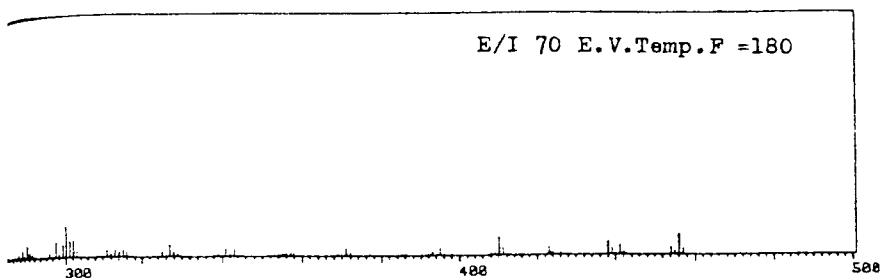
E/I 70 E.V. Temp. F= 180

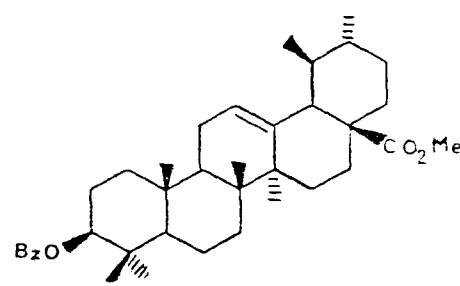
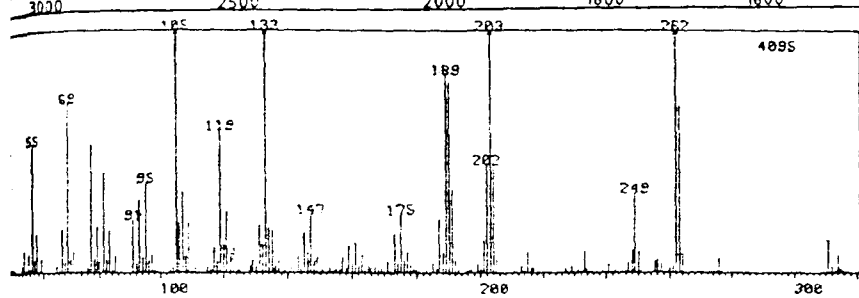
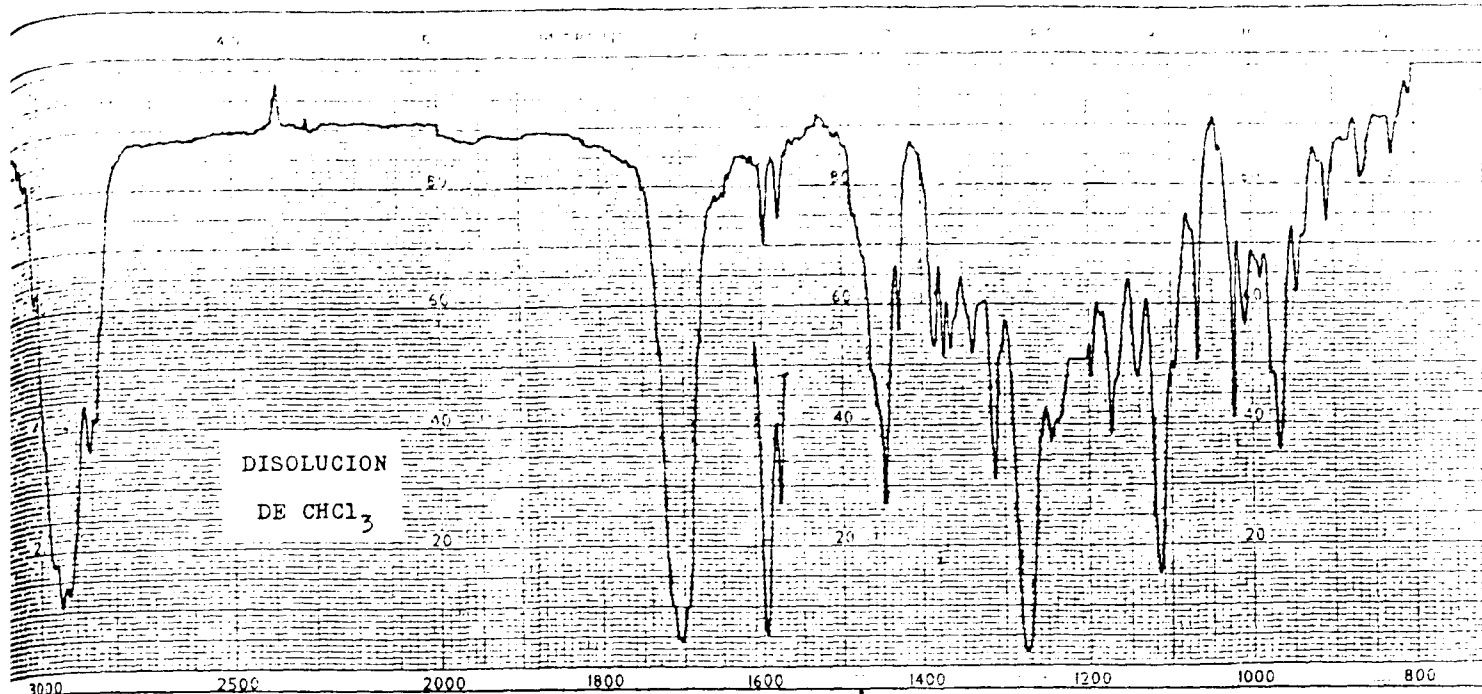


GRAFICA XXXIV

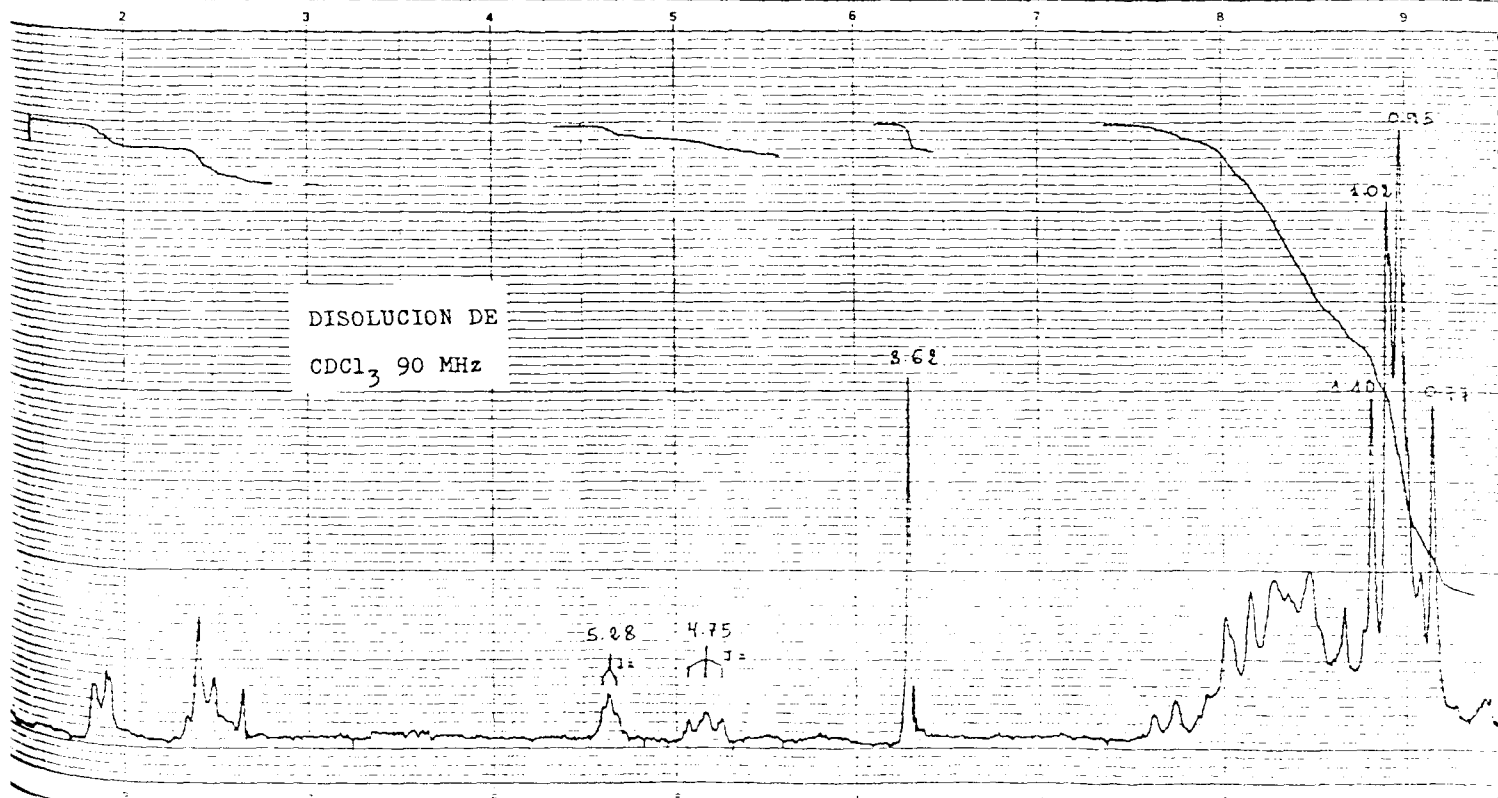
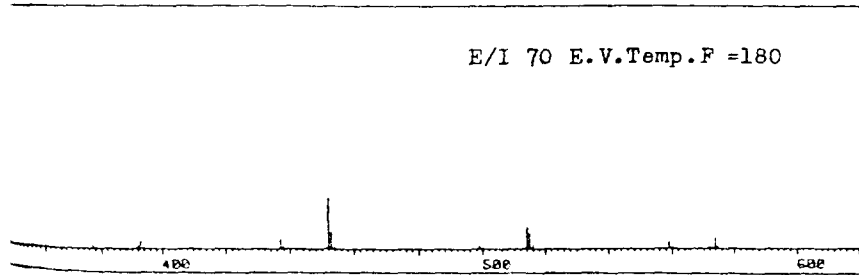


