

VCH-FC
DOC-Q
F.175
C.1

ESTUDIO QUIMICO DEL GENERO BERBERIS

Tesis presentada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Química.

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y
FARMACEUTICAS



VICTOR FAJARDO MORALES

05-0200859

DIRECTOR : Dr. Maurice Shamma (Universidad del Estado de Pennsylvania, U.S.A.)

PATROCINANTE : Dr. Mariano Castillo (Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas).

FACULTAD DE CIENCIAS
BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

VICTOR FAJARDO MORALES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Química.

Patrocinante de Tesis:

Dr. Mariano Castillo

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Manuel Cortés

Dr. Jorge Medina

Dr. Jorge Naranjo

Dr. Aurelio San Martín

Four handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal line. The signatures correspond to the names listed on the left: Mariano Castillo, Manuel Cortés, Jorge Medina, and Aurelio San Martín.



A Jessy

A mis hijos :

Jessy, Pablo y Paulina

A mi madre



AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a los Profesores Dr. Maurice Shamma y Dr. Mariano Castillo por su constante dedicación y preocupación en el desarrollo del trabajo.

Agradezco sinceramente al Profesor Bruce Cassels por el estímulo y colaboración prestada en todo momento.

Agradezco la Beca otorgada por la Universidad de Magallanes y a la colega Margarita Garrido por sustituirme en mis funciones en la Universidad.

Agradezco también, al Dr. Robert Minard, el registro de los espectros de masas y al Dr. Varadaraj Elango el de los de RMN (Universidad de Estado de Pennsylvania), al colega Eduardo Scott por la colaboración dada en la confección de las figuras de la tesis y al Dr. Sankar Chattopadhyay la síntesis de la lactama A (3-8).-

INDICE DE MATERIAS



LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xiv
INTRODUCCION	1
1.1.- Introducción General a los alcaloides Isoquinolínicos	1
1.2.- El género <u>Berberis</u> en Chile. Introducción.	5
1.3.- <u>Berberis buxifolia</u>	6
1.3.1.- (-)-Calafatina, <u>1-3.</u>	8
1.3.2.- Chillanamina, <u>1-5.</u>	11
1.3.3.- (-)-Osornina, <u>1-6.</u>	12
1.3.4.- (-)-Curacautina, <u>1-7.</u>	15
1.3.5.- (-)-Talcamina, <u>1-8.</u>	16
1.4.- Configuración absoluta y consideraciones biogénicas de los alcaloides bisbencilisoquinolínicos aislados de <u>Berberis</u> .	17
1.5.- <u>Berberis Chilensis</u> Gillies ex Hoox	26
1.5.1.- (+)-Berbamina, <u>1-15.</u>	26
1.5.2.- (-)-Isotalicberina, <u>1-32.</u>	28
1.5.3.- (-)-7-0-desmetilisotalicberina, <u>1-31.</u>	30
1.5.4.- (-)-0-metilisotalicberina, <u>1-24.</u>	31
1.5.5.- (-)-12-0-desmetillauberina, <u>1-36.</u>	32
1.5.6.- (-)-Espinina, <u>1-22</u>	33
1.6.- <u>Berberis empetrifolia</u> Lam.	33

1.6.1.- Características generales	33
1.6.2.- Estudio químico de <u>Berberis empetrifolia</u> Lam.	34
1.6.3.- Objetivos del Trabajo	34
PARTE EXPERIMENTAL	37
2.1.- Material Vegetal	37
2.2.- Antecedentes Generales	37
2.3.- Extracción y fraccionamiento preliminar de <u>Berberis empetrifolia</u>	38
2.4.- Aislamiento de los alcaloides	38
2.5.- Identificación de los alcaloides:	38
2.5.1. Puntarenina, <u>3-6.</u>	38
2.5.2. Conversión de puntarenina al acetato enólico, <u>3-10.</u>	40
2.5.3. Conversión de puntarenina en dihidropuntarenina	42
2.5.4. Preparación de acetato de dihidropuntarenina	43
2.5.5. Natalinamina, <u>3-23.</u>	45
2.5.6. Isotetrandrina, <u>1-19.</u>	46
2.5.7. Oxiberberina, <u>3-20.</u>	48
2.5.8. Chilenina, <u>3-3.</u>	49
2.5.9. Nandinina, <u>3-17.</u>	50
2.5.10. Preparación de canadina, <u>3-18.</u>	53
2.5.11. Acetato de nandinina, <u>3-19.</u>	54
2.5.12. Noroxihidrastinina, <u>3-15.</u>	56
2.5.13. Dorifornina, <u>3-16.</u>	58
2.5.14. Coyhaiquina, <u>3-35.</u>	59
2.5.15. Reordenamiento de Coyhaiquina a la aporfina <u>3-36.</u>	61



2.5.16.- (-)-Glaziovina, <u>3-39</u> .	62
2.5.17.- Natalinina, <u>3-24</u> .	64
2.5.18.- Protopina, <u>3-13</u> .	65
2.5.19.- Pakistanina, <u>1-37</u> .	66
2.5.20.- Patagonina, <u>3-26</u> .	68
2.5.21.- Producto de reordenamiento de patagonina al dimero, <u>3-27</u> .	70
2.5.22.- Talictricina, <u>3-14</u>	71
2.5.23.- Coyhaiquinina, <u>3-38</u> .	73
2.5.24.- Valdivianina, <u>3-28</u> .	74
2.5.25.- Chitralina, <u>1-38</u> .	75
2.5.26.- Porveniramina, <u>3-22</u> .	77
2.5.27.- Natalamina, <u>3-25</u> .	78
 RESULTADOS Y DISCUSION	 80
3.1.- Generalidades	80
3.2.- Chilenina : Un alcaloide isoindolobenzacepínico	82
3.3.- Biogénesis de Chilenina, <u>3-3</u> .	85
3.4.- Puntarenina, <u>3-6</u> .	86
3.5.- Algunas notas biogénéticas acerca de puntarenina, <u>3-6</u> .	97
3.6.- Determinación de estructuras de alcaloides protopínicos	97
3.6.1. Protopina, <u>3-13</u> .	97
3.6.2. Talictricina, <u>3-14</u> .	100
3.7.- Determinación de estructuras de alcaloides isoquinolínicos	102
3.7.1. Noroxihidrastinina, <u>3-15</u> .	102
3.7.2. Dorifornina, <u>3-16</u> .	104
3.8.- Nandinina, una tetrahidroprotoberberina	106

3.9.- Isotetrandrina, <u>1-19</u> .	112
3.10.- Oxiberberina, <u>3-20</u> .	115
3.11.- Determinación de estructuras de alcaloides diméricos aporfina- bencilisoquinolinas.	115
3.11.1. Generalidades espectroscópicas	115
3.11.2. Pakistanina, <u>1-37</u> .	119
3.11.3. Chitralina, <u>1-38</u> .	121
3.11.4. Porveniramina, <u>3-22</u> .	123
3.12.- Determinación de estructuras de alcaloides seco aporfínicos	125
3.12.1. Generalidades	125
3.12.2. Natalinamina, <u>3-23</u> .	126
3.12.3. Natalinina, <u>3-24</u> .	128
3.12.4. Natalamina, <u>3-25</u> .	128
3.13.- Determinación de estructuras de alcaloides dimericos proapor- finas-bencilisoquinolinas.	132
3.13.1. Generalidades espectroscópicas	132
3.13.2. RMN-ENO de los alcaloides diméricos proaporfinas- bencilisoquinolinas	134
3.13.3. Patagonina, <u>3-26</u> .	135
3.13.4. Valdivianina, <u>3-28</u> .	138
3.13.5. Estereoquímica del reordenamiento dienonafenol en la transformación de proaporfinas en aporfinas	141
3.14.- Determinación de estructuras de alcaloides seco proapor- finas-bencilisoquinolinas	145
3.14.1. Coyhaiquina, <u>3-35</u> .	145
3.14.2. Coyhaiquinina, <u>3-38</u> .	149

3.15.- Conclusiones acerca del estudio realizado en compuestos proapor- fínicos	153
3.16.- Glaziovina, <u>3-39</u> .	156
CONCLUSION	158
RECOMENDACIONES	161
BIBLIOGRAFIA	162
APENDICE	166

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-1 : Relación biogénica de alcaloides bencilisoquinolínicos.
- Figura 1-2 : Alcaloides originados de las protoberberinas.
- Figura 1-3 : Grupos de alcaloides encontrados en el género Berberis.
- Figura 1-4 : Primeros metabolitos secundarios aislados de Berberis buxifolia Lam.
- Figura 1-5 : Fragmentos observados en el espectro de masas de calafatina.
- Figura 1-6 : ruta biogénica parcial de los alcaloides bisbencilisoquinolínicos aislados de Berberis buxifolia.
- Figura 1-7 : Posible origen de la posición oxigenada en C-10.
- Figura 1-8 : Fragmentos más importantes en el espectro de masas de la berbamina.
- Figura 1-9 : Modo de fragmentación del espectro de masas del alcaloide (-)-isotalicberina.
- Figura 3-1 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de chilénina.
- Figura 3-2 : Espectro de IR de Chilénina.
- Figura 3-3 : Síntesis de chilénina.
- Figura 3-4 : Espectro de masas de puntarenina.
- Figura 3-5 : Espectro de RMN- H^1 (360 MHz) de puntarenina.
- Figura 3-6 : Espectro de RMN- C^{13} con desacoplamiento parcial de puntarenina.
- Figura 3-7 : Espectro de RMN- C^{13} desacoplado de puntarenina
- Figura 3-8 : Espectro de masas de acetato de puntarenina
- Figura 3-9 : Espectro de RMN- H^1 (360 MHz) de acetato de puntarenina.
- Figura 3-10 : Espectro de RMN- H^1 (360 MHz) de dihidropuntarenina.

- Figura 3-11 : Espectro de masas de dihidropuntarenina.
- Figura 3-12 : Espectro de IR de dihidropuntarenina.
- Figura 3-13 : Espectro de RMN de protones (360 MHz) de acetato de dihidropuntarenina.
- Figura 3-14 : Esquema de fragmentación de protopinas.
- Figura 3-15 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de protopina.
- Figura 3-16 : Esquema de fragmentación de talictricina.
- Figura 3-17 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de talictricina.
- Figura 3-18 : Espectro de masas de talictricina.
- Figura 3-19 : Esquema de fragmentación de noroxihidrastinina.
- Figura 3-20 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de noroxihidrastinina.
- Figura 3-21 : Espectro de IR de noroxidrastinina.
- Figura 3-22 : Espectro de RMN- C^{13} de noroxihidrastinina
- Figura 3-23 : Esquema de fragmentación de dorifornina.
- Figura 3-24 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de dorifornina.
- Figura 3-25 : Espectro de masas de dorifornina.
- Figura 3-26 : Esquema de fragmentación de nandinina.
- Figura 3-27 : Espectro de RMN- H^1 (360 MHz) de nandinina.
- Figura 3-28 : Espectro de masas de nandinina.
- Figura 3-29 : Espectro de RMN- C^{13} de nandinina.
- Figura 3-30 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de canadina.
- Figura 3-31 : Espectro de masas de canadina.
- Figura 3-32 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de acetato de nandinina.
- Figura 3-33 : Espectro de masas de acetato de nandinina.
- Figura 3-34 : Esquema de fragmentación de isotetrandrina
- Figura 3-35 : Espectro de masas de isotetrandrina.

- Figura 3-36 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de isotetrandrina.
- Figura 3-37 : Espectro de masas de oxiberberina.
- Figura 3-38 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de oxiberberina.
- Figura 3-39 : Esquema de fragmentación de los dímeros aporfina-bencilisoquinilinas.
- Figura 3-40 : Esquema de fragmentación de pakistanina.
- Figura 3-41 : Espectro de masas de pakistanina.
- Figura 3-42 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de pakistanina.
- Figura 3-43 : Espectro de masas de chitralina.
- Figura 3-44 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de chitralina.
- Figura 3-45 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de porveniramina.
- Figura 3-46 : Espectro de UV de porveniramina
- Figura 3-47 : Curva de DC de porveniramina.
- Figura 3-48 : Espectro de masas de natalinamina.
- Figura 3-49 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de natalinamina
- Figura 3-50 : Espectro de masas de natalinina.
- Figura 3-51 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de natalinina.
- Figura 3-52 : Espectro de UV de natalinina.
- Figura 3-53 : Espectro de masas de natalamina
- Figura 3-54 : Espectro de RMN- H^1 (200 MHz) de natalamina
- Figura 3-55 : Esquema de fragmentación de los dímeros proaporfina-bencilisoquinolinas.
- Figura 3-56 : Espectro de RMN- H^1 (360 MHz) de patagonina.
- Figura 3-57 : Esquema de fragmentación de patagonina.
- Figura 3-58 : Espectro de RMN- H^1 (360 MHz) de valdivianina.
- Figura 3-59 : Reordenamiento dienoenona-fenol.

- Figura 3-60 : Esquema de fragmentación de coyhaiquina.
- Figura 3-61 : Espectro de RMN- H^1 (360 MHz) de coyhaiquina.
- Figura 3-62 : Espectro de masas de coyhaiquina.
- Figura 3-63 : Espectro de IR de coyhaiquina.
- Figura 3-64 : Esquema de fragmentación de coyhaiquinina.
- Figura 3-65 : Espectro de RMN- H^1 (360 MHz) de coyhaiquinina.
- Figura 6-66 : Espectro de masas de coyhaiquinina.
- Figura 6-67 : Espectro de IR de coyhaiquinina.
- Figura 3-68 : Desplazamientos químicos¹ de protones vinílicos en proaporfina de la serie syn.
- Figura 3-69 : Desplazamientos químicos de protones vinílicos en proaporfina de la serie anti.
- Figura 3-70 : Espectro de masas de glaziovina.
- Figura 3-71 : Espectro de RMN- H^1 (360 MHz) de glaziovina.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1-1 : Curvas de dicroísmo circular (DC) de los alcaloides encontrados en Berberis buxifolia.
- Tabla 3-1 : Datos de DC de los alcaloides diméricos aporfina-bencilisoquinolinas.
- Tabla 3-2 : Valores de DC para los alcaloides diméricos proaporfinas-bencilisoquinolinas.

RESUMEN

El género Berberis, consta de 497 especies repartidas en ambos Hemisferios, de las cuales muy pocas han sido estudiadas desde un punto de vista de sus alcaloides menores, y muy excepcionalmente otros metabolitos. En Chile el género Berberis está representado por cerca de 50 especies, distribuidas desde Antofagasta (II Región) hasta Magallanes en la XII Región.

En general las especies del género Berberis, son conocidas por producir un ordenamiento muy especial de alcaloides isoquinolínicos. Previo a este trabajo un estudio de 4 Berberis de Pakistán dio como resultado el aislamiento de pakistanamina, el único dímero del tipo proaporfina-bencilisoquinolínico. Analizando B. empetrifolia de Chile, se aislaron y caracterizaron una serie de nuevas bases proaporfínicas-bencilisoquinolínicas. Con ellas se establecieron importantes correlaciones en la transformación de proaporfinas en aporfinas examinando la estereoquímica del reordenamiento dienona-fenol.

Productos de oxidación in vivo de los dímeros mencionados, examinados mediante RMN-EN0 sirvió para establecer un sencillo método para la asignación de la estereoquímica en el carbono 13 de las proaporfinas, sean dímeros ó monómeros.

Dos nuevos alcaloides aislados de B. empetrifolia denominados chile nina y puntarenina mostraron esqueletos isoquinolínicos únicos, por primera vez encontrados como productos naturales.

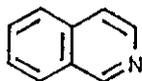
Durante el desarrollo de la tesis se aislaron y caracterizaron 10 alcaloides nuevos y 11 conocidos. Algunos de estos últimos

fueron caracterizados por primera vez en las especies del género Berberis. Se discute cada uno de los compuestos aislados basados en las técnicas modernas de análisis, RMN-¹H, RMN-¹³C, DC, Poder Rotatorio, Espectrometría de Masas y Espectrometría de U.V.

INTRODUCCION

1.1.- Alcaloides Isoquinolínicos

Para que un alcaloide sea llamado un alcaloide isoquinilínico, debe contener o ser derivado de la unidad básica siguiente:



Aunque hay muchos grupos de alcaloides de este tipo todos ellos están relacionados biogénicamente, pues derivan del amino-ácido tirosina como se muestra en la figura 1-1.

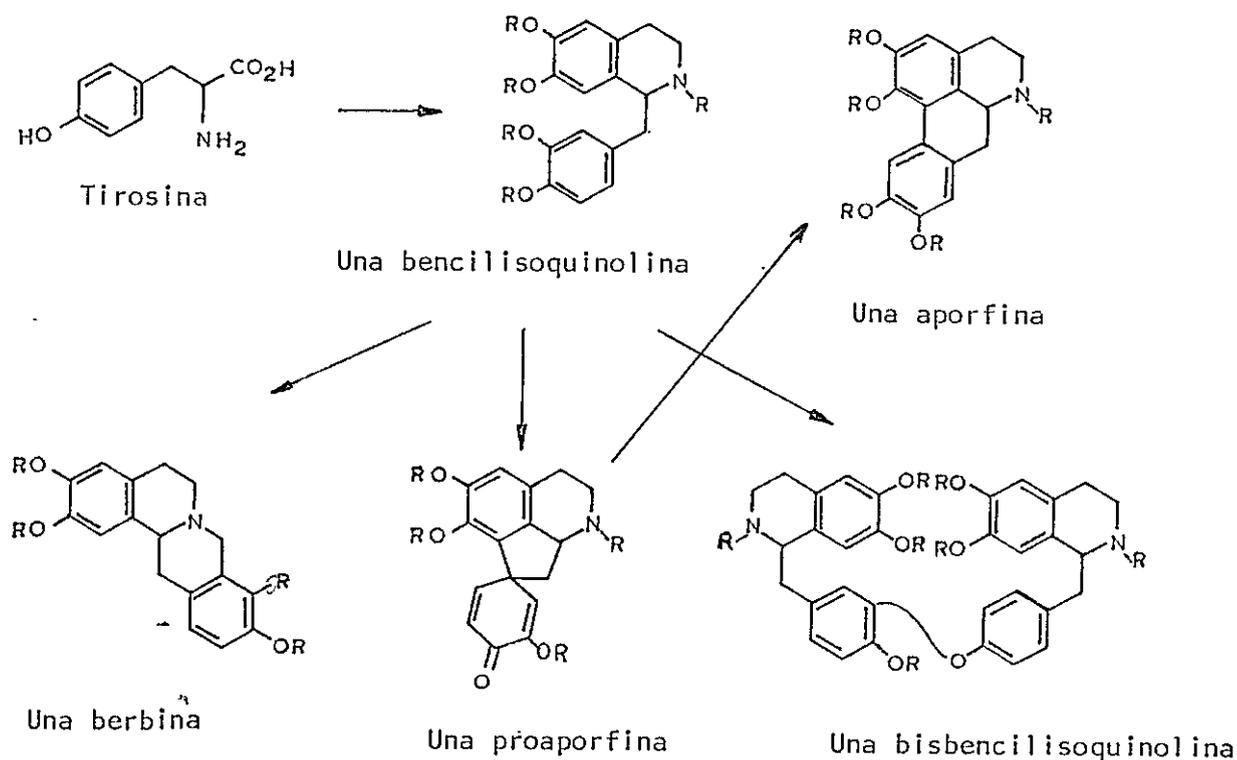


figura 1-1

Relación biogénica de alcaloides bencilisoquinilínicos

Las bencilisoquinolinas derivadas biogénicamente de la tirosina actúan in vivo como precursores de muchos otros alcaloides naturales, tales como las proaporfinas, aporfinas, pavinas, protoberberinas entre otros. Las protoberberinas, a su vez originan otros grandes grupos de alcaloides isoquinolínicos, tales como las protopinas, las benzofenantridinas y las ftalidoisoquinolinas (figura 1-2).

