INVESTIGACION DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LA GONILEPTIDINA

María Isabel Ardao

Clemente Estable, del Instituto de Investigaciones de Ciencias Biológicas, Ministerio de Salud Pública, Montevideo, Uruguay, descubrió que el flúido acuoso, amarillo, secretado por el arácnido sudamericano **Gonileptide**, tenía notables propiedades antibióticas in vitro.[1, 2, 3] Ello condujo a que en el Dpto. de Bioquímica del mismo Instituto realizáramos el aislamiento, determinación cuantitativa e iniciación del estudio de la naturaleza química del pigmento activo llamado gonileptidina.

La secreción externa fue recogida con pipeta capilar y mantenida a baja temperatura para evitar pérdidas debidas a la inestabilidad y volatibilidad de la substancia.

El aislamiento del producto activo volátil se llevó a cabo por destilación del estado congelado en un tubo de Thumberg. La gonileptidina destila primero en cristales aciculares amarillo brillante y es seguida de una solución acuosa del pigmento. Los cristales fueron recogidos y desecados sobre pentóxido de fósforo a baja temperatura.

---

1. Soc. Biol. de Montevideo. Sesión 5 de mayo de 1954. I. Clemente Estable: "Efecto de la gonileptidina en la célula aislada". II. N. Pradines Brasil: "Efecto de la gonileptidina en bacterias Gram positivo y Gram negativo".

2. "Gonyleptidine. Joint communication". C. Estable, M. I. Ardao, N. Pradines, Instituto de Investigaciones de Ciencias Biológicas, Montevideo, Uruguay; Louis F. Fieser, Chemical Laboratories, Harvard University, Cambridge, Mass. Meeting of the American Chemical Society, Medicinal Division, Minneapolis, september, 1955. Journal of the American Chemical Society 77, 4942, 1955.

3. "Propiedades biológicas de alquilquinonas". Solicitud de patente ante la U.S.P.O. Nº 525.822, julio de 1955.

La gonileptidina funde alrededor de 12° C. Por encima de esta temperatura se volatiliza fácilmente. Es soluble en el agua en unos 3 mg. por ml. a la temperatura de 1° C. Es muy soluble en las grasas y en los disolventes orgánicos en general. Sus soluciones son amarillas y neutras.

El análisis elemental cualitativo reveló que la gonileptidina está formada únicamente por C, H y O.

El análisis espectral ultravioleta de la gonileptidina muestra absorción selectiva a 254 mμ con el coeficiente de extinción $E^{1\%}$ 1400 (agua).

El estudio funcional indicó sólo la presencia del grupo carbonilo y la naturaleza quinónica de la gonileptidina fue claramente establecida por numerosas reacciones químicas de estos compuestos. El color amarillo y reacciones específicas (Craven, Novelli, etc.) mostraron que se trataba de para-quinona.

La determinación cuantitativa se realizó por absorciometría trazando una curva de valoración a 255 mμ en el espectrofotómetro de Beckman.

La elucidación de la estructura y la síntesis de la gonileptidina, estando fuera de las actividades del Instituto de Investigaciones de Ciencias Biológicas, se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Universidad de Harvard bajo la dirección del Prof. Louis F. Fieser y con la ayuda económica de la "Rockefeller Foundation".

El destilado acuoso de gonileptidina fue tratado con hidrosulfito de sodio y la hidroquinona extraída por éter y cristalizada por adición de éter de petróleo. Los cristales blancos tienen punto de fusión alrededor de 165°. La hidroquinona fue sometida a acetilación y el diacetato purificado por cromatografía. El material resultó no homogéneo y, dada su pequeña cantidad, sólo pudo aislarse el componente principal de la mezcla de punto de fusión 105-106°. El análisis elemental, determinación de acetilo y del peso molecular, establecieron que la substancia tenía la fórmula $C_{12}H_{14}O_4$ y que era el hidroquinona diacetato de la quinona de fórmula $C_8H_8O_2$. Tratándose de una para-quinona, debía ser una de las siguientes substancias: 2-etil-1,4-quinona, 2,3-, 2,5- ó 2,6-dimetil-1,4-quinona. En la tabla I se dan las propiedades de estas quinonas y sus derivados.

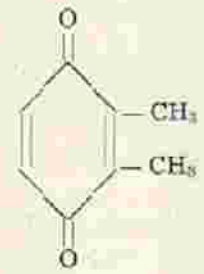
TABLA I

PUNTOS DE FUSION DE 1,4-BENZOQUINONAS, °C.

Substituyentes	Quinona	Hidroquinona	Hidroquinona diacetato
2-Etil [1]	38	113	—
2,3-Dimetil [2]	56	221	—
2,5-Dimetil [3]	124	208	135
2,6-Dimetil [4]	73	150	92

1. H. P. Bayrac: Bull. soc. chim. (3), 11, 1130 (1894). 2. E. Nölting and S. Forel: Ber., 18, 2673 (1885). 3. E. Carstanjen: J. prakt. Chem. (2), 23, 451 (1881); A. Jacob, M. Steiger, A. R. Todd and T. S. Work: J. Chem. Soc., 542 (1939); E. Nölting and T. Baumann: Ber., 18, 1151 (1885). 4. M. H. Stern, C. D. Robeson, I. Weisler and J. G. Baxter: J. Am. Chem. Soc., 69, 869 (1947).

La hidroquinona cruda aislada funde a una temperatura más alta que la 2-etil- o la 2,6-dimetilhidroquinona y el diacetato purificado tiene un punto de fusión que difiere del isómero 2,5- en 29°. El diacetato de 2,3-dimetilhidroquinona, no descripto en la literatura, fue preparado y resultó tener el mismo punto de fusión que el diacetato aislado y ser ambos idénticos. El principal componente de la gonileptidina quedó así identificado como I.



(I)

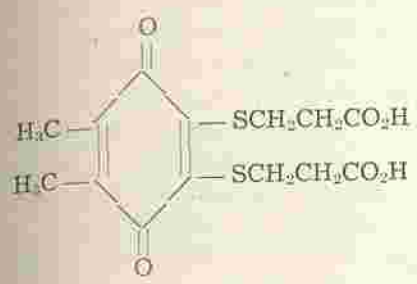
2,3-Dimetil-1,4-quinona sintética fue enviada a Montevideo para ser ensayada biológicamente y resultó tener propiedades antibióticas comparables a las de la gonileptidina.

El análisis espectral infrarrojo fue de gran utilidad para la identificación de los otros componentes que se hallan en pequeña proporción. El espectro de absorción infrarrojo de la gonileptidina fue comparado con el de la 1,4-benzoquinona, sus 6 derivados metilados y el de la 2-etil-1,4-quinona. En el espectro del pigmento, figura 1, tres bandas, **c**, **e**, **i**, son características de la 2,3-dimetil-1,4-quinona sólo, mientras que las bandas **f** y **h** son características exclusivamente del isómero 2,5- y de la trimetilquinona respectivamente. Resumiendo el promedio de los resultados de estudios preliminares con microorganismos representativos, el Prof. Estable informó que 2,5-dimetil-1,4-quinona es dos veces más activa que la gonileptidina contra bacterias Gram positivo y cuatro veces más activa contra las Gram negativo. La trimetilquinona es sólo algo menos potente que ésta y más activa que la 2,3-dimetil-1,4-quinona.