E/I 70 E.V. Temp. F = 180

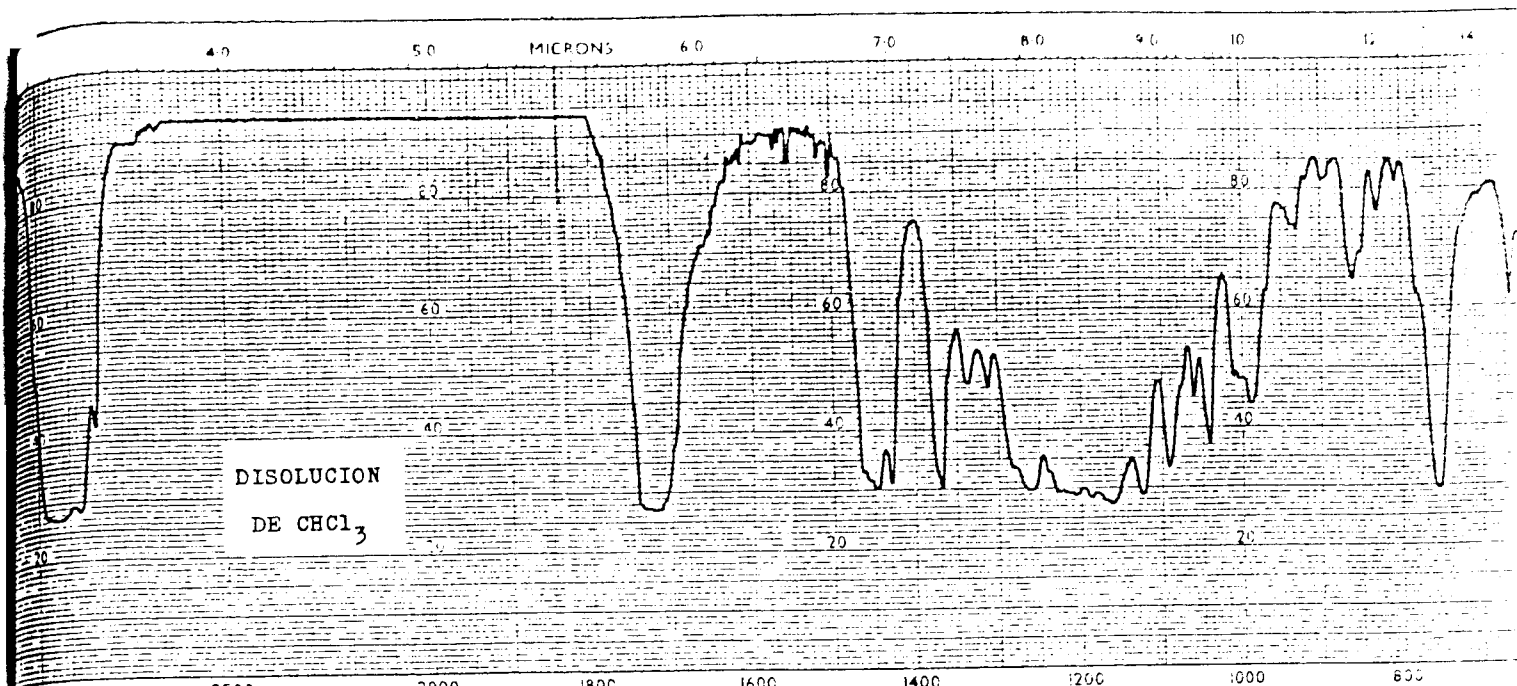




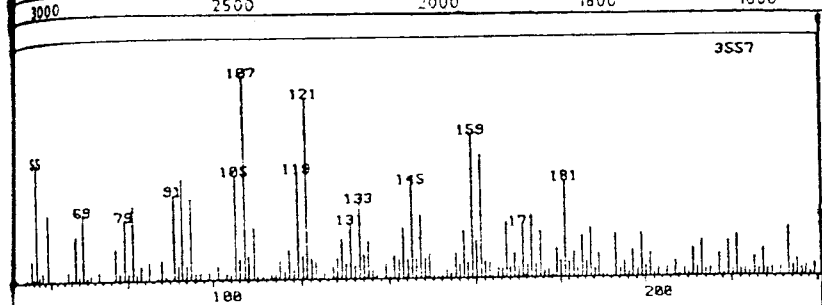
E/I 70 E.V. Temp. F = 180



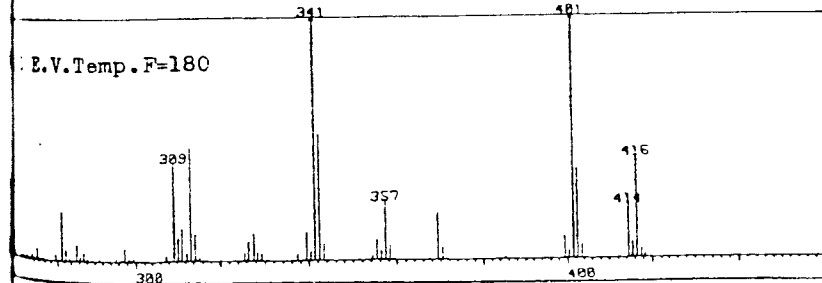
GRAPION AXANI



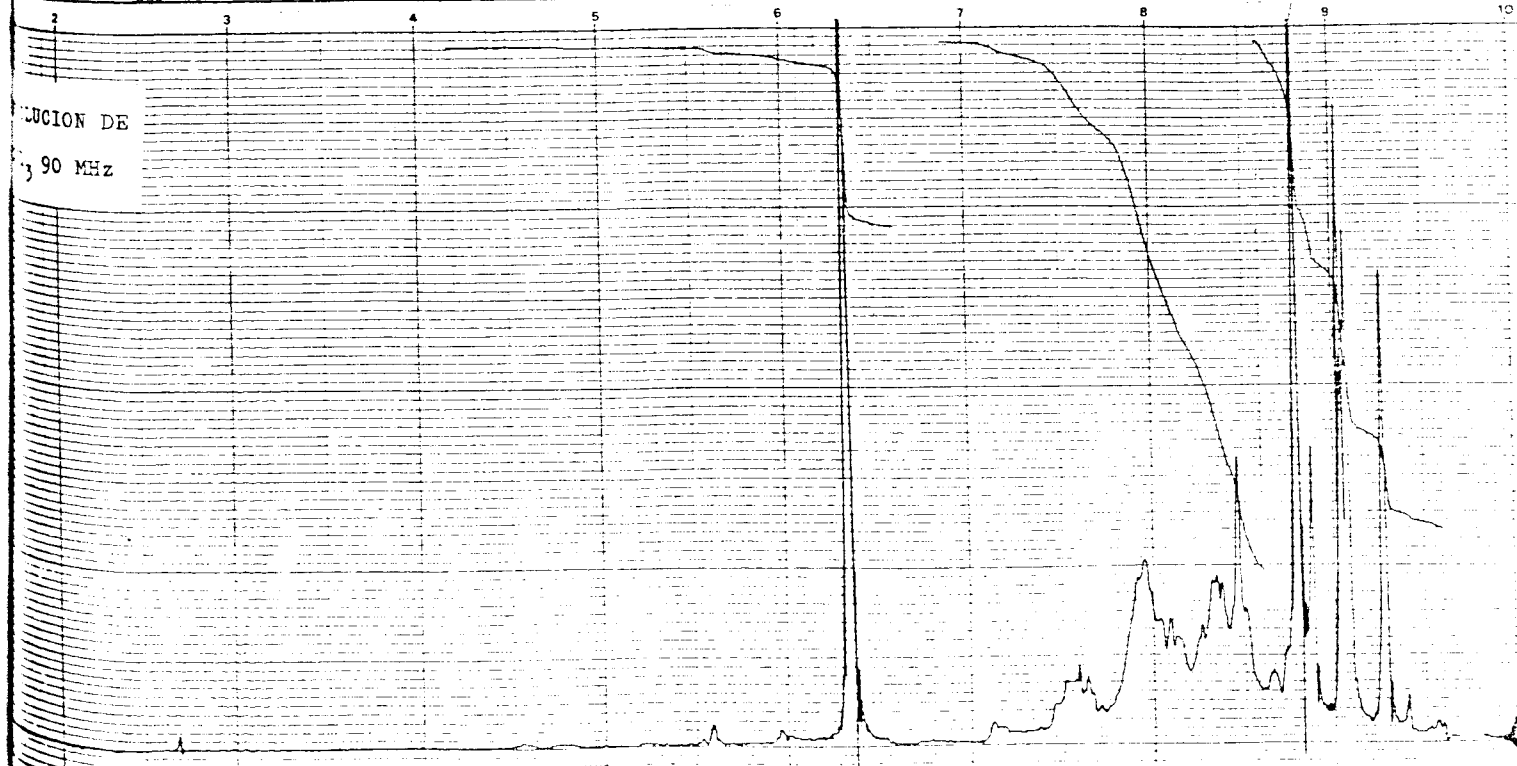
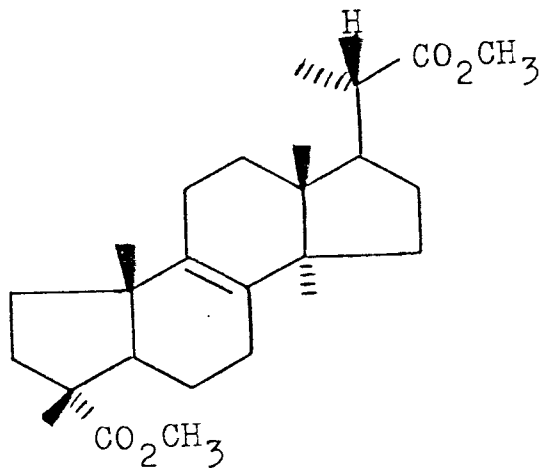
DISOLUCION
DE CHCl₃

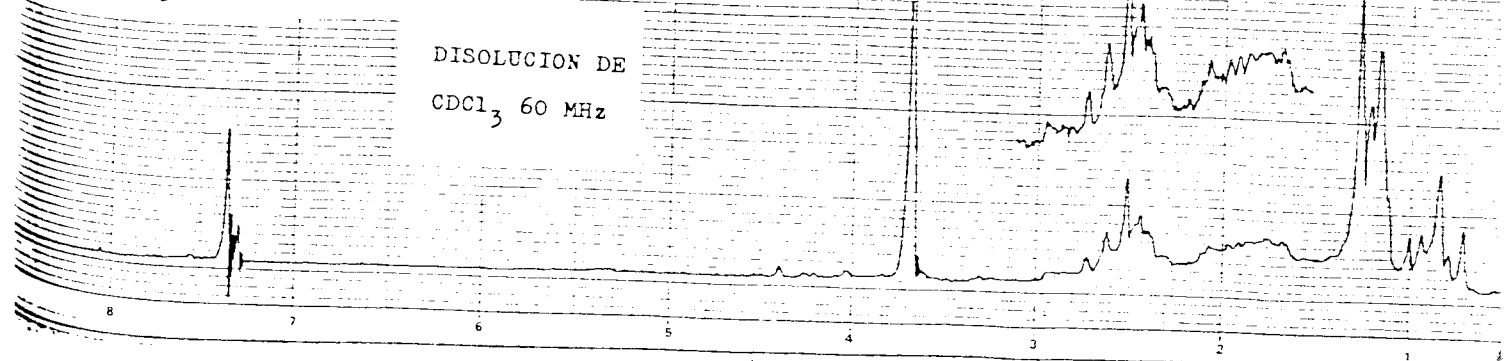
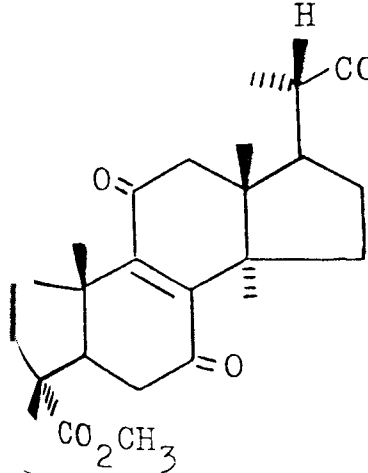
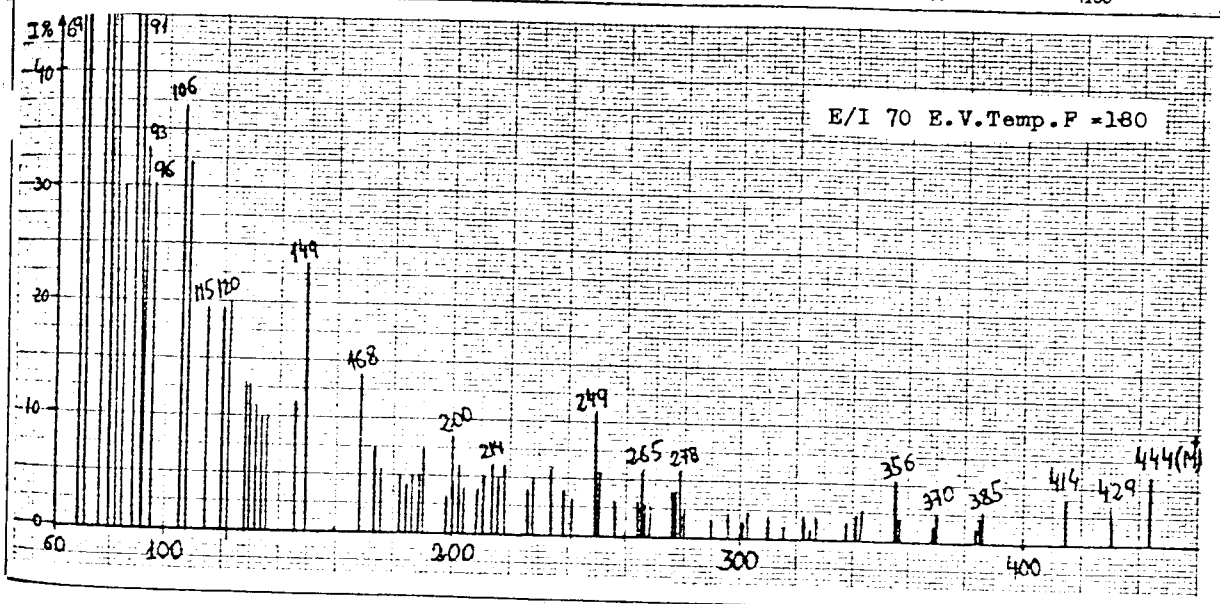
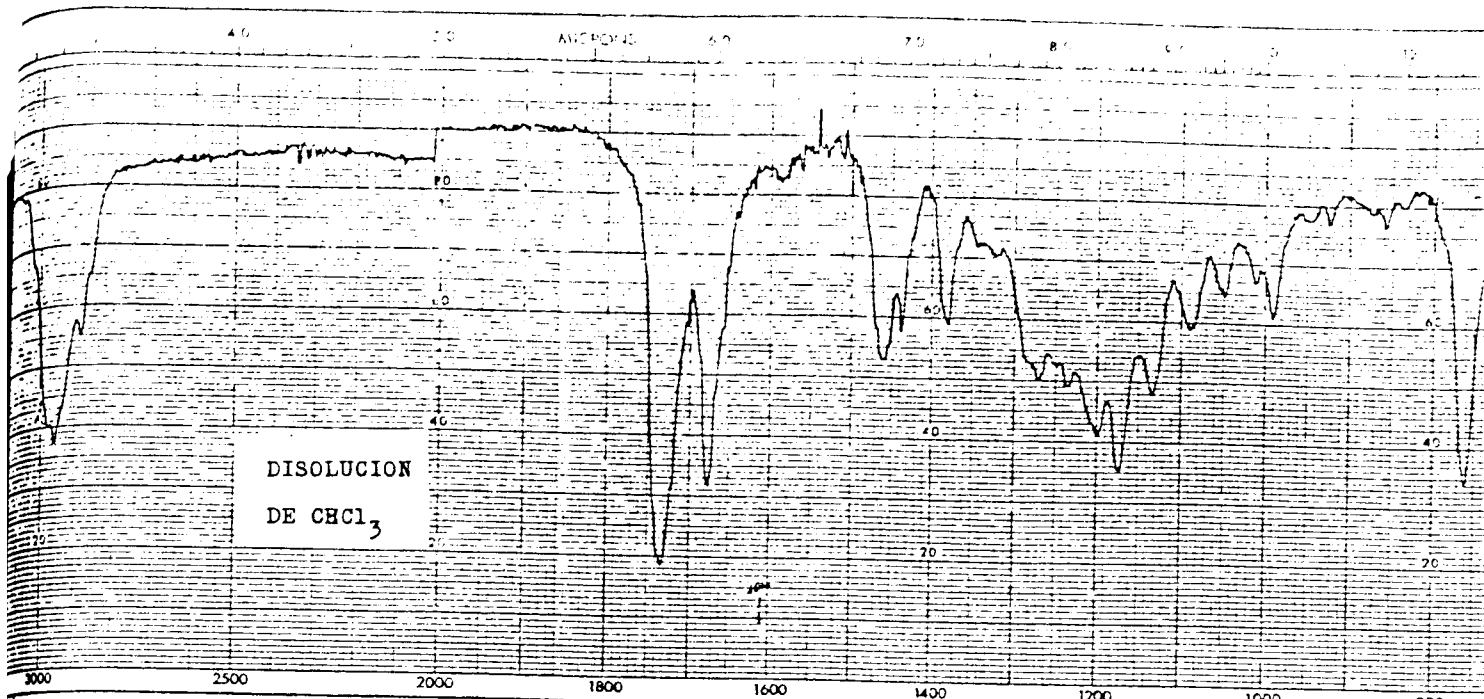


3557

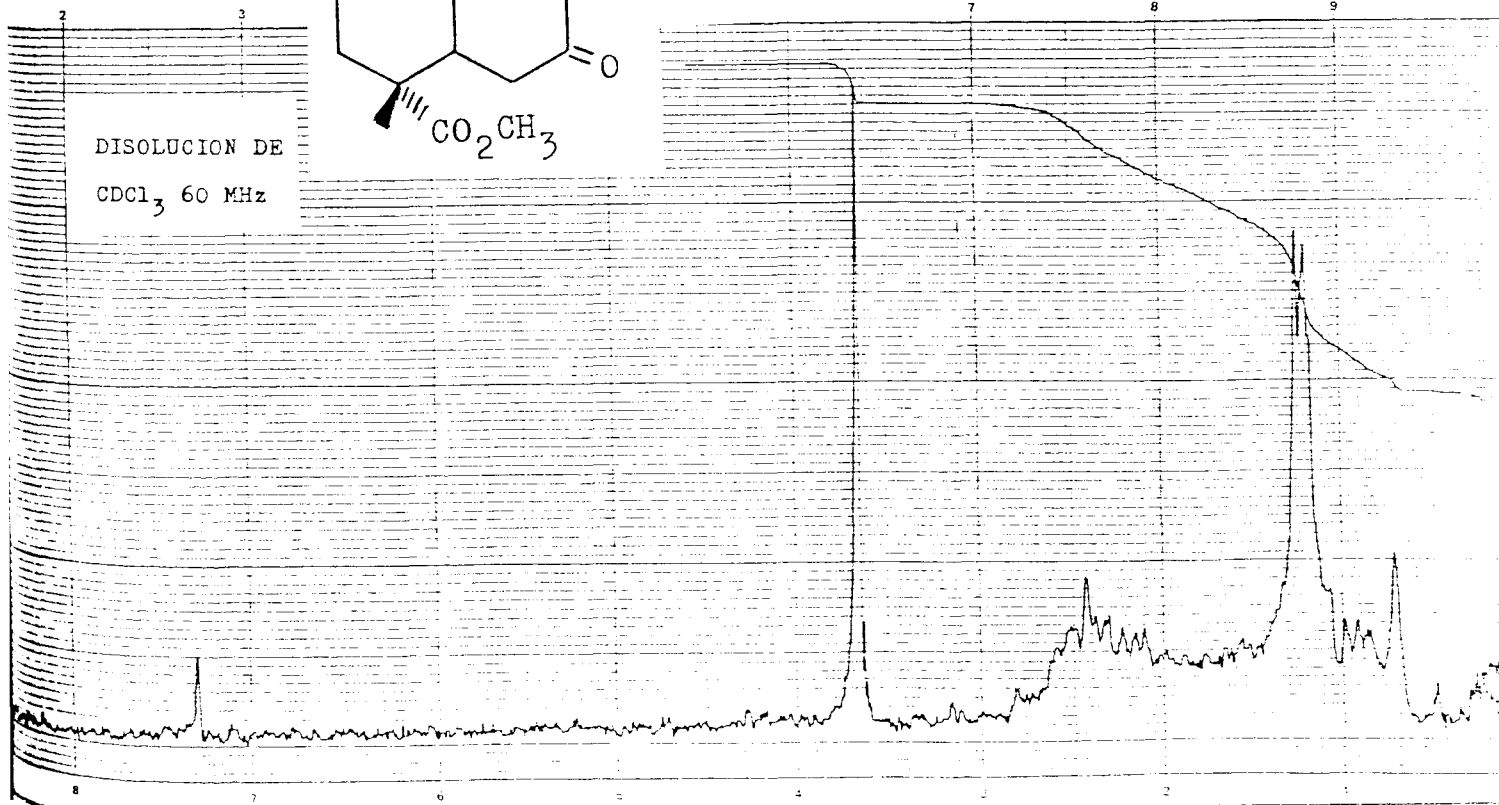
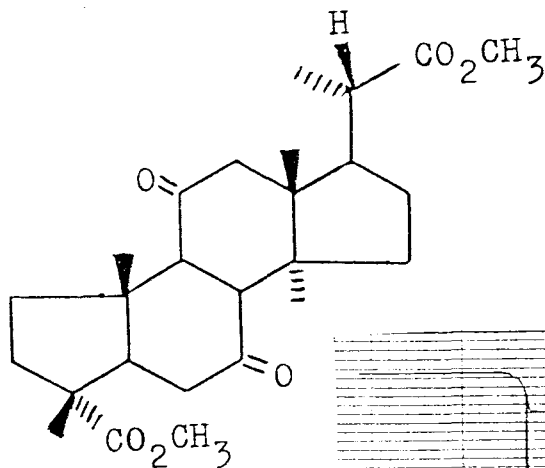
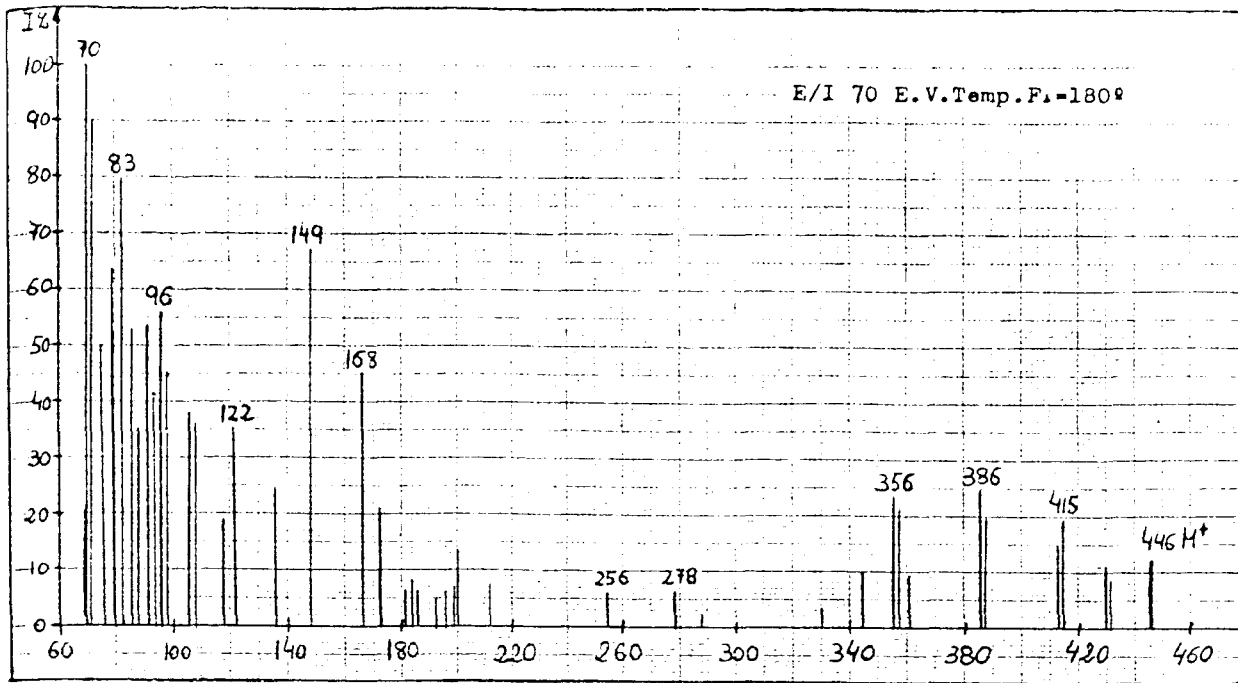


