

Aislamiento de α -amirina y de ácido ursólico de la yerba mate

Por JORGE R. MENDIVE

Durante la realización de diversos trabajos efectuados con yerba mate obtuvimos una serie de extractos en varios disolventes orgánicos de los cuales los más abundantes fueron el clorofórmico y el etéreo. Por evaporación del extracto clorofórmico en baño de vapor hemos obtenido un residuo sólido amorfo quebradizo, de color verde oscuro, de olor que recuerda al del mate y en una cantidad de aproximadamente del 10 % del peso de la yerba empleada en la extracción. Del extracto etéreo, por simple estacionamiento a 0°, se separa un precipitado amorfo que después de filtrado y lavado se presenta como un polvo de color verde claro, en una proporción del 1-1,3 % de la yerba utilizada.

Como la cantidad de dichos extractos era relativamente abundante (100 y 20 gramos respectivamente), creímos interesante iniciar el estudio de los mismos.

Del insaponificable del extracto clorofórmico se obtuvo una sustancia blanca cristalina, soluble en disolventes orgánicos e insoluble en agua, que funde a 183-5°. Si se efectúa la reacción de Liebermann-Burchard siguiendo la técnica utilizada por Ruzicka (1) se produce un color rojo violáceo intenso. La sustancia da fácilmente un acetato de p. f. 221-2°. Su benzoato funde a 193-5°.

Por oxidación en frío de la sustancia con CrO_3 se obtiene un producto que funde a 125°. Tanto la sustancia como su acetato no adicionan bromo y las tentativas para hidrogenar el acetato con catalizador de Adams a una presión de 40 libras y a temperatura ambiente fracasaron. El poder rotatorio en benzol es $[\alpha]_D^{20} + = 90,9^\circ$ y el de su acetato en el mismo disolvente $[\alpha]_D^{20} = + 76,1^\circ$.

Recibido en Octubre de 1939.

Por todas estas constantes hemos identificado esta substancia con la α -amirina, pues coinciden con los valores encontrados en la literatura (cuadro 1) correspondiendo además la coloración de la reacción de Liebermann con la descripta por Ruzicka (1).

	P. F.	$[\alpha]_D^{20}$	Acetato P. F.	Acetato $[\alpha]_D^{20}$	Benzoato	Amirina
α -amirina	176 a 186	+ 89	225	+ 77	193-4	125
Substancia	183-5	+ 90,9	221-9°	+ 76,1	193-5	125

Como se sabe las amirinas son alcoholes triterpénicos, de fórmula $C_{30}H_{50}O$ que poseen una doble ligadura difícil de hidrogenar y que no adiciona bromo. Su carácter no saturado se pone de manifiesto con el tetranitrometano y por el espectro de absorción de derivados. Se conocen dos amirinas isómeras, la α y la β , diferenciándose entre sí por sus constantes físicas y las de sus derivados.

Han sido halladas en las siguientes familias de plantas: *Balanophoraceae*, *Eritroxilaceae*, *Rutaceae*, *Burseraceae*, *Euforbiaceae*, *Guttiferaceae*, *Sapotaceae*, *Apocinaceae*, *Asclepiadaceae* y *Moraceae* (Klein) (2), así como también en el *Sarcostema australe* (Earl y Doherty) (3). En la mayor parte de estas plantas se encuentra una mezcla de los dos isómeros y en el resto del isómero β solo; también se ha aislado la β -amirina del aceite de germen de trigo (Todd, Bergel, Waldmann, Work) (4) y (Akigoshi Ichiba) (5). Hacemos notar que en ninguna planta perteneciente a la familia de las *Aquifoliaceae*, a la cual pertenece el *Ilex paraguariensis*, ha sido señalada la presencia de amirinas.