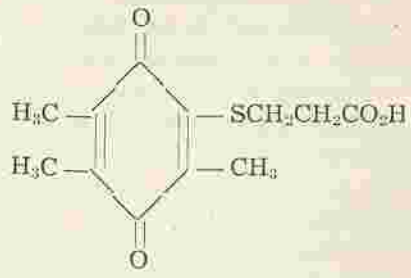
Ambos, actividad biológica y análisis espectrográfico, indicaron que los componentes en proporciones menores en la gonileptidina son 2,5-dimetil-1,4-quinona y 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona. Se procedió entonces, a desarrollar un procedimiento de separación de la mezcla específica indicada. Dada la pequeña cantidad de gonileptidina disponible, el procedimiento debía basarse en reacciones de alto rendimiento que permitieran la separación e identificación de los componentes presentes en baja concentración. La separación por adsorción cromatográfica resultó inadecuada. Se ensayó la distribución por contracorriente entre éter de petróleo y buffer acuoso, en el aparato de Craig de 32 tubos, determinando luego la concentración en las dos fases por absorción en el ultravioleta. El procedimiento fracasó debido a la rápida desaparición del pigmento, probablemente, por descomposición de la 2,3-dimetil-1,4-quinona que es muy sensible a la luz, los ácidos y el calor.

Un primer método químico de separación se basó en la adición de ácido tioglicólico o tiopropiónico y oxidación de la resultante hidroquinona substituída a quinona. De trabajos previos en ambas series, benzo- (1) y naftoquinona (2), se dedujo que todas las posiciones libres serían substituídas.

El ácido β-tiopropiónico fue preferido al tioglicólico por no originar lactonización de la hidroquinona y por producir un mejor aumento del peso molecular. El reactivo sulfhidrilado se adicionó a las tres di-



(II)

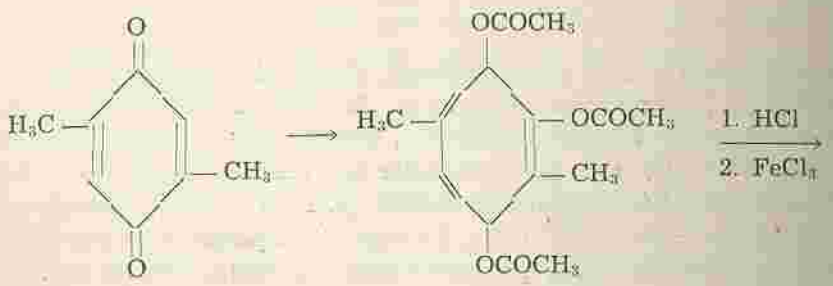


(III)

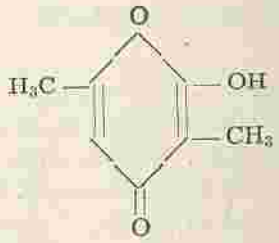
metilquinonas y a la trimetilquinona, siendo el producto de adición oxidable a la correspondiente quinona. La labil 2,3-dimetil-1,4-quinona da un derivado tetrasubstituído (II), estable, rojo, de alto punto de fusión (172°) y con un peso molecular dos veces y media mayor. La 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona, muy volátil (p. f. 29°) da un derivado no volátil, que funde a 104° (III). La separación posterior de los tioderivados puede efectuarse por distribución en contracorriente (3). El método, sin embargo, no fue aplicable porque los procesos de sulfhidrilación y oxidación fueron de pobre rendimiento. Estos y otros derivados similares fueron ensayados en Montevideo biológicamente y demostraron poseer interesantes propiedades antibióticas, en especial el compuesto (III).

Se recurrió entonces, a la reacción de Thiele (4, 5) en un ensayo empírico desde que la adición catalítica de anhidrido acético a las quinonas es todavía, indefinida. Usando ácido sulfúrico como catalizador, Thiele (4) obtuvo de la p-benzoquinona el triacetato de hidroquinona puro con rendimiento del 80 %. En el caso de α-naftoquinona, el eterato de fluoruro de boro da un rendimiento mejor (81 %) (6), pero el ácido de Lewis es menos satisfactorio que el ácido sulfúrico en la reacción con p-benzoquinona. Thiele y Winter establecieron que el principal producto de la reacción de p-toluquinona es el isómero con el subsiguiente acetoxi en posición para- al grupo metilo; el rendimiento obtenido por nostros fue de 47 %. Según Erdtman (7) la orientación es la misma en la reacción de Thiele de 2-metoxi-1,4-quinona y el rendimiento es casi cuantitativo. Erdtman notó que la 2,6-dimetil-1,4-

quinona experimenta la reacción de Thiele catalizada por ácido sulfúrico pero que la 2,6-dimetoxi y la 2,5-dimetoxi-1,4-quinona no reaccionan. Con respecto a los supuestos componentes de la gonileptidina, la 2,3-dimetil-1,4-quinona, como puede preverse, da la reacción. La 2,5-dimetil-1,4-quinona, contrariamente a la 2,3-dimetoxi-1,4-quniona, experimenta una débil reacción con BF_3 como catalizador. El triacetato V, cristalino, de doble peso molecular que la quinona, da un rendimiento de 91 % y es un compuesto útil para la caracterización. Es convertido por hidrólisis y oxidación en la hidroxiquinona (VI) la cual se creyó de utilidad en la separación.



(IV) (V)



(VI)

En buffer alcalino absorbe a 530 mμ $E_{mol.} = 1970$ y se distingue de la isomérica 5-hidroxi-2,3-dimetil-1,4-quinona que absorbe a 490 mμ $E_{mol.} = 1590$. Las constantes logarítmicas de extracción, pE^s halladas para la 5-hidroxi-2,3-dimetil-1,4-quinona (pE = 3.70) y para la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (pE 3.17) son ambos menores que los valores calcu-