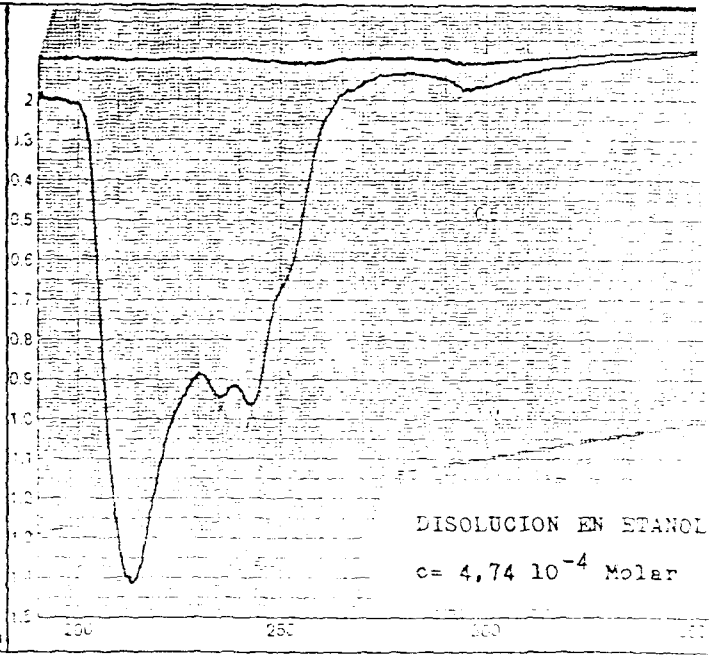
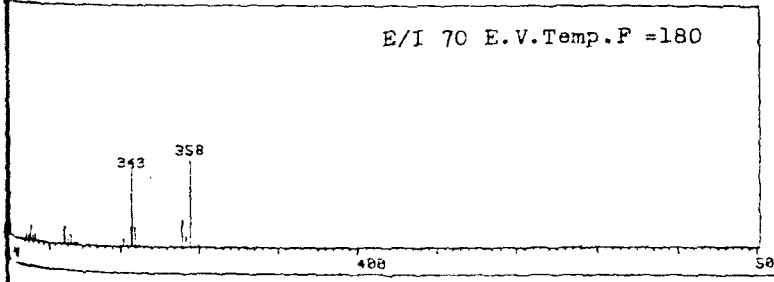
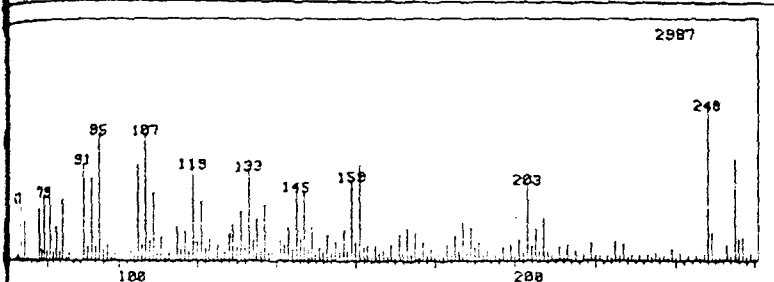
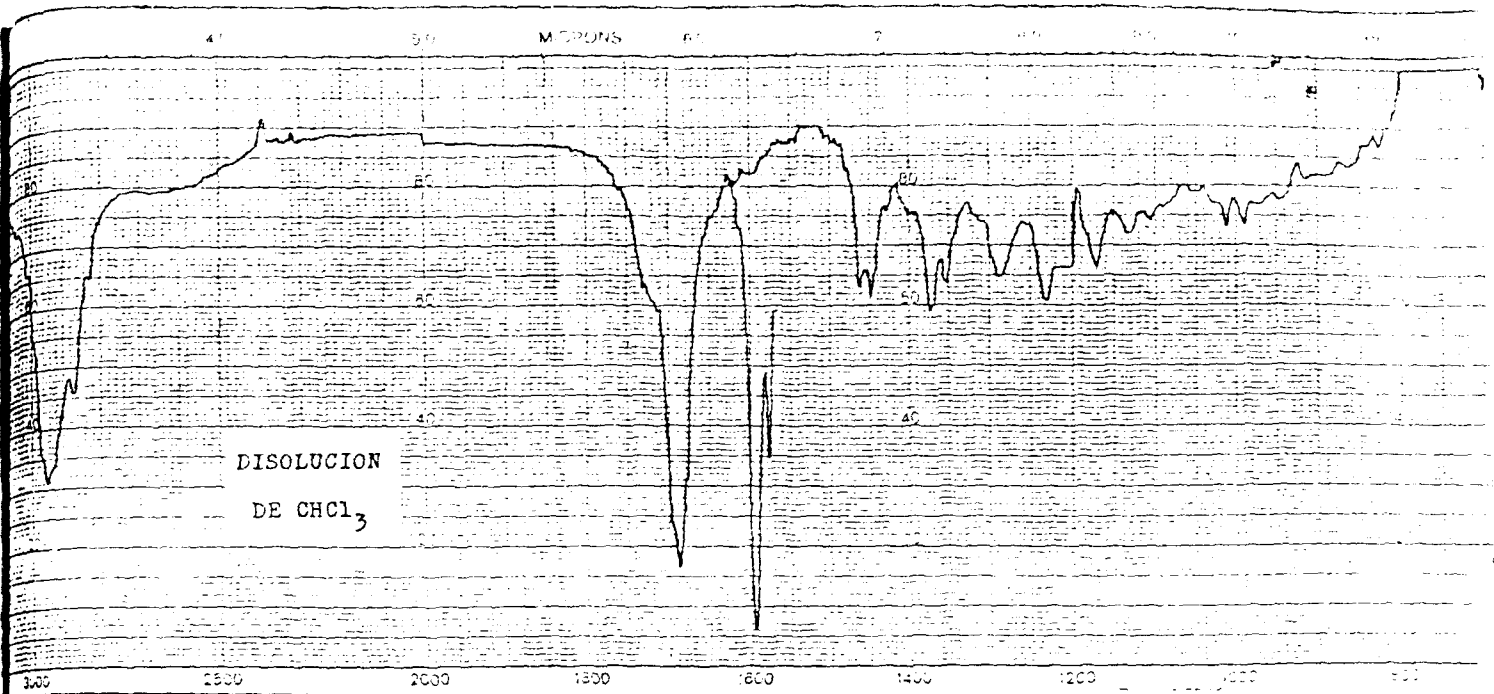
E.V. Temp. F=180



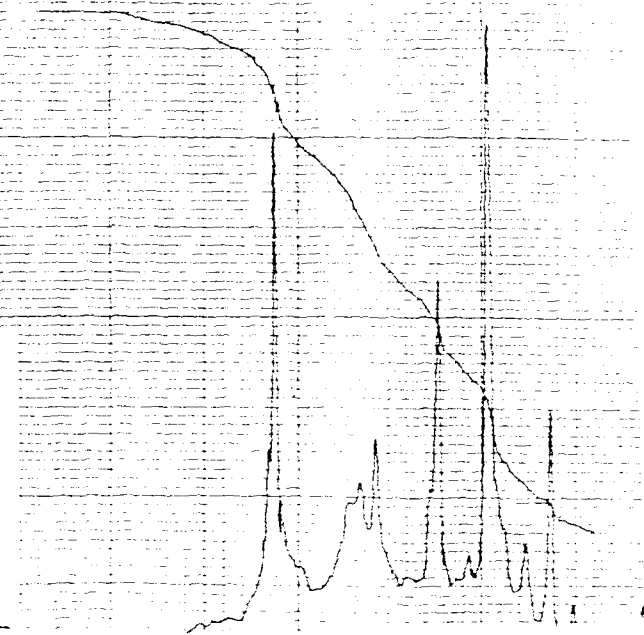
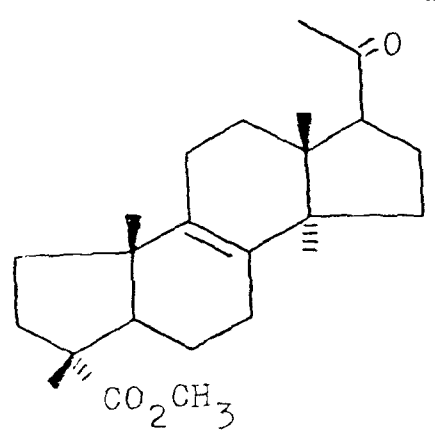


GRÁFICA XXXVIII

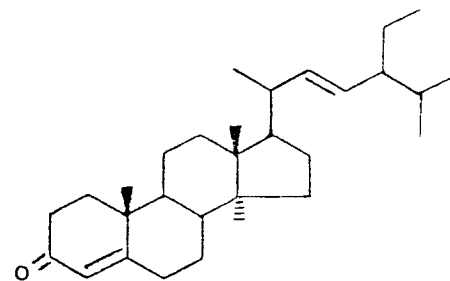
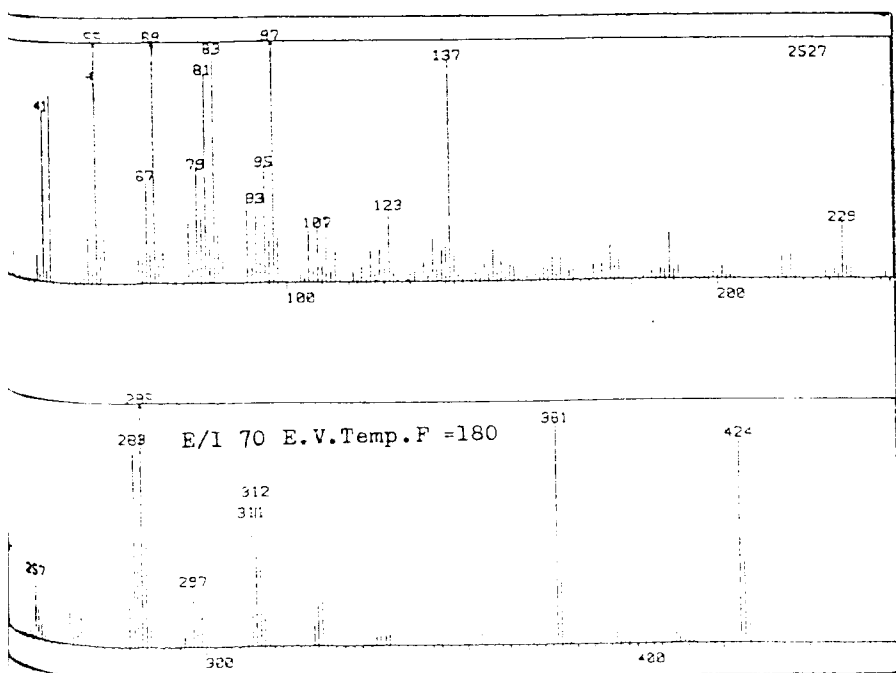
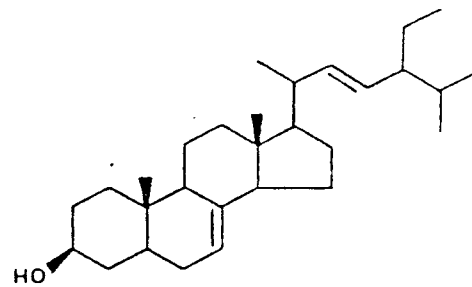
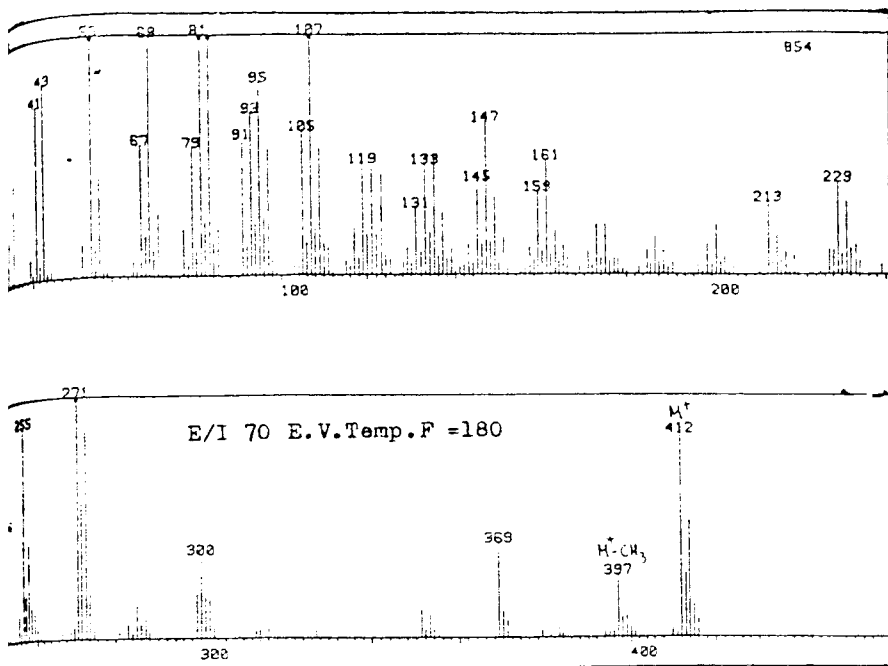




DISOLUCION DE
CHCl₃ 90 MHz



GRAFICA XL



BIBLIOGRAFIA

- 1- J.H. Lange, D.M. Lange y X. Llimona, Hongos de Europa -- (1976).
- 2- N.J. McCorkindale, S.A. Hutchinson, B.A. Pursey, W.T. Scott y R. Wheeler, Phytochemistry 8, 861 (1969).
- 3- J.W. Hendrix, Annu. Rev. Phytopathol 8, 111 (1970).
- 4- C.G. Elliot, Adv. Microb. Physiol. 15, 121 (1977).
- 5- G.A. Bean, Adv. Lipid. Res. 11, 193 (1973).
- 6- S.A. Warner y A. J. Domnas, Exp. Mycol. 5, 184 (1981).
- 7- S.A. Warner, G. Wayne y A.J. Domnas, Phytochemistry 21, 2135 (1982).
- 8- E. Heftmann, B.E. Wright y C.U. Liddel, Arch. Biochem. Biophys 97, 232 (1962).
- 9- G.A. Bean, G.W. Patterson y J.J. Mota, Comp. Biochem. Physiol. 43 B, 935 (1973).
- 10- G. Goulston y E.I. Mercer, Phytochemistry 8, 1945 (1969).
- 11- G. Goulston, L.J. Goad y T.W. Goodwin, Biochem. J. 102, -- 150 (1967).
- 12- J.D. Weete, J.L. Laseter y G.C. Lawler, Arch. Biochem. Biophys. 155, 411 (1973).
- 13- P.J. van Dijck y P. de Somer, J. Gen. Microbiol 18, 377 - (1958).
- 14- H. Vanderhaeghe, P.J. van Dijck y P. de Somer, Nature 205, 710 (1965).
- 15- T.C. McMorris y A.W. Barksdale, Nature 215, 320 (1967).
- 16- G.P. Arsenault, K. Biemann, A.W. Barksdale y T.C. McMorris J. Am. Chem. Soc. 90, 5635 (1968).
- 17- M. Lenfant, M.F. Lecompte y G. Farrugia, Phytochemistry 9, 2529 (1970).