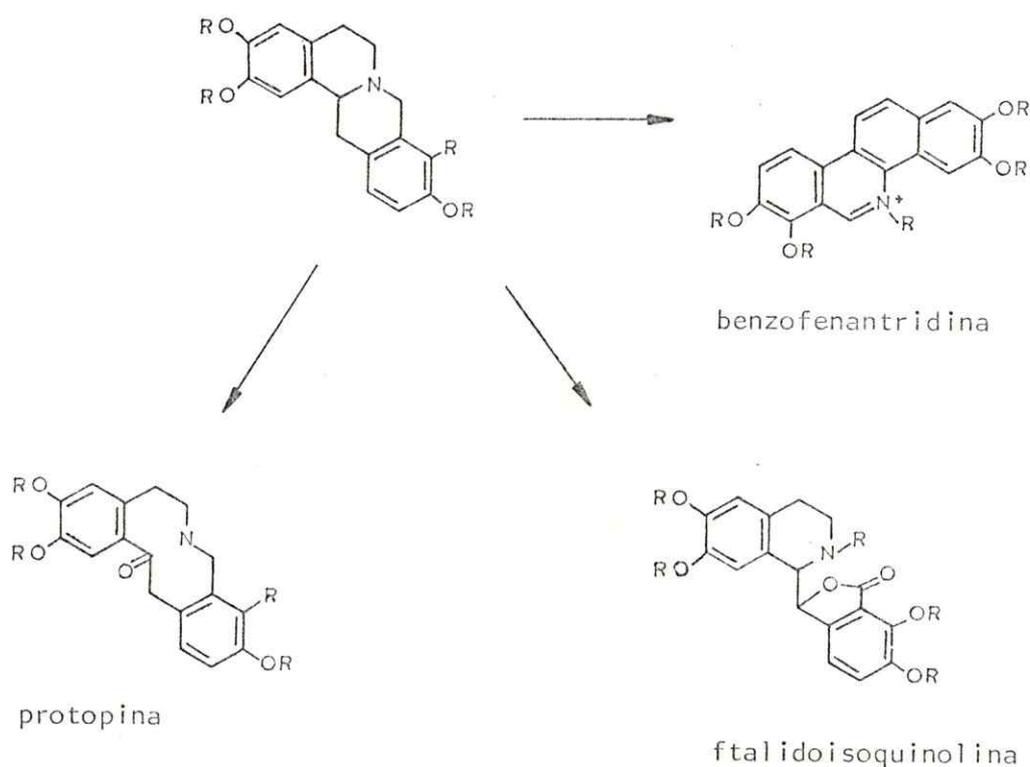
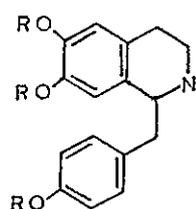


figura 1-2

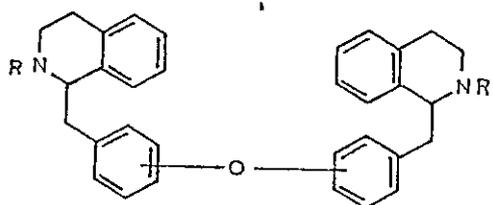
Alcaloides originados de las protoberberinas

De todos los grupos mencionados anteriormente, sólo el de las benzofenantridinas no ha sido encontrado en ninguno de los géneros de la familia de las Berberidáceas, siendo comunes en la familia de las Fumariáceas, Papaveráceas y Rutáceas. El presente trabajo está relacionado

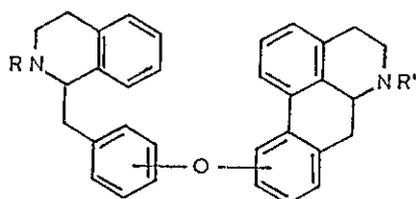
con los grupos de las proaporfinas, aporfinas, protopinas, berbinas, isoquinolonas, dímeros proaporfina-bencilisoquinolinas, dímeros aporfina-bencilisoquinolinas, y bisbencilisoquinolinas, así también como dos nuevos grupos estructurales, las homochileninas y los alcaloides isoindolobenzacepínicos por primera vez aislados en forma natural (figura 1-3). Una discusión detallada de cada uno de los grupos mencionados aparece en cada una de las secciones correspondientes.



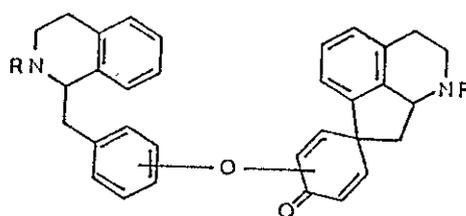
bencilisoquinilina



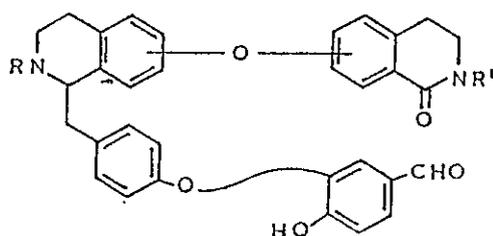
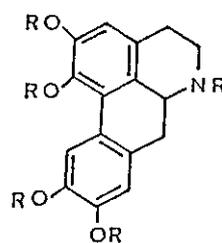
bisbencilisoquinolina (Puede también contener uniones cabeza-cabeza)



dímero bencilisoquinolina-aporfina

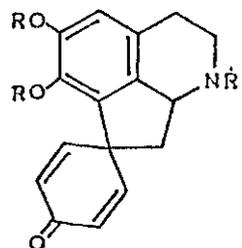


dímero bencilisoquinolina-proaporfina

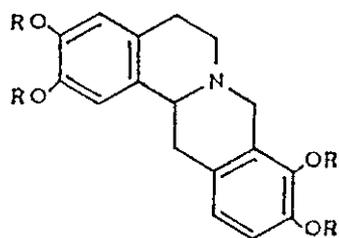
seco
bisbencilisoquinolínica

aporfina

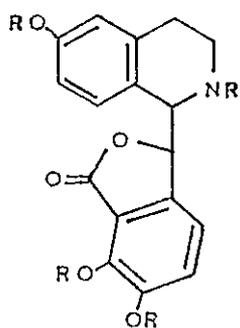
Grupos de alcaloides encontrados en el género Berberis



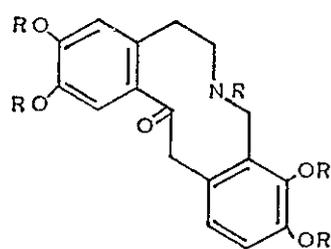
proaporfina



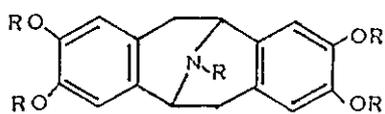
berbina



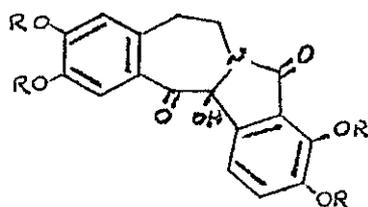
ftalidoisoquinolina



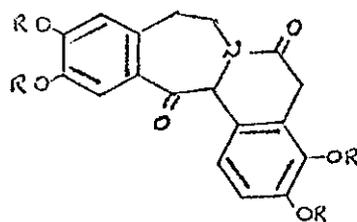
protopina



Pavina



isoindolobenzazepina



homochilenina

1.2.- El género Berberis en Chile

Introducción.-

El género Berberis de la familia de las Berberidáceas, ha mostrado ser de bastante interés para el fitoquímico por su contenido de alcaloides de estructuras nuevas y novedosas. El estudio químico del género Berberis fue iniciado en Chile el año 1976¹⁻³ con el aislamiento de (-)-nor argemonina (1-1), (-)-argemonina (1-2), (-)-calafatina (1-3), calafatimina junto, al lignano siringaresinol (1-4), de Berberis buxifolia Lam. (figura 1-4), planta recolectada cerca del Estrecho de Magallanes a pocos kilómetros de la Ciudad de Punta Arenas.

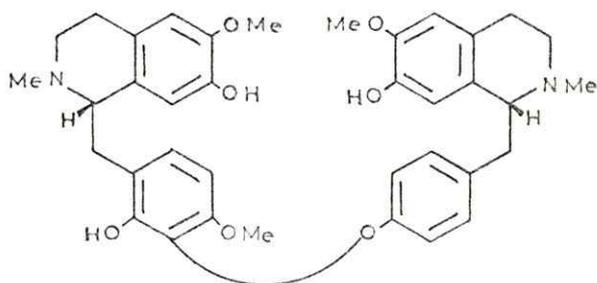
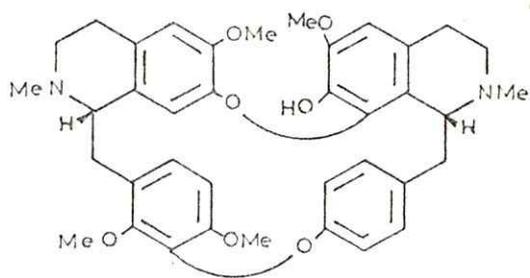
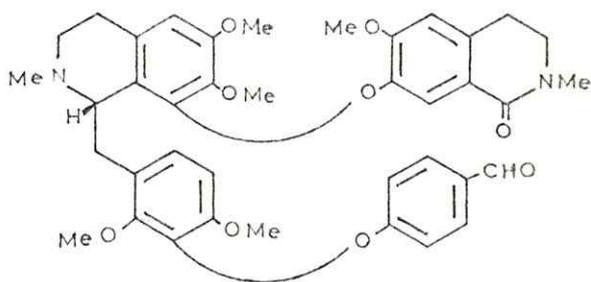
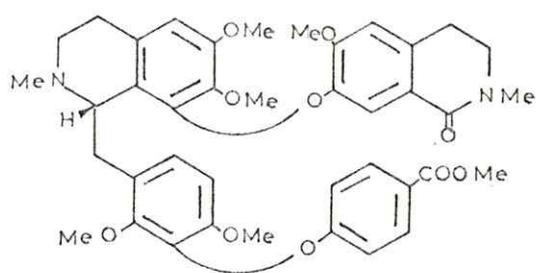
El género Berberis, consta de 497 especies⁴, de las cuales alrededor de 50 se encuentran distribuidas a lo largo de Chile desde Antofagasta a la Patagonia Austral. En este género se han encontrado alcaloides pertenecientes a los siguientes grupos estructurales: bencilisoquinolinas, bisbencilisoquinolinas, dímeros bencilisoquinolinas-aporfinas, dímeros bencilisoquinolinas-proaporfinas, ftalidoisoquinolinas, aporfinas, protoberberinas, protopinas y pavinas.

Las especies chilenas que actualmente están siendo estudiadas desde un punto de vista químico son B. buxifolia, B. chilensis, B. valdiviana y B. empetrifolia.

A continuación se detallan los trabajos realizados en cada una de las especies nombradas.

1.3.- Berberis buxifolia

Ya se ha mencionado la presencia de (-)-norargemonina (1-1), argemonina (1-2), calafatina (1-3) y calafatimina de estructura parcialmente caracterizada en B. buxifolia. Trabajos recientes han informado nuevos alcaloides bisbencilisoquinolínicos, chillanamina (1-5) y osornina (1-6), como así también las nuevas secobisbencilisoquinolinas (-)-curacautina (1-7) y talcamina (1-8)⁵.

1-51-61-71-8

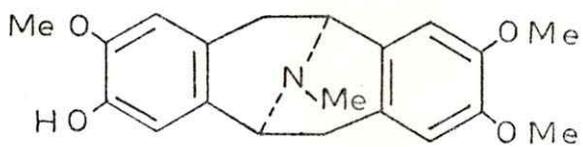
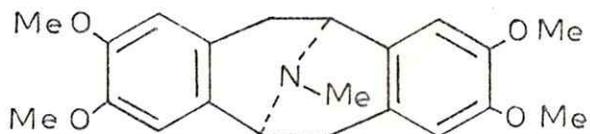
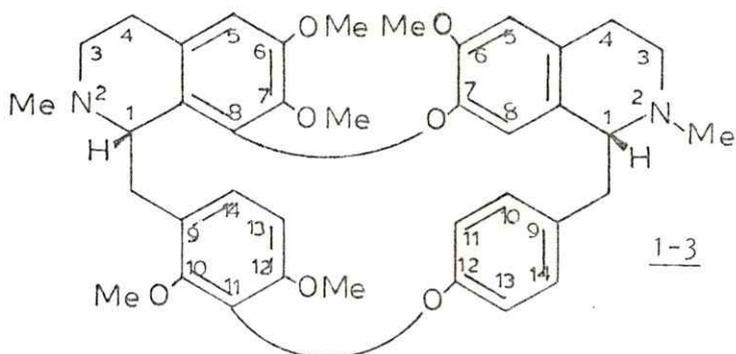
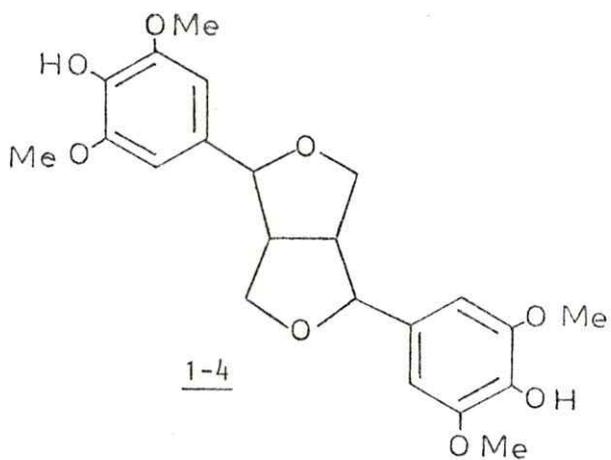
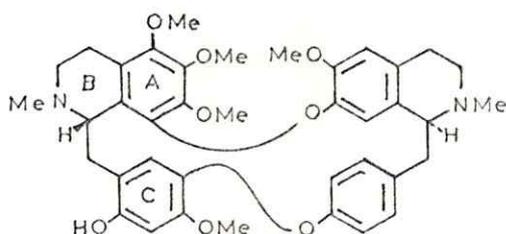
1-11-21-31-4

figura 1-4

Primeros metabolitos secundarios aislados de

Berberis buxifolia Lam.

Los dímeros bisbencilisoquinolínicos aislados en B. buxifolia incorporan un oxígeno extra en el anillo C, al igual que unas pocas bases encontradas en las especies del género Thalictrum (Ranunculaceae)⁶ uno de cuyos exponentes es el alcaloide (+)-talibrunina (1-9).

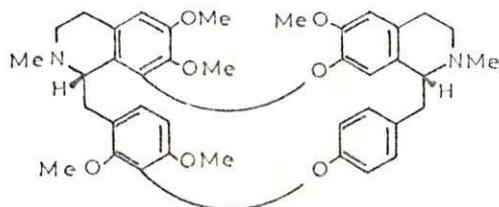


1-9

A continuación se detallan los estudios realizados en la determinación estructural de los alcaloides bisbencilisoquinolínicos aislados en Berberis buxifolia Lam.

1.3.1.- (-)-Calafatina.

Calafatina cristalizó de benceno-ciclohexano en forma de agujas, p.f. 135-137°C, $(\alpha)_D -154^\circ$ (c 0.28, CHCl₃). Su espectro de UV mostró $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 281 (3,82), 258 nm (3,32), no experimentando cambio con la adición de álcali, consistente con un cromóforo oxigenado benciltetrahidroisoquinolínico no-fenólico.



1-3

Su espectro de masas (figura 1-5) mostró un ión molecular a m/z 652 correspondiente a la fórmula molecular $C_{39}H_{44}N_2O_7$. El pico base se encuentra a m/z 198 y junto al observado a m/z 396 (26%) dieron evidencia de la unión éter difenólica cabeza-cabeza⁷.

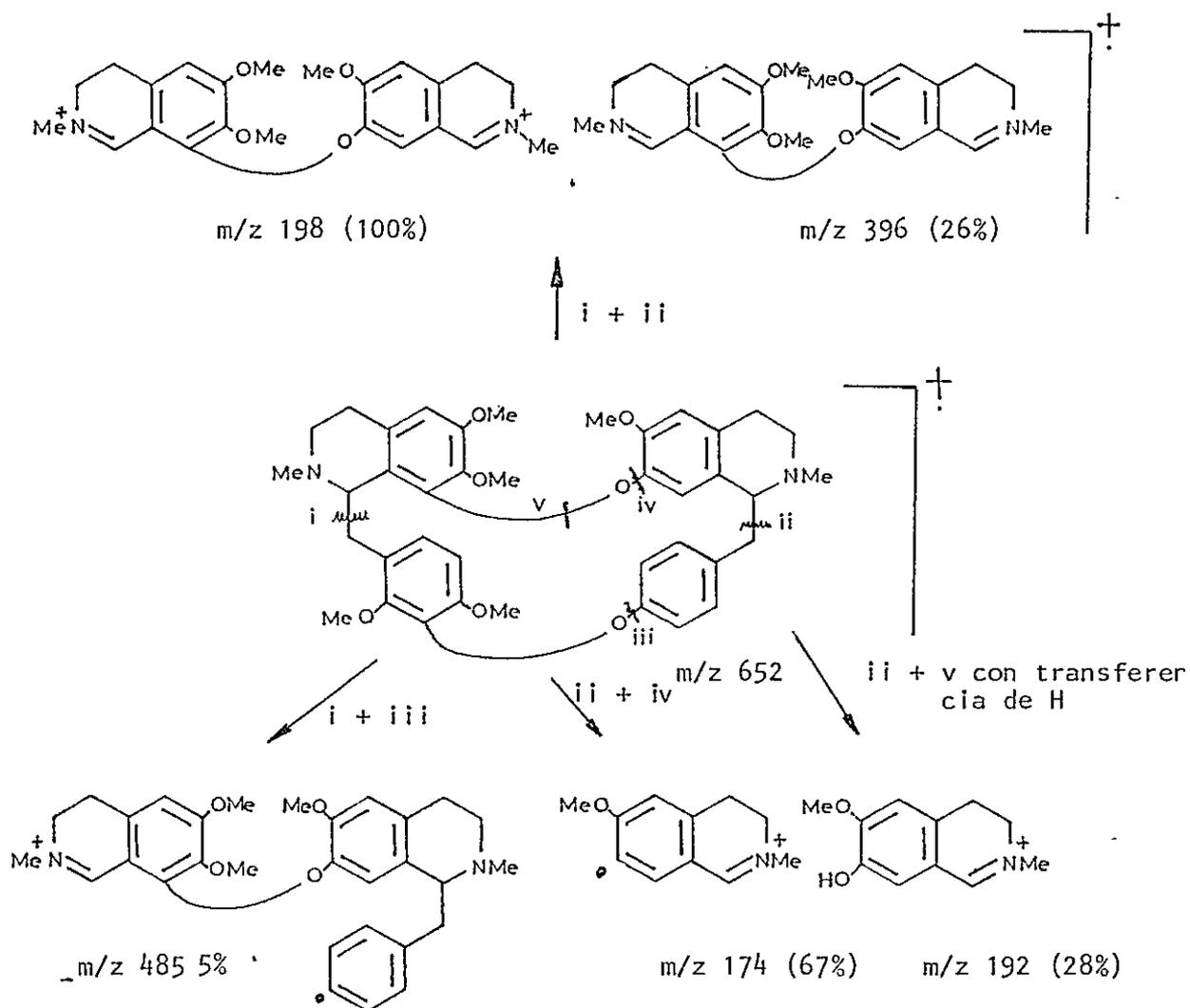
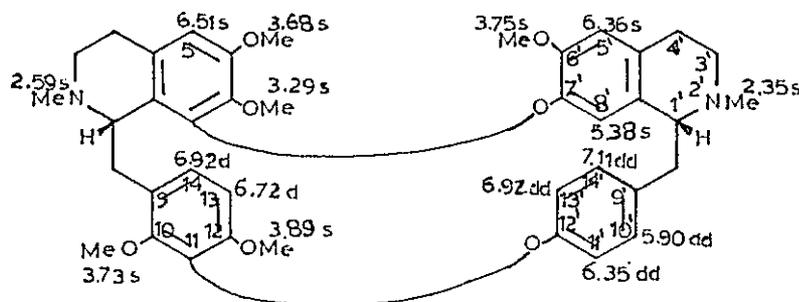


figura 1-5

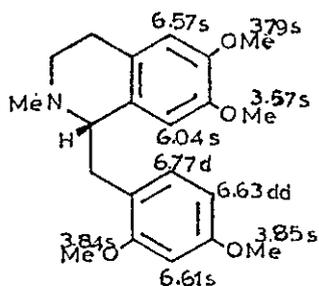
Fragmentos observados en el espectro de masas de calafatina

El espectro de $\text{rmp}(\text{CDCl}_3)$ mostró la presencia de dos grupos N-metilos a δ 2,35 y 2,59 ppm y cinco metoxilos a 3,29; 3,68; 3,75; 3,73 y 3,89 ppm. Un protón resonando como un singulete a 5,38 se asignó al hidrógeno en C-8'. Otros dos singuletes corresponden a los hidrógenos enlazados a los carbonos 5 y 5' presentan desplazamientos químicos a δ 6,36 y 6,51 ppm. La molécula presenta también un par de dobletes con un acoplamiento de hidrógeno aromáticos en posición orto (J 8,5 Hz) a 6,92 y 6,72 ppm correspondiente a los átomos de hidrógenos enlazados a C-14 y C-13, respectivamente. Cuatro doblete de dobletes, correspondientes a los hidrógenos en C10', 11', 13' y 14' resuenan a δ 5,90; 6,35; 6,92 y 7,11 ppm con J_o 8,5 Hz y J_m 2,1 Hz.