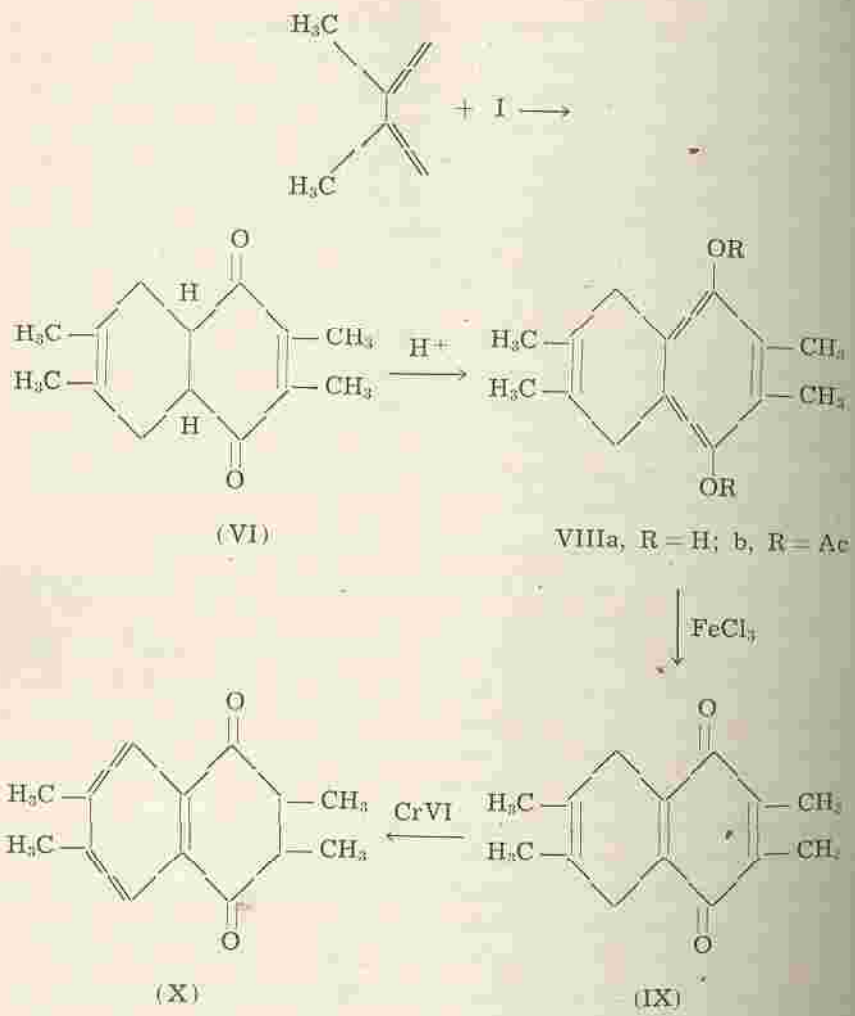
lados de la ecuación empírica para n e i-alkilhidroxinaftoquinonas. La quinona VI, con un substituyente metil adyacente al grupo hidroxilo es resistente a la esterificación de Fischer dejándola durante la noche con metanol-eterato de fluoruro de boro, mientras que, en las mismas condiciones, las hidroxibenzoquinonas sin grupos substituyentes adyacentes al hidroxilo son fácilmente eterificadas. Sin embargo, las hidroxibenzoquinonas son, generalmente, tan sensibles y fácilmente descomponibles, que una separación basándose en su formación sería muy dudosa.

Mientras, como ya lo hemos hecho notar, la 2,6-dimetil-1,4-quinona da la reacción de Thiele en presencia de ácido sulfúrico, no experimenta acetoxilación con eterato de fluoruro de boro como catalizador. Esto demuestra que el fluoruro de boro es un catalizador menos potente que el ácido sulfúrico y que la 2,6-dimetil-1,4-quinona es menos activa que su isómero 2,5-.

La trimetilbenzoquinona no da la reacción de Thiele.

La separación de la 2,5-dimetil-1,4-quinona de la 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona puede efectuarse basándose en que la primera da la reacción de Thiele mientras que la segunda permanece como tal en la mezcla. Si esta se vierte en agua y la solución se destila, la trimetilquinona pasa cuantitativamente en el destilado. El compuesto triacetoxilado V, no volátil, puede recobrarse de la solución acuosa incolora que queda en el matraz de destilación.

Para nuestro propósito es conveniente separar primero de la mezcla la 2,3-dimetil-1,4-quinona mediante una reacción estabilizante específica. La reacción de Diels-Alder aparece ideal desde que los dienes se adicionan a temperatura ambiente a las quinonas conteniendo un sistema enediona no substituido. Cuando el sistema está bloqueado por un grupo metilo la adición tiene lugar sólo bajo condiciones especiales (9). En condiciones semejantes a las establecidas en la preparación de p-benzoquinona-butadieno (en ácido acético a temperatura del laboratorio) la 2,3-dimetil-1,4-quinona da con el 2,3-butadieno el producto de adición VII con un rendimiento aproximadamente cuantitativo. Este compuesto cristalino puede caracterizarse como tal o como la hidroquinona VIIIa a la cual se isomeriza por ácidos, su diacetato VIIIb, o la más estable naftoquinona X (p. F. 167°). El peso molecular de VIIIb es 2.2 veces el del material de partida I.



(VI) VIIIa, R = H; b, R = Ac

(X) (IX)

El procedimiento de separación se aplicó a una solución de 100 miligramos de 2,3-dimetil-quinona y 25 mg. de cada una, de las 2,5-dimetil- y 2, 3, 5-trimetilquinonas en 150 ml. de agua. Esta mezcla, según los datos analíticos hasta el momento, debía tener una composición próxima a la de la gonileptidina y nos proporcionaba un modelo artificial sobre el cual ensayar el método de separación químico. La solución se saturó con cloruro de sodio y el pigmento extraído por

éter, se dejó reaccionar veinte horas con 2,3-dimetil-butadieno. El material fue recogido en éter y la solución, lavada hasta neutralidad, se agitó con hidrosulfito lo cual no afecta al producto de adición VII. Las 2,5-dimetil- y 2, 3, 5-trimetil-hidroquinonas originadas fueron extraídas con álcali y la fracción etérea, neutra, fue sometida al proceso de obtención del compuesto de adición VII con un recobro de 150 mg. (94 %). La solución alcalina fue introducida en un embudo de separación conteniendo éter y ácido mineral; se le agregó cloruro férrico y las quinonas se extrajeron y sometieron a la reacción de Thiele. El producto de la reacción fue destilado en corriente de vapor permitiendo la separación de la 2, 3, 5-trimetilquinona. Esta fue finalmente aislada como hidroquinona con un recobro del 78 %. El triacetato V de 2,5-dimetilquinona se obtuvo con un rendimiento de 64 %. El procedimiento, que es cualitativo y aproximadamente cuantitativo, fue entonces aplicado a 43 ml. de gonileptidina destilada conteniendo 115 miligramos de pigmento amarillo. El producto de adición de 2,3-dimetilquinona, de la misma pureza que el de los ensayos con mezclas conocidas, fue identificado por el punto de fusión como tal y como la naftoquinona X. El derivado 2,5-dimetil-triacetoxi- del isómero 2,5-dimetil- fue aislado e identificado por el punto de fusión de la mezcla y por comparación del espectro infrarrojo. La 2, 3, 5-trimetilquinona fue identificada por el coeficiente de extinción a 260 mμ por la completa correspondencia del espectro infrarrojo y punto de fusión de la mezcla de la hidroquinona. Suponiendo que las pérdidas fueran las del experimento ensayo, los rendimientos obtenidos en los 115 mg. de gonileptidina fueron: 71 mg. de 2,3-dimetil-, 11 mg. de 2,5-dimetil- y 15 mg. de 2, 3, 5-trimetilquinona. No más de trazas de componente no quinónico pudo estar presente.