- 18-H.G. Floss, *Tetrahedron* 32, 873 (1976)
- 19- Y.S. Chen y R.H. Haskins, *Can. J. Chem.* 41, 1647 (1962)
- 20- H. Wieland y W. Benend, *Ann. Chem.* 554, 1 (1943).
- 21- M.J. Vacheron y G. Michel, *Phytochemistry* 7, 1645 (1968)
- 22- Y. Tsuda y K. Isobe, *Tetrahedron Letter* 3337 (1965).
- 23- J. MacMillan, A.E. Vantsone y S.K. Yeboah, *Chem. Commun.* 613 (1968).
- 24- P.W. Brian y J.C. McGowan, *Nature* 156, 144 (1945).
- 25- J.S. Moffatt, J.D. Bu'Lock y T.H. Yuen, *Chem Commun* 839, (1969).
- 26- J.F. Grove, *J. Chem. Soc. C*, 549 (1969).
- 27- W. von Daehne, H. Lorch y W.O. Godtfredsen, *Tetrahedron Letters* 4843 (1968).
- 28- D. Aragoni, *Gazz. Chim. Ital*, 92, 884 (1962).
- 29- D. Aragoni, *Pure Appl. Chem.* 17, 331 (1968).
- 30- H. Wieland y G. Coutelle, *Ann. Chem.* 548, 270 (1941).
- 31- G.H. Alt y D.H.R. Barton, *J. Chem. Soc.* 1356 (1954).
- 32- P. Wieland y V. Prelog, *Helv. Chim. Acta* 30, 1028 (1947)
- 33- E. Chain, H.W. Florey, M.A. Jennings y T.I. Williams, --
Brit. J. Exp. Pathol. 24,108 (1943).
- 34- D.H.R. Barton y T. Bruun, *J. Chem. Soc.* 2728 (1951).
- 35- H.S. Burton y E.P. Abraham, *Biochem. J.* 50, 168 (1951).
- 36- T.S. Chou, E.J. Eisenbraun y R.T. Rapala, *Tetrahearon* 25, 3341 (1969).
- 37- S. Okuda, S. Iwasaki, K. Tsuda, Y. Sano, T. Hata, S. Uda
gawa, Y. Nakayama y H. Yamaguchi, *Chem. Pharm. Bull(To-
kio)* 12, 121 (1964).

- 38- S. Okuda, Y. Nakayama y K. Tsuda, Chem. Pharm. Bull. (Tokio).14, 436 (1966).
- 39- S. Okuda, Y. Sato, T. Hattori y M. Wakabayashi, Tetrahedron Letters 4847 (1968).
- 40- S. Okuda, Y. Sato, T.Hattori y I. Igarashi, Tetrahedron Letters 4769 (1968).
- 41- T. Hattori, H. Igarashi, S. Iwasaki y S. Okuda, Tetrahedron Letters 1023 (1969).
- 42- T.G. Halsall, E.R.H. Jones, G. Lowe y E.E. Newall, Chem Commun. 685 (1966).
- 43- T.S. Chou y J. Eisenbrau, Tetrahedron Letters 409 (1967).
- 44- H. Kaise, K. Munakata y T. Sassa, Tetrahedron Letters 3789 (1972).
- 45- H. Kaise, K. Munakata y T. Sassa, Tetrahedron Letters 199 (1972).
- 46- D.H.R. Barton y J. D. Cox, J. Chem. Soc. 1354 (1948).
- 47- C. Tanret, Compt. Rend. 147, 75 (1908).
- 48- E. Merdinger y E.M. Devine, J. Bacteriol. 89, 1488(1965)
- 49- F. Blank, F.E. Shorland y G. Just, J. Invest. Dermat.39, 91 (1962).
- 50- E.P. Serebryakov, A.V. Simolin, V.F. Kucherov, Tetrahedron,26,5215 (1970).
- 51- W.O. Godtfredsen, S. Jahnsen, H. Lorck, K. Roholt y L. Tybring, Nature 193, 987 (1962).
- 52- X.A. Dominguez, G. Guzmán, L. Dávalos, E. Guajardo, Rev. Latinoamer. Quim. 12, 48 (1981).

- 53- J. Alder, M. Young y W.R. Nes, *Lipids* 12, 364 (1977).
- 54- D.C. Morris, S. Safe y R. Subden, *Biochem. Genet.* 12, 459 (1974).
- 55- I. Yamamoto, *Agr. Biol. Chem. (Tokio)* 25, 400 (1961).
- 56- A. Saito, *J. Fermentation Technol (Japan)* 31, 328(1953)
- 57- S.M. Clarke y M. Mckenzie, *Nature* 213, 504 (1967).
- 58- S. Hata, T. Nishino, Y. Oda y H. Katsuki, *Tetrahedron Letters* 24, 4729 (1983).
- 59- D.H.R. Barton, D.M. Harrison y D.A. Wieddowson, *Chem. Commun* 17 (1968).
- 60- D.H.R. Barton, J.E.T. Corrie, D.A. Wieddowson, M. Bard y R.A. Woods, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 1326 (1974)
- 61- G. Bauslaugh, G. Just y F. Blank, *Nature* 202, 1218(1964)
- 62- S. Safe, L.M. Safe y W.S.G. Maass, *Phytochemistry* 14, - 1821 (1975).
- 63- J.R. Lenton, L.J. Goad y T.W. Goodwin, *Phytochemistry* - 12, 1135 (1973).
- 64- C.J. Brooks, E.C. Horning y J.S. Young, *Lipids* 3 , 391 (1968).
- 65-R.B. Holtz y L.C. Schisler, *Lipids* 7, 251 (1972).
- 66- H. Yokokawa y T. Mitsuhashi, *Phytochemistry* 20, 1349, - (1981).
- 67- A. Yokoyama, S. Natori y K. Aoshima, *Phytochemistry* 14 487 (1975).
- 68- F. De Simone, F. Senatore, D. Sica y F. Zollo, *Phytochemistry* 18, 1572 (1979).

- 69- R. Bentley, W.V. Lvate y C.G. Sweeley, *Comp. Biochem Physiol.* 11, 263 (1964).
- 70- A.M. Bui, A. Cavé, MM Janot, J. Parello y P.Potier, *Tetrahedron* 30, 1327 (1974).
- 71- H. Yokokawa, *Phytochemistry* 19, 2615 (1980).
- 72- R.C. Cambie y P.W. Le Quesne, *J. Chem. Soc. C* 72 (1966)
- 73- S. Endo, Y. Shibuya, K. Tanabe y T. Mitsuhashi, *Nippon Kagaku Zasshi*, 92, 1009 (1971).
- 74- O.N. Breivak, J.L. Owades y R.F. Light, *J. Org Chem.* 19 1734 (1954).
- 75- K. Petzoldt, M. Kuhne ; E. Blanke, K. Kieslich y E. Kaspar, *Ann. Chem.* 709, 203 (1967).
- 76- H.K. Adam, T.A. Bryce, I.M. Campbell y N.J. McCorkindale, *Tetrahedron Letters* 16, 1461 (1967).
- 77- H. Inouye, K. Tokura y T. Hayashi, *Yakugaku Zasshi* 92, 621 (1972).
- 78- H. Inouye y K. Tokura, *Yakugaku Zasshi* 92, 859 (1972).
- 79- A. Yokoyama y S.Natori, *Chem. Pharm. Bull (Tokio)* 22, - 877 (1974).
- 80- H. Yokokawa, *Yukagaku* 19, 41 (1970).
- 81- F.T. Bond, D.S. Fullerton. L.A. Sciuchetti y P. Catalfo mo, *J. Am. Chem. Soc* 88, 3882 (1966).
- 82- A. Kanematsu y S. Natori, *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)* 20, 1993, (1972).
- 83- H.R. Arthur, T.G. Halsall y R.D. Smith, *J. Chem Soc* 2603 (1958).

- 84- Y. Ishida y T. Mitsuhashi, *Yukagaku* 19, 37 (1970).
- 85- P. Singh y S. Rangaswami, *Indian J. Chem.* 3, 575, (1965)
- 86- H.D. Munro y O.C. Musgrave, *J. Chem. Soc C.* 685 (1971).
- 87- A.K. Bhatta y S. Rangaswami, *Curr. Sci.* 39, 416 (1970).
- 88- A.K. Bhatta y S. Rangaswami, *J. Chem. Soc. Perkin Trans*
1, 451 (1975).
- 89- K. E. Schulte, G. Rücker y H. Fachmann, *Tetrahedron Le-*
tters 46, 4763 (1968).
- 90- T. Kariyone y G. Korono, *J. Pharm. Soc. Japan* 60, 318,
(1940).
- 91- R.M. Gascoigne, A. Robertson y J.J.H. Sims, *J. Chem. Soc*
1830 (1953).
- 92- C.G. Anderson y W.W. Epstein, *Phytochemistry* 10, 2713 ,
(1971).
- 93- W.W. Epstein y G Van Lear, *J. Org. Chem.* 31, 3434 (1966)
- 94- C.G. Anderson, W.W. Epstein y G. Van Lear, *Phytochemis-*
try 11, 2847 (1972).
- 95- T.G. Halsall y G.C. Sayer, *J. Chem. Soc.* 2031 (1959).
- 96- J.M. Guider, T.G. Halsall y E. R.H. Jones, *J. Chem. Soc.*
4471 (1954).
- 97- J.J. Beereboom, H. Fazakerley y T.G. Halsall, *J. Chem. -*
Soc. 3437 (1957).
- 98- K. Sheth, P. Catalfomo y L.A. Sciuchetti, *J. Pharm. Sci.*
56, 1656 (1967).
- 99- L. Canonica, E. Fedeli y A. Fiecchi, *Gazz. Chim. Ital.* 89
818 (1959).
- 100- L.B. Kier, *J. Pharm Sci.* 50, 471 (1961).

- 101- L.E. Kier y W.S.Erey, J. Pharm. Sci. 52, 465 (1963).
- 102- F. De Hirtzbach y G. Ourisson, Tetrahedron 28, 2259 ;
(1972).
- 103- A. Gonzalez, J Bermejo, F.J. Toledo y M^aJ. Mediavilla,
Ann. Quim.(1983), aceptado para publicación.
- 104- F. De Hirtzbach y G. Ourisson, C.R. Acad. Sci. Ser. C.
273, 1448 (1971).
- 105- R.K. Thappa, S.G. Agarwal, K.L. Dhar y C.K. Atal, Phy
tochemistry 20, 1746 (1981).
- 106- G.R. Pettit y J.C.Knight, J. Org. Chem. 27, 2696 (1962)
- 107- L.I. Strigina, Y.N. Elkin y G.B. Elyakov, Phytochemis-
try 10, 2361 (1971).
- 108- Y. Yamada, C.S. Hsu y M. Suzuki, Tokyo Yakka Daigaku -
Kenkyu Nempo 24, 427 (1974).
- 109- J. Protiva, H. Skorkovska, J. Urban y A. Vystreil, Co-
llection Czechoslov Chem. Commun. 45, 2710 (1980).
- 110- H. Ripperger y H. Budzikiewicz, Phytochemistry 14, 2297
(1975).
- 111- J.O. Toth, B. Luu y G. Ourisson, Tetrahedron Letters 24
1081 (1983).
- 112- F.H. Milazzo, Can. J. Bot. 43, 1347 (1965).
- 113- L.A. Cort, R.M. Gascoigne, J.S.E. Holker, B.J. Ralph, A
Robertson y J.J.H.Simes, J. Chem. Soc. 3713 (1954).
- 114- J.H. Birkinshaw, E.N. Morgan y W.P.K. Findlay, Biochem.
J. 50,509 (1952).

- 115- M. Endo, M. Kajiwara y K. Nakanishi, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 309 (1970).
- 116- R. Battaglia, M. De Bernardi, G. Fronza, G. Mellerio, G. Vidari y P. Vita-Finzi, Journal Natural Products - 43, 319 (1980).
- 117- V.R. Villanueva, Phytochemistry 10, 427 (1971).
- 118- W. Lawrie, J. McLean y J. Watson, J. Chem. Soc. C 1776 (1967).
- 119- I.L. Batey, J.T. Pinhey, B.J. Ralph y J.R.H. Simes, Aust J. Chem. 25, 2511 (1972).
- 120- R.M. Gascoigne, J.S.E. Holker, B.J. Ralph y A. Robertson, J. Chem. Soc 2346 (1951).
- 121- F.N. Lahey y P.H.A. Strasser, J. Chem. Soc. 873 (1951).
- 122- J. Fried, P. Grabowich, E.F. Sabo y A. Cohen, Tetrahedron 20, 2297 (1964).
- 123- L.L. Jackson y D.S. Frear, Phytochemistry 7, 654 (1968)
- 124- M. De Bernardi, G. Mellerio, G. Vidari y P. Vita-Finzi, Journal of Natural Products 44, 351 (1981).
- 125- M. Ikeda, H. Watanabe, A. Hayakawa, K. Sassa y Y. Miura Agric. Biol. Chem. 41. 1543 (1977).
- 126- M. Ikeda, G. Niwa, K. Tohyama, T. Sassa y Y. Miura, Agric. Biol. Chem. 41, 1803 (1977).
- 127- A.M. Lobo, P. Macedo, S. Prabhakar y L.S. Godinho, Tetrahedron Letters 24, 2205 (1983).
- 128- T.A. Bryce, I.M. Campbell y N.J. McCorkindale, Tetrahedron 23, 3427 (1967).

- 129- L.C. Cross, C.G. Eliot, I.M. Heilbron y E.R.H. Jones
J. Chem. Soc. 632 (1940).
- 130- W.O. Godtfredsen, W. von Daehne, S. Vangedal, A. Marquet
D. Aragoni y A. Melera, Tetrahedron 21, 3505 (1965).
- 131- H. Kojima, Nippon Kagaku Zasshi 79, 1458 (1958).
- 132- S. Ahmad, G. Hussain y S. Razaq, Phytochemistry 15,2000
(1976).
- 133- A. Gonzalez, J. Bermejo, F. Toledo y M^aJ. Mediavilla, -
Ann. Quim.(1983), aceptado para publicación.
- 134- D.H.R. Barton, D.M. Harrison y G.P. Moss, Chem Commun.
595 (1966).
- 135- M. Devys y M. Barbier, Bull. Soc. Chim. Biol 51, 925 -
(1969).
- 136- G.H. Alt y D.H.R. Barton, Chem. Ind. (London) 45, 1103
(1952).
- 137- A. Gonzalez, J. Bermejo, F. Toledo y M^aJ. Mediavilla, tra
bajo no publicado.
- 138- A. Bowers, T.G. Halsall, E.R.H. Jones y A.J. Lemin, J.
Chem. Soc. 2548 (1953).
- 139- A. Bowers, T.G. Halsall y G.C. Sayer, J. Chem. Soc. 3070
(1954).
- 140- T.G. Halsall y R. Hodges, J. Chem. Soc. 2385 (1954).
- 141- A. Kanematsu y S. Natori, Yakugaku Zasshi 90, 475 (1970)
- 142- A. Kanematsu y S. Natori, Chem. Pharm. Bull (Tokio) 18,
779 (1970).
- 143- S. Nakanishi, M. Yamamoto y T. Ikeda, Yakugaku Zasshi 59
725 (1939).