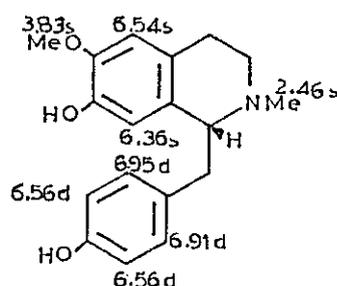


1-3

El alcaloide calafatina es levorotatorio y su fisión con sodio en amoníaco líquido produjo 6,7,10,12-tetrametoxi-1-benciltetrahydroisoquinolína, (+)-(1-10) y 6-metoxi-7,12-dihidroxi-1-benciltetrahydroisoquinolína, (-)-(1-11). La oxidación con permanganato de potasio dio lugar a la formación del alcaloide encontrado en forma natural en la misma planta, (-)-curacautina (1-7).



1-10



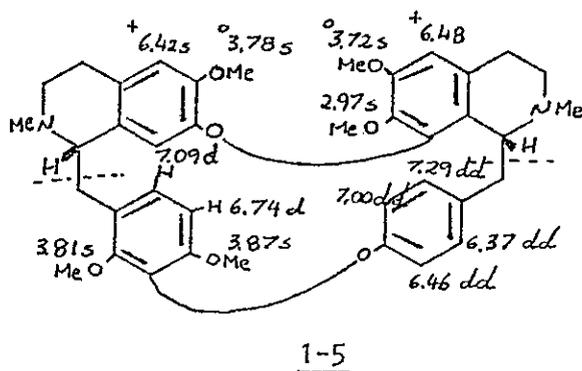
6-Metoxi-7,12-dihidroxi-1-bencil
isoquinolina (N-metilcoclaurina)

1-11

Biogenéticamente, calafatina y los alcaloides relacionados implica que dos unidades N-metilcoclaurínicas se combinan primero cola-cola. El dímero resultante es luego oxidado enzimáticamente orto al puente éter diarílico para originar la función oxigenada en C-10. Posteriores O-metilaciones daría lugar a la formación de chillanamina (1-5), (-)-osornina (1-6) y (-)-calafatina (1-3). Mayores consideraciones biogenéticas se hacen en la sección 1-4.

1.3.2.- Chillanamina (1-5)

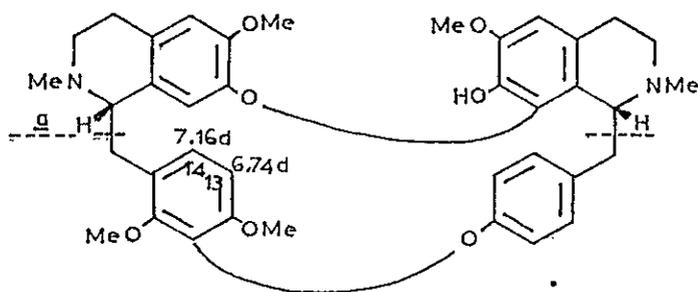
Es este un alcaloide obtenido en forma amorfa. Su espectro de UV mostró absorciones a $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 209, 226 h, 283 nm (4,81; 4,54; 4,02). El espectro de masas de este alcaloide exhibió un modelo bastante simple que incluía un pequeño ión molecular a m/z 626 $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{N}_2$ con un ión base a m/z 192 debido a la porción a del dímero.



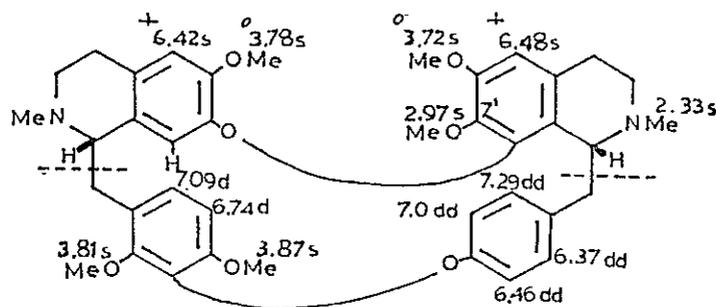
El espectro de rmp, resumido en la estructura 1-5, es concordante con la estructura propuesta. La clave es el par de dobletes integrado para dos protones con una constante de acoplamiento de 8,5 Hz, centrados a 6,69 y 6,58 ppm. representando los dos hidrógenos aromáticos del anillo C, un estudio de rnm usando el efecto nuclear Overhauser mostró que la irradiación del singulete metoxílico en C-12 a δ 3,91 daba como resultado un incremento de 6,8% del doblete a 6,69 ppm (h-13), indicando que los hidrógenos involucrados deberían estar cerca.

1.3.3.- (-)-Osornina (1-6)

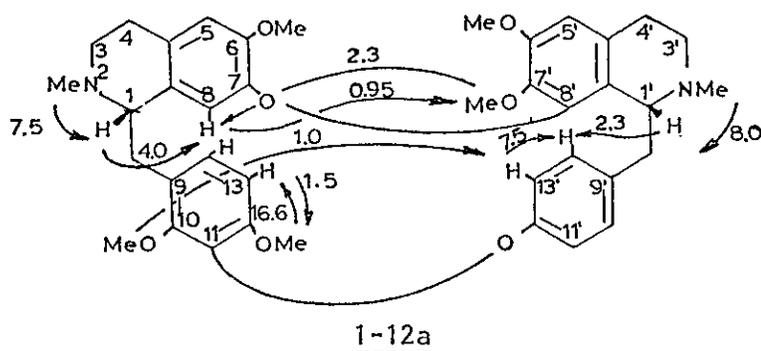
Osornina (1-6) es un producto cristalino que funde a 244-245°C (metanol). Su espectro de UV mostró absorciones a $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 207 (4,80), 230 (4,53), y 282 nm (3,75). El espectro de masas exhibió un ión molecular a m/z 638 correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{N}_2$. El pico base se encuentra a m/z 381 representado por la porción a de la molécula, menos un átomo de hidrógeno.

1-6

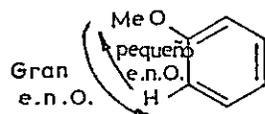
El espectro de rmp se encuentra resumido en la estructura 1-6 observándose que hay un doblete de dobletes centrados a 6,74 y 7,16 ppm (J_0 8,6 Hz) representando los protones H-13 y 14 semejante al modelo mostrado por el alcaloide chillanamina. La O-metilación de osornina condujo a la obtención de (-)-O-metilosornina (1-12), $C_{39}H_{44}O_7N_2$, cuyo espectro de rmp incluye un singulete extra correspondiente a un grupo metoxilo en C-7' a δ 2,97. Su espectro de rmn está mejor definido que el de la osornina misma, y sus datos de desplazamiento químico se anotan en la estructura 1-12.

1-12

Con la finalidad de asignar correctamente las señales observadas en el espectro de rnm protónica se llevó a cabo un estudio usando el e.n.O. irradiando diversas zonas del espectro. Los resultados de este detallado estudio se encuentran resumidos alrededor de la expresión siguiente, 1-12a.

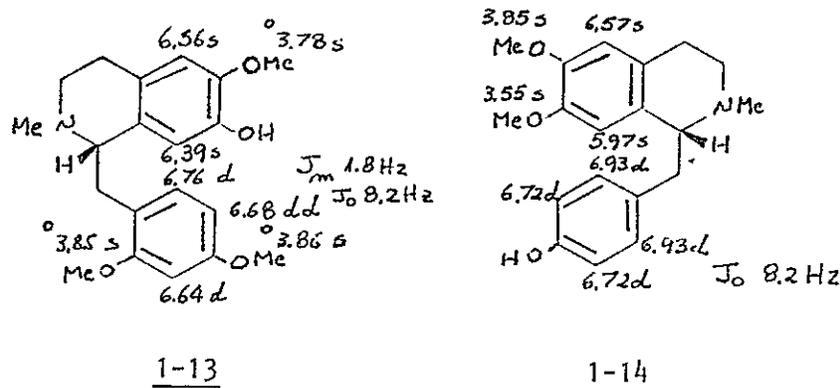


De particular importancia es el incremento de 1% de H-13' ($\delta 7,00$) observado por la irradiación del metoxilo en C-10 ($\delta 3,81$), y el e.n.O. de 2,3% de H-8 ($\delta 4,79$) resultante de la irradiación del metoxilo en C-7' ($\delta 2,97$). En general, como se indica en la figura de más abajo, un grupo metoxilo puede relajarse rápidamente, no pudiendo hacerlo de igual forma un hidrógeno aromático. Se observarán así, e.n.O., diferentes para ambos tipos de



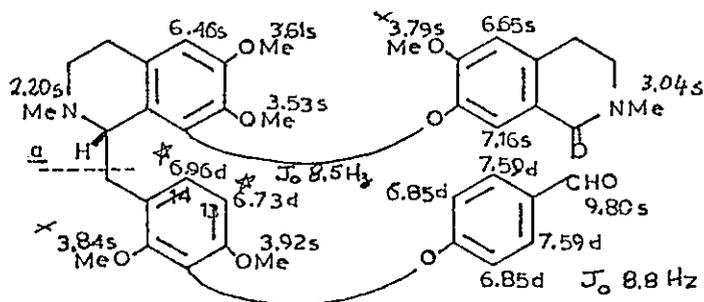
protones, es decir si se irradian los protones metoxílicos se obtendrá un gran e.n.O. para los H aromáticos.

Para conocer la estereoquímica, tanto de osornina, como de la (-)-0-metilosornina se realizó la fisión con sodio en amoníaco líquido del último de los alcaloides nombrados. La reacción produjo las tetrahidrobencilisoquinolinas (+)-(1-13) y (-)-armepavina (1-14) indicando que la estereoquímica de osornina y 0-metilososrnina es SR.



1.3.4.- (-)-Curacautina (1-7)

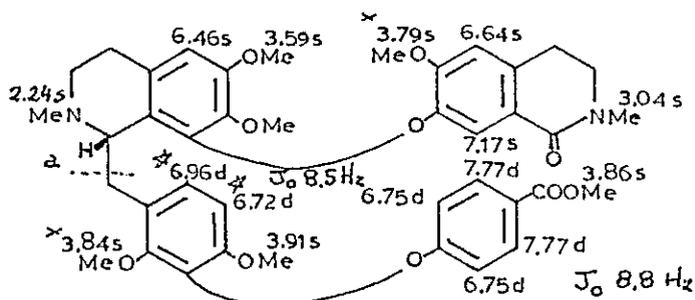
Este compuesto es uno de los dos alcaloides secobisbencilisoquinolínicos aislados en *B. buxifolia*. Su espectro de UV muestra absorciones a $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 207 (4,85), 223 h (4,74), 2,71 (4,35), 282 nm (4,29). En el espectro de IR se observan ν_{max} a 1610, 1640 y 1690 cm^{-1} . El espectro de masas mostró un pequeño ión molecular a m/z 682 ($\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{O}_9\text{N}_2$) y un pico base a m/z 411 debido a la porción a de la molécula. La curva dicroísmo circular con un máximo a 214 nm es consistente con una tetrahidrobencilisoquinolina de configuración S^8 . Tal como se indicó anteriormente la oxidación de (-)-calafatina dio como principal producto el alcaloide (-)-curacautina, idéntico en todas sus propiedades al producto siguiente, siendo característico los dos dobletes (J_o 8,5 Hz) centrados a 6,73 y 6,96 ppm asignables a los átomos de hidrógeno en C-13 y 14.



1-7

1.3.5.- (-)-Talcamina (1-8).

Este alcaloide obtenido en muy bajo rendimiento corresponde al ester metílico del ácido derivado de curacautina (1-7). Su espectro UV mostró absorciones a $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 208 (4,93), 225 h (4,79), 260 (4,41), 272 h (4,27) y 305 nm (3,67) Al IR se observan ν_{max} CHCl_3 a 1605, 1640 y 1710 cm^{-1} . El espectro de masas mostró un pequeño ión molecular a m/z 712 y su pico base se localizó a m/z 411 idéntico al observado para el alcaloide curacautina y debido a la porción a de la molécula. Las curvas de DC son muy similares como puede observarse en la Tabla 1-1, reflejando igual configuración para los alcaloides 1-7 y 1-8. Los datos de espectro rmp se anotan en la estructura 1-8.



1-8

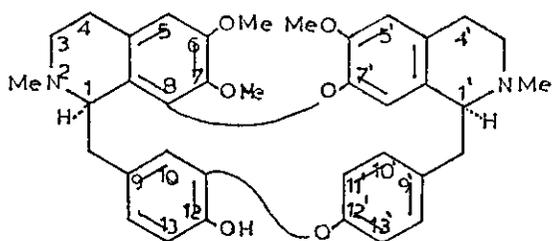
Tabla 1-1 Curvas de disroismo circular de los alcaloides encontrados en Berberis buxifolia

Compuesto	$\Delta\epsilon$ (nm)					
Calafatina	0(300)	+9(247)	0(242)	-18(234)	0(225)	+10(219)
Chillanamina	0(300)	+0.5(271)	0(265)	-6(230)	0(220)	+8.3(212)
Osornina	0(300)	+0.6(282)	0(276)	-2(270)	0(250)	+41(232)
	0(219)	-6.0(209)				
Curacautina	0(320)	-1.5(300)	0(290)	+1.7(281)	+3(263)	0(249)
	-16(230)	0(218)	+4.3(214)			
Talcamina	0(320)	-3(297)	0(266)	+4(252)	0(245)	-23(230)
	0(221)	+14(214)				

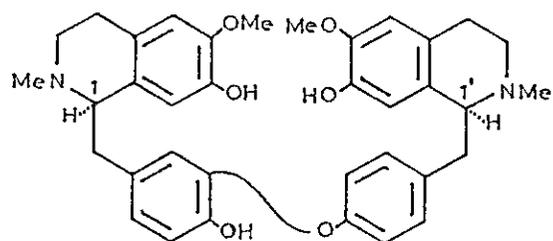
1.4.- Configuración absoluta y consideraciones biogénicas de los alcaloides bisbencilisoquinolínicos aislados de Berberis.

Hasta ahora la quiralidad de los alcaloides bisbencilisoquinolínicos (BBI) ha sido determinada inequívocamente haciendo uso de las reacciones de fisión, con sodio en amoníaco líquido, las que permiten obtener en la mayor parte de los casos, las dos mitades del dímero. Luego, se analizan las curvas de dicroismo circular y el poder rotatorio de ambos fragmentos bencilisoquinolínicos. De los alcaloides encontrados en Berberis buxifolia, sólo a chillanamina no fué posible hacerlo reaccionar con sodio en amoníaco líquido dada la escasez de material. Sin embargo, un estudio cuidadoso de las estructuras de la (-)-calafatina 1-3, chillanamina 1-5, (-)-osornina 1-6, (-)-curacautina 1-7 y (-)-talcamina 1-8 sugiere que todos estos alcaloides están biogénicamente relacionados. Se puede indicar que chillanamina debe incorporar la misma configuración

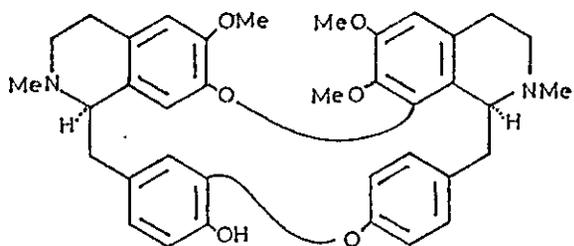
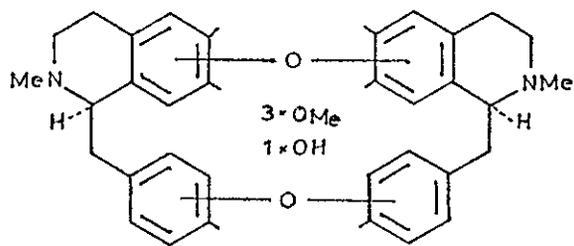
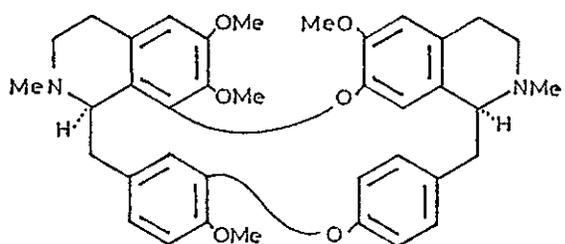
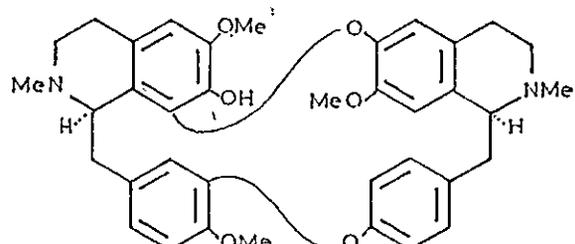
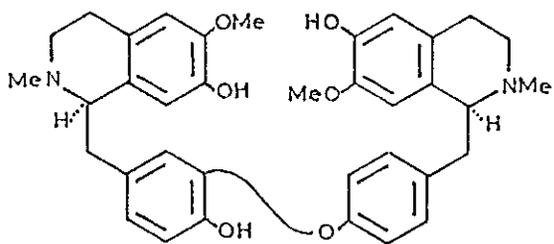
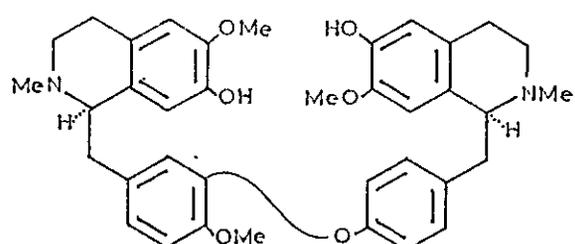
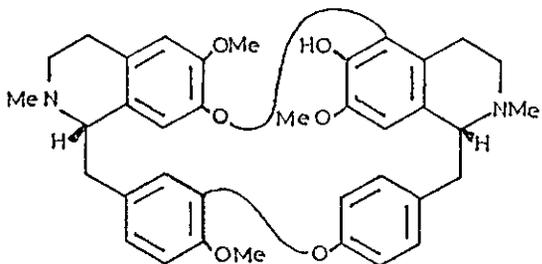
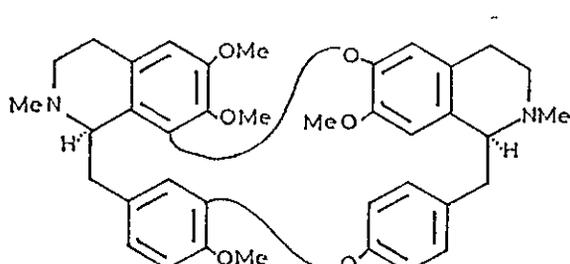
absoluta que sus acompañantes en *B. buxifolia*, de tal forma que H-1 y H-1' están localizados sobre el plano de la molécula, como se dibuja en cada una de las estructuras. Es también importante indicar que todos los alcaloides BBI aislados de las Berberidáceas, como la berbamina (1-15), berbaminina (1-16), oxiacantina (1-17), himantina (1-18), isotetradrina (1-19), belarina (1-20), espinidina (1-21), espinina (1-22), lauberina (1-23), 0-metilisotalicberina (1-24), obaberina (1-25), 2'-N-metilberbamina (1-26), oblongamina (1-27), obamegina (1-28), aromolina (1-29), baluchistina (1-30), 7-0-desmetilisotalicberina (1-31), isotalicberina (1-32), y talrugosina (1-33) incorporan la configuración absoluta 1R, 1'S ó 1S, 1'R, es decir los hidrógenos en los carbonos asimétricos son syn uno respecto del otro, estando ambos sobre o bajo el plano de la molécula.