En cuanto a la substancia aislada directamente de los extractos clorofórmico y etéreo, se presenta como agujas blancas solubles en disolventes orgánicos. Funde a 283,5°-285,5°; se comporta como un ácido, pues es soluble en una solución de KOH en etanol diluido; en estas condiciones no es extraído por el éter, pero sí lo es después de acidificar la solución. Posee también función alcohólica, pues da un acetato, que funde a 283-5°. El poder rotatorio de la substancia en piridina es $[\alpha]_D^{20} = + 65,9$ y el del acetato en cloroformo $[\alpha]_D^{20} = + 61$. La reacción de Liebermann-Burchard efectuada en las condiciones señaladas en (1) da color rojo violáceo que pasa lentamente al azul y finalmente al verde.

Por todas estas propiedades la substancia fué identificada como ácido ursólico (ver cuadro 2).

	P. F.	$[\alpha]_D^{20}$	Diacetato p. f.	Mono-acet p. f.	$[\alpha]_D^{20}$
Acido ursólico . .	284-5°	+ 67,5 (1)	200-1° y luego 320-2	279-80 289-90	+ 62,4
Substancia . . .	283,5-5,5	+ 65,9 (2)	200-1° y luego 300	283-85	+ 61

(1) En KOH N alcohólica.

(2) En piridina.

El ácido ursólico pertenece también a los triterpenos y su fórmula es $C_{30}H_{48}O_3$. Es un ácido que posee una función alcohólica secundaria y posee el mismo esqueleto carbonado que la α -amirina, como lo demostró Goodson al transformarlo en dicho alcohol por reducción del grupo carboxilo a metilo. Este ácido ha sido encontrado en varios vegetales: en las hojas del *Arctostaphylos uva ursi* (Trommsdorff, quien lo llamó urson) (citado a través de Dodge (7)), de la *Escalonia totuosa* por Goodson (6), de *Epigaea asiatica* por Fujii Shimada Sasaki (8), de *Arbustus unedo* por Sanna (9), de hojas de vid por Kuwada y Matsukawa (citados por Sando (10)), de (*alluma vulgaris*, *Erica tetralix*, *Vaccinium macrocarpus*, *Empetrum nigrus*, y en el *Ilex aquifolium* por Nooijen (Sando (11)).

También se encuentra en la cutícula de ciertos frutos: en la de *Prunus serotina* (Power y Moore (12), quienes lo llamaron prunol); en la de *Pyrus malus* (Sando (13), quien lo llamó Malol); en la de *pyrus communis* (Markley Hendrichs y Sando (14), y en la de *Prunus avium* (Markley y Sando (15)).

Van der Haar (16) identificó el prunol y el malol con la urson y propuso la denominación de ácido ursólico por sus propiedades. La característica interesante que presenta el ácido ursólico al ser acetilado fué explicada por Van der Haar (17). Este autor encontró que al preparar el derivado acetilado se forma el diacetato el que cristaliza con una molécula de anhídrido acético. Este cuerpo funde a 200-1° y a esa temperatura pierde el anhídrido de cristalización solidificándose el acetato que funde nuevamente a 320-2°. Cuando se hierve el diacetato con alcohol se obtiene el monoacetato que funde a 279-80°.

En la literatura muy extensa existente sobre la yerba mate, la cual ha sido recopilada en forma prácticamente completa por el Dr. Houssay (comunicación privada), hemos encontrado algunos trabajos en revistas extranjeras no existentes en el país, que por su

título parecerían tratar de sustancias del tipo de las aisladas por nosotros. Sin embargo de la lectura del trabajo de Hauschild (15), quien ha consultado esas revistas, que no están a nuestro alcance, podemos deducir que ellos no se relacionan con sustancias como las amirinas o el ácido ursólico.

Hauschild, aísla una sustancia a partir del extracto etéreo, a la cual llama matesterina, la cual, purificada por destilación a alto vacío y recristalización en alcohol, da un punto de fusión de 276°-278°. Esta sustancia se comporta como un alcohol y da la reacción de Liebermann-Burchard de los esteroides. Por las constantes que dicho autor da para la matesterina y su acetato creemos que es idéntica a la aislada por nosotros e identificada como ácido ursólico.