- 144- S. Shibata, S. Natori, K. Fujita, I. Kitagawa y K. Watanabe, Chem. Pharm. Bull. (Tokio) 6, 608 (1958).
- 145- S. Iseda y K. Yagishita, Yakugaku Zasshi 76, 970 (1956)
- 146- F.W. Hougen, B.M. Craig y G.A. Ledingham, Can. J. Microbiol. 4, 521 (1958).
- 147- D. Andina, M. De Bernardi, A. Del Vecchio, G.Fronza, G. Mellerio, G. Vidari y P. Vita-Finzi, Phytochemistry 19, 93 (1980).
- 148- Z. Sakurai, Nihon-yakuho 11, 25 (1936).
- 149- A. Gonzalez, J. Bermejo, y F. Toledo, Phytochemistry 22, 1049 (1983).
- 150- N. Entwistle y A.D. Pratt, Tetrahedron 24, 3949 (1968).
- 151- N. Entwistle y A.D. Pratt, Tetrahedron 25, 1449 (1969).
- 152- N. Entwistle y A.D. Pratt, J. Chem. Soc. Perkin I, 1235 (1973).
- 153- J. Vrkoc, M. Budesinský y L. Dolejs, Phytochemistry 15, 1782 (1976).
- 154- T.G. Halsall, R. Hodges y G.C. Sayer, J. Chem. Soc 2036 (1959).
- 155- R.C. Cambie, R.N. Duve y J.C. Parnell, New. Zealand. J. Sci. 15, 200 (1972).
- 156- J.J.H. Simes, M. Wootton, B.J. Ralph y J.T. Pinhey, Chem Commun. 1150 (1969).
- 157- S. Nozoe, A. Takahashi y G. Kusano, Chemistry Letters - 1679 (1982).
- 158- A. Angeletti y G. Tappi, Gazz. Chim. Ital. 77, 112 (1947)

- 159- A. Gaudemer, J. Polonsky, R. Gmelin, H.K. Adam y N.J. McCorkindale, Bull. Soc. Chim. France 1844 (1967).
- 160- H. Inouye, K. Tokura y T. Hayashi, Tetrahedron Letters 2811 (1970).
- 161- H. Yokokawa, E. Ishizima, K. Ishii, Y. Kanayama y S. Endo, Yukagaku 27, 847 (1978).
- 162- T. Ono, W. Sugiura, K. Matsuoka y H. Arimoto, J. Jpn. Soc. Food. Nutr. 26, 547 (1973).
- 163- D.H.R. Barton y J.D. Cox, J. Chem. Soc. 214 (1949).
- 164- H. Morimoto, I. Imada, T. Murata y N. Matsumoto, Anna len 708, 230 (1967).
- 165- W.O. Godfredsen y S. Vangedal, Tetrahedron 18, 1029 (1962).
- 166- E. Merdinger, P. Kohn y R.C. McClain, Can. J. Microbiol 15, 1021 (1968).
- 167- H. Wieland y W.M. Stanley, Ann. Chem. 489, 31(1931).
- 168- W.A. Ayer y L.M. Browne, Tetrahedron 37, 2199 (1981)
- 169- H. Wieland, F. Rath y H. Hesse, Ann. Chem. 548, 34 - (1941).
- 170- N.L. Allinger y J.L. Coke, J. Org. Chem. 4522 (1961).
- 171- W.A. Ayer y S. Fung, Tetrahedron 33, 2771 (1977).
- 172- W. Gruber y G. Proske, Monatsh. Chem. 81, 837 (1950).
- 173- W. Gruber y G. Proske, Monatsh. Chem. 81, 1024 (1950)
- 174- W. Gruber y G. Proske, Monatsh. Chem. 82,255 (1950).
- 175- L. Schmid y H. Czerny, Monatsh. Chem. 85, 1307 (1954)
- 176- R.M. Gascoigne, J.S.E. Holker, B.J. Ralph, A. Robertson Nature, 166;652 (1950).

177- L.F. Fieser, M. Fieser y R. Narayan, J. Am. Chem. Soc. 71
2226 (1949).

178- J. Elks, J. Chem. Soc (London) 468 (1954).

179- E.J. Corey y G. Schmidt, Tetrahedron Letters 5, 399 (1979)

180- P.A. Malya, J.R.Wright y W. R. Nes, Journal of chromatographic
Science 9, 700 (1971).

181- M.M. Fisch, R. Ernst, B.H. Flick, J. Ardini, D.H.R. Barton
P.D. Magnus y J.D. Menzies, J.C.S. Chem. Commun. 530 (1973)

182- R.L. Airth, G.E. Foerster, J. Cell. Comp. Physiol. 56,173
(1960).

183- A. Windaus y O. Linsert, Ann.465, 148 (1928).

184- A. Windaus, W. Bergmann y A. Luttringhaus, Ann. 472, 195
(1929).

185- A. Windaus y J. Brunken, Liebigs Ann. 460, 225 (1928).

186- A. Zurcher, H. Heusser, O. Jeger y P. Geisttich, Helv.37
1562 (1954).

187- G.A. Blondin, B.D. Kulkarni, J.P. John, R.T. van Aller, P.
T. Russell y W.R Nes, Analytical Chemistry 36 (1967).

188- H.K. Adam, I.M. Campbell, N.J. McCorkindale, Nature 216,
397 (1967)

189- R.L. Airth y W.D. McElroy, J. Bacteriol, 77,249 (1959).

190- R.L. Airth y G.E. Foerster, Arch. Biochem. Biophys 97,
567 (1962).

191- I.D. Frantz, A.G. Davison, E. Dulit y M.L. Mobberly, J.
Biol. Chem. 234,2290 (1959).

192- E.C. Wassink y S. Kuwabara, "Bioluminescence in Progress"
Princeton Univ. Press, New Jersey, p 247 (1966).

- 193- R.L.Airth, G.E.Ferberster y P.Q. Behrens, "Bioluminescence in Progress" Princeton Univ. Press, New Jersey, p203 (1966).
- 194- T.J.Scallen y M.W. Schuster, Steroids 12,683 (1968).
- 195- L.J. Goad, G.F. Gibbons, L. Lolger, H.H. Rees y T.W. - Goodwin, Biochem. J. 96,79 (1969).
- 196- M. Akhtar y S. Marsh, Biochem. J. 102, 462 (1967).
- 197- A.M. Paliokas y G.J. Schroepfer, Biochem. Biophys. Res. Commun, 26, 736 (1967).
- 198- A.M. Paliokas y G.J. Schroepfer, J. Biol. Chem. 243, - 453 (1968).
- 199- M. Akhtar y M.A. Parvez, Biochem. J. 108, 527 (1968).
- 200- T. Bimpson, L.J. Goad y T.W. Goodwin, Chem. Commun.297 (1969).
- 201- R.W. Topham y J.L. Gaylor, Biochem. Biophys. Res. Commun 27, 644 (1967).
- 202- R.W. Topham y J.L. Gaylor, J. Biol. Chem. 245, 2319 - (1970).
- 203- R.W. Topham y J.L. Gaylor, Biochem. Biophys. Res. Commun 47, 180 (1972).
- 204- J.G. Hamilton y R.N. Castrejon, Federation Proc. 25, 221 (1966).
- 205- L.F. Fieser y M. Fieser "Steroids" Reinhold Publishing Corp, New York, N.Y. p341-363 (1959).
- 206- W. Bergmann y E.M. Low, J. Org. Chem. 12, 67 (1947).
- 207- K.Tsuda, Y. Kishida y R. Hayatsu, J. Am. Chem. Soc. 82, 3396 (1960).

- 208- W.R. Nes, K. Krevitz y S. Behzadan, *Lipids* 11, 118 (1976).
- 209- L.J. Mulheirn, *Tetrahedron Letters* 3175 (1973).
- 210- W.R. Nes, K. Krevitz, S. Behzadan, G.W. Patterson, J.R. Landrey y R.L. Conner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1462 (1975).
- 211- T. Brun, *Acta Chem.Scand*, 8, 76 (1954).
- 212- W.H. Hui, C.T. Ho, *Aust. J.Chem.* 1675 (1968).
- 213- J.M. Beaton, F.S. Spring, R. Stevenson y J.L. Stewart, *J. Chem. Soc.* 2131 (1955).
- 214- J.L. Beton, T.G. Halsall y E.R.H. Jones, *J. Chem. Soc.* 2904 (1956).
- 215- R.A. Micheli, *J.Org. Chem.* 27, 666, (1962).
- 216- Les triterpenoids en physiologie vegetale et animale Gauthier-Villars (1964); a) pag.137; b) pag. 138.
- 217- L. Tökes, R.T. Lalonde y C. Djerassi, *J. Org. Chem.* 32, 1020 (1967).
- 218- Ze'ev Zaretskii: "Mass spectrometry of steroids" (1975). a) pg 126, 129-134. b)pg 13-15.
- 219- L. Ruzicka, Denss y O. Jeger, *Helv.* 28, 759 (1945)
- 220- W. Voser, M. Montavon, Hs. H. Günthard, O. Jeger y L. Ruzicka, *Helv. Chim. Acta*, 35, 1893 (1950).
- 221- A.G. Gonzalez y J.L. Bretón, *Anales de Fisica y Quimica* LV-B 93 (1959).
- 222- E.J. Corey y G. Schmidt, *Tetrahedron Letters*, 5, 399 (1979).

- 223- S. Osamu, Y. Toshihiro, Y. Takao; Yakogaku 31(1), 23
(1982)
- 224- G. Gola, G. Negri y C. Cappelletti; "Tratado de Botánica" (1965).
- 225- T. Hiroshi, N. Koichi, Y. Toshiro y M. Toshio; Nippon
Kingakkai Kaiho 23(1), 21 (1982).

APENDICE

ESPECTROMETRIA DE MASAS DE ESTEROIDES

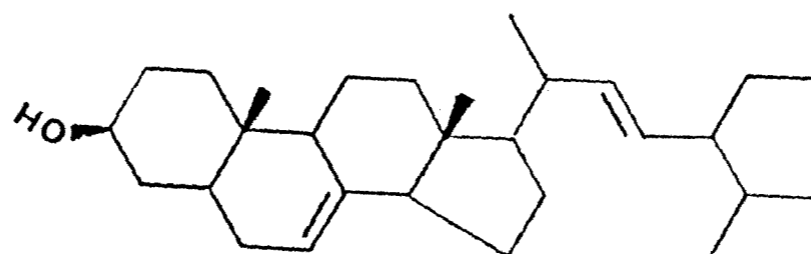
Desde hace años la espectroscopia de masas se ha mostrado como una excelente técnica para la identificación - (1-3), localización de grupos funcionales (4) y diferenciación de especies isoméricas (5-7) de esteroides.

En este apéndice [@] se realiza un estudio de los espectros de masas de catorce esteroides (I a XIV), analizando la influencia de los grupos funcionales sobre los [#] mecanismos de ruptura (8,9).

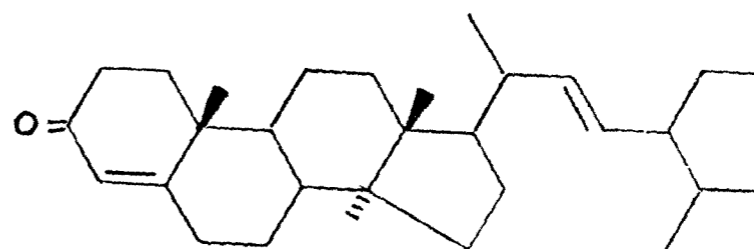
#####

@La numeración de productos, esquemas y bibliografía de este apéndice es independiente de la del resto del trabajo.

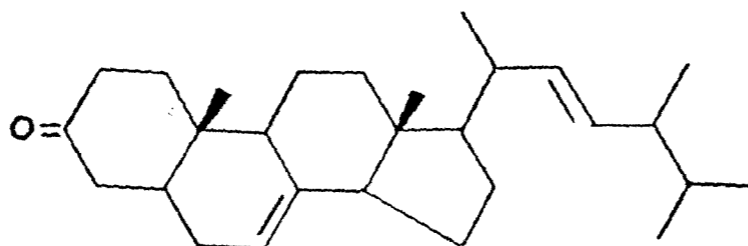
Las fórmulas empíricas de las fragmentaciones aludidas en el texto han sido confirmadas por espectroscopia de masas de alta resolución.