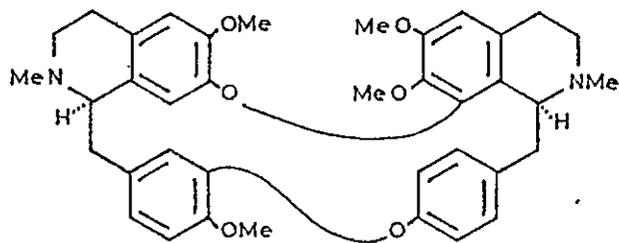
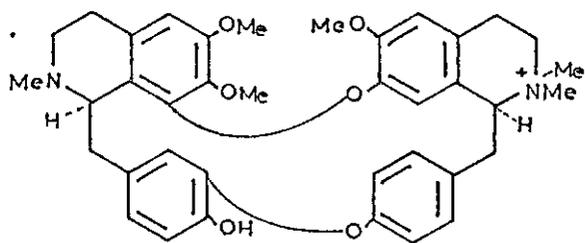
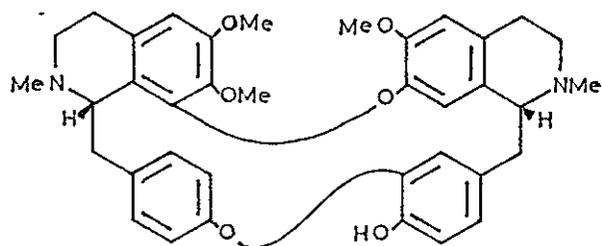
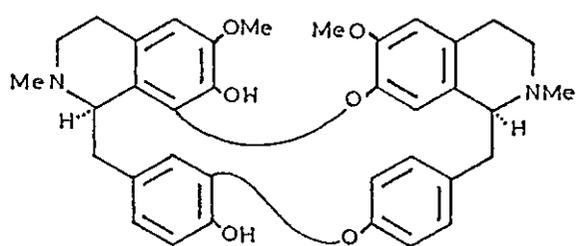
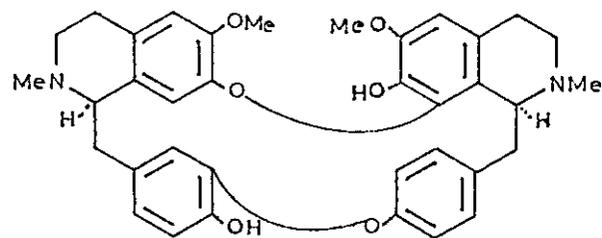
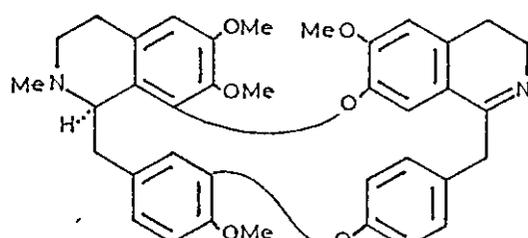
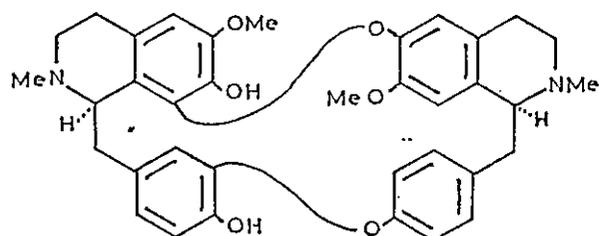
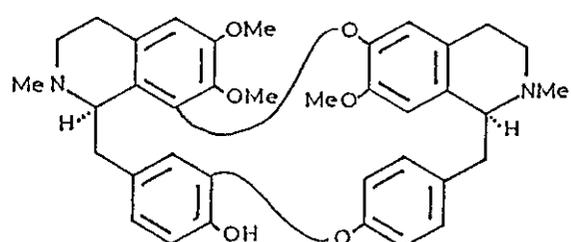
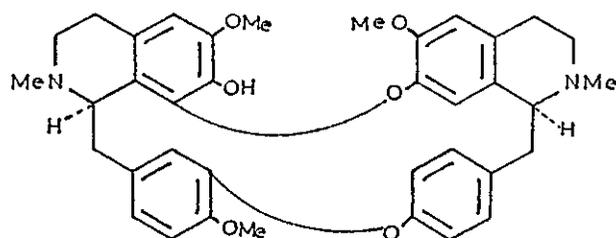


1-15

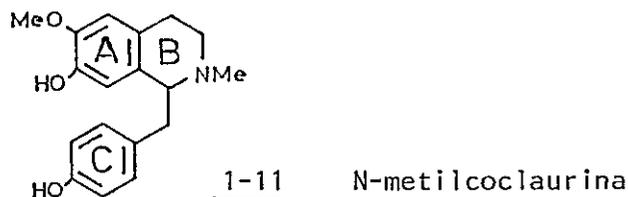


1-16

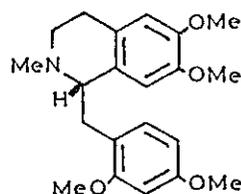
1-171-181-191-201-211-221-231-24

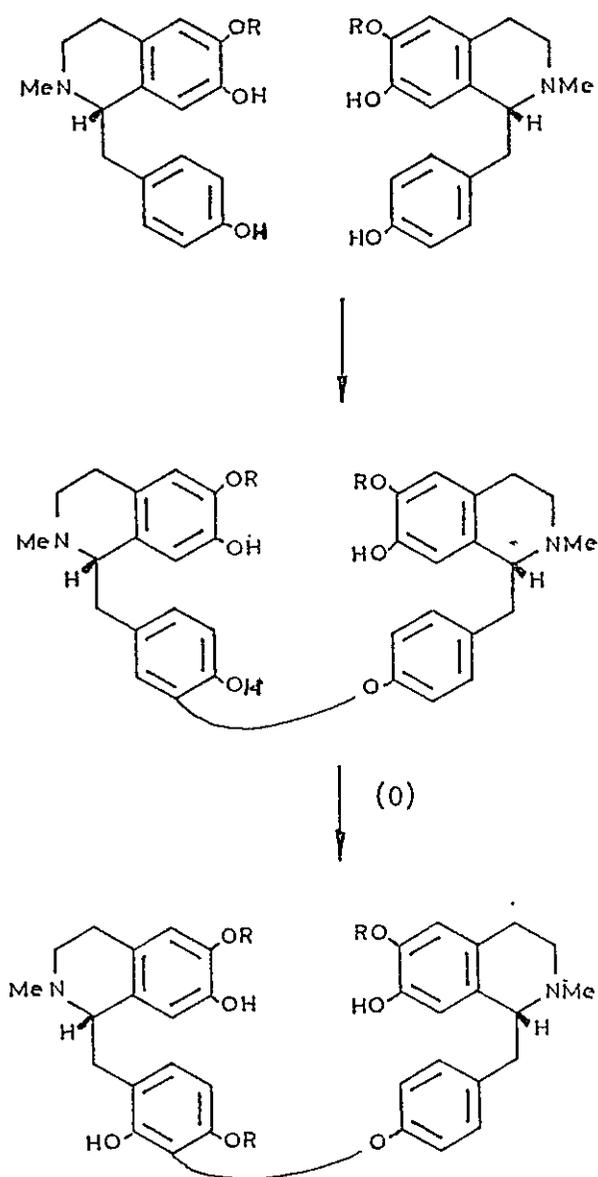
1-251-261-271-281-291-301-311-321-33

Considerando que todos los alcaloides bisbencilisoquinolínicos de rivan del acoplamiento oxidativo de dos unidades N-metilcoclaurínicas (1-11), es posible preguntarse donde se produce



la incorporación de la función oxigenada extra en C-10 presente en todas estos compuestos. Esta cuestión puede responderse con cierto grado de seguridad, ya que monómeros del tipo 1-10 y 1-13 no han sido aislados de fuente natural alguna, de tal forma que no pueden acoplarse oxidativamente con una mitad N-metilcoclaurínica, para dar los alcaloides en B. buxifolia. Las especies 1-10 ó 1-13 tendrían que originarse de una mitad N-metilcoclaurínica que sufre oxidación meta en el anillo C, y tal oxidación es desconocida en la naturaleza. La conclusión es, por lo tanto, que dos N-metilcoclaurinas se combinan cola-cola, y el dímero resultante es luego oxidado enzimáticamente orto al eter diarílico para proporcionar la función oxigenada en C-10. Posteriores O-metilaciones en el estado apropiado darían lugar a la formación de chillanamina (1-5) (figura 1-7).

1-131-10

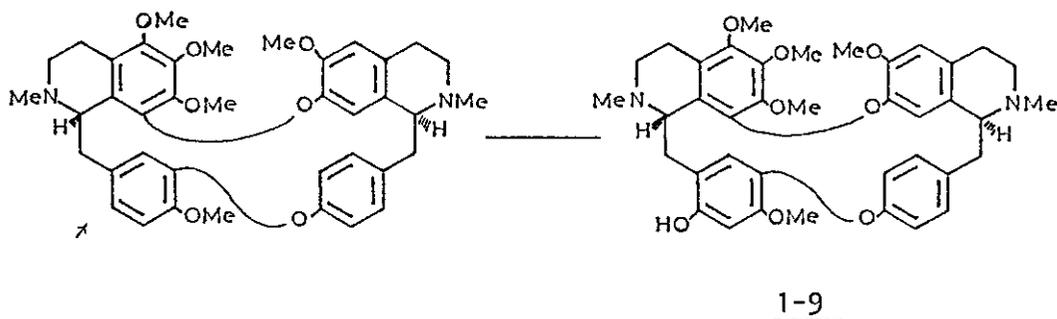


Alcaloide tipo chillanamina

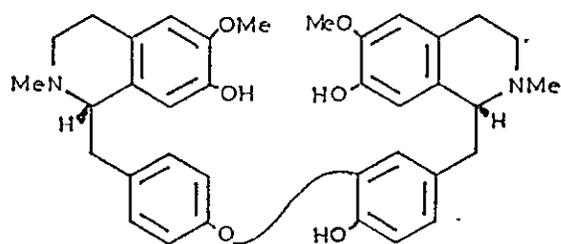
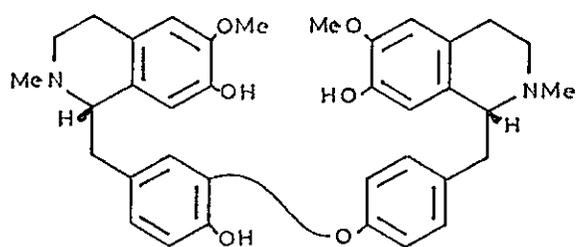
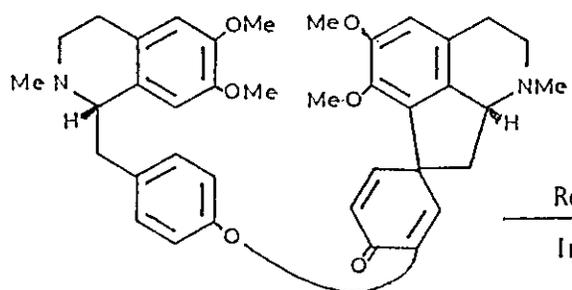
figura 1-7

Origen posible de la posición oxigenada en C-10

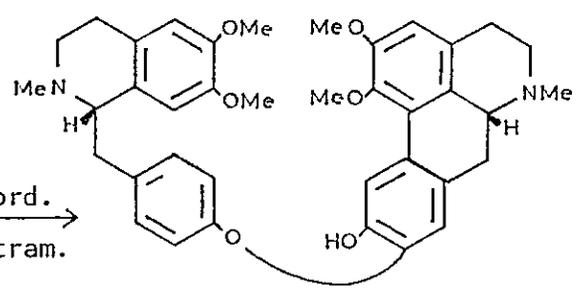
En el caso de los alcaloides del tipo de la talibrunina (1-9), características de las especies del género Thalictrum (Ranunculaceae) la oxidación enzimática tendría que ocurrir en posición para al puente eter diarílico siguiendo un esquema similar al mostrado para los alcaloides aislados de las Berberidáceas:



Otro punto interesante que debe ser analizado en la formación del puente eter diarílico originado por condensación de las dos unidades N-metilcoclaurínicas, es si él origina el alcaloide berbaminina (1-16) o su enantiómero (-)-magnolina (1-34), cuyos modos de dimerización pueden ocurrir en las especies del género Berberis. Como se verá más adelante, sólo berbaminina puede sufrir oxidación fenólica para dar como producto los dímeros proaporfina-bencilisoquinolinas de la serie de la pakistanamina (1-35), la que podría reordenarse en forma intramolecular al dímero 1-O-metilpakistanina (1-39), como queda de manifiesto por el trabajo realizado en la presente tesis y cuya exposición se realiza en la sección 3.13.5. Por otra parte, la (-)-magnolina (1-34) sigue un curso diferente, con uno de los caminos involucrando oxidación orto al puente eter diarílico acompañado por O-metilaciones para originar chillanamina (1-5), tal como se explicó anteriormente.

1-161-341-35

Reord.
Intram.

1-39

1.5.- Berberis chilensis Gillies ex Hook.

Berberis chilensis es una de las especies más abundantes en la Cuenca de Santiago. Esta especie ha sido bastante estudiada desde un punto de vista químico, habiéndose informado la presencia de una serie de nuevos alcaloides, todos ellos del tipo de las bases bisbenciltetrahydroisoquinolínicas⁹⁻¹¹. Todos presentan configuración absoluta 1R, 1'S a diferencia de los dímeros de configuración 1S, 1'R característicos de B. buxifolia Lam. Los alcaloides diméricos aislados en B. chilensis, como se vio en la Sección anterior se forman por condensación de dos unidades N-metilcoclaurínicas, las cuales no incorporan una posición oxigenada extra como en el caso de (-)-calafatina (1-3) y sus derivados. Los alcaloides aislados hasta el momento en la planta son: (+)-berbamina (1-15), (-)-isotalicberina (1-32), 7-O-desmetilisotalicberina (1-31) (-)-O-metilisotalicberina (24), (-)-espinina (22) y (-)-12-O-desmetillauberina (1-36). A continuación se detalla la forma como se realizó la determinación estructural de cada uno de los compuestos mencionados.

1.5.1.- (+)-Berbamina (1-15)

Este compuesto al igual que los restantes fue obtenido, trabajando con las partes aéreas (incluyendo las hojas) de la planta. Fue purificado de una de las fracciones de la columna cromatográfica, mediante recristalización con una mezcla de cloroformo y benceno, fundiendo a 174-175°C. El espectro de UV medido en etanol mostró absorciones a λ_{\max} (log ϵ) 282 nm (3,80). Su $(\alpha)_D$ es igual a + 104°. El espectro de masas mostró un ión molecular a m/z 608 correspondiente a la fórmula molecular $C_{37}H_{40}O_6N_2$, observándose otros fragmentos importantes, característicos de estos compuestos, uno a m/z 396 que representa al pico base

(figura 1-8) y otro a m/z 198 que corresponde al fragmento anterior con doble carga positiva.