	P. F.	$[\alpha]_D^{20}$	Acetato
Matesterina	276-278	+ 65	274-5
Sustancia aislada	283,5-5,5	+ 65,9	283-5°

Además los datos del análisis efectuado por Hauschild concuerdan con los calculados para el ácido ursólico.

Encontrado	C % 78,14	H % 10,7
Calculado	C » 78,88	H » 10,6

Arata (12) ha estudiado una cera que extrajo de la yerba tratándola con alcohol y aunque por los caracteres descriptos es posible que haya tratado con alguna de las sustancias aquí estudiadas, no es posible abrir juicio sobre cuál de ellas era, pues los puntos de fusión dados para la cera aislada son muy bajos comparados con los que tienen la α -amirina y el ácido ursólico.

PARTE EXPERIMENTAL

1 kg de yerba finamente molida, se extrae en varias porciones con cloroformo en un Soxhlet, hasta que el líquido de extracción sea incoloro. La solución clorofórmica de color verde oscuro se evapora a sequedad en baño de vapor. El residuo obtenido pesa alrededor de 100 g.

Obtención de α -amirina. — 10 g del residuo se disuelven en 150 cm³ de etanol y se le añaden 10 g de KOH disueltos en 50 cm³ de etanol. La mezcla se hierve a reflujo durante tres horas, se enfría, se adi-

ciona agua y se extrae con éter de petróleo tres veces. El éter de petróleo se evapora y se obtienen agujas blancas sedosas impregnadas de un aceite amarillo que no cristaliza. Se disuelve en acetona decolorándose con carbón. Después de filtrar se concentra lentamente y se obtienen cristales que funden a 175-8°. Recristalizados tres veces de acetona se separan 0,43 g de α -amirina que funden a 183-5°.

Poder rotatorio. — 0,1916 g disueltos en benzol hasta 20 cm³,
l = 189,4 mm

$$[\alpha] = + 1,65 \quad [\alpha]_D^{20} = + 90,9$$

Análisis elemental. — 24,65 mg secados a 110° sobre P₂O₅, durante 5 horas pierden 0,02 mg.

$$\text{CO}_2 = 76,13 \quad \text{H}_2\text{O} = 26,25.$$

Encontrado.	C % 84,33	H % 11,91
Calculado	C » 84,50	H » 11,73

Preparación del acetato. — 250 mg de α -amirina se hierven a reflujo con 2,5 cm³ de anhídrido acético. Por enfriamiento se obtienen 250 mg de cristales que funden a 202-6°. Recristalizados cuatro veces de ácido acético los cristales funden a 221-2°.

Poder rotatorio. — 0,2632 g se disuelven en benzol hasta 20 cm³
l = 189,4 mm.

$$\alpha = + 1,90 \quad [\alpha]_D^{20} = + 76,1$$

Preparación del benzoato. — 100 mg de α -amirina se disuelven en 2,5 cm³ de piridina y se añade 0,6 cm³ de cloruro de benzoilo. Se hierve a reflujo durante media hora. Se vierte sobre agua, se toma con éter lavándose con HCl primero, luego con carbonato de sodio y finalmente con agua. Evaporado el éter se recristaliza tres veces de alcohol. P. F. 193-5°.

Preparación de α -amirina. — 100 mg de α -amirina se disuelven en 2,5 cm³ de ácido acético y se le añaden 0,04 g de CrO₃ disueltos en el mismo disolvente. Se calienta durante media hora a 30°. Se añade agua y se extrae con éter. Se evapora a sequedad y se recristaliza dos veces de alcohol metílico. P. F. 123-5°.

Obtención de ácido ursólico. — 1,5 Kg de yerba finamente molida se extrae con éter. El extracto etéreo, de color verde oscuro, se deja reposar varios días a 0°. Se filtra y el precipitado se lava con éter frío varias veces. El residuo amorfo, seco, pesa 18 g. Dos gramos de este polvo se disuelven en alcohol y se decolora con carbón. Si la solución se concentra demasiado no se obtienen cristales sino un gel. Esta propiedad de dar gel ya la señala Dodge (7). Por agregado de alcohol y calentando se disuelve el gel y al enfriar cristaliza el ácido ursólico en forma de agujas que funden a 279-281°. Recristalizado dos veces más de alcohol se obtiene 0,2 g de cristales que funden a 283,5-285,5.