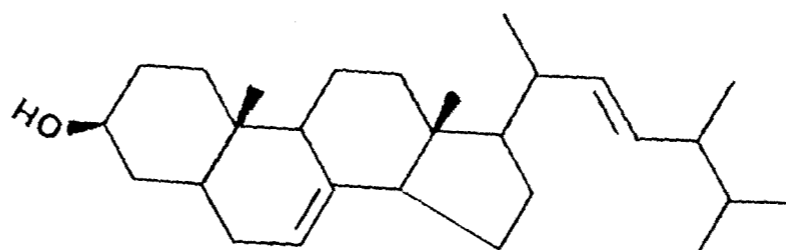
I



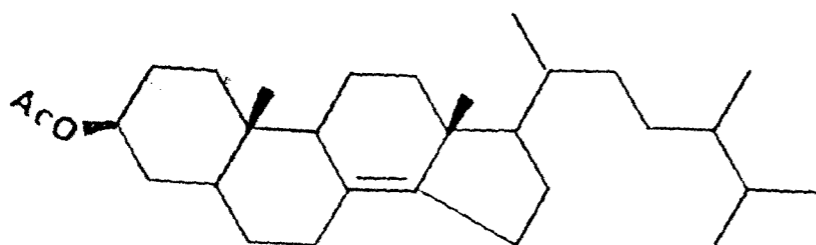
II



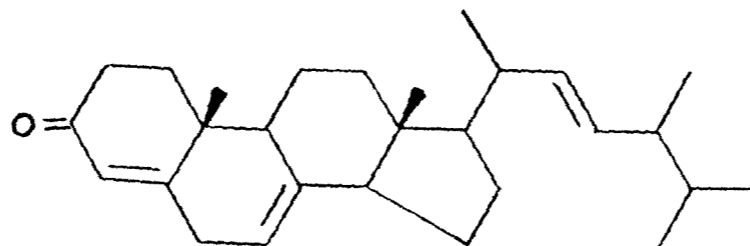
III



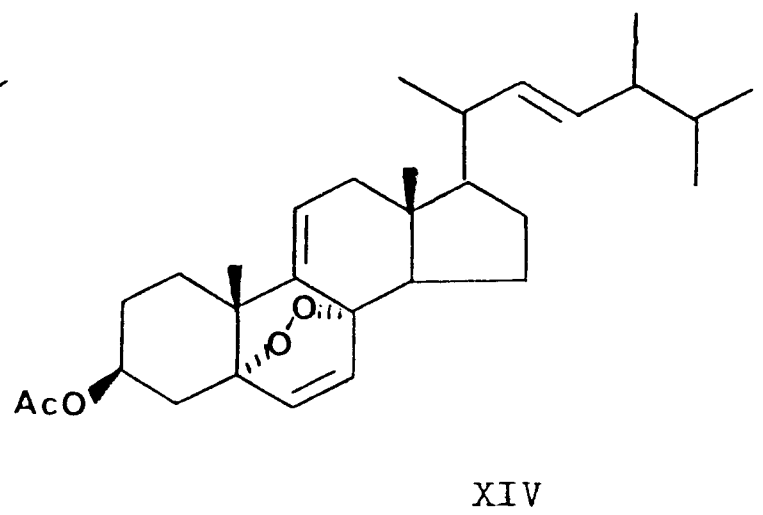
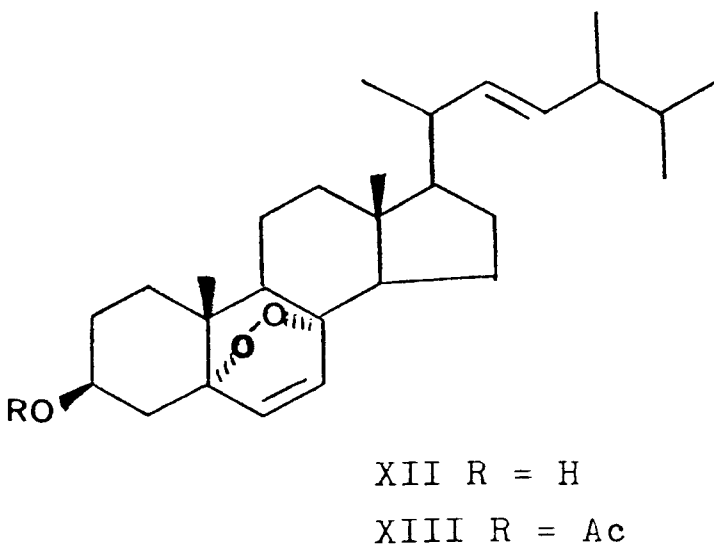
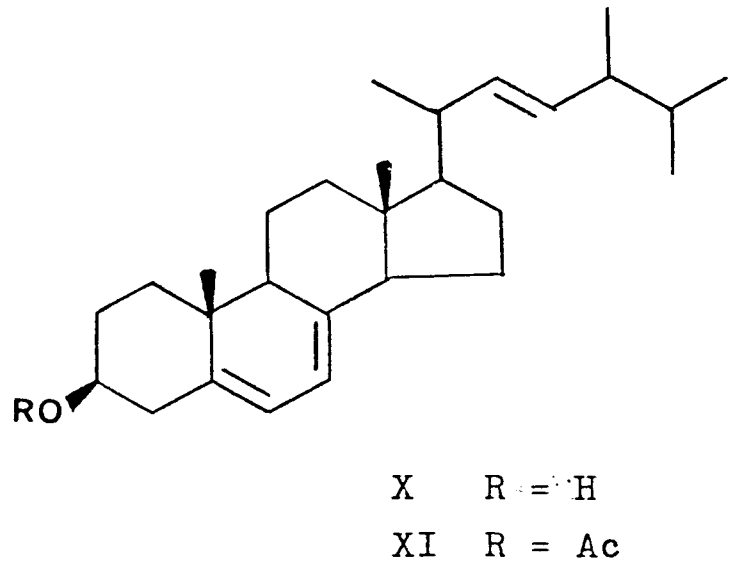
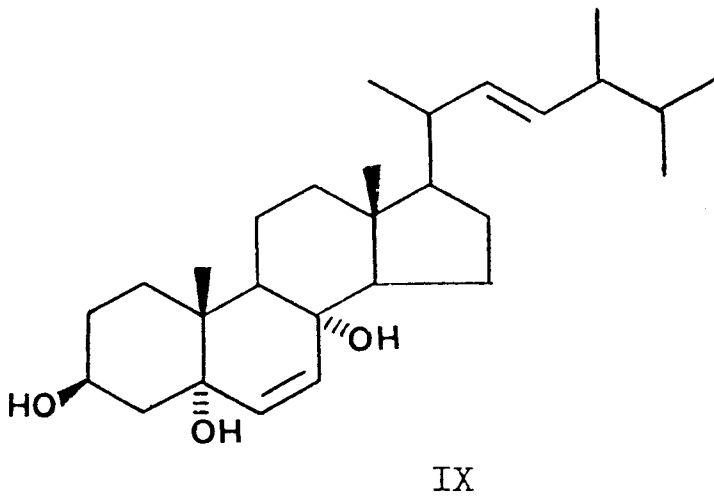
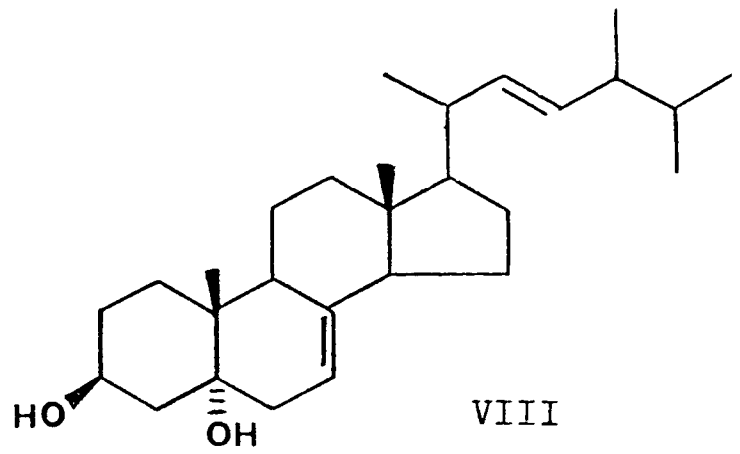
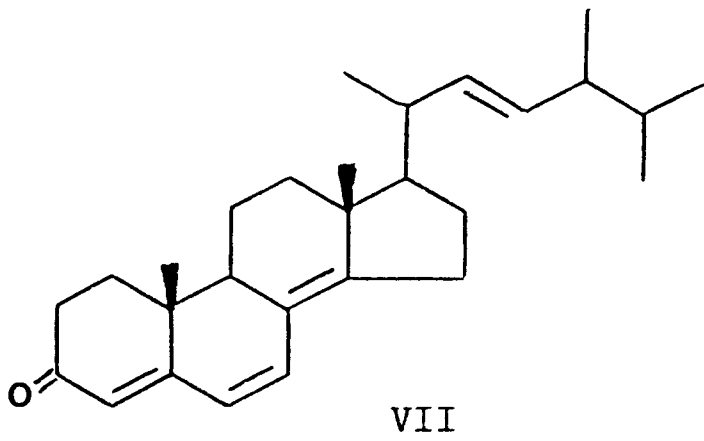
IV



V

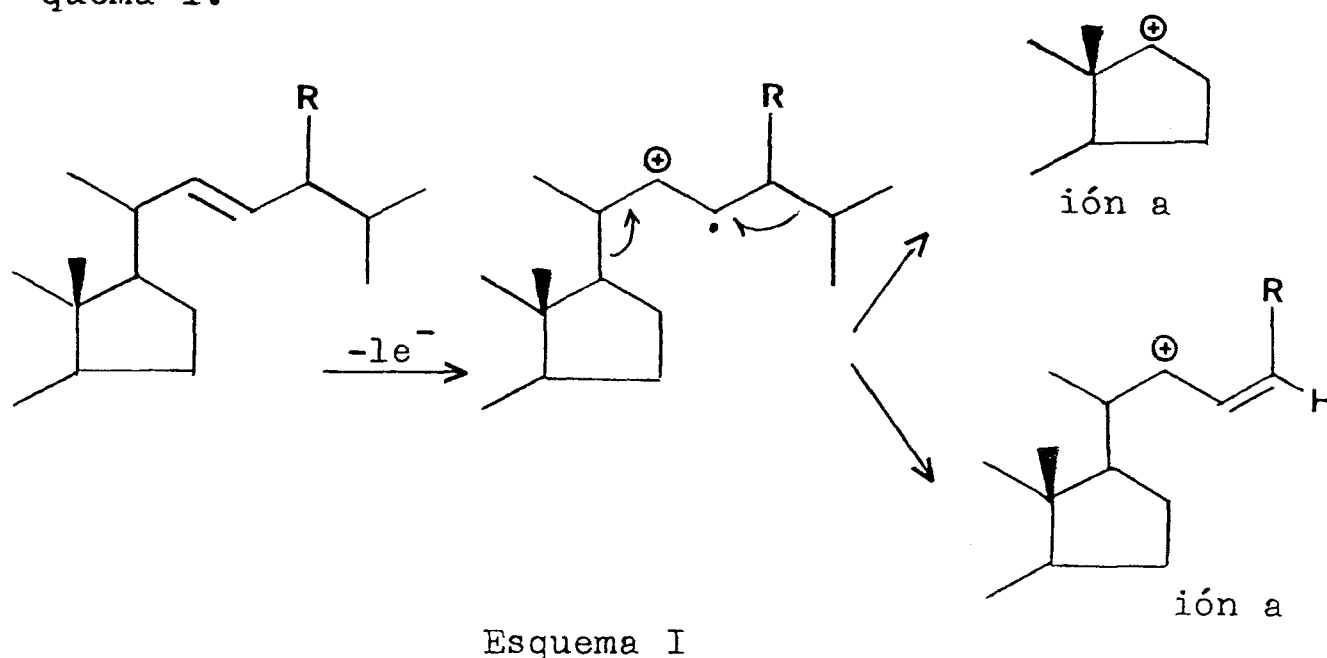


VI



Existen similitudes en todos los espectros de masas estudiados. Así, la ruptura de cadena suele originar una señal intensa. Sin embargo, el mecanismo de esta eliminación varia en función de los dobles enlaces y grupos sustituyentes de la molécula. Hemos observado para los Δ^{22} esteroides dos tipos de fragmentaciones $C_{17}-C_{20}$.

1) Fragmentación sin migración de hidrógeno, que se origina mediante una ruptura alílica simple, según el esquema I.



2) Fragmentación con migración de dos hidrógenos al doble enlace de la cadena con participación del metilo -18 (10) como se muestra en el esquema II.

En la tabla I se muestran las intensidades de los iones (a), (a') y (b) para los compuestos I a XIV; cuando existen grupos fácilmente eliminables, la ruptura de cadena se observa también sobre los productos de eliminación (tabla II).

ESQUEMA II

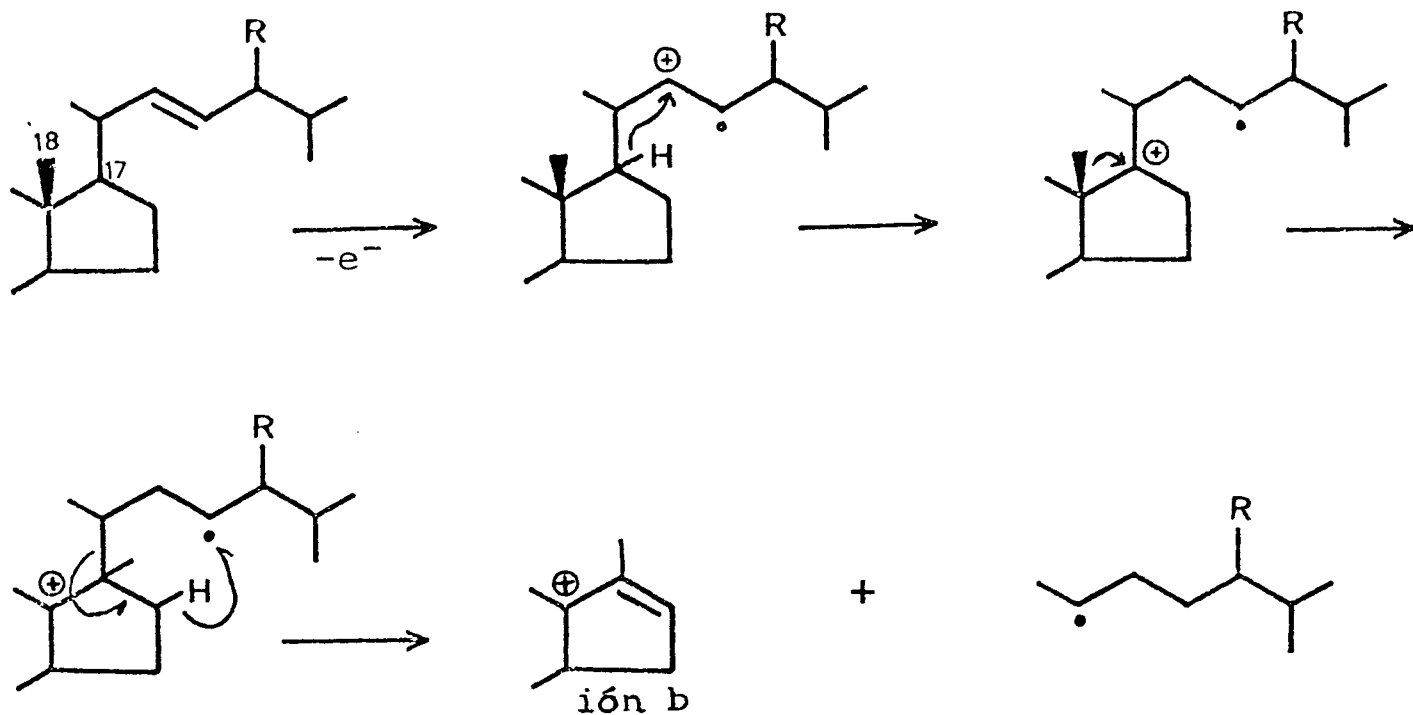


Tabla I

Producto, M^+ (%)	a (%)	a' (%)	b (%)
I 412 (41.9)	273 (43.0)	369 (19.4)	271 (100.0)
II 424 (42.1)	285 (58.5)	381 (45.4)	283 (41.6)
III 396 (19.3)	271 (50.4)	353 (12.3)	269 (100.0)
IV 398 (23.4)	273 (22.8)	355 (5.3)	271 (56.2)
V 442 (57.6)	315 (6.3)		
VI 394 (17.0)	269 (26.0)	351 (5.0)	267 (48.0)
VII 392 (26.3)	267 (69.3)	349 (2.9)	265 (5.1)
X 396 (10.0)	271 (8.5)		269 (8.5)
XII 428 (9.3)	303 (6.6)	385 (4.1)	301 (7.0)
XIV 468 (2.2)	343 (2.3)	425 (1.4)	341 (2.8)

Tabla II

Producto;	reacción de eliminación	Pérdida de grupo funcional y pérdida de cadena con formación de iones tipo		
			a (%)	b (%)
I	412 (41.9) $\xrightarrow{-H_2O}$	394 (1.4)	255 (44.4)	253 (5.4)
IV	398 (23.4) $\xrightarrow{-H_2O}$	380 (1.0)	255 (29.4)	253 (7.3)
V	442 (57.6) $\xrightarrow{-AcOH}$	382 (2.8)	255 (11.6)	---
VI	414 (0.7) $\xrightarrow{-H_2O}$	396 (61.5)	271 (22.8)	269 (11.2)
	$\xrightarrow{-2H_2O}$	378 (3.0)	253 (28.3)	251 (3.5)
IX	430 (1) $\xrightarrow{-H_2O}$	412 (28.3)	287 (5.5)	285 (1.9)
	$\xrightarrow{-2H_2O}$	394 (23.5)	269 (14.1)	267 (3.8)
	$\xrightarrow{-3H_2O}$	376 (10.6)	251 (51.3)	249 (4.4)
XI	438 (7.8) $\xrightarrow{-AcOH}$	378 (85.7)	253 (4.4)	---
XII	428 (9.3) $\xrightarrow{-O_2}$	396 (58.5)	271 (6.6)	269 (6.0)
XIII	470 (2.2) $\xrightarrow[-O_2]{-AcOH}$	378 (55.5)	253 (5.9)	251 (4.4)
XIV	468 (2.2) $\xrightarrow[-O_2]{-AcOH}$	376 (22.2)	251 (9.9)	249 (6.7)

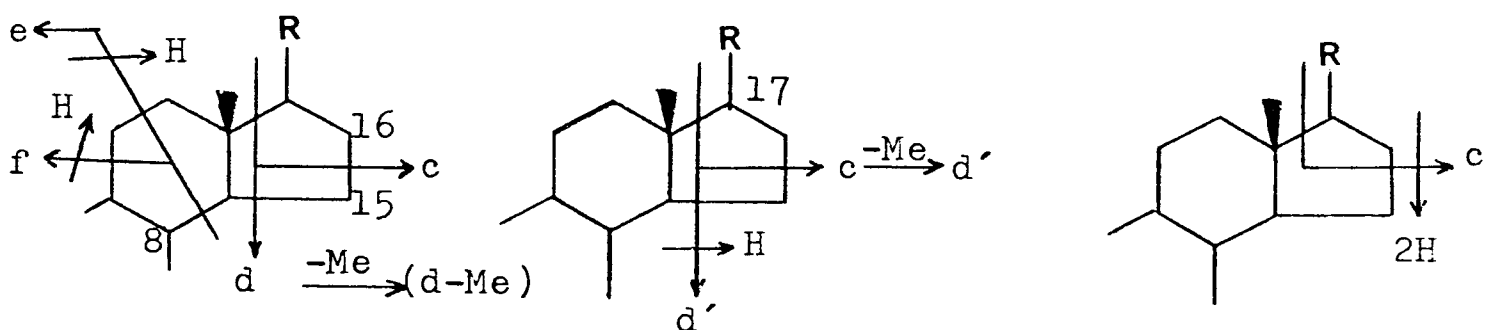
A partir de estos datos hemos sacado las siguientes conclusiones:

1) Para Δ^7 esteroides sin sustituyentes ni otros dobles enlaces en los anillos B, C y D, la intensidad del ión (b) es aproximadamente el doble de la del ión (a).