Si la mezcla hubiera contenido la 2-metil-1,4-benzoquinona junto a la 2,3-dimetil- (10), la mezcla de los productos de adición diene pudo haber sido convertida en la mezcla de naftoquinonas, de las cuales, solamente la derivada de la 2-metilquinona sería capaz de reaccionar con el ácido tioacético o tiopropiónico dando un producto extraíble por bicarbonato.

PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento del diacetato de 2,3-dimetilhidroquinona.— Aproximadamente 38 ml. de destilado de secreción de gonieptes se trataron con 1 g. de hidrosulfito de sodio provocando la desaparición del color ama-

rillo. La solución se extrajo por éter libre de peróxido y el extracto, secado y evaporado a pequeño volumen, se adicionó de éter de petróleo. Una hidroquinona se separó en agujas blancas, de punto de fusión alrededor de 185° y con un rendimiento de 80 mg. 67 mg. de este material fueron acetilados con anhidrido acético y piridina dando 81 mg. de diacetato de hidroquinona que fue purificado por cromatografía y cristalización. El principal componente que se aisló fundió a 105-106° y no deprimió el punto de fusión del diacetato de 2,3-dimetil hidroquinona sintético (105-106°). El espectro infrarrojo, mostró también exacta correspondencia.

Análisis.— Calculado para $C_{12}H_{14}O_4$ (222.23): C, 64.85; H, 6.35, Acetil, 37.83. Hallado: C, 64,69; H, 6.46; Acetil, 38.02, peso mol., 237.

2,3-dimetil-1,4-quinona (I).— Dos tomas de 76.6 g. de 2,3-dimetilfenol se acoplaron con ácido sulfanílico diazotado y el colorante reducido con hidrosulfito según un método standard (11). Las dos remesas de 2,3-dimetil-4-aminofenol se reunieron y disolvieron en una solución de 265 ml. de ácido clorhídrico concentrado y 2 g. de dihidrato de cloruro estannoso en 500 ml. de agua. La solución se filtró a través de norita y se diluyó a 1250 ml. con agua. Si el rendimiento fuera cuantitativo, 100 ml. de esta solución contendrían 0.1 mol. del clorhidrato de aminofenol.

La oxidación a quinona fue conducida a media luz. Una solución de 65 g. de hexahidrato de cloruro férrico en 100 ml. de agua se colocó en un matraz de destilación de 500 ml. con carborundo como regulador de la ebullición. En un embudo de separación, con tubo suficientemente largo para sobrepasar el tubo lateral del matraz de destilación, se introdujeron 100 ml. de la solución de clorhidrato de aminofenol caliente. Sobre la solución férrica a ebullición ligera, se agregó el aminofenol en un tiempo de 15-20 minutos. La quinona formada debe destilar a la velocidad en que se agrega la solución para evitar su descomposición. El destilado se saturó con cloruro de sodio (0.2 g. por ml.) y se extrajo por éter. La capa acuosa fue descartada y la solución etérea amarilla filtrada a través de un cono de sulfato de sodio anhidro. La solución fue evaporada en bañomaría evitando sobrecalentamiento y las últimas trazas de éter eliminadas al vacío de la trompa de agua, en frío. El aceite residual amarillo, se solidificó fácilmente y resultó 2,3-dimetil-1,4-quinona pura. El rendimiento fue de 9.6 g. (71 %). El rendimiento a partir del clorhidrato de aminofenol puro fue de 80 %. La substancia es fácilmente soluble en éter de petróleo (p. eb. 30-60°) pero se obtienen sucesivas cristalizaciones en este disolvente a 5°, en cristales amarillos que funden a 55°. Los líquidos madre de color rojizo fueron evaporados y el producto disuelto en éter. La solución etérea se agregó gota a gota en un embudo de separación a una solución acuosa hirviente de ftalato ácido de potasio al 5 % contenida en un matraz de destilación. El destilado fue saturado con cloruro de sodio y la capa etérea suministró nuevas cantidades de 2,3-dimetil-1,4-quinona pura.

Esta quinona es inestable en diversas condiciones. La solución acuosa, amarillo brillante se vuelve púrpura después de adición de solución de bicarbonato y es también inestable frente al acetato de sodio o fosfato buffer de pH 7.0. Si la solución amarilla se calienta a reflujo aparecen gotas de aceite amarillo en el condensador, pero si la solución se trata con una traza de ácido clorhídrico, adquiere pronto un color pardo, la formación de las gotas aceitosas cesa y se separan productos oscuros de descomposición. Doscientos mg. de la quinona se disolvieron en pocos ml. de éter y la solución se distribuyó sobre las paredes de un matraz de 100 ml. dejándola evaporar. El matraz invertido se expuso a una intensa luz solar. En pocos minutos el pigmento amarillo comenzó a volverse blanco y al cabo de una hora, prácticamente, toda la quinona se transformó en el polímero blanco, insoluble en éter.

Diacetato de 2,3-dimetilhidroquinona.— Se obtuvo cristalizado en metanol-agua en largas agujas, p. f. 105-106°.

Análisis.— Calculado para $C_{12}N_{14}O_4$ (222.23): C, 64,85; H, 6.35. Encontrado: C, 65.10; H, 6.58.

2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona.— Una suspensión de 152 g. de trimetilhidroquinona (12) (p. f. 169-170°) en 1 l. de ácido acético, fue agitada mecánicamente en un matraz de 2 l. hasta disolución en caliente. La solución se enfrió luego en baño de hielo hasta que la temperatura descendió a 40°. Se agregó luego una solución fría de 108 g. de dihidrato de bicromato de sodio en 250° ml. de ácido acético en el curso de 25 minutos y con constante control de la temperatura entre 35 y 40°. Después de agitar por 5 minutos más, la solución fue diluída con agua y enfriada. La mezcla fue extraída tres veces con éter y el extracto amarillo brillante fue lavado con solución saturada de cloruro de sodio hasta neutralidad, filtrado a través de sulfato de sodio y el disolvente evaporado. El aceite puro, residual se solidificó fácilmente y

fundió a 29-30°, en concordancia con el punto de fusión dado por Smith (13). El punto de fusión no cambió por cristalización en éter de petróleo. El rendimiento fue de 128.3 g. (86 %).