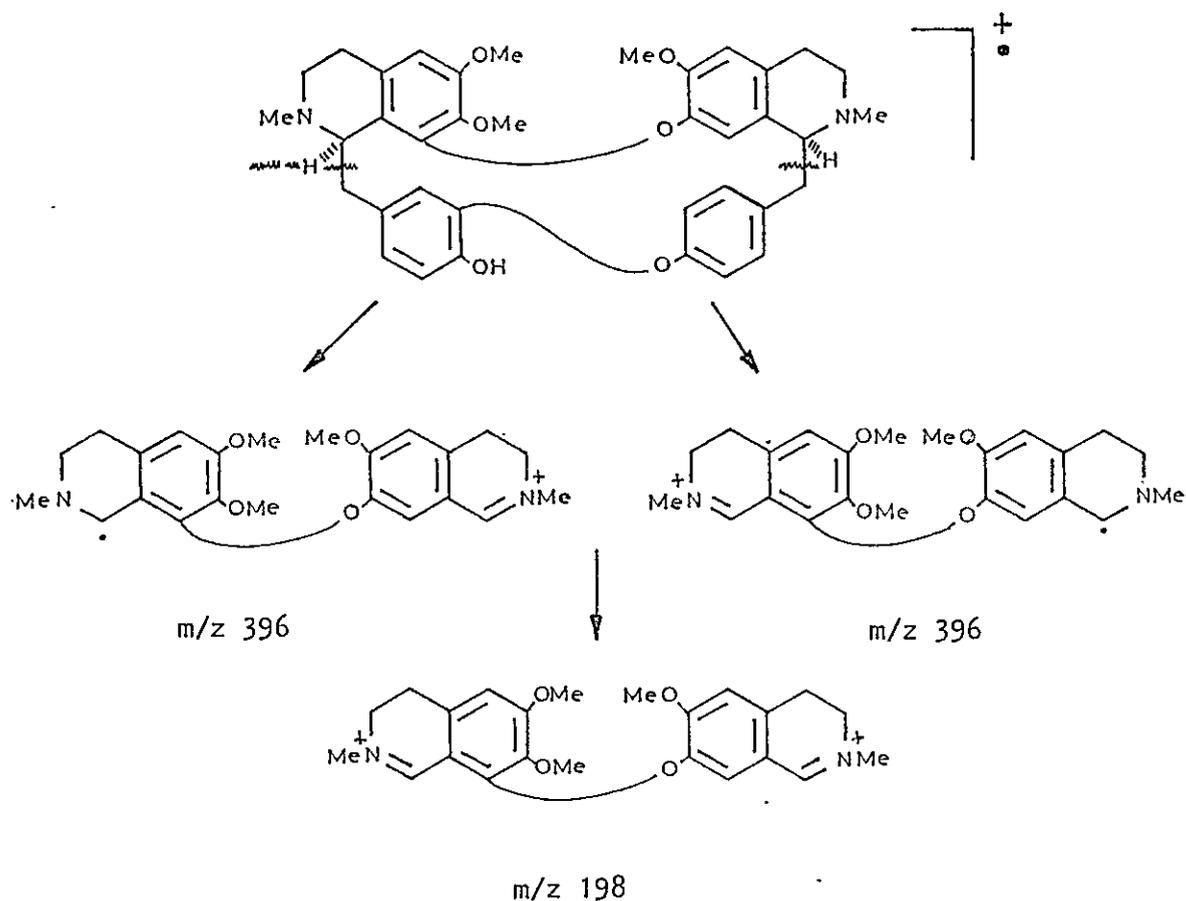
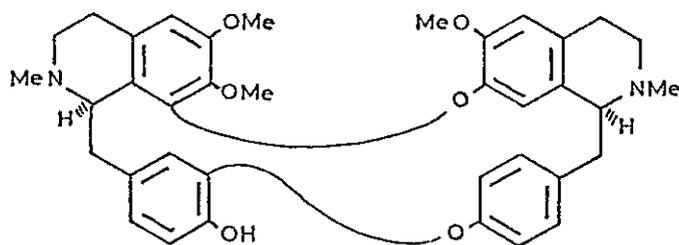


figura 1-8

Fragmentos más importantes registrados en el espectro de masas de la berbamina

El espectro de rmp medido en CDCl_3 a 300 MHz mostró los desplazamientos químicos que se anotan en la estructura misma. Los acoplamientos de los protones aromáticos no se observan con claridad, notándose sólo multipletes mal resueltos.



6.33-6.53	(m A ₂ B ₂ , 4H, ArH)	(+)-berbamina (1-15)
6.68	(s, 2H, Ar H)	
6.90	(s, 1H, Ar H)	
7.10	(d, 1H, Ar H)	

1.5.2.- (-)-Isotalicberina (1-32).

(-)-Isotalicberina (1-32), $(\alpha)_D^{25} -205$ ($c=0.2$, CHCl_3), tiene un peso molecular de 608 con una fórmula molecular de $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_2$. Su espectro de UV mostró absorciones a $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (log ϵ) 284 nm (3,98). El alcaloide fue recristalizado de CHCl_3 -ciclohexano y fundió a 153-155°C. El espectro de masas muestra la fragmentación común en este tipo de compuesto, un ión originado por la pérdida de los anillos C y C' y un pico base correspondiente al mismo fragmento, pero doblemente cargado, tal como se observa en la figura 1-9.

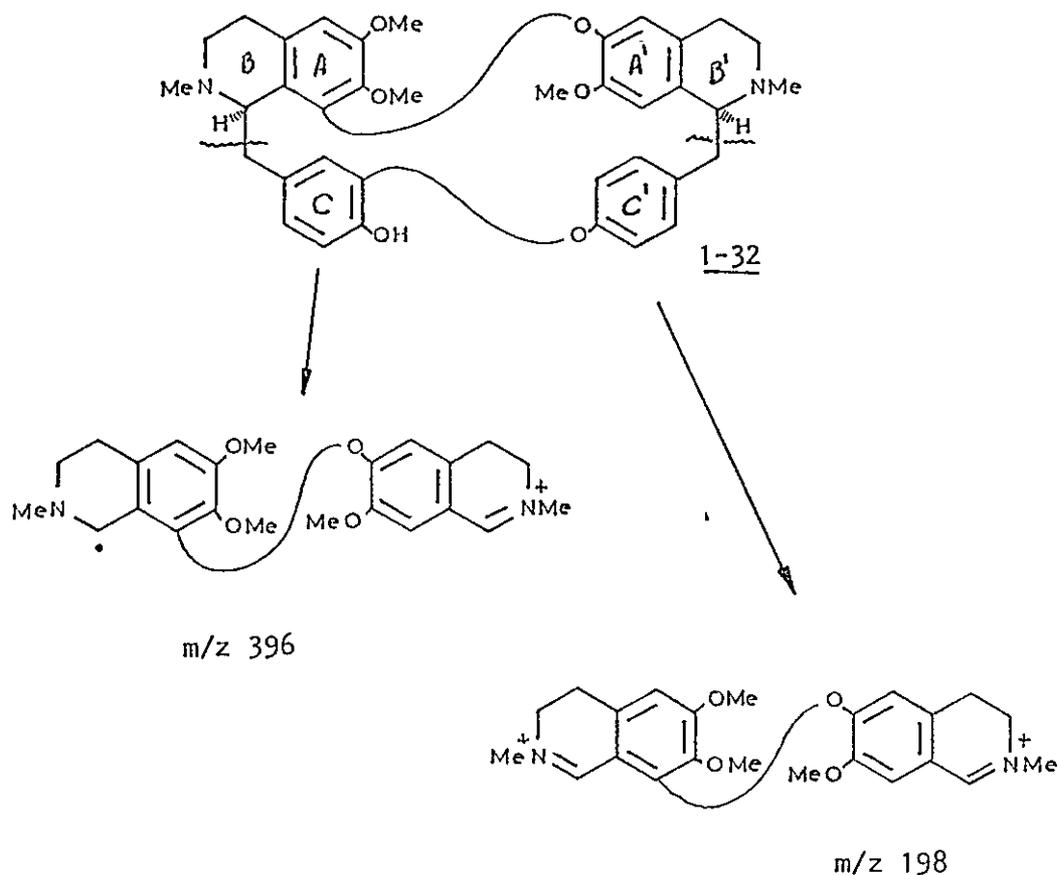
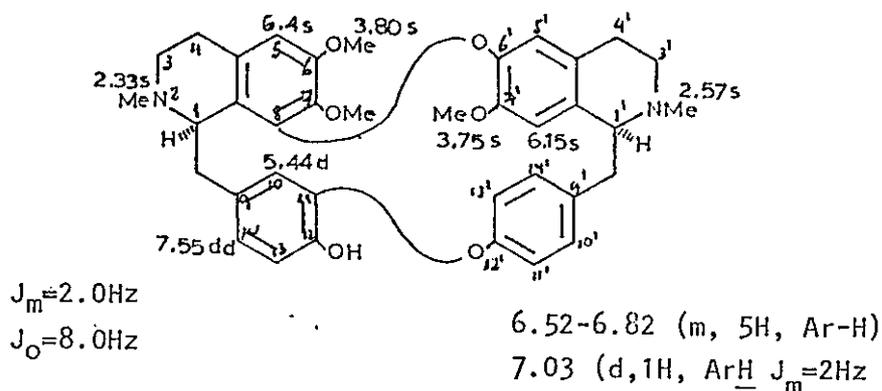


figura 1-9

Esquema de fragmentación del espectro de masas del alcaloide

(-)-isotalicberina (1-32)

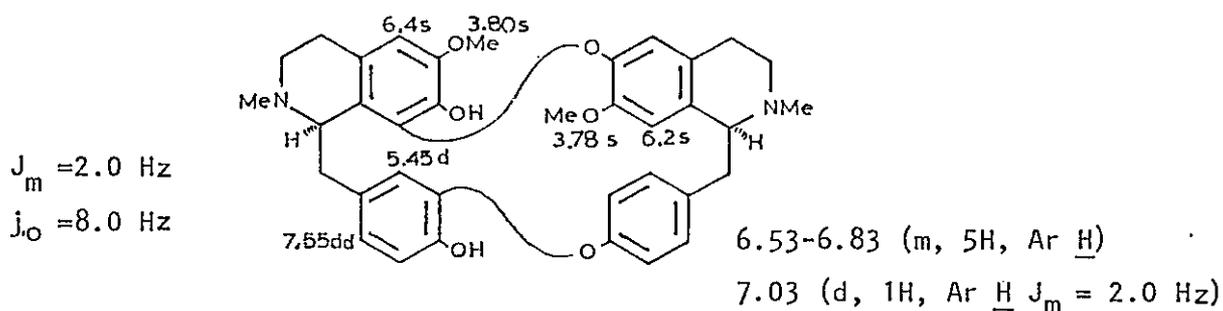
Los espectros de rmp de los alcaloides isotalicberina, (1-32), 0-Metilisotalicberina (1-24), y 7-0-desmetilisotalicberina (1-31) son bastante parecidos en cuanto a los datos que se pueden leer en la bibliografía^{10,11}. Por ejemplo, los protones aromáticos, presentan parecida complejidad con desplazamientos químicos que van desde 5,44 ppm a 7,55 ppm. En la estructura (1-32a) se anotan los δ del alcaloide isotalicberina.



1-32a

1.5.3.- (-)-7-0-desmetilisotalicberina (1-31).

7-0-desmetilisotalicberina, (α)_D²⁵ -230°, tiene un PM de 594 y una fórmula molecular $C_{36}H_{38}O_6N_2$. Como se mencionó, su espectro de rmp es muy similar a la 0-metilisotalicberina (1-24), pero en este caso hay dos metilos menos.



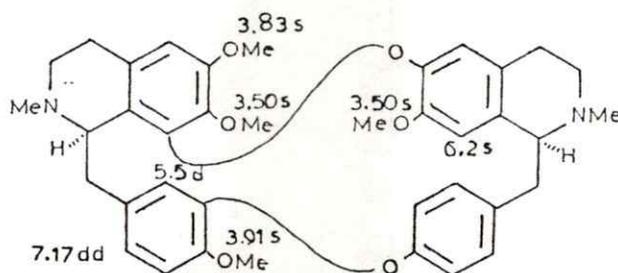
1-31

Como una forma de determinar con exactitud la estructura de la base 7-0-desmetilisotalicberina y de la base isotalicberina se llevó a cabo la permetilación con diazometano en eter, originando en ambos casos un producto idéntico con la 0-metilisotalicberina, previamente aislado de Berberis laurina¹². En cuanto al espectro de masas es aplicable el mismo

esquema de la fig. 1-8, con la diferencia que el pico base se encuentra a m/z 381, que corresponde a la pérdida de los dos anillos inferiores. El fragmento a m/z 381 es el equivalente al de m/z 396 de la figura 1-9, menos CH_3 .

1.5.4.- (-)-0-metilisotalicberina (1-24).

Este compuesto fue aislado por primera vez el año 1965 en una especie uruguaya, Berberis laurina¹². La 0-metilisotalicberina, es un compuesto no-fenólico, que se diferencia de los dos anteriores en un mayor o menor grado de desmetilación. Cristalizó de metanol, fundiendo a 207-208°C. Su poder rotatorio fue de -197° ($c=0,3 \text{ CHCl}_3$). El espectro de masas muestra un ión molecular bastante intenso y su pico base a m/z 198 corresponde a la pérdida de los dos anillos inferiores C y C', el cual se encuentra doblemente cargado. Unos datos del espectro de rmp medido a 300 MHz se escriben en la estructura siguiente 1-24a.

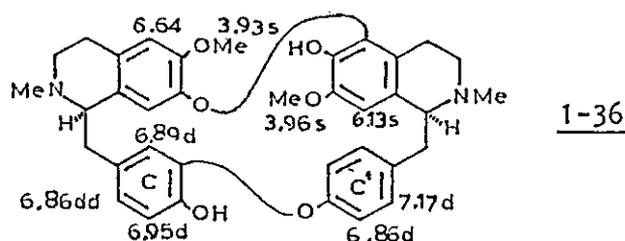


1-24a

1.5.5.- (-)-12-0-desmetillauberina (1-36).

En las XIV Jornadas Chilenas de Química se informó de la presencia de este compuesto y de otra bisbencilisoquinolina, la espinina característico de Berberis laurina¹². La presencia de estas dos bases, junto a las anteriores derivadas de la 0-metilisotalicberina acercan bastante a la especie chilena y a la uruguaya, en cuanto a su contenido en alcaloides. De B. laurina se ha reportado la presencia de 0-metilisotalicberina (1-24), lauberina (1-23), espinina (1-22), espinidina (1-21) y berbamina (1-15)¹⁰.

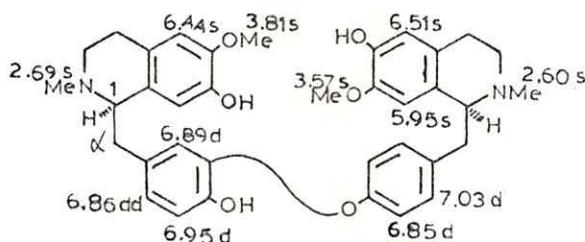
12-0-desmetillauberina (1-36) fue obtenido de una de las fracciones de una columna cromatográfica, que contenía dos alcaloides, uno de los cuales se obtuvo por cristalización con benceno, resultando ser la 7-0-desmetilisotalicberina. Las aguas madres de los cristales, mostraron por ccf la presencia de un alcaloide minoritario, el cual se purificó por repetidas placas preparativas, dando origen a un compuesto amorfo caracterizado como la 12-0-desmetillauberina. Este último presenta un (α) -334°, con un espectro de masas que contiene a los fragmentos a m/z 594 ($C_{36}H_{38}O_6N_2$), m/z 382 y 381. Estos dos últimos representan la pérdida de los anillos C y C', tal como ocurre en la 0-metilisotalicberina y derivados (ver figura 1-9).



El espectro de rmp medido a 200 MHz en $CDCl_3$ presenta los desplazamientos químicos dibujados en la estructura.

1.5.6.- (-)-Espinina (1-22)

Espinina (1-22) fue obtenido como un sólido amorfo, $(\alpha)_D^{20} -13^\circ$ (Metanol). Su espectro de masas mostró un ión molecular casi imperceptible (1%), con un pico base a m/z 192 formado por la ruptura de la unión C-1, C- α . El espectro de rmp medido a 360 MHz en $CDCl_3$ reportó los datos que se anotan en la estructura.



1-22

1.6.- Berberis empetrifolia Lam.

1.6.1.- Características generales¹³

Berberis empetrifolia Lam. (Nombre común: "michay, zarcilla") es una especie que crece en ambas vertientes de la Cordillera de los Andes, desde Santiago a la Patagonia Austral, donde baja al nivel del mar.

Arbusto bajo, a veces decumbente, de ramas retorcidas y entre nudos cortos; espinas partidas, más cortas que sus hojas coriáceas, lineares, mucronadas, de borde doblado hacia abajo. Flores solitarias o reunidas de a dos; estambres cortos apendiculados. El fruto es una baya esférica, comestible, negro vinoso, con fuerte rocío glauco que le comunica un viso azulado.

En el sistema de Ahrendt, Berberis empetrifolia está clasificado en la Sección Buxifolia, Subsección Empetrofilia a la cual pertenecen cuatro especies sin datos completos de su distribución:

1.- B. empetrifolia var. empetrifolia

Provincia Magallanes, Prov. Santiago, Prov. Ñuble y Prov. Valdivia.

2.- B. empetrifolia var. magellanica Schneid.

Prov. Magallanes

3.- B. wawrana Schneid.

Prov. Colchagua

4.- B. mutabilis Phil.

Prov. Maule, Hacienda de Cauquenes, Cajón del Arriero, Prov. Valdivia y Villarrica.

1.6.2. Estudio químico de Berberis empetrifolia Lam.

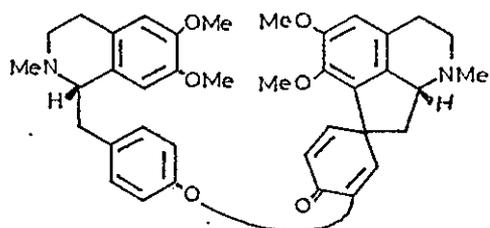
De todos los trabajos realizados en la planta, ninguno merecía confianza en cuanto a la composición alcaloidal. En un trabajo antiguo¹⁴ se informa de la presencia de berberina, berbamina y oxiacantina sin ningún tipo de prueba. De los alcaloides mencionados sólo berberina pudo ser identificado.

Berberina es el alcaloide mayoritario en todas las especies estudiadas.

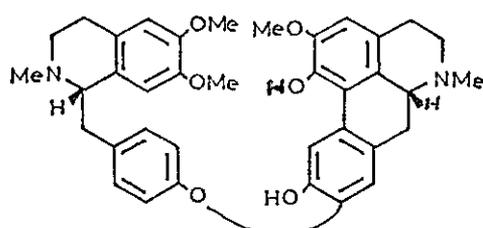
1.6.3.- Objetivos del trabajo.

Las especies del género Berberis, pertenecientes a la familia de las Berberidáceas, han producido una serie de alcaloides isoquinolínicos nuevos y muy novedosos. En particular, un estudio de 4 especies del género Berberis cosechadas en Pakistan¹⁵⁻¹⁷, produjo hasta ahora un solo alcaloide dimérico del tipo de las proaporfinas-bencilisoquinolinas, la pakistanami na (1-35)¹⁶, así también como una variedad de dímeros aporfina-benciliso-

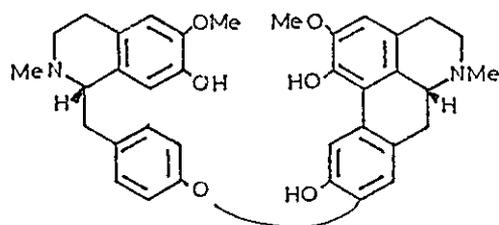
quinolinas, entre las cuales se puede incluir la pakistanina (1-37), chitralina (1-38), 1-0-metilpakistanina (1-39), kiberina (1-40), y kalashina (1-41).



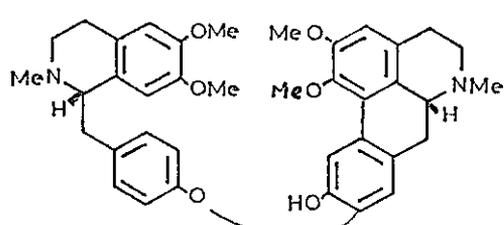
1-35



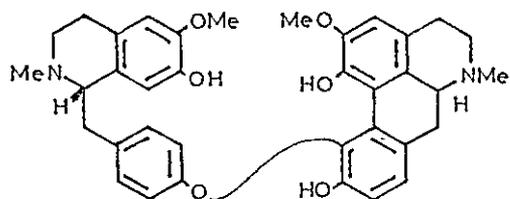
1-37



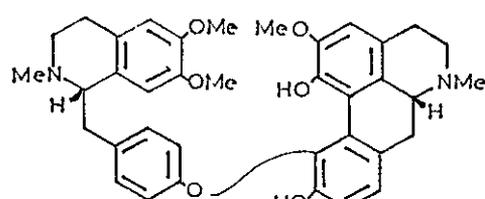
1-38



1-39



1-40



1-41

Con la intención de ubicar otros compuestos fenólicos análogos a la pakistanamina (1-35) que ayudaría a explicar la secuencia biogenética que conduce a los dímeros aporfina-bencilisoquinolinas, se decidió realizar un estudio de las abundantes especies del género Berberis chilenas distribuidas desde Antofagasta hasta el Archipiélago de Tierra del Fuego con

cerca de 50 especies descritas. El estudio químico que comenzó con Berberis buxifolia, continuó con B. empetrifolia y los resultados obtenidos en ésta última especie constituyen el aporte original de la presente tesis.