Este ácido se puede obtener a partir del extracto clorofórmico siguiendo una técnica análoga a la descripta, aunque la decoloración con carbón se debe repetir varias veces antes de obtener una solución débilmente coloreada de amarillo verdoso.

Poder rotatorio. — 0,2726 g se llevan a 20 cm³ con piridina $l = 189,4$ mm

$$\alpha = +1,87 \quad [\alpha]_D^{20} = +65,9$$

Preparación del diacetato. — 50 mg de ácido ursólico se hierven 1 hora a reflujo con 0,9 cm³ de anhídrido acético. Se deja enfriar y cristaliza el diacetato. Este funde a 200-1° para solidificarse a 204-5° y fundir nuevamente por encima de 300°.

Preparación del monoacetato. — El diacetato se hierve media hora con alcohol, se concentra la solución y por enfriamiento cristaliza el monoacetato. P. F. 284-7°. Recristalizado de alcohol funde a 283-85°. Mezclado con ácido ursólico de igual punto de fusión, funde a 255°.

Poder rotatorio. — 0,0936 g de monoacetato se disuelven en clorofórmico y se llevan a 20 cm³

$$l = 189,4 \text{ mm} \quad \alpha = +0,54 \quad [\alpha]_D^{20} = +61.$$

CONCLUSIONES

1° Ha sido caracterizada por primera vez, en el *Ilex paraguariensis*, la presencia de α -amirina y de ácido ursólico.

2° Se ha demostrado que la substancia llamada matesterina por Hauschild es ácido ursólico.

La determinación de carbono e hidrógeno fué realizada por el Dr. R. Labriola, a quien me complazco en expresar mi agradecimiento.

BIBLIOGRAFIA

1. RUZICKA, GOLDBERG. y WIR. *Helv. Chim. Acta*, **18**-61-1935.
2. KLEIN. *Handbuch der Pflanzenanalyse*.
3. EARL y DOHERTY. *J. Coun. Scienc. Ind. Research*, **10**-26-1937 (*Chem. Abst.* **31**-2964-1937).
4. TODD, BERGEL, WALDMANN y WORK. *Biochem. J.*, **31**-2247-1937.
5. AKIGOSHI, ICHIBA. *Sci. Pap. Inst. Phy. Chem. Research*, **34**-121-1937.
6. GOODSON. *J. Chem. Soc.*, 999-1938.
7. DODGE. *J. Am. Chem. Soc.*, **40**-1917-1918.
8. FUJII SHIMADA SASAKI. *J. Phar. Soc. Japan*, 55-650 (*Chem. Abst.*, **33**-9183-1938).
9. SANNA. Atti IV Cong. Chim. Pur. App. 1932 (*Chem. Abst.*, **29**-4041-1935).
10. SANDO. *J. Biol. Chem.*, **123**-641-1938.
11. SANDO. *J. Biol. Chem.*, **90**-477-1931.
12. POWER y MOORE. *J. Chem. Soc.*, **97**-1099-1910.
13. SANDO. *J. Biol. Chem.*, **56**-457-1923.
14. MARKEY HENDRICHs y SANDO. *J. Biol. Chem.*, **111**-133-1935.
15. MARKEY y SANDO. *J. Biol. Chem.*, **119**-641-1937.
16. VAN DER HAAR. *Rec. Trav. Chim.*, **43**-542-1924 y **43**-548-1924.
17. VAN DER HAAR. *Rec. Trav. Chim.*, **47**-585-1928.
18. HAUSCHILD. *Promotion-Arbeite*, Berna-Leipzig, 1935 y MITT. LEBENSM. HYG. **26**-329-1935 (*Chem. Abst.*, **30**-3537-1936).
19. ARATA. *An. Soc. Cient. Arg.*, **3**-132-1877.