Acido 2,3-dimetil-1,4-quinona-5,6-di-β-tiopropiónico (II).— 2.1 g. de ácido β-mercaptopropiónico fueron agregados con agitación a una suspensión de 1.4 g. de 2,3-dimetil-1,4-quinona en 50 ml. de agua. El sólido se disuelve rápidamente, el color desaparece y una hidroquinona blanca comienza a separarse formando en una hora una pasta espesa con sólo algunas manchas oscuras. El sólido se recogió, lavó con agua en un vaso y se adicionó de 1.5 g. de bicarbonato de sodio. Agitando y calentando el sólido se disolvió casi completamente y la solución incolora fue filtrada, acidificada y enfriada para reprecipitar la hidroquinona. El sólido blanco fue recogido y disuelto húmedo en 10 ml. de una solución normal de ambos, cloruro férrico y ácido clorhídrico. Cuando la solución roja se enfrió y diluyó con 50 ml. de agua, la quinona se separó en cristales rojos de punto de fusión 167°; el rendimiento fue 0.96 g. (28 %). La substancia es muy soluble en metanol frío, poco soluble en éter, muy poco soluble en benceno y cloroformo. El material cristalizado en agua se presenta en pequeñas agujas rojas de punto de fusión 171-172°, invariable por recristalización.

Análisis.— Calculado para $C_{14}H_{16}O_6S_2$ (344.40): C, 48.84; H, 4.67. Hallado: C, 48.84; H, 4.80.

Cuando la adición del tiol se hizo en etanol acuoso la quinona no pudo obtenerse cristalina.

Acido 2,5-dimetil-1,4-quinona-3,6-di-β tiopropiónico.— Una solución de 1.4 g. de la correspondiente quinona en 15 ml. de etanol de 95 % caliente, fue enfriada hasta producir una suspensión y se le agregó una solución de 2.1 g. de ácido β-mercaptopropiónico. La quinona se disolvió rápidamente, dando color pardo a la solución, la cual después de una hora, cuando se tornó incolora, fue tratada con 20 ml. de etanol y 40 ml. de solución normal de cloruro férrico y ácido clorhídrico. La solución se diluyó, extrajo por éter y el extracto lavado varias veces con solución saturada de cloruro de sodio, secada y evaporada a pequeño volumen. Enfriando y raspando con varilla, dió un material cristalino de punto de fusión 145-150°; rendimiento 0.67 g. (20 %). La quinona cristalizó muy bien del metanol-agua en placas naranja brillantes, de p. de f. 154-156° recristalizada, 155-157°.

Análisis.— Calculado para $C_{14}H_{16}O_6S_2$ (344.40): C, 48.84; H, 4.67. Encontrado: C, 49.25; H, 4.86.

Acido 2,6-dimetil-1,4-quinona-3,5-di-β-tiopropiónico.— Se obtuvo por el procedimiento descripto para II con un rendimiento de 0.82 g. (24 %), punto de fusión 127-129°. Fue cristalizado dos veces por dilución de una solución etérea con éter de petróleo y evaporado a un pequeño volumen. Se separaron agujas color naranja de punto de fusión 131-132°.

Análisis.— Calculado para $C_{14}H_{16}O_6S_2$ (344.40): C, 48.84; H, 4.67. Encontrado: C, 48.96; H, 4.67.

El rendimiento fue algo menor cuando se usó etanol-agua como disolvente en la adición del tiol y mucho más pobre cuando se usó etanol sólo.

Acido 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona-6β-tiopropiónico (III).— Se preparó a partir de 8.8 g. de la correspondiente quinona por el procedimiento descripto en II. La solución en bicarbonato de la hidroquinona requirió una pequeña cantidad de hidrosulfito para decolorarse. El precipitado de hidroquinona se recogió y secó dando un rendimiento de 81 %. La oxidación en ácido acético caliente con cloruro férrico dió un producto cristalino, puro de punto de fusión 103-104° con un rendimiento de 76 %. La quinona cristalizó en prismas amarillo naranja por dilución con ligroina de una solución etérea y concentración. Punto de fusión 103-104°.

Análisis.— Calculado para $C_{12}H_{14}O_4S$ (254.23): C, 56.69; H, 5.55. Hallado: C, 56.35, 56.34; H, 5.69, 5.74.

Acido 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona-6β-tioacético.— La reacción de adición fue conducida según Snell y Weisberger (1): una solución de 1.5 g. de la correspondiente quinona en 15 ml. de etanol de 95 % se trató con 0.9 g. de ácido tioglicólico en 10 ml. de agua dejándolo reaccionar durante la noche. La solución oscura fue tratada con 22 ml. de solución normal de cloruro férrico y ácido clorhídrico, diluida con 20 ml. de agua y extraída con éter. El extracto se lavó con solución saturada de cloruro de sodio y se extrajo con bicarbonato de sodio al 5 %. El extracto se acidificó y la quinona se extrajo por éter, el cual dejó por evaporación 1.7 g. de un sólido color naranja. La substancia es muy soluble en acetona, soluble en benceno y poco soluble en ligroína. Para cristalizarlo se disolvió en éter, se agregó ligroina (60-90°) y la solución se evaporó hasta saturación. Se separaron racimos de agujas prismáticas naranja, de punto de fusión 130-131° (el dado en (6) es 126-127°). El rendimiento fue 1.3 g. (95,7 %).

La fracción neutra (0.5 g.) recobrada de la solución etérea después de extracción con bicarbonato y dos cristalizaciones en benceno-ligroina (norita), da agujas incoloras de punto de fusión 196-197° de la hidroquinona lactona.

Análisis.— Calculado para $C_{11}H_{12}O_3S$ (224.21): C, 58.52; H, 5.40. Hallado: C, 58.79; H, 5.46.

2,3-dimetil-1,4,5-triacetoxibenceno.— Una mezcla de 1 g. de 2,3-dimetil-1,4-quinona, 10 ml. de anhidrido acético y 1 ml. de eterato de fluoruro de boro, se dejó por dos horas a 26°, se agregó agua para hidrolizar el exceso de anhidrido acético, se extrajo por éter. El extracto se lavó hasta neutralidad, secó y evaporó el disolvente. Residuo 1.3 g. (73 %). El punto de fusión no cambió por recristalizaciones.

Análisis.— Calculado para $C_{14}H_{16}O_6$ (280.27): C, 59.99; H, 5.75. Hallado: C, 59.76; H, 5.90.

5-hidroxi-2,3-dimetil-1,4-quinona.— Una solución de 1.5 g. del triacetato descripto, en 50 ml. de metanol, fue saturada con N_2 libre de oxígeno por una hora y luego tratada con una mezcla, libre de oxígeno, de 12 ml. de hidróxido de sodio al 25 % y 50 ml. de agua. Se dejó hidrolizar por 20 minutos y se agregó 12 ml. de ácido clorhídrico concentrado y 12 ml. de solución normal de cloruro férrico y ácido clorhídrico. La solución se extrajo 6 veces con éter y los extractos lavados con solución saturada de cloruro sódico y extraídos con solución de bicarbonato. El extracto rojo intenso se volvió amarillo claro por acidificación y la adición de cloruro de sodio provocó la separación de la hidroxiquinona amarilla. Esta fue extraída por éter y el extracto secado y evaporado a presión reducida dió 0.9 g. de polvo amarillo (teoría 0.8 g.). Este se disolvió en éter y la solución filtrada se diluyó con éter de petróleo y se concentró hasta saturación. La hidroxiquinona cristalizó en pequeños prismas amarillos de punto de fusión 115-116°; recristalizada: 116-117°. La solución en "buffers" alcalino es roja: λ^{anion} 490 mμ (E^{mol} =1590). El promedio de tres determinaciones del pE fue 3.71 ± 0.015. Para 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, pE = 3.17 ± 0.08.