Berberis nra
Berberis
Did. lucion
C. O. tallo grueso a 700m
Berberis dioica

PARTE EXPERIMENTAL

Cual Nardunino *EM*
MT-14

2.1.- Material Vegetal

La corteza y madera de tallos subterráneos de Berberis empetrifolia fue recolectada a 70 km de Punta Arenas sobre el Seno Otway, a orillas del mar en Febrero de 1981. La identificación fue realizada por el Sr. Edmundo Pisano del Instituto de la Patagonia, donde se mantiene la especie en herbario.

2.2.- Antecedentes Generales

La mayor parte de los alcaloides se obtuvieron como sólido amorfo y en aquellos casos donde fue posible su cristalización se determinó su punto de fusión en un aparato de Kofler. Los espectros de rnm fueron registrados a 200 o 360 MHz usando TMS como referencia interna, en un aparato Bruker 200 MHz Supercom (TF) y Bruker 360 MHz Supercom (TF) en soluciones de CDCl_3 . Los espectros de UV se registraron en un aparato Hewlett-Packard 8450 A UV/VIS en soluciones de metanol. Los espectros de IR se registraron en un aparato Perkin Elmer, usando soluciones de CHCl_3 o pastillas de KBr. Los espectros de masas fueron registrados con fragmentación inducida por impacto electrónico a 70 eV en un aparato AEI MS-902. Las medidas de Dicroísmo circular fueron realizadas en un espectropolarímetro Jasco-20. Para la cromatografía en capa fina se utilizaron los siguientes sistemas : CHCl_3 -MeOH (9:1) (Sistema A), CHCl_3 -MeOH (8:2) (Sistema B), Et_2NH - CHCl_3 (1:9) (Sistema C), C_6H_6 -Acetona- NH_4OH (60:60:1,5) (Sistema D) en capas de gel de sílice preempacadas Merck de un espesor de 0,2 y 0,5 mm. Las últimas fueron usadas en forma preparativa, revelándolas con reactivo de Dragendorff o ácido cloroplatínico. La rotación óptica (α) fue medida en un instrumento Perkin Elmer 420. En los

diagramas, los desplazamientos químicos con idéntico exponente (ϵ , #, o, *, etc) son intercambiables.

2.3.- Extracción y fraccionamiento preliminar de Berberis empetrifolia Lam.

La planta fue secada al aire y molida obteniéndose 20 kg. de polvo el que fue agotado con metanol frío durante una semana, lavándose periódicamente con solvente puro. La solución metanólica fue concentrada a no más de 40° C de temperatura en un evaporador rotatorio. El residuo obtenido fue luego tratado varias veces con una solución acuosa de HCl 5% p/v. El volumen total de ácido usado fue de 10 l.

El extracto ácido fue alcalinizada con hidróxido de amonio a pH 9-10 y extraído con CHCl_3 para dar 62 g de alcaloides crudos, luego de lavar, secar y evaporar el solvente en un evaporador rotatorio a 30° C.

2.4.- Aislamiento de Alcaloides.

Los 62 g del crudo fueron disueltos en 200 ml de cloroformo y ubicados en una columna cromatográfica rellena en húmedo con gel de sílice 60 Merck (2,5 kg). La elución fue realizada con CHCl_3 (15 l) y CHCl_3 -MeOH de polaridad creciente. Se recogieron cerca de 400 fracciones de aproximadamente 100 ml cada una contadas desde el momento que comienza a producirse reacción positiva en los eluatos. Esto ocurre cuando se está eluyendo con una concentración de MeOH en CHCl_3 de 2% v/v.

2.5.- Identificación de los Alcaloides.

2.5.1.- Puntarenina (3-6)

De las primeras fracciones de la columna (5 a 11), reunidas una vez analizadas por ccf analítica en el Sistema A, se obtuvo un compuesto que cristalizó de MeOH y fundió a 214-216°C. Se obtuvieron 46 mg de

este alcaloide en forma racémica. El análisis mediante espectrometría de masas de alta resolución dio un ión molecular M^+ de m/z 381 calculado para $C_{21}H_{19}O_6N$.

RMN $CDCl_3$: a 360 MHz

C-6 <u>H</u>	δ 3.00, 4.60	(2H, tt, $J_1=6.0$ $J_2=19$ Hz)
C-5 <u>H</u>	3.24, 3.32	(2H, dd, $J_1=8.0$ $J_2=13$ Hz)
C-9 <u>H</u>	3.00, 3.88	(2H, d, $J_{gem}=19$ Hz)
C-10 OCH_3	3,81	(3H, singlete)
C-11 OCH_3	3.89	(3H, singlete)
C-2,3 OCH_2O	6.023, 6.029	(2H, d, $J=1.3$ Hz)
C-1,4 <u>H</u>	6.73, 7.21	(2H, singletes)
C-12,13 <u>H</u>	6.90, 7.07	(2H, d, $J_O=8.5$ Hz)

IR : ($CHCl_3$)

1642 cm^{-1}	(amida)
1690	(cetona conjugada)

UV :

λ_{max}^{MeOH}	$\log \epsilon$
231	3.93
278	3.45
316	3.44

Espectro de masas :

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
381	50	$M^+(C_{21}H_{19}O_6N)$
352	100	m/z (381-CO-H)
205	28	
190	21	m/z (205-CH ₃)

Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13 (RMC) en CDCl₃.

C-5	δ 32.0	C-9a	124.1 ^x
C-9	33.0	C-13a	125.9 ^x
C-6	42.0	C-4a	130.8 ^ε
11-OCH ₃	55.8 ⁺	C-15a	134.5 ^ε
10-OCH ₃	60.7 ⁺		
C-14	66.7	C-2	142.5 [#]
OCH ₂ O	102.0	C-11	145.5 [#]
C-1	108.7	C-3	152.1 ^o
C-4	109.9	C-10	152.5 ^o
C-12	110.5	C-8	169.0
C-13	123.5	C-15	198.9

2.5.2.- Conversión de Puntarenina al acetato enólico (3-10).

Puntarenina (3-6) (10mg) se disolvió en 0.5 ml de piridina, se añadió 0.5 ml de anhídrido acético; y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 hrs. Se agregaron 3 ml de EtOH y se concentró a sequedad, repitiendo estas operaciones hasta eliminación del olor a piridina. Se obtuvieron 8 mg los que fueron purificados en una placa de 0.25 mm de espesor en el Sistema A.

Se recuperaron 6 mg de compuesto puro.

Análisis por espectrometría de masas

M^+ calculado para $C_{23}H_{21}O_7N$: m/z 423

RMN : 360 MHz (TF) en $CDCl_3$

\underline{CH}_3 -CO	δ 2.18	(3H, s)
C-5 \underline{H}	3.10	(2H, t, $J=8.0$ Hz)
C-9 \underline{H}	3.60	(2H, s)
C-10 OCH_3	3.83	(3H, s)
C-11 OCH_3	3.90	(3H, s)
C-6 \underline{H}	4.03	(2H, t, $J=6.0$ Hz)
OCH_2O	5.98	(2H, s)
C-1,4 \underline{H}	6.75 ⁺ , 6.72 ⁺	(2H, s)
C-12,13 \underline{H}	6.82, 7.13	(2H, d, $J=8.3$ Hz)

IR $CHCl_3$:

1655 cm^{-1}	(amida)
1755	(acetato enólico)

UV : λ	MeOH	Log ϵ
	max	
210 nm		4.02
318		3.65

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
423	33	$M^+(C_{23}H_{21}O_7N)$
380	100	M^+-CH_3CO
352	38	m/z (380-CO)
205	7	

2.5.3.- Conversión de puntarenina en dihidropuntarenina (3-11)

A 15 mg de puntarenina (3-6) disueltos en MeOH (3 ml) se le agregó NaBH_4 (alrededor de 15 mg) en pequeñas porciones por espacio de 5 minutos. La mezcla fue dejada en la oscuridad durante toda la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente fue disuelta en agua (10 ml), y extraída con CHCl_3 (2 x 10 ml). Las capas orgánicas fueron lavadas con agua, secadas sobre K_2CO_3 y evaporadas. Posteriormente, el compuesto dihidropuntarenina obtenido fue purificado en ccf usando el Sistema A.

Análisis por espectrometría de masas:

M^+ calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}$: m/z 383

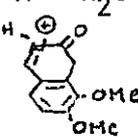
RMP : 360 MHz (TF) CDCl_3

C-5 $\underline{\text{H}} \alpha$	δ 2.67	(1H, dd, $J_1=5.0\text{Hz}$, $J_2=14.0\text{ Hz}$)
C-6 $\underline{\text{H}} \alpha$	2.81	(1H, t, $J=12.5\text{ Hz}$)
C-5 $\underline{\text{H}} \beta$	3.50	(1H, t, $J=12.5\text{ Hz}$)
C-9 $\underline{\text{H}}$	3.72, 3.84	(2H, d, $J_{\text{gem}}=21\text{ Hz}$)
C-10 OCH_3	3.83	(3H, s)
C-11 OCH_3	3.88	(3H, s)
C-14 $\underline{\text{H}}$	4.63 ⁺	(1H, s)
C-15 $\underline{\text{H}}$	4.73 ⁺	(1H, s)
C-6 $\underline{\text{H}} \beta$	4.93	(1H, dd, $J_1=5$, $J_2=14.0\text{ Hz}$)
OCH_2O	5.95, 5.97	(2H, d, $J=1.5\text{ Hz}$)
C-1,4 $\underline{\text{H}}$	6.68, 6.73	(2H, singuletes)
C-12,13 $\underline{\text{H}}$	6.87, 6.94	(2H, d, $J_{\text{O}} = 8.3\text{ Hz}$)

IR(CHCl₃) 1635 cm⁻¹ (amida)
3610 (hidroxilo)

UV : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ log ϵ
212 nm 4.46
283 3.65

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
383	29	M ⁺ (C ₂₁ H ₂₁ O ₆ N)
365	6	M ⁺ - H ₂ O
205	100	

2.5.4.- Preparación de acetato de dihidropuntarenina (3-12)

Dihidropuntarenina (3-12), (10mg) se disolvió en 0.5 ml de piridina para luego agregar 0.5 ml de anhídrido acético. Entonces se procedió de igual forma que como se realizó en la preparación del acetato enólico. Su purificación se llevó a cabo mediante ccf, usando el Sistema A.

Análisis por espectrometría de masas:

M⁺ calculado para C₂₃H₂₃O₇N : m/z 425

RMN 360 MHz (TF) en CDCl_3

CH_3CO	δ 1.93	(3H, s)
C-5 $\underline{\text{H}} \alpha$	2.69	(1H, dd, $J_1=5.5$, $J_2=15.7$ Hz)
C-6 $\underline{\text{H}} \alpha$	2.84	(1H, t, $J=12.2$ Hz)
C-5 $\underline{\text{H}} \beta$	3.39	(1H, t, $J=12.2$ Hz)
C-9 $\underline{\text{H}} \alpha$	3.54	(1H, d, $J_{\text{gem}}=21.3$ Hz)
C-9 $\underline{\text{H}} \beta$	3.88	(1H, d, $J_{\text{gem}}=21.3$ Hz)
C-10 OCH_3	3.83	(3H, s)
C-11 OCH_3	3.88	(3H, s)
C-14 $\underline{\text{H}}$	4.81	(1H, s)
C-6 $\underline{\text{H}}$	4.98	(1H, dd, $J_1=5.4$, $J_2=15.4$ Hz)
C-15 $\underline{\text{H}}$	5.69	(1H, s)
OCH_2O	5.94, 5.95	(2H, d, $J=1$ Hz)
C-1,4 $\underline{\text{H}}$	6.93, 6.66	(2H, singletes)
C-12,13 $\underline{\text{H}}$	6.88, 6.97	(2H, d, $J=8.5$ Hz)

RMN-ENO (efecto nuclear Overhauser): CDCl_3 a 360 MHz

<u>Protón Irradiado</u>	<u>δppm</u>	<u>Señal Observada (δ)</u>	<u>% Incremento</u>
$\text{H}\alpha$ -5	2.87	$\text{H}\beta$ -5 (3.39) H -4 (6.66)	6.3 7.8
$\text{H}\alpha$ -6	2.84	$\text{H}\beta$ -6 (4.98) H-14 (4.81)	16.3 10.0
$\text{H}\beta$ -5	2.39	H- α 5 (2.69)	12.5
$\text{H}\beta$ -9	3.88	$\text{H}\alpha$ -9 (3.54)	3.8
10-Ome	3.83	$\text{H}\alpha$ -9 (3.54)	5.0
11-Ome	3.88	H -12 (6.88)	16.0
H -14	4.81	$\text{H}\alpha$ -6 (2.84) $\text{H}\alpha$ -15 (5.69) H -13 (6.97)	10.0 8.1 15.0

H β -6	4.98	H α -6 (2.84)	10.0
H α -15	5.69	H -14 (4,81)	6,3)
		H -1 (6.93)	37.0
		H -13 (6.97)	8.8
H -4	6.66	H α -5 (2.69)	7.5
H -12	6.88	H-OMe (3.88)	2.7
		H -13 (6.97)	5.7

2.5.5.- Natalinamina (3-23)

De las fracciones 17 a 21 se obtuvo una mezcla de alcaloides difíciles de separar mediante ccf preparativa. Por lo tanto, se usó una pequeña columna, empacada con no más de 10 g de gel de sílice, usada comúnmente en la preparación de placas finas. A lo largo del trabajo fue muy común el uso de estas pequeñas columnas, eluyendo con el Sistema A o B. En la separación de las fracciones 17-21 se eluyó con la mezcla de MeOH en CHCl₃ (90:10) (Sistema A) con bastante buen resultado. Directamente de la columna en forma pura se obtuvo el alcaloide aporfínico, bautizado natalinamina. El compuesto fue obtenido como un sólido amorfo, (α)-29° (c=0.04 metanol).

DC : $\Delta\epsilon$ (nm) + 1.9 (300), + 4.2 (274), -23 (239)

Análisis por espectroscopía de masas:

M⁺ para C₂₆H₂₇O₅N : m/z 433

RMN : 200 MHz en CDCl₃

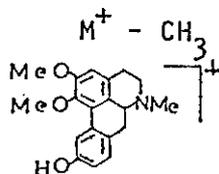
N-CH ₃	δ 2.65	(3H, singlete)
C-1 OCH ₃	3,73	(3H, singlete)
C-2 OCH ₃	3.89	(3H, singlete)
C-4' CH ₂ OH	4.70	(2H, singlete)
C-3 H	6.63	(1H, singlete)

C-8 <u>H</u>	6.71	(1H, singulete)
C-2', 6' <u>H</u>	7.09	(2H, doblete, J=8.55 Hz)
C-3', 5' <u>H</u>	7.39	(2H, doblete, J=8.55 Hz)
C-11 <u>H</u>	8.13	(1H, singulete)

UV : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	log ϵ
217 nm	4.69
277	3.36
304	3.13

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
433	65	M^+ ($C_{26}H_{27}O_5N$)
432	100	$M^+ - H\cdot$
418	47	$M^+ - CH_3$
310	4	



2.5.6.- Isotetrandina (1-19).

Otro de los compuestos obtenidos de la pequeña columna anterior, fue la isotetrandina, una bisbenzylisoquinolina conocida previamente en cinco especies del género Berberis. Este compuesto fue idéntico en todas sus propiedades a una muestra patrón de la colección del Profesor Dr. M. Shamma.

Análisis por espectrometría de masas:

M^+ para $C_{38}H_{42}O_6N_2$: m/z 622

RMN : 200 MHz en $CDCl_3$

N- $\underline{CH_3}$	δ 2.23	(3H, singulete)
N- $\underline{CH_3}$	2.54	(3H, singulete)
C-7 $\underline{OCH_3}$	3.10	(3H, singulete)
C-6' $\underline{OCH_3}$	3.58	(3H? singulete)
C-6 $\underline{OCH_3}$	3.71	(3H, singulete)
C-12 $\underline{OCH_3}$	3.88	(3H, singulete)
C-8' \underline{H}	5.97	(1H, singulete)
C-5,5' \underline{H}	6.25,6.51	(2H, singuletes)
C-10',11',13', 14'H	6.42,6.66, 7.11,7.29	(4H, 4q, $J_m=2.44$, $J_o=8.24$ Hz)
C-10,13,14 \underline{H}	6.80	(3H, singulete)

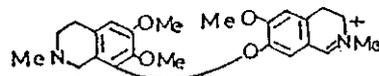
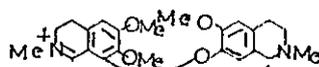
UV : λ MeOH max	log ϵ
283 nm	3.65

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
622	100	M^+ ($C_{38}H_{42}O_6N$)

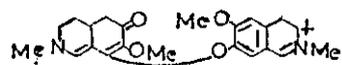
396

82



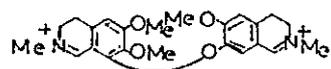
381

55



198

38



2.5.7.- Oxiberberina (3-20).

Las fracciones 26 a 31 contenían principalmente un alcaloide, que al ser analizado en ccf daba una coloración azul, más o menos a los diez segundos de revelar con reactivo de Dragendorff. Este compuesto fue obtenido en forma pura, de una placa de gel de sílice preparativa, revelando uno de los costados de la placa.

El espectro de masas tomado a baja resolución mostró un ión molecular a m/z 351 ($C_{20}H_{17}NO_5$), que también correspondía al pico base.

RMN : 200 MHz en $CDCl_3$

C-5 <u>H</u>	δ 2.89	(2H, triplete)
C-9 <u>OCH₃</u>	3.95	(3H, singulete)
C-10 <u>OCH₃</u>	4.01	(3H, singulete)
C-6 <u>H</u>	4.29	(2H, triplete)
<u>OCH₂O</u>	6.01	(2H, singulete)
C-4 <u>H</u>	6.71 ^a	(1H, singulete)
C-10 <u>H</u>	6.73 ^a	(1H, singulete)
C-1 <u>H</u>	7.22	(1H, singulete)
C-13 <u>H</u>	7.30 ^b	(1H, singulete)
C-12 <u>H</u>	7.31 ^b	(1H, singulete)

UV : λ_{max} MeOH	log ϵ
228	4.39
340	4.09

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
351	100	M^+ ($C_{20}H_{17}O_5N$)
336	97	$M^+ - CH_3$

2.5.8.- Chilenina (3-3)

Desde la fracción 35 se cambió la concentración del solvente de 2% de MeOH en $CHCl_3$ al 4%, para a partir de la fracción 41 comenzar a recibir un alcaloide que fue purificado por ccf preparativa, usando el Sistema A. Se obtuvo 20 mg de este novedoso alcaloide, ópticamente inactivo.

Análisis por espectrometría de masas:

M^+ para $C_{20}H_{17}O_5N$: m/z 383 El espectro fue corrido a baja resolución.

RMN : 200 MHz (TF) en $CDCl_3$

C-5 <u>H</u>	δ 3.08, 3.56	(2H, cuartetos, $J_1=3.5$ $J_2=7.0$ $J_3=14$ Hz)
C-6 <u>H</u>	3.28, 4.25	(2H, cuartetos, $J_1=4.0$ $J_2=9.0$ $J_3=15$ Hz)
C-10 <u>OCH₃</u>	3.88	(3H, singulete)
C-9 <u>OCH₃</u>	4.00	(3H, singulete)
<u>OCH₂O</u>	5.95, 5.97	(2H, dobletes, $J=1.2$ Hz)
C-4 <u>H</u>	6.67	(1H, singulete)

C-1 <u>H</u>	6.72	(1H, singulete)
C-12 <u>H</u>	7.04 ⁺	(1H, doblete, J ₀ =8.2 Hz)
C-11 <u>H</u>	7.37 ⁺	(1H, doblete, J ₀ =8.2 Hz)

IR: (CHCl₃)

1690 cm ⁻¹	(lactama)
1720	(cetona conjugada)
3450	(hidroxilo)

UV :	λ	MeOH max	log ε
	211	nm	4.39
	228	h	4.25
	281	h	3.68
	312		3.72

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
383	17	M ⁺ (C ₂₀ H ₁₇ O ₇ N)

2.5.9.- Nandinina (3-17).