2) Dobles enlaces conjugados en el anillo B o sustituyentes y dobles enlaces en el anillo C disminuyen la intensidad del ión (b) hasta hacerla igual o inferior a la del ión (a).

3) En la tabla II se observa que sobre los productos de eliminación de grupo funcional el ion predominante en la ruptura de la cadena es el ión (a). La creación de nuevas insaturaciones, que disminuyen la tendencia del núcleo esteroidal a ceder hidrógeno, puede ser la causa de este comportamiento. Así, para el compuesto VII, muy insaturado, se presenta un pico de masa 268 (97.5 %), que corresponde a la ruptura de cadena con migración de un hidrogeno hacia el núcleo.

Además de las fragmentaciones de cadena, las rupturas descritas en el esquema III son también comunes para esta serie de compuestos, aunque como en el caso anterior los mecanismos varían según la funcionalización.



Esquema III

Los iones (c), (d), (d'), (d-Me), (e) y (f) se originan a partir de todos los compuestos estudiados, aunque para los esteroides VIII a XIV, solo se observan con

intensidad significativa sobre los productos de eliminación de grupo funcional. Para estos productos VIII a XIV el ión (d') es el más intenso de los originados por fragmentación del anillo D. Este ión proviene en un 79-76 % de la escisión de los enlaces 13-17 y 14-15 con migración de un hidrógeno predominantemente de la posición 14. El resto se origina por pérdida de metilo a partir del ión (c) (11,12).

En los compuestos II, V y VII (tabla III) que no poseen hidrógeno en posición 14, el ión (d') se presenta también con intensidades elevadas. En este caso la migración debe provenir de las posiciones 8 y 12, aunque es previsible que en II, (d') proceda fundamentalmente del ión (c) por pérdida de metilo. En V y VII la migración puede producirse asimismo de la posición 14 a partir de los productos de transposición del doble enlace 8-14.

En los compuestos V y VII, se observa también la formación de un ión (c'), con intensidad semejante a la del ión (c). Esta nueva fragmentación, descrita con anterioridad para otros $\Delta^{8(14)}$ esteroides (13), se produce por fisión de los enlaces 13-14 y 15-16 con migración de dos hidrógenos del fragmento cargado.

Tabla III

Producto	c (%)	d (%)	d' (%)
I	246 (23.7)	232 (5.0)	231 (15.2)
II	258 (6.3)	244 (3.8)	243 (15.6)
III	244 (19.3)	230 (7.6)	229 (25.7)
IV	246 (16.3)	232 (3.0)	231 (10.1)
V	288 (3.3)	274 (2.5)	273 (5.4)
VI	242 (8.0)	228 (20.0)	227 (12.0)
VII	240 (8.3)	226 (5.8)	225 (6.9)
X	244 (2.5)	230 (3.0)	229 (2.0)