Análisis.— Calculado para $C_8H_8O_3$ (152.14): C, 63.15; H, 5.30. Hallado: C, 62.87; H, 5.39.

2,5-dimetil-1, 3, 4-triacetoxibenceno (V).— Una suspensión de 2 g. de la correspondiente quinona en 10 ml. de anhidrido acético fue tratada con 0.5 g. de eterato de fluoruro de boro, con lo que el sólido se disolvió. Se dejó durante la noche, se diluyó con agua y el precipitado que se separó fue recogido; rendimiento 4.07 g. (99 %); punto de fusión, 105-107°. Se cristalizó en metanol-agua (3.75 g., 91 % y en benceno-ligroina, en forma de prismas que funden a 106-107°.

Análisis.— Calculado para $C_{14}H_{16}O_6$ (280.27): C, 59.99; H, 5.75. Hallado: C, 59.71; H, 5.61.

6-hidroxi-2,5-dimetil-1,4-quinona (VI).— Esta quinona es sensible y fácilmente destruíble por lo que el proceso de saponificación en metanol-agua usado para el isómero conduce a productos insatisfactorios. Supresión del metanol mejora los resultados. Una suspensión de 1 g. de V en 25 ml. de agua fue liberada de oxígeno y adicionada de 8 ml. de hidróxido de sodio al 25 %. La mezcla se calentó hasta que el triacetato se disolvió y la hidrólisis fue completa. Se agregaron entonces 8 ml. de ácido clorhídrico concentrado y, después de filtración, 8 ml. de solución normal de cloruro férrico y ácido clorhídrico. La hidroxiquinona amarilla microcristalizada, se separó y recogió enfriando en hielo. El rendimiento fue de 0.5 g. y el punto de fusión 140-141°. La substancia se descompuso cuando se intentó cristalizarla en agua; es tan soluble en éter de petróleo frío que no puede cristalizarse en este disolvente. El producto, preparado como se dijo, se sometió a análisis.

Análisis.— Calculado para $C_8H_8O_3$ (152.14-): C, 63.15; H, 5.30. Hallado: C, 63.55; H, 5.40.

La quinona se disuelve en "buffers" alcalinos con color púrpura y la solución absorbe a 530 mμ ($E^{mol.}$ = 1970). Una mezcla de 100 mg. del triacetato de hidroquinona V, 50 ml. de agua y 1 ml. de ácido clorhídrico concentrado, se calentó a reflujo por una hora, se enfrió, trató con 3 ml. de solución de cloruro férrico, se extrajo con éter tres veces y finalmente con un "buffer" de pH 10.4. El coeficiente de extinción a 530 mμ indicó un recobro de 92 %.

Una solución de hidroxiquinona en metanol fue tratada con eterato de fluoruro de boro, se dejó reaccionar durante la noche, diluyó y extrajo por éter. El pigmento fue extraído completamente por bicarbonato, indicando que la eterificación de Fischer no se había producido.

2,3-dimetil-1,4-quinona-2,3-dimetil-butadieno (VII).— Una solución de 2 g. de quinona y 1.5 g. de dieno (14) en 5 ml. de ácido acético se

dejó por 20 horas a 25-27°, al cabo de las cuales se separaron finas y largas agujas blancas. Este material se recogió (1.2 g., p. f. 103-104°) y el líquido madre, por dilución con agua, dió un segundo precipitado de 1.9 g., p. f. 102-104°; rendimiento 3.1 g. (97 %). Cristalizado de metanol-agua en agujas, dió un punto de fusión de 103-104°.

Análisis.— Calculado para $C_{14}H_{18}O_2$ (218.28): C, 77.03; H, 8.31. Hallado: C, 76.87; H, 8.20.

El producto de adición se volatiliza muy lentamente en corriente de vapor. Se recobró como tal después de tratamiento con piridina y anhidrido acético por 2 horas a la temperatura del laboratorio.

5,8-dihidro-2, 3, 6, 7-tetrametil-1,4-naftohidroquinona (VIIIa).— Una solución de 0.65 g. de VII en 4 ml. de ácido acético se trató con 2 ml. de agua y 0.2 ml. de ácido clorhídrico concentrado y fue calentada al bañomaría por 30 minutos. Se formó una pasta espesa, blanca, que se diluyó con agua, filtró y lavó. El rendimiento del sólido blanco fue de 0.6 g., p. f. 266-267°. La substancia cristalina es difícilmente soluble en metanol o acetona y tiende a transformarse cuando se intenta cristalizarla de mezclas acuosas. Se preparó una muestra analítica agregando una gota de ácido clorhídrico a una solución caliente de 200 mg. del producto puro en 2 ml. de ácido acético y 1 ml. de agua. La hidroquinona cristalizó en agujas de punto de fusión 265-266°.

Análisis.— Calculado para $C_{14}H_{18}O_2$ (218.28): C, 77.08; H, 8.31. Hallado: C, 76.92; H, 8.23.

El **diacetato** cristalizó en metanol en agujas aplastadas de punto de fusión 190-191°.

Análisis.— Calculado para $C_{18}H_{22}O_4$ (302.36): C, 71.50; H. 7.33. Hallado: C, 71.45; H, 7.16.

5,8-dihidro-2, 3, 6, 7-tetrametil-1,4-naftoquinona (IX).— Una solución de 334 mg. VII en 15 ml. de metanol se trató, a la temperatura del laboratorio, con 4 ml. de solución normal férrica-clorhídrica y 0.4 miligramos de ácido clorhídrico concentrado. En pocos minutos aparecen largas agujas amarillo brillante. Rendimiento 248 mg.; punto de fusión 147-149° desc. Una muestra recristalizada de metanol fundió a 150-152°, desc. El punto de descomposición no es definido o característico.

Análisis.— Calculado para $C_{14}H_{16}O_2$ (216.27): C, 77.75; H. 7.46. Hallado: C, 77.74; H, 7.49.

En un experimento previo, la hidroquinona (1.3 g.) VIIIa, se oxidó en solución caliente de ácido acético (100 ml.) con nitrito de sodio a

100°, pero el análisis demostró que el producto (p. f. 147-149°) era, en su mayor parte, la naftoquinona X.