De la fracción 44 a la 59 se recibió un compuesto muy inestable, que fue purificado por ccf, usando el Sistema C. Fue muy difícil su caracterización, tanto porque descomponía rápido, como porque su espectro de masas daba un PM mayor que el real. Sin embargo, su transformación en canadina y el derivado acetilado permitió conocer su estructura, que

correspondía al conocido alcaloide nandinina.

Análisis por espectrometría de alta resolución:

M^+ calculado para $C_{19}H_{19}O_4N$: m/z 325, 1275

RMN : 360 MHz(TF) en $CDCl_3$

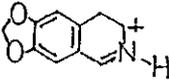
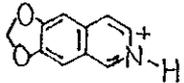
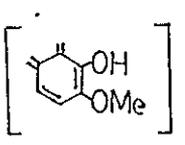
C-5,6,8,13,14 <u>H</u>	δ 3.25-4.36	(9H, multipletes complejos)
C-10 <u>OCH₃</u>	3.87	(3H, singlete)
<u>OCH₂O</u>	5.93	(2H, singlete)
C-4 <u>H</u>	6.60	(1H, singlete)
C-11 <u>H</u>	6.67	(1H, doblete, J=8.5Hz)
C-1 <u>H</u>	6.73	(1H, singlete)
C-12 <u>H</u>	6.73	(1H, doblete, J=8.5Hz)

RMC: ($CDCl_3$)

C-5	δ 28.92	C-12	119.32
C-13	35.81	C-8a	121.30
C-6	51.04	C-4a	127.33
C-8	53.00	C-12a	128.10
10-OCH ₃	56.15	C-1a	131.00
C-14	59.45	C-9	141.59
<u>OCH₂O</u>	100.84	C-10	144.17
C-1	105.48	C-2	145.90
C-4	108.46	C-3	146.10
C-11	109.26		

UV :	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	log ϵ
	205	4.11
	285	3.32
	236 h	3.54

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
325.1275	67	M^+ ($C_{19}H_{19}O_4N$)
176.0705	100	
174.0553	34	
150.0682	40	
135.0444	16	m/z 150-CH ₃

2.5.10.- Preparación de canadina (3-18)

A una solución de base (7mg), en MeOH se agregaron 6 ml de diazo metano en éter (de 2g de nitrosometilurea con 13 ml de KOH 50%) y la mezcla se mantuvo por 2 días en refrigerador. Se añadió HOAc para descomponer el exceso de diazometano. Se evaporó a sequedad y luego se disolvió en cloroformo, extrayendo con NaOH (2 veces con 5 ml). La solución clorofórmica se lavó con agua, se secó con Na_2SO_4 anh. y se evaporó el solvente, obteniéndose 3mg de canadina de p.f. 164-165°C.

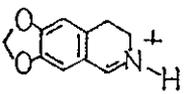
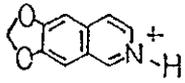
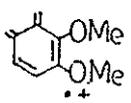
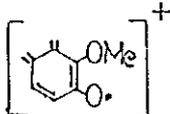
Análisis por espectrometría de masas dió un PM correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}$, m/z 336 (baja resolución).

RMN : 360 MHz (TF) en CDCl_3 .

C-5,6,8,13 <u>H</u>	δ 3.21-4.27	(9H, multiplete compl.)
C-9,10 <u>OCH₃</u>	3.85	(6H, singulete)
<u>OCH₂O</u>	5.92	(2H, singulete)
C-4 <u>H</u>	6.60	(1H, singulete)
C-1 <u>H</u>	6.73	(1H, singulete)
C-11 <u>H</u>	6.79	(1H, doblete, J=8.0Hz)
C-12 <u>H</u>	6.87	(1H, doblete, J=8.0Hz)

UV : λ <u>MeOH</u> max	log ϵ
284 nm	3.69

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
336	75	M^+ ($C_{20}H_{21}O_4N$)
176	13	
174	8	
164	27	
149	83	

2.5.11.- Acetato de Nandinina (3-19).

Nandinina (3-17) (5 mg) se disolvió en 0.5 ml de piridina, se añadió 0.5 ml de anhídrido acético, y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 18 horas. Se agregaron 3 ml de etanol y se concentró a sequedad, repitiendo estas operaciones hasta eliminación del olor a piridina. Se obtuvieron 3 mg de producto.

Análisis por espectrometría de masas de baja resolución:

M^+ para $C_{22}H_{25}O_5N$ m/z : 383

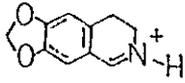
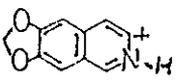


RMN : 200 MHz (TF) en CDCl_3

COCH_3	δ 2.35	(3H, singlete)
C-5,6,8,13 $\underline{\text{H}}$	3.21-4.09	(8H, multipletes compl.)
C-10 OCH_3	3.82	(3H, singlete)
OCH_2O	5.93	(3H, singlete)
C-4 $\underline{\text{H}}$	6.60	(1H, singlete)
C-1 $\underline{\text{H}}$	6.72	(1H, singlete)
C-12 $\underline{\text{H}}$	6.85	(1H, doblete, $J=8.55$ Hz)
C-11 $\underline{\text{H}}$	7.03	(1H, doblete, $J=8.55$ Hz)

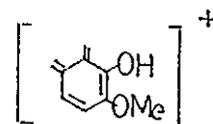
UV : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	log ϵ
211 nm	4.3
218 h	3.73
282	3.37

Espectro de masas:

m/z	Intensidad Relativa	Asignación
367	60	M^+ ($\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}$)
352	9	M^+ $-\text{CH}_3$
324	21	M^+ $-\text{CH}_3\text{CHO}$
176	38	
174	45	

150

100



2.5.12.- Noroxihidrastinina (3-15).

Las fracciones de la columna madre entre la 60 y 69 contenían pequeñas cantidades de nandinina y un alcaloide mayoritario (15 mg), que de acuerdo a sus datos espectroscópicos resultó ser el conocido alcaloide noroxihidrastinina (3-15). Este compuesto fue purificado por ccf preparativa usando el sistema B. p.f. 182-183°C.

El análisis por espectrometría de masas de alta resolución entregó un ión molecular a m/z 191.0593 para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$

RMN : 200 MHz (TF) en CDCl_3

C-3,4 <u>H</u>	δ 2.99-3.91	(4H, multipletes comp.)
<u>OCH</u> ₂ O	6.00	(2H, singulete)
C-5 <u>H</u>	6,65	(1H, singulete)
C-8 <u>H</u>	7.52	(1H, singulete)

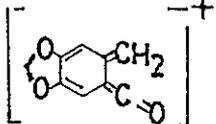
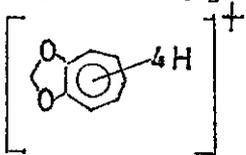
RMC : (CDCl_3) a 90,56 MHz

C-4	δ 30.4	C-1a	118.2
C-3	41.7	C-4a	134.6
<u>OCH</u> ₂ O	100,5	C-7	145.9
C-8	106.1 ^a	C-6	150.4
C-5	106.8 ^a	C-1	166.0

IR : CHCl_3 1660 cm^{-1} (amida)

UV :	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	$\log \epsilon$
	222 nm	4.39
	263 h	3.85
	301	3.93

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
191.0593	82	$M^+(C_{10}H_9O_3N)$
162.0269	4	
134.0369	5	

Desde la fracción 70 se comenzó a eluir la columna con una concentración de MeOH en $CHCl_3$ 8%. A partir de la fracción 80 se comenzó a recibir una mezcla de 5 alcaloides, uno de los cuales correspondía a la noroxihidrastinina que ya se encontraba en muy pequeña cantidad. Analizadas por ccf se juntaron las fracciones 84 a 126. Una vez evaporado el solvente, siempre lo más rápido posible para evitar descomposición, se cromatografió el residuo resultante (600 mg) en una serie de 15 placas preparativas. Se eligió este método, porque al analizar la muestra en el Sistema C se observaba una muy buena separación. Fue así como se cortaron 4 zonas positivas, obteniéndose los alcaloides que se detallan a continuación:

2.5.13.- Dorifornina (3-16).

Fue obtenido como un sólido que funde a 210-213°C (CHCl₃). Su análisis por espectroscopía de masas mostró un ión molecular a m/z 205 para una fórmula molecular C₁₁H₁₁O₃N.

RMN : 200 MHz (TF) en CDCl₃

N-CH ₃	δ3.59	(3H, singlete)
C-6 OCH ₃	4.00	(3H, singlete)
C-4 H	6.41	(1H, doblete, J=7.32 Hz)
C-5H	6.87	(1H, singlete)
C-3 H	6.98	(1H, doblete, J=7.32 Hz)
C-8 H	7.91	(1H, singlete)

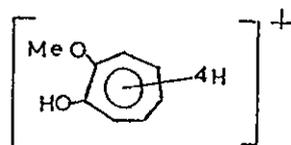
UV : λ _{max} MeOH	log ε
242	4.64
271	3.46
282	3.50
292	3.53
325	3.32

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
205	100	M ⁺ (C ₁₀ H ₉ O ₃ N)
164	34	

136

12



121

20

m/z 136-CH₃2.5.14. Coyhaiquina (3-35).

Coyhaiquina, con un rf 0.75 en el sistema C produjo 16 mg de compuesto puro. Dorifornina presentaba un rf algo mayor en el mismo sistema y en la misma placa. Coyhaiquina debió ser manejada cuidadosamente, ya que descompone tan rápido al aire, como en medio orgánico. Además si no es extraído rápido de la placa, ésta se torna de un color café, obligando a extraer y recromatografiar. Este proceso se repitió un par de veces, hasta identificación del interesante alcaloide de (α) + 28° (\pm 0.02 MeOH) y Dc $\Delta\epsilon$ (nm) MeOH, +5.2 (270), + 1.3 (246), + 6.5 (229).

El análisis por espectrometría de masas de alta resolución por impacto electrónico y ionización química mostró ión molecular a m/z 433.3991, correspondiendo también a su pico base y a una fórmula molecular C₂₆H₂₇O₅N.

RMN : 360 MHz (TF) en CDCl₃

N-CH ₃	δ 2.36	(3H, singlete)
C-7 H _{α}	2.17	(1H, dd, J ₁ =10.7, J ₂ =11.6 Hz)
C-7 H _{β}	2.41	(1H, dd, J ₁ =5.8, J ₂ =12.0 Hz)
C-6a H	3.43	(1H, dd, J ₁ =6.2, J ₂ =10.8 Hz)
C-1 OCH ₃	3.64	(3H, singlete)

C-2 OCH_3	3.81	(3H, singlete)
C-1' CH_2OH	4.61	(2H, singlete)
C-8 H	6.14	(1H, doblete, $J_m=2.4$ Hz)
C-11 H	6.37	(1H, doblete, $J_o=9.8$ Hz)
C-12 H	7.06	(1H, dd, $J_m=2.4$, $J_o=9.8$ Hz)
C-3', 5' H	7.08	(2H, doblete, $J_o=8.5$ Hz)
C-2', 6' H	7.30	(2H, doblete, $J_o=8.5$ Hz)

UV : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	log ϵ
210 nm	4.44
231 h	4.24
283	3.63

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
433.3991	100	M^+ ($\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{O}_5\text{N}$)
432.3758	85	$M^+ - \text{H}^+$
310.1416	32	$M^+ - \text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2$

RMN-ENO :

<u>Protón Irradiado</u>	<u>δ</u>	<u>Señal Observada</u>	<u>% Incremento</u>
C-8 H	6.14	C-1 OCH_3 (3.64)	1
		C-3', 5' H (7.08)	3
		C-7 H (2.17)	3

C-1 OCH_3	3.64	C-8 H (6.14)	2
		C-3', 5' H (7.08)	2
C-12 H	7.06	C-11 H (6.39)	8
C-11 H	6.37	C-12 H (7.06)	5

IR CHCl_3 : 1660 cm^{-1} (cetona)

2.5.15.- Reordenamiento de coyhaiquina (3-35) a la aporfina (3-36).

Una solución de 5 mg de coyhaiquina en 5 ml de HCl 5% fue calentada en un baño de aceite a 70° durante 24 hr. La solución fue alcalinizada con NH_4OH a pH 8 y extraída con cloroformo. El solvente fue secado y evaporado para dar un sólido amorfo que presenta un poder rotatorio $(\alpha)_D^{25}$ de -29 (c 0.04 MeOH) y una curva de $\text{DC}\Delta\epsilon(\text{nm})$ con los siguientes valores: +1.9 (300), + 4.2 (274), -23 (239), cola positiva a 210 nm. Análisis por espectrometría de masas a baja resolución:

M^+ para $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{O}_5\text{N}$ m/z : 433

RMN : 200 MHz (TF) en CDCl_3

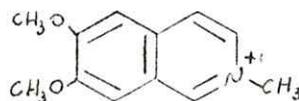
NCH_3	δ 2.56	(3H, singlete)
C-1 OCH_3	3.72	(3H, singlete)
C-2 OCH_3	3.89	(3H, singlete)
C-1' CH_2OH	4.59	(3H, singlete)
C-3 H	6.63	(1H, singlete)
C-8 H	6.71	(1H, singlete)
C-3', 5' H	7.10	(2H, dobletes, $J=8.5 \text{ Hz}$)

C-2', 6' H	7.40	(2H, doblete, J=8.5 Hz)
C-11 H	8.13	(1H, singlete)

UV :	λ	MeOH	
	max		log ϵ
	217 nm		4.36
	227		3.99
	304		3.84

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
433	21	M^+ ($C_{26}H_{27}O_5N$)
310	4	$M^+ - C_7H_7O_2$
204	100	



2.5.16.- (-)-Glaziovina (3-39)

El tercer compuesto que se cortó de la placa preparativa, sembrada con el residuo de las fracciones 84-126, presentaba un $r_f=0.57$. Este alcaloide descompone rápido cuando no es separado de la gel de sílice inmediatamente de desarrollar la placa. Es así como sólo se logró obtener 3.5 mg de compuesto puro, suficiente como para determinar su estructura. Presenta un poder rotatorio $(\alpha) -38^\circ$ y un DC con dos efectos Cotton, uno a 275 nm y otro muy pequeño a 235 nm.

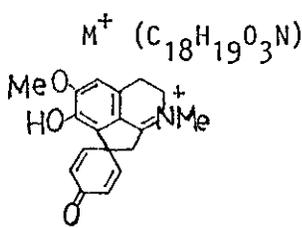
El análisis por espectrometría de masas mostró un ión molecular a m/z 297 correspondiente a la fórmula molecular $C_{18}H_{19}O_3N$, representando también el pico base.

RMN : 360 MHz (TF) en $CDCl_3$

NCH_3	δ 2.51	(3H, singulete)
C-2 OCH_3	3.84	(3H, singulete)
C-9 H	6.31	(1H, dd, $J_m = 1.8$, $J_o = 9.9$ Hz)
C-11 H	6.41	(1H, dd, $J_m = 1.8$, $J_o = 9.9$ Hz)
C-12 H	6.89	(1H, dd, $J_m = 2.7$, $J_o = 9.9$ Hz)
C-8 H	6.98	(1H, dd, $J_m = 2.7$, $J_o = 9.9$ Hz)

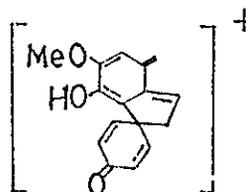
UV :	λ MeOH max,	log ϵ
	209 nm	4.00
	232	3.72
	285	3.15

Espectro de masas a baja resolución:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
297	100	M^+ ($C_{18}H_{19}O_3N$)
289	10	
268	50	m/z 289-CO

254

42



239

4

m/z 254-CH₃2.5.17.- Natalinina (3-24)

El cuarto compuesto obtenido de la fracción 80-126, purificado por ccf preparativa ($r_f=0.37$) fue una seco-bisbenzilaporfina-bencilisoquinolina, denominada natalinina que representa un nuevo compuesto para la ciencia. Su curva de DC tomada en metanol exhibió los siguientes datos: $\Delta\epsilon$ (nm) + 1.0 (310), +1.7 (273), + 1.7 (213), -6.5 (243)

Análisis por espectrometría de masas de baja resolución:

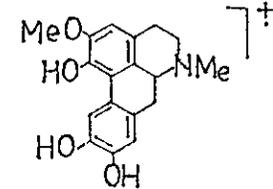
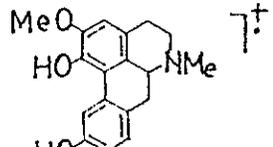
M^+ para C₂₅H₂₃O₅N a m/z 417.

RMN : 200 MHz (TF) en CDCl₃

NCH ₃	δ 2.52	(3H, singlete)
C-2 OCH ₃	3.93	(3H, singlete)
C-8 <u>H</u>	6.89	(1H, singlete)
C-3', 5' <u>H</u>	7.16	(2H, doblete, $J_o=8.5$ Hz)
C-2', 6' <u>H</u>	7.88	(2H, doblete, $J_o=8.5$ Hz)
C-11 <u>H</u>	8.16	(1H, singlete)
CHO	9.95	(1H, singlete)
C-3- <u>H</u>	6.59	(1H, singlete).

UV :	MeOH	log
	max	
	209 nm	4.41
	277	4.03
	308	3.87

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
417	100	M^+ ($C_{25}H_{23}O_5N$)
313	40	
297	70	

2.5.18.- Protopina (3-13)

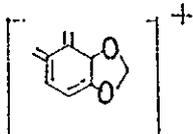
Las fracciones 130-158 de la columna madre contenían alrededor de 7 manchas positivas con el reactivo de Dragendorff. Como se observaban compuestos muy cercas en la placa cromatográfica, se eligió intentar la separación, usando una columna pequeña empacada con gel de sílice, de la usada para la placa fina. Tanto el empacado de la columna, como el sistema usado fue MeOH al 20% en $CHCl_3$. La muestra colocada en la columna fue de 100 mg. Directamente de la columna se obtuvo dos compuestos en forma pura. Uno de ellos fue el conocido alcaloide protopina (3-13). Recristalizado de metanol fundió a 205-207°. El espectro de masa mostró un ión a m/z 353 correspondiente al ion molecular de fórmula molecular $C_{20}H_{19}O_5N$.