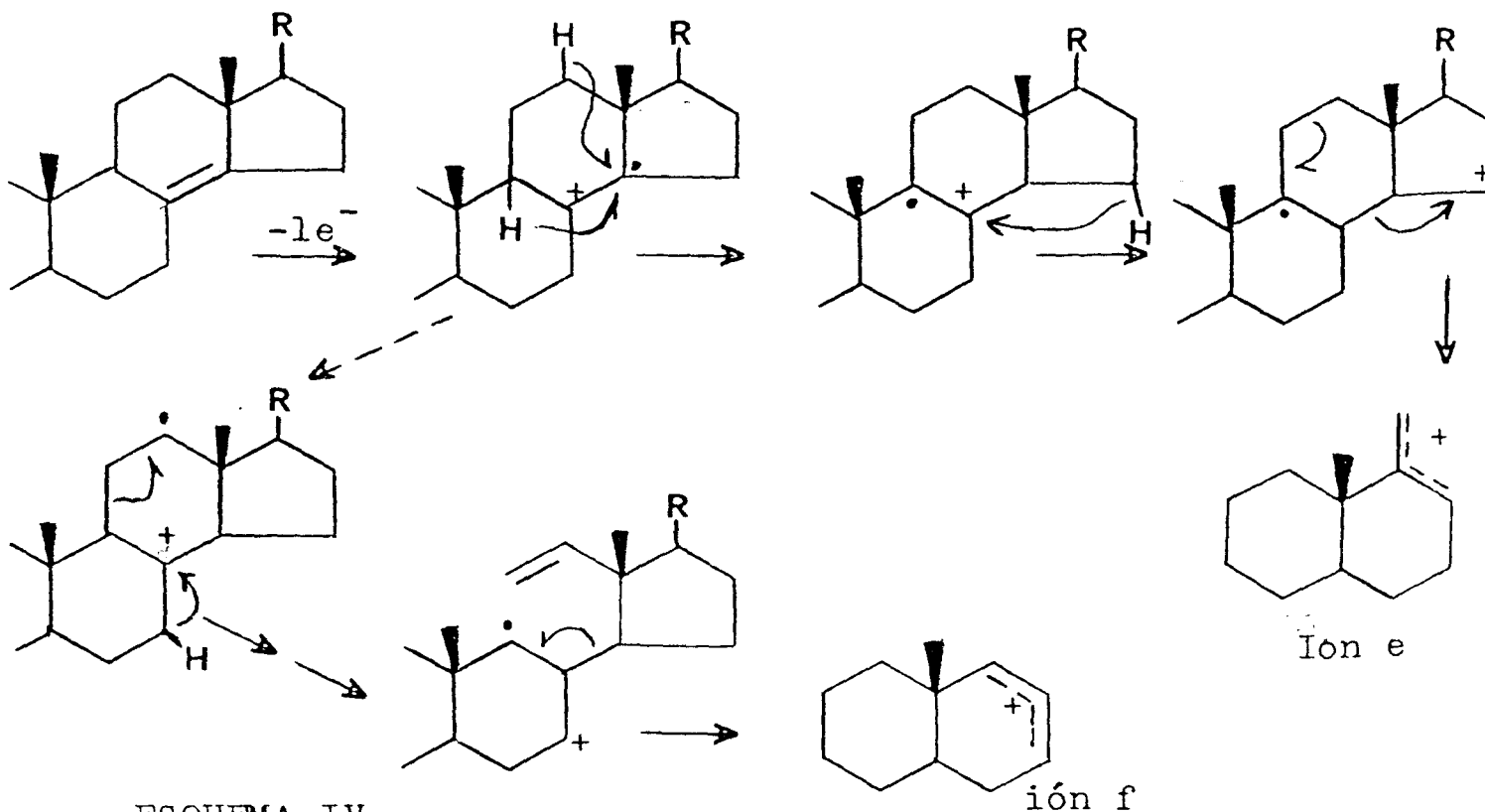
~~~~~

| Producto | e (%)                                      | f (%)                                      |
|----------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| I        | 177 (3.3) $\xrightarrow{-H_2O}$ 159 (17.3) | 163 (9.0) $\xrightarrow{-H_2O}$ 145 (19.9) |
| II       | 175 (7.2)                                  | 161 (5.3)                                  |
| III      | 175 (9.2)                                  | 161 (20.0)                                 |
| IV       | 177 (2.1) $\xrightarrow{-H_2O}$ 159 (17.0) | 163 (3.6) $\xrightarrow{-H_2O}$ 145 (19.1) |
| V        | 221 (1.0) $\xrightarrow{-AcOH}$ 161 (8.4)  | 207 (0.5) $\xrightarrow{-AcOH}$ 147 (15.9) |
| VI       | 173 (16.0)                                 | 159 (19.0)                                 |
| VII      | 173 (17.3)                                 | 159 (4.4)                                  |
| X        | 175 (6.0)                                  | 161 (10.7)                                 |

Aunque en la formación de los iones (e) y (f) (esquema III) se observa la migración de un único hidrógeno hacia el fragmento que contiene la cadena, el mecanismo es más complejo. Así, la formación del ión (f) implica una triple transferencia de hidrógeno entre las posiciones 5, 8 y 14, que parece estar relacionada con la configuración de C-5 (11,14).

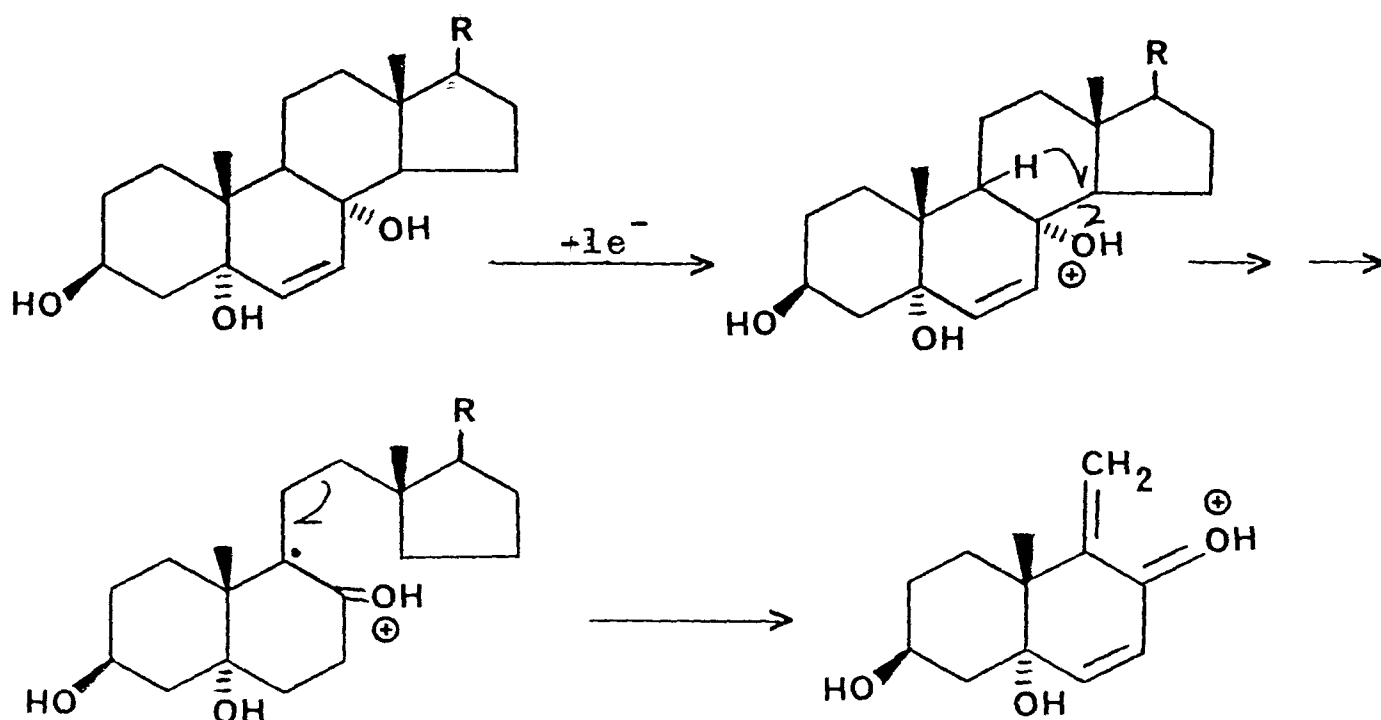
Nosotros no observamos diferencias que relacionen la ausencia de hidrógeno en 5 u 8 con la intensidad del ión (f), aunque hemos advertido algunas modificaciones sobre el mecanismo.

Así para que se escinda el anillo C en V y VII, se tiene que producir una transposición del doble enlace -- 8-14, en este caso, la migración de hidrógeno ocurre en sentido contrario al expuesto en el mecanismo general ; en el esquema IV desarrollamos una posible ruta para la formación de los iones (e) y (f) en estos compuestos.



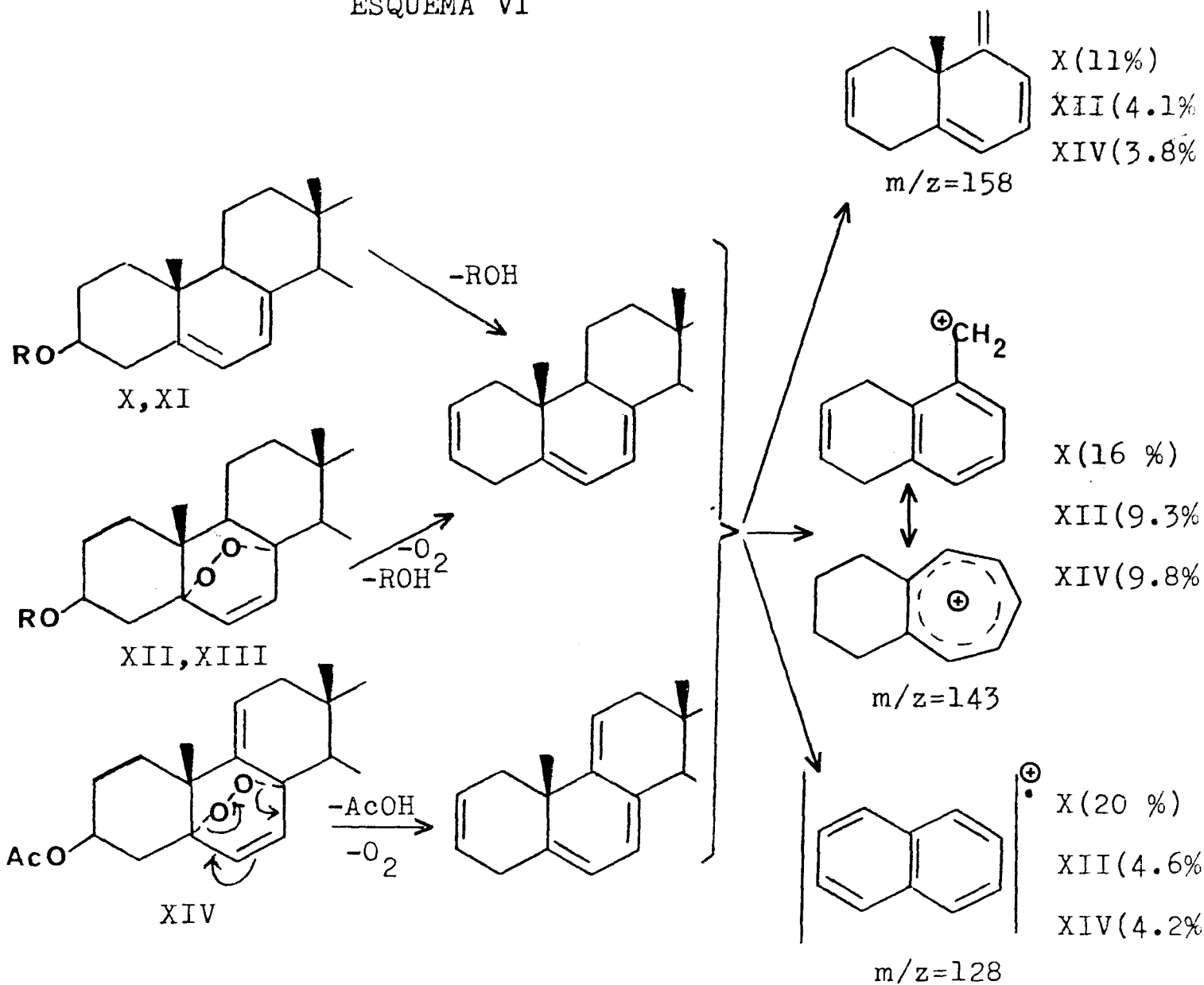
Para el compuesto IX, la formación del ión (e) de masa 209 (9.3) es la fragmentación más intensa obtenida a partir del ión molecular. La participación del hidroxilo en 8 en la ruptura del enlace 8-14, así como la alta estabilidad del ión resultante, son la causa de este comportamiento; en el esquema V se expone un posible mecanismo para la formación de este ión.

ESQUEMA V



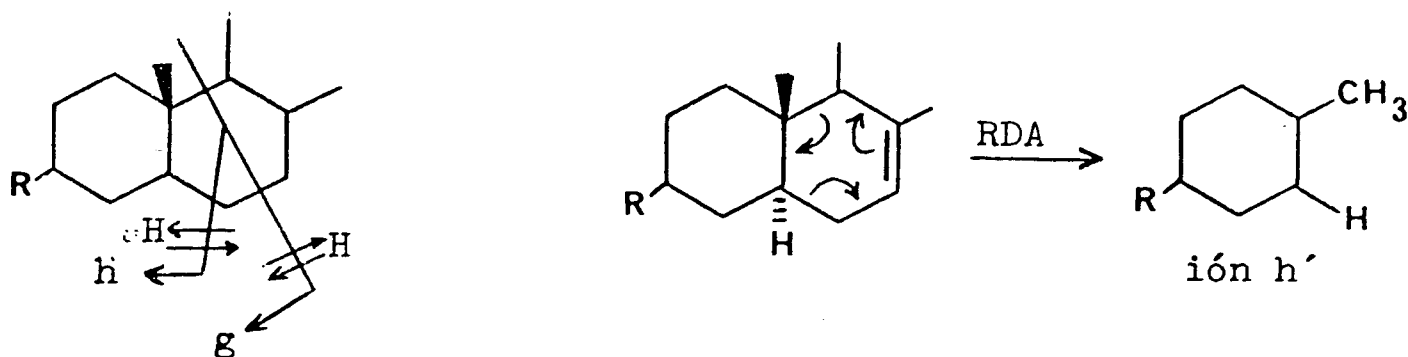
Aunque los iones (e) y (f) se observan en todos los compuestos estudiados, en los productos X a XIV se presenta además una alta tendencia a la aromatización, mostrando los fragmentos de masa 128, 143 y 158, típicos de los  $\Delta^{5,7}$  esteroides (15) (esquema VI).

ESQUEMA VI



Sobre el anillo B de esteroides se encuentran dos rupturas comunes a los compuestos I a VII (esquema VII). Para las cetonas  $\alpha, \beta$ -insaturadas II, VI y VII, los iones (g) y (h) se originan con migración de un hidrógeno hacia el fragmento cetónico, mientras que para I, III, IV y V la formación de (g) y (h) ocurre con una migración de hidrógeno en sentido contrario.

## Esquema VII



En los  $\Delta^7$  esteroides I, III y IV, la reacción de retro Diels Alder da origen a iones ( $h'$ ) cuyas intensidades son muy inferiores a las del ión ( $h$ ). Los resultados se muestran en la tabla IV.

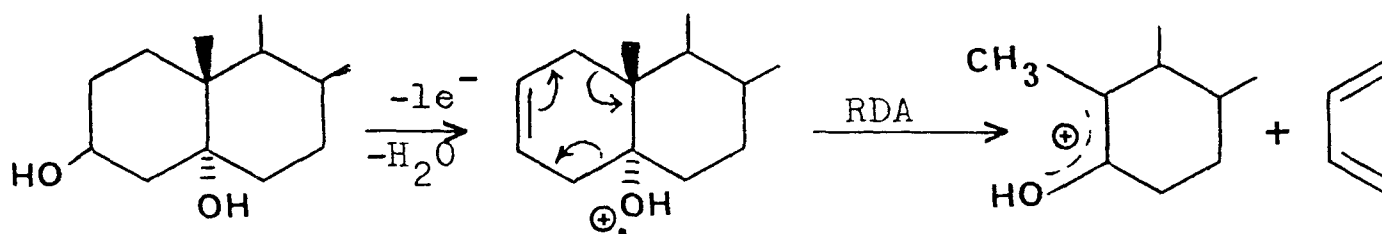
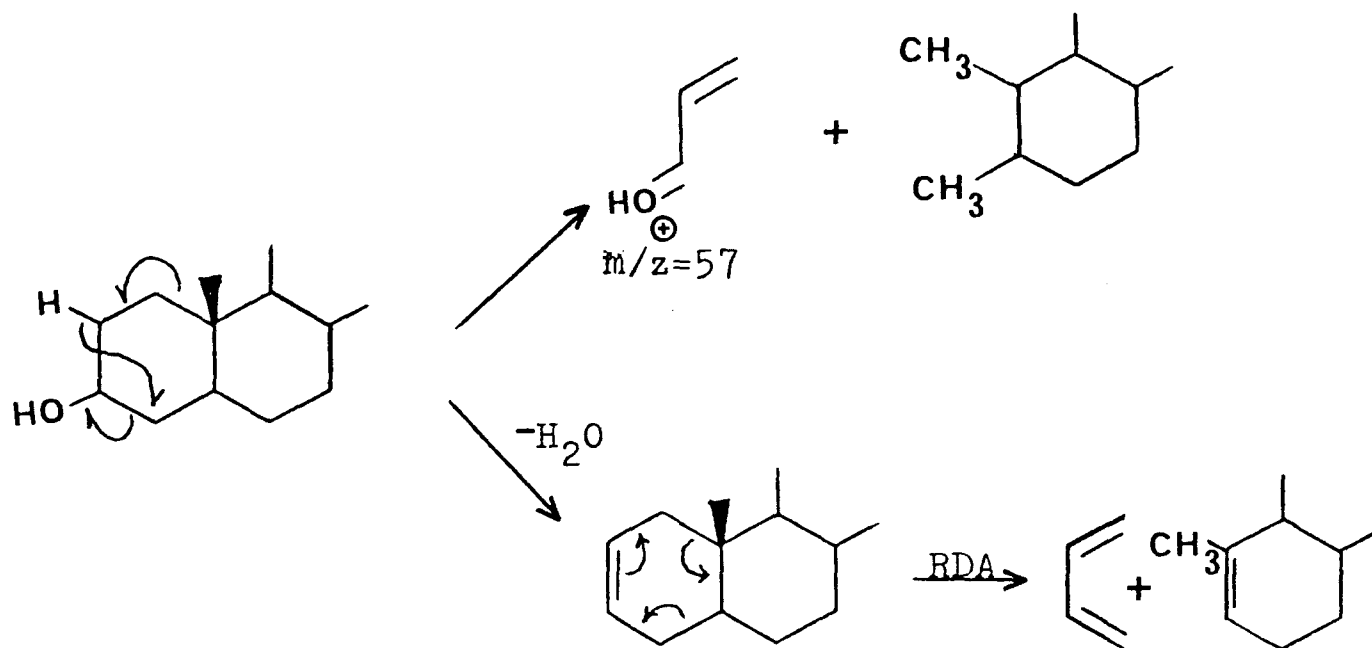
Respecto al anillo A, el grupo hidroxilo en posición 3, induce dos fragmentaciones que implican la pérdida de 57 y 72 unidades (sus mecanismos se exponen en el esquema VIII); estas rupturas se observan sobre el producto de eliminación de la cadena, con una intensidad media del 9% en I y IV. En los  $5\alpha$ -hidroxi esteroides VIII y IX solo se aprecia la pérdida de 72 unidades (16) con intensidades - del 11 y 12 %. La preferencia de esta eliminación se funda en la alta estabilidad del ión formado. Para el acetato V, se produce también la reacción de eliminación de -- ácido acético, seguida de retro Diels Alder.



Tabla IV

| Producto | g (%)      |                                  | h (%)      |                                 | h' (%)    |                                 |
|----------|------------|----------------------------------|------------|---------------------------------|-----------|---------------------------------|
| I        | 125 (3.6)  | $\xrightarrow{-H_2O}$ 107 (52.2) | 111 (5.7)  | $\xrightarrow{-H_2O}$ 93 (33.7) | 112 (1.2) | $\xrightarrow{-H_2O}$ 94 (12.4) |
| II       | 123 (14.8) |                                  | 109 (13.9) |                                 |           |                                 |
| III      | 123 (19.6) |                                  | 109 (31.1) |                                 | 110 (5.3) |                                 |
| IV       | 125 (13.3) | $\xrightarrow{-H_2O}$ 107 (42.2) | 111 (3.3)  | $\xrightarrow{-H_2O}$ 93 (25.4) | 112 (0.6) | $\xrightarrow{-H_2O}$ 94 (8.4)  |
| V        | 167 (0.4)  | $\xrightarrow{-AcOH}$ 107 (21.7) | 153 (0.4)  | $\xrightarrow{-AcOH}$ 93 (12.5) |           |                                 |
| VI       | 123 (8.6)  |                                  | 109 (21.0) |                                 |           |                                 |
| VII      | 123 (7.8)  |                                  | 109 (19.4) |                                 |           |                                 |

ESQUEMA VIII



## BIBLIOGRAFIA

- 1- H. Budzikiewicz y C. Djerassi, *J.Am.Chem.Soc*, 84, 1430 (1962).
- 2- J.Sjövall y R. Vihko, *Steroids*, 7, 447 (1966).
- 3- P. Eneroth, K. Hellström y R. Ryhage, *Steroids*, 6, 707, (1965).
- 4- S. Hata, T. Nishino, Y. Oda y H. Katsuki, *Tetrahedron Letters*, 24, 4729 (1983).
- 5- F.J. Hammerschmidt y G. Spiteller, *Tetrahedron*, 29, 2465 (1973).
- 6- M. Ende y G. Spiteller, *Tetrahedron*, 29, 2457 (1973).
- 7- J. Janovic y G. Spiteller, *Tetrahedron*, 29, 4017 (1973).
- 8,9- Los esteroides analizados han sido obtenidos de fuentes naturales (*Ganoderma australe* y *Phellinus pomaceus*) y por procedimientos sintéticos.
- 10- S. Wyllie y C. Djerassi, *J.Org.Chem*, 33, 305, (1968).
- 11- L. Tökes , C. Djerassi y G. Jones, *J.Am.Chem.Soc.*, 90, 5465 (1968).
- 12- L. Tökes y C. Djerassi, *J. Am.Chem.Soc.*, 91, 5017 (1969)
- 13- J.W. Clark-Lewis y I. Dainis, *Aust. J. Chem.*, 20, 1961 (1967).
- 14- L. Tökes y B.A. Amos, *J.Org.Chem.*, 37, 4421 (1972).
- 15- G. Galli y S. Maroni, *Steroids*, 10, 189 (1967).
- 16- A. Rotman, A. Mandelbaum y Y. Mazur, *Tetrahedron*, 29, 1303 (1973).

## METODOS GENERALES

## Puntos de fusión

Fueron realizados en un aparato Kofler y están sin corregir.

## Actividades ópticas

Se hicieron en un polarimetro Perkin- Elmer 141, usando cloroformo y tetracloruro de carbono como disolventes, en células de 1 cm.

## Espectros UV

Se hicieron en un aparato Perkin- Elmer 402, utilizando etanol como disolvente.

## Espectros IR

Fueron realizados en nujol, cloroformo o film en un aparato Perkin-Elmer 257, usando células de 0.1 mm.

## Espectros de masas

Se hicieron en un V.G. Micromass LTD - ZAB - 1F y en un espectrómetro Hewlett-Packard, mod. 5930 A, a un potencial de ionización de 15 ó 70 e.V.

## Espectros de RMN

Fueron trazados en un espectrómetro Perkin - Elmer R-12B (60 MHz) ó en un R-32 (90 MHz) utilizando tetramethylsilano como referencia interna y cloroformo deuterado como disolvente.

Los desplazamientos químicos se dan en unidades  $\delta$ . Los acoplamientos se describen como s, singlete; t, triplete; c, cuartete; m, multiplete, las constantes de -- acoplamiento se dan en Hertz.

## Cromatografía de gases

Se realizó con un aparato Perkin - Elmer 900.

## Cromatografía en capa fina

Se utilizó gel de sílice G de la casa Merck, sola o impregnada en nitrato de plata al 20 % usandose diferentes mezclas eluyentes.

Las placas se revelaron con oleum ( $H_2SO_4$  : HOAc :  $H_2O$  , 4:80:16) calentando a  $120^\circ C$  durante unos minutos.

## Cromatografía en capa gruesa

Se llevó a cabo en placas hechas con las siguientes mezclas según su grosor:

0.75 mm            75gr de gel en 155 ml de agua

1 mm 100 gr de gel en 210 ml de agua

0.5 mm 50 gr de gel en 100 ml de agua

Una vez realizada la mezcla y extendida sobre las placas estas eran activadas a 130°C durante 6 a 7 horas.

### Cromatografía en columna

Se usó gel de sílice Merck de grano 0.2 a 0.5 mm y de 0.5 a 0.02 mm.

La cromatografía en gel de sílice - nitrato de plata se hicieron al 20 %.

### Secado de disolventes

Los disolventes se secaron a partir de sodio.

En los procesos de extracción de las mezclas de reacción y cromatografía los disolventes se secaron sobre sulfato sódico.

## CONCLUSIONES



Con este trabajo se inicia una nueva línea de investigación sobre metabolitos de hongos superiores, enfocada hacia el aislamiento y estudio de terpenoides.

## CONCLUSIONES

1- Se realiza una revisión de triterpenos y esteroides de hongos que agrupa 198 especies.

2- Se obtienen del hongo *Ganoderma australe* seis ácidos grasos identificados como: ácidos linoleico, docosanoico, tricosenoico, tetracosanoico, pentacosanoico y hexacosanoico. Además se aíslan otros seis esteroides identificados como: ergosta-7,22-dien-3-ona, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona, ergost-7-en-3 $\beta$ -ol, ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol y 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-ergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol.

4- Todos los esteroides aislados del hongo *Ganoderma australe* han sido correlacionados químicamente con el ergosterol.

5- Se sintetizan via ergosterol los siguientes esteroides: ergosta-4,7,22-trien-3-ona, ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol, ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -triol y ergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -triol.

6- Se dilucida el mecanismo de la reducción de Birch de 1,4 endoperóxidos.

7- Se discute la autenticidad del peróxido del ergosterol como producto natural, llegando a la conclusión de que en nuestro caso, el compuesto no es un artefacto.

8- Del hongo *Phellinus pomaceus* se aislan dos ácidos grasos que se identifican como ácidos palmítico y oleico, un esteroide: el ergosta-7,22-dien-3-ona y cuatro triterpenos pentacíclicos: friedelina, taraxerol, ácido ursólico y ácido  $\beta$ -boswéllico, de estos cuatro triterpenos únicamente la friedelina había sido encontrada en dos especies de hongos.

9- Del hongo *P. pomaceus* se logran aislar dos nuevos productos con un nuevo esqueleto derivado del lanostano, este se origina por degradación de la cadena y eliminación de un metileno del anillo A.

10- Los dos nuevos productos se identifican como el ácido -20-oxo-4 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dimetil-A-nor-5 $\alpha$ -pregnen-8-en-4-óico y el 4 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dimetil-A-nor-5 $\alpha$ -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi, que denominamos ácido phellínico y dimetil ester del ácido javierico.

11- Se sintetizan a partir del  $4\beta,14\alpha$ -dimetil-A-nor- $5\alpha$ -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi dos nuevos productos: el 7,11-dioxo- $4\beta,14\alpha$ -dimetil-A-nor- $5\alpha$ -pregnen-8-en-4,20-dicarbometoxi y el 7,11-dioxo- $4\beta,14\alpha$ -dimetil-A-nor- $5\alpha$ -pregnen-4,20-dicarbometoxi.

12- Se realiza un estudio de espectrometria de masas sobre catorce esteroides de origen natural y sintético.

PUBLICACIONES A QUE HA DADO ORIGEN  
ESTA TESIS

- 1- STEROIDS AND FATTY ACIDS FROM THE BASIDIOMYCETE GANODERMA AUSTRALE aceptado para publicación en los Anales de Química (1983).
- 2- BIRCH REDUCTION OF 1,4-ENDOPEROXIDES aceptado para publicación en la revista Latino Americana de química (1983).
- 3- QUIMICA DE HONGOS PARTE III: COMPONENTES QUIMICOS DEL BASIDIOMYCETE PHELLINUS POMACEUS aceptado para publicación en los Anales de química (1984).
- 4- ESPECTROSCOPIA DE MASAS DE ESTEROIDES DE ORIGEN NATURAL Y SINTETICO aceptado para publicación en la revista Latino Americana de química (1984)
- 5- NUEVOS ESQUELETOS TRITERPENICOS OBTENIDOS DEL HONGO PELLINUS POMACEUS trabajo pendiente de publicación.