2, 3, 6, 7-tetrametil-1,4-naftoquinona (X).— Una solución de 1 g. de IX y 2 g. de dihidrato de bicromato de sodio en 50 ml. de ácido acético, se calentó en bañomaría por 10 minutos y se diluyó al punto de saturación. La naftoquinona separada en placas amarillas, p. f. 166-167°, dió un rendimiento de 0.92 g. Es poco soluble en metanol, más soluble en ácido acético. El punto de fusión no cambia por recristalización.

Identificación de las quinonas de la gonileptidina.— El destilado acuoso de gonileptidina, conservado por tres o cuatro meses en congelación era una solución amarilla de pH 4.0. Se saturó con cloruro de sodio, extrajo con éter y la capa acuosa reextraída con éter. Las soluciones etéreas combinadas se filtraron sobre sulfato de sodio anhidro y la mayor parte del disolvente removido al bañomaría. Las últimas trazas del disolvente se eliminaron en frío por succión a la trompa. El aceite residual amarillo pesó 115 mg. y enfriado a 5° cristalizó en largas y finas agujas. El pigmento fue algo más oscuro que el obtenido de destilados recientes del estado congelado. El coeficiente de extinción a λ 255 mμ (agua) fue de $E^{1\%}$ 1280, inferior al hallado en Montevideo repetidas veces para destilados frescos: 1400.

El total de 115 mg. se preparó para análisis espectrográfico y nuevamente recobrado por el proceso descripto. Se trató con 2 ml. de ácido acético y 0.2 ml. de 2,3-dimetilbutadieno y se dejó en la obscuridad por 20 horas a 25-27°. La solución, todavía amarilla, se tomó por éter y se agitó una vez con solución saturada de cloruro de sodio. Se agregaron sucesivas pequeñas porciones de solución de bicarbonato al 5 %, agitando, hasta neutralizar todo el ácido acético, se saturó la capa acuosa con cloruro de sodio y, finalmente, se le agregó una solución de 300 mg. de hidrosulfito de sodio en 2 ml. de agua y 15 ml. de solución saturada de cloruro de sodio. Se agitó hasta decoloración de ambas capas y se descartó la capa acuosa. A esta altura la solución etérea debe estar en un embudo de separación que no permita más de un 30 % de espacio de aire. Se agregó al éter una solución de 25 mg. de hidrosulfito en 5 ml. de agua y 3 ml. de hidróxido de sodio al 10 % y la mezcla fue agitada vigorosamente. La capa alcalina incolora fue transferida a un matraz conteniendo 2 ml. de ácido clorhídrico concentrado y 5 ml. de agua. El éter se lavó con agua para quitar lo mejor

posible el líquido alcalino. Una nueva extracción con 3 ml. de hidróxido de sodio al 10 % y 5 ml. de agua removió sólo pequeñas cantidades de hidroquinona. La solución etérea neutra se agitó con solución saturada de cloruro de sodio, filtró a través de sulfato anhidro y evaporó a sequedad. El residuo sólido incoloro pesó 106 mg. y fundió a 100-102°. Por cristalización en metanol-agua se obtuvieron 76 mg de material con un punto de fusión de 102-103°, identificado, por el p. de f. (103-104°) de la mezcla, con el **2,3-dimetil-1,4-quinona-2,3-dimetilbutadieno.** Con fines de confirmación el compuesto de adición fue convertido por isomerización ácida, oxidación con ácido nitroso y luego con bicromato, y cristalización en metanol, en la **2,3,6,7-tetrametil-1,4-naftoquinona** de punto de fusión 166-167°. El punto de fusión de la mezcla fue 166-167°.

La solución acidulada del extracto alcalino se trató con 5 ml. de solución normal férricoclorhídrica y cloruro de sodio hasta saturación. Por extracción con éter se obtuvo un aceite amarillo brillante que fue tratado con 1 ml. de anhidrido acético y 0.05 ml. de eterato de fluoruro de boro y se dejó a 25-27° por 2 horas. La solución, todavía amarilla, se lavó con un poquito de éter en un matraz de destilación de 50 ml. Se agregaron 25 ml. de agua y la mezcla se destiló en corriente de vapor hasta que el contenido del matraz se decoloró. Esta solución residual se neutralizó adicionando pequeñas porciones de bicarbonato de sodio sólido, se saturó con cloruro de sodio y se extrajo con éter.

La evaporación de la solución etérea dió 14.5 mg. de un producto cristalino, casi incoloro. Este se disolvió en una mezcla, 1:1 de éter-éter de petróleo y la solución se clarificó con Norita y se evaporó con repetidas adiciones de éter de petróleo hasta que el éter dietílico fue casi totalmente eliminado. Después de cierto tiempo a 5° apareció una masa de cristales prismáticos que fundieron a 102-103°; el punto de fusión de la mezcla con 2,5-dimetil-1,3-triacetoxibenceno (p. f. 105-106°) resultó 104-105°. El espectro infrarrojo fue superponible con el del compuesto sintético.

El destilado acuoso amarillo, presentó un máximo de absorción a 260 mμ (agua) con un coeficiente de extinción correspondiente a 11.9 mg. de 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona. El espectro infrarrojo correspondió exactamente en todas las regiones con el de la quinona sintética. La quinona fue recuperada por saturación con sal y extracción con éter y fue tratada con polvo de zinc, anhidro acético y trietilamina por 10 minutos a la temperatura del laboratorio. El producto, recobrado después de hidrólisis, lavando con ácido mineral y con bicarbonato, fue tomado por éter, adicionado de éter de petróleo y evaporada hasta saturación. Se separó un polvo blanco (p. f. 165-168°) y cuando se recristalizó en benceno formó tres pequeños prismas de punto de fusión 166-168°; la mezcla con 2, 3, 5-trimetilhidroxiquinona sintética fundió a 166-169°. El material recobrado del líquido madre se calentó con anhidrido acético y piridina por 15 minutos en baño-maría y el producto neutro cristalizó en éter de petróleo a 5°. Formó un apequeña roseta de agujas que fundieron a 99°; una mezcla con diacetato de **2, 3, 5-trimetilhidroquinona** (p. f. 104-105°) fundió a 100-102°.

El procedimiento seguido fue ensayado, varias veces, en una mezcla que, casualmente, resultó ser comparable en cantidad y proporciones a la muestra de gonileptidina procesada: 100 mg. de 2,3-dimetil-1,4-quinona, 25 mg. de cada una, 2,5-dimetil-1,4-quinona y 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona. Los derivados de cada una de los tres componentes se aislaron por el procedimiento descripto y se identificaron después de cristalización. Los rendimientos de los productos no cristalizados parecen dar una indicación del contenido y fueron 2,3-dimetil-1,4-quinona-2,3-dimetilbutadieno, 150 mg. (94 %); 2,5-dimetil-1, 3, 4-triacetoxibenceno, 51.5 mg. (64 %); 2, 3, 5-trimetilhidroquinona, 22 mg. (78 %). Suponiendo que el recobro fue el mismo cuando se procesó la gonileptidina, los 115 mg. iniciales de esta substancia contenían 71 mg. de 2,3-dimetil-1,4-quinona, 11 mg. de 2,5-dimetil-1,4-quinona y 15 mg. de 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona.

CONCLUSIONES

El principal componente del antibiótico gonileptidina, un pigmento amarillo secretado por el arácnido sudamericano **Gonilepte,** fue identificado por aislamiento del diacetato de hidroquinona como 2,3-dimetil-1,4-quinona.

Dada la correspondencia de las bandas de absorción en el infrarrojo con las de la gonileptidina y el aún mayor poder antibiótico, la 2,5-dimetil-1,4-quinona y la 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona aparecieron como los probables componentes menores de la gonileptidina. Se ensayaron varios métodos de análisis en mezclas conocidas de las tres quinonas

sintéticas. El que finalmente se aplicó a 115 mg. de gonileptidina involucró, en el primer paso, la conversión selectiva de 2,3-dimetil-1,4-quinona en un producto de adición con 2,3-dimetilbutadieno. El compuesto quedó en la fracción neutra cuando las quinonas que no reaccionaron fueron reducidas con hidrosulfito y extraídas con álcali. Estas fueron sometidas a la acetoxilación de Thiele. La 2,5-dimetil-1,4-quinona presente fue transformada en el compuesto no volátil, 2,5-dimetil-1, 3, 4-triacetoxibenceno y la 2, 3, 5-trimetil-1,4-quinona fue aislada por destilación al vapor.

Derivados de los ácidos tioacéticos y β-tiopropiónicos de las alkil-1,4-quinonas fueron preparados incidentalmente y resultaron bacteriostáticos.

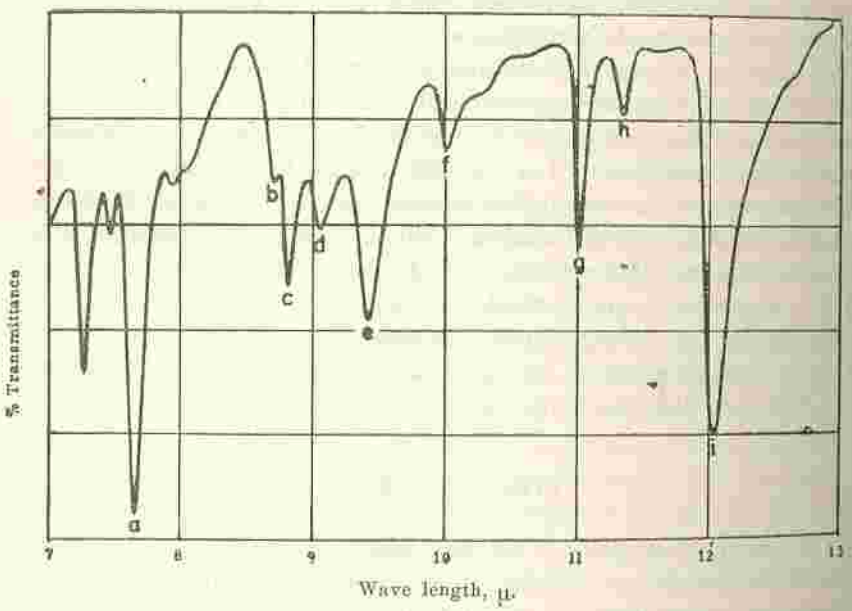


Fig. 1.— Espectro infrarrojo de la gonileptidina (Spectrofotómetro Baird). Bandas características de la 2,3-dimetil-1,4-quinona: *a* (también característica de *p*-benzoquinona), *c*, *d* (también 2,3,5-trimetil-1,4-quinona), *e*, *i*; de 2,5-dimetil-1,4-quinona; *b*, *f* (también de *p*-toluquinona), *g* (también dada por el isómero 2,6- en el cual, sin embargo, la banda correspondiente tiene un doble pico); de 2,3,5-Trimetil-1,4-benzoquinona; *d* (también de 2,3-dimetilquinona), *h*. La etilquinona tiene una banda intensa en 11.0 pero las bandas de la región 7-8 y 9-10 están considerablemente desplazadas con respecto a las de la figura.

Bibliografía

(1) **Snell, J. N.** and **Weissberger, J.**; Am. Chem. Soc., **61**, 450 (1939); **Blackhall, A.** and **Thompson, R. H.**; J. Chem. Soc., 1138 (1953).

(2) **Fieser, L. F.** and **Turner, R. B.**; J. Am. Chem. Soc., **69**, 2335 (1947).

(3) **Fieser, L. F.**; J. Am. Chem. Soc., **70**, 3237 (1948).

(4) **Thiele, J.**; Ber., **31**, 1248 (1898).

(5) **Thiele, J.** and **Winter, E.**; Ann., **311**, 341 (1900).

(6) **Fieser, L. F.**; J. Am. Chem. Soc., **70**, 3165 (1948).

(7) **Erdtman, H.**; Svensk. Kem. Tids., **44**, 135 (1932). [Chem. Absts., **26**, 4803 (1932)].

(8) **Fieser, L. F.**; **Ettlinger, M. G.** and **Fawaz, G.**; J. Am. Chem. Soc., **70**, 3228 (1948).

(9) **Fieser, L. F.** and **Seligman, A. M.**; J. Am. Chem. Soc., **56**, 2690 (1934).

(10) El extracto de flour beetle contiene etilquinona (80-90 %), p-toluquinona y metoxiquinona. **Alexander, P.** and **Barton, D. H. R.**; Biochem. J., **37**, 463 (1943); **Hackman, R. H.**; **Pyror, M. G. M.** and **Todd, A. R.**; ibid., **43**, 474 (1948); **Loconti, J. D.** and **Roth, L. M.**; Ann. Ent. Soc. Am., **46**, 281 (1953).

(11) **Fieser, L. F.** and **Fieser, M.**; J. Am. Chem. Soc., **57**, 491 (1935); **Fieser, L. F.**; Org. Synth., Coll. Vol. **2**, 35 (1943).

(12) Estamos agradecidos a Merck y Co., Inc. y a Hoffmann La Roche, Inc., por suministrarnos generosamente este producto.

(13) **Smith, L. I.**; J. Am. Chem. Soc., **56**, 472 (1934).

(14) Dajac Laboratories dicne, recientemente privado del antioxidante.

Expreso mi profundo agradecimiento al Prof. Clemente Estable, Director del Instituto de Investigaciones de Ciencias Biológicas (Ministerio de Salud Pública), por haberme dado la oportunidad de realizar este estudio y al Dr. Louis F. Fieser, Profesor Sheldon Emery de Química Orgánica (Departamento de Química, Universidad de Harvard), por el interés puesto en la orientación del mismo y por su generosidad durante el curso del trabajo.

Por ayuda financiera estoy reconocida a la "Rockefeller Foundation", Nueva York, y al Ministerio de Salud Pública del Uruguay.

Montevideo, agosto 1955.