RMN : 200 MHz (TF) en CDCl_3

NCH_3	$\delta 1.94$	(3H, singulete)
C-5,6,8,13 $\underline{\text{H}}$	2.56-3.75	(8H, multipletes complejos)
OCH_2O	5.93,5.96	(4H, singuletes)
C-4 $\underline{\text{H}}$	6.65	(1H, singulete)
C-11 $\underline{\text{H}}$	6.68 ^a	(1H, singulete)
C-12 $\underline{\text{H}}$	6.69 ^a	(1H, singulete)
C-1 $\underline{\text{H}}$	6.92	(1H, singulete)

UV : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$		log ϵ
207 nm		4.18
233 h		3.49
285		3.19

Espectro de masas:

m/z	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
353	10	M^+ ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}$)
148	100	

2.5.19.- Pakistanina (1-37)

El segundo compuesto a que se hacía mención, obtenido de la fracción 130-158 es el dímero aporfina-bencilisoquinolina, pakistanina,

aislado previamente de una serie de Berberis asiáticas¹⁵⁻¹⁷. En esta fracción 130-158 pakistanina estaba en muy pequeña cantidad, pero fue aumentando en las sucesivas fracciones, constituyendo el segundo alcaloide en importancia, en cuanto a su rendimiento. Se obtuvo más de 5g en forma pura, los cuales deben mantenerse en el refrigerador y en lo posible bajo atmósfera de nitrógeno para evitar descomposición. El alcaloide fue idéntico en todas sus propiedades a una muestra patrón de la colección del Dr. M. Shamma. De la columna principal se eluyó pakistanina en forma pura desde la fracción 162 a la 175. P.f. 155°C, $(\alpha)_D + 106^\circ$ (c=0.57 MeOH).
 $DC \Delta \epsilon$ (nm) = 5.03 (310), + 7.63 (276), -18.02 (244), +22.56 (212).

Análisis por espectrometría de masas:

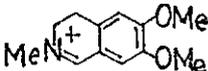
M^+ para $C_{37}H_{40}O_6N_2$ a m/z 608

RMN : 200 MHz (TF) en $CDCl_3$

$N-CH_3$	δ 2.50 ^a	(3H, singulete)
NCH_3	2.54 ^a	(3H, singulete)
C-7' OCH_3	3.64	(3H, singulete)
C-2 OCH_3	3.84	(3H, singulete)
C-6' OCH_3	3.92	(3H, singulete)
C-8' H	6.11	(1H, singulete)
C-3,5 H	6.57	(2H, singulete)
C-8 H	6.72	(1H, singulete)
C-11', 13' H	6.69	(2H, doblete, $J_o=8.54$ Hz)
C-10', 14' H	7.08	(2H, doblete, $J_o=8.54$ Hz)
C-11 H	8.12	(1H, singulete)

UV : λ	MeOH max	log ϵ
	211	4.61
	270 h	4.13
	277	4.21
	308	4.07

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
608	20	M^+ ($C_{37}H_{40}O_6N_2$)
206	100	

2.5.20.- Patagonina (3-26).

Hasta la fracción 170 se obtuvo pakistanina pura, directamente de la columna. La fracción 171 a 180 contenía, además de la base mencionada otros dos compuestos que daban reacción de Dragendorff positiva. Ellos fueron separados de la mezcla, mediante ccf preparativa usando el Sistema A, con la variante que en la cubeta de desarrollo se ubicó un vaso de 50 ml que contenía NH_4OH . Se probaron una serie de otros sistemas que no dieron buen resultado. Patagonina (3-26), que representaba el compuesto de mayor r_f fue el primero en ser extraído, por su rápida descomposición a un compuesto de color café.

(α) + 192° (c=0.2 MeOH). DC $\Delta\epsilon$ (nm) + 8.8(279), 5.5(248), + 32 (230).

Análisis por espectrometría de masa:

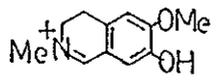
M^+ para $C_{37}H_{40}O_6N_2$ a m/z 608.

RMN : 360 MHz (TF) en $CDCl_3$

NCH_3	δ 2.37 ^a	(3H, singulete)
NCH_3	2.55 ^a	(3H, singulete)
C-1 OCH_3	3.65	(3H, singulete)
C-2 OCH_3	3.78 ^b	(3H, singulete)
C-6' OCH_3	3.79 ^b	(3H, singulete)
C-8' H	5.55	(1H, singulete)
C-8 H	5.95	(1H, doblete, $J_m=2.5$ Hz)
C-3 H	6.48 ^c	(1H, singulete)
C-11 H	6.37	(1H, doblete, $J_o=9.8$ Hz)
C-5' H	6.58 ^c	(1H, singulete)
C-10', 14' H	6.98	(2H, singulete ancho)
C-11', 13' H	6.98	(2H, singulete ancho)
C-12 H	7.04	(1H, dd, $J_m=2.5$, $J_o=9.8$ Hz)

UV :	λ_{max}^{MeOH}	log ϵ
	209 nm	4.70
	231 h	4.50
	283	4.01

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
608	0.2	M^+ ($C_{37}H_{40}O_6N_2$)
416	5	M^+ - mitad benisoq.
192	100	

2.5.21.- Producto de reordenamiento de patagonina al dímero 3-27.-

Patagonina fue reordenada mediante la catálisis ácida en la misma forma que para coyhaiquina, obteniéndose el dímero aporfina-bencilisoquinolina (3-30), (α) + 29° (c=0.4 MeOH) DC $\Delta\epsilon$ (nm) + 2.6 (304), + 7(275), -33(239), + 27 (210).

Análisis por espectrometría de masas:

M^+ para $C_{37}H_{40}O_6N_2$ a m/z 608

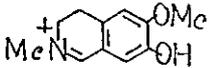
RMN : 200 MHz (TF) en $CDCl_3$

NCH_3	δ 2.50	(6H, singlete)
C-1 OCH_3	3.71	(3H, singlete)
C-2 OCH_3	3.85 ^a	(3H, singlete)
C-6' OCH_3	3.88 ^a	(3H, singlete)
C-8' H	6.35	(1H, singlete)
C-3 H	6.53 ^b	(1H, singlete)
C-5' H	6.61 ^b	(1H, singlete)
C-8 H	6.72	(1H, singlete)

C-11', 13' <u>H</u>	6.97 ^c	(2H, doblete, J _o =8.5 Hz)
C-10', 14' <u>H</u>	7.10 ^c	(2H, doblete, J _o =8.5 Hz)
C-11 <u>H</u>	8.10	(1H, singlete)

UV	:	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	log ϵ
		210 nm	4.60
		224	4.54
		267 h	4.04
		278	4.17
		304	3.97

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
608	0.2	M ⁺ (C ₃₇ H ₄₀ O ₆ N ₂)
192	100	

2.5.22.- Talictricina (3-14)

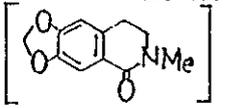
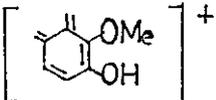
Talictricina representa al tercer compuesto de la fracción 171-180. La comparación de éste compuesto con una muestra patrón fue idéntica en todas sus propiedades, co-cromatografía, RMN, UV y EM. Funde a 260-261°C. El análisis por espectrometría de masas a alta resolución mostró un ión molecular débil a m/z 355.1435 para una fórmula molecular C₂₀H₂₁O₅N.

RMN 200 MHz CDCl_3 (Figura 3-17).

NCH_3	δ 1.92	(3H, singlete)
C-9 OCH_3	3.76	(3H, singlete)
OCH_2O	5.96	(2H, singlete)
C-4 H	6.64	(1H, singlete)
C-11 H	6.83 ^a	(1H, singlete)
C-12 H	6.84 ^a	(1H, singlete)
C-1 H	6.94	(1H, singlete)

UV	:	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	$\log \epsilon$
		208 nm	4.19
		229	3.62
		286	3.30

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
355.1435	4	M^+ ($\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}$)
206.0811	100	
150.0675	14	

2.5.23.- Coyhaiquinina (3-38)

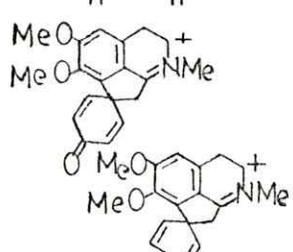
Las fracciones 181 a 202 de la columna principal, contenían principalmente tres compuestos, que fueron separados mediante ccfc usando el Sistema C. El compuesto de mayor r_f resultó ser pakistanina, y luego venían coyhaiquinina (3-38) y valdivianina (3-28) en ese mismo orden. Coyhaiquinina se obtuvo como un compuesto amorfo que descomponía rápido, dando una coloración café. El espectro de masas mostró un ión molecular a m/z 431 correspondiente a la fórmula molecular $C_{26}H_{25}O_5N$.

RMN : 360 MHz (TF) en $CDCl_3$

NCH_3	δ 2.41	(3H, singulete)
C-1 OCH_3	3.70	(3H, singulete)
C-2 OCH_3	3.83	(3H, singulete)
C-11 H	6.38	(1H, doblete, $J_o = 9.77$ Hz)
C-8 H	6.58	(1H, doblete, $J_m = 2.75$ Hz)
C-3 H	6.66	(1H, singulete)
C-12 H	7.06	(1H, dd, $J_m = 2.75, J_o = 9.77$ Hz)
C-2', 6' H	7.19	(2H, doblete, $J_o = 8.85$ Hz)
C-3', 5' H	7.86	(2H, doblete, $J_o = 8.85$ Hz)
CHO	9.91	(1H, singulete)

UV $CHCl_3$:	λ MeOH max	log ϵ
	209 nm	4.54
	275	4.17

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
431	30	$M^+ (C_{26}H_{25}O_5N)$
430	100	$M^+ - H$
310	30	
282	20	

2.5.24.- Valdivianina (3-28)

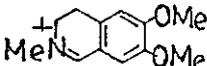
Fue obtenido como un sólido amorfo, que también descompone rápidamente a un compuesto de color café. (α) + 120° (c=0.2, MeOH), DC $\Delta\epsilon$ (nm) -0.74 (300), +8.0(278), +3.8(235), +17 (211). Su análisis por espectrometría de masas mostró un ión molecular a m/z 608 correspondiente a la fórmula molecular $C_{37}H_{40}O_6N_2$.

RMN : 360 MHz (TF) en $CDCl_3$ (Figura 3-58).

NCH_3	δ 2.36 ^a	(3H, singulete)
NCH_3	2.54 ^a	(3H, singulete)
C-2,6' OCH_3	3.83	(6H, singulete)
C-7 OCH_3	3.54	(3H, singulete)
C-3 H	6.55 ^b	(1H, singulete)
C-5' H	6.57 ^b	(1H, singulete)
C-8' H	5.99	(1H, singulete)
C-11 H	6.34	(1H, doblete, $J_o=9.8$ Hz)
C-8 H	6.19	(1H, doblete, $J_m=2.5$ Hz)
C-12 H	6.99	(1H, dd, $J_m=2.5$, $J_o=9.8$ Hz)
C-10',11',13',14' H	7.01	(4H, singulete)

UV :	λ	MeOH max	log ϵ
	214	nm	4.74
	232		4.72
	282		4.12

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
608	0.1	M^+ ($C_{37}H_{40}O_6N_2$)
206	100	

2.5.25.- Chitralina (1-38)

Chitralina fue obtenido a partir de la fracción 210, en la cual estaban presente otros dos compuestos. Se trabajó con alrededor de 400mg de muestra, que fueron sembrados en una serie de placas preparativas (12 placas) y desarrolladas usando el Sistema D. Se repitió el proceso dos y tres veces, dependiendo de la separación observada. r_f 0.27, DC $\Delta\epsilon$ (nm) +4.79 (310), + 6.44 (272) -21.96(243), + 19.65(210). Análisis por espectrometría de masas: M^+ $C_{36}H_{38}O_6N_2$ para una m/z : 594

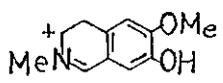
RMN : 200 MHz (TF) en $CDCl_3$

NCH_3	δ 2.46	(3H, singlete)
NCH_3	2.49	(3H, singlete)
C-2 OCH_3	3.79	(3H, singlete)

C-6' OCH_3	3.85	(3H, singlete)
OH	5.21	(1H, singlete ancho)
C-8' H	6.20	(1H, singlete)
C-5' H	6.50 ^a	(1H, singlete)
C-3' H	6.52 ^a	(1H, singlete)
C-8' H	6.61	(1H, singlete)
C-11', 13' H	6.67	(2H, doblete, $J_o=8.5$ Hz)
C-10', 14' H	6.99	(2H, doblete, $J_o=8.5$ Hz)
C-11' H	8.08	(1H, singlete)

UV :	λ MeOH max	$\log \epsilon$
	220 nm h	4.51
	268 h	4.03
	278	4.10
	292 h	3.94
	304	3.96

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
594	0.3	M^+ ($\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_2$)
192	100	

2.5.26.- Porveniramina (3-22)

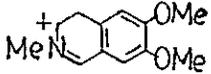
Porveniramina presenta un $r_f=0.28$ en el Sistema D. (α) + 40° (c=0.1 metanol). DC $\Delta\epsilon$ (nm) + 5.4 (305), + 8.2 (274), -24 (244) + 22 (212). Su análisis por espectrometría de masas mostró un ión molecular a m/z 594 para $C_{36}H_{38}O_6N_2$.

RMN : 200 MHz (TF) en $CDCl_3$

NCH_3	δ 2.50	(3H, singulete)
NCH_3	2.52	(3H, singulete)
C-7' OCH_3	3.51	(3H, singulete)
C-2 OCH_3	3.85	(3H, singulete)
C-8' H	5.90	(1H, singulete)
C-3 H	6.53 ^a	(1H, singulete)
C-5' H	6.55 ^a	(1H, singulete)
C-8 H	6.69	(1H, singulete)
C-10', 14' H	6.99	(2H, doblete, $J_o=8.8$ Hz)
C-11', 13' H	6.89	(2H, doblete, $J_o=8.8$ Hz)
C-11 - H	8.07	(1H, singulete)

UV :	λ_{max}^{MeOH}	log ϵ
	225 nm	4.66
	267 h	4.19
	277	4.26
	307	3.90

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
594	0.2	$M^+(C_{36}H_{38}O_6N_2)$
192	100	

2.5.27.- Natalamina (3-25)

El último compuesto de Berberis empetrifolia obtenido fue la secobisbencilporfina-bencilisoquinilina, denominada natalamina. Su espectro de masas entregó un ión molecular a m/z 419 para $C_{25}H_{25}O_5N$.

RMN : 200 MHz (TF) en $CDCl_3$

<u>NCH₃</u>	δ 2.50	(3H singulete)
C-2 <u>OCH₃</u>	3.81	(2H, singulete)
<u>CH₂OH</u>	4,67	(2H, singulete)
C-3 <u>H</u>	6.56	(1H, singulete)
C-8 <u>H</u>	6.73	(1H, singulete)
C-3', 5' <u>H</u>	7.06	(2H, doblete, $J_o=8.5$ Hz)
C-2', 6' <u>H</u>	7.35	(2H, doblete, $J_o=8.5$ Hz)
-C-11 <u>H</u>	8.13	(1H, singulete)

UV :	λ MeOH max	log ϵ'
	215 nm	4.25
	276	3.83
	267 h	3.74
	308	3.77

Espectro de masas:

<u>m/z</u>	<u>Intensidad Relativa</u>	<u>Asignación</u>
419	80	M^+ ($C_{25}H_{25}O_5N$)
418	100	$M^+ - H$

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.- Generalidades

De las especies chilenas estudiadas hasta antes de 1981 ninguna había informado la presencia de dímeros del tipo proaporfina-bencilisoquinolina o aporfina-bencilisoquinilina, si bien habían sido mencionados alcaloides bisbencilisoquinolínicos con modelos de oxigenación únicos y raramente presentes en otras familias, tal como se vio en el Capítulo I.

De las cuatro especies estudiadas de Berberis chilenas, se habían aislado 14 alcaloides bien definidos. Con los alcaloides conocidos aislados en el presente estudio de Berberis empetrifolia, berberina (3-1), dorifornina (3-18), chitralina (1-38), pakistanina (1-37), isotetrandina (1-19), oxiberberina (3-20), protopina (3-13), talictricina (3-10), glaziovina (3-39), noroxihidrastinina (3-15), y nandinina (3-17), más los alcaloides nuevos para la ciencia: chilénina (3-3), puntarenina (3-6), coyhaiquina (3-35), coyhaiquinina (3-37), patagonina (3-26), valdivianina (3-28), porveniramina (3-22), natalinamina (3-27), natalamina (3-25), y natalinina (3-24), hacen un total de 34 alcaloides completamente caracterizados. Otra de las especies que está siendo sometida a intenso estudio es B. valdiviana, que ha mostrado al igual que B. empetrifolia una serie de dímeros derivados de la pakistanamina (1-35), por lo que serán tratados en conjunto.

Los extractos metanólicos de los 20 kg de corteza y madera de tallos subterráneos de B. empetrifolia fueron separados en fracciones de acuerdo a su distribución entre CHCl_3 y HCl 5% acuoso y CHCl_3 e hidróxido de

amonio (pH 9-10). De la capa orgánica de esta última fracción se obtuvo 62 g de un crudo que daba reacción de Dragendorff positiva. El residuo fue fraccionado en una columna rellena con gel de sílice 60, recogién^{do}se más de 400 fracciones. Las que tenían igual comportamiento en capa fina fueron recromatografiados, en nuevas columnas o en capa fina preparativa. Los alcaloides que presentaban r_f muy próximos, que constituían mezclas difíciles de separar en ccf fueron purificados usando columnas pequeñas empacadas con gel de sílice del tipo de la usada en ccf (HF₂₅₄ Merck). Luego se eluía con una mezcla de solventes, que previamente había sido probado analíticamente en capa fina.

Uno de los buenos sistemas cromatográficos usados en ccf fue el de Et₂NH-CHCl₃ (10:90), que fue empleado para separar casi todos los dímeros proaporfina-bencilisoquinolina, con pureza adecuada para su análisis. Otro de los sistemas usados, que dio muy buen resultado fue benceno-acetona-NH₄OH (60:60:1.5), que separó adecuadamente los dímeros aporfina-bencilisoquinolinas y un producto de oxidación de ellos. Para separar porveniramina de chitralina fue necesario correr las placas 2 o más veces, siempre asegurándose de cambiar el solvente, ya que de otra manera se producían superposiciones de bandas difíciles de separar. Para esta mezcla de compuestos se debía tener la precaución de cortar las placas lo más rápidamente posible, para evitar la descomposición de los alcaloides, que cambian a verde cuando se les deja al aire. Esta característica es común en las bases fenólicas aporfínicas, lo cual dificultó mucho su purificación.

El mismo procedimiento se debió realizar cuando se trataba de bases proaporfínicas que descomponen a un compuesto café cuando se les mantiene por mucho tiempo en la placa y al aire.

Entre los alcaloides con mayor rendimiento en Berberis empetrifolia después de la berberina están la pakistanina (5.0 g), chitralina (0.5 g), patagonina (0.6 g), isotetrandina (1.0g) y protopina (1.0 g). Las cantidades son sólo aproximadas, pues hubo fracciones que no fueron separadas por contener mezclas ya conocidas.

Para la elucidación estructural se requirieron técnicas de análisis muy avanzadas, RMN-H, RMN-¹³C, DC, (α), espectrofotometría de ultra violeta y espectrometría de masas. Además, algunos alcaloides muy difíciles de reconocer y con un comportamiento biogénico desconocido requirió de ciertas reacciones químicas y experimentos de doble irradiación y estudios de RMN usando el efecto nuclear Overhauser.

3.2.- Chilenina: un alcaloide isoindolobenzacepínico

Chilenina (3-3), representa el primer alcaloide isoindolobenzacepínico natural. Es un compuesto incoloro, sin actividad óptica que mostró $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 221, 228 h, 281 h y 312 nm (log ϵ 4.39, 4.25, 3.68 y 3.72). El ión molecular dio una señal en el EM a m/z 383, lo que permitió postular la fórmula extraordinariamente oxigenada C₂₀H₁₇O₇N. El espectro de RMN mostró señales a δ 3.08 y 3.56 correspondientes a los 2H en C-5, acoplados con los protones en C-6 y consigo mismo, mostrando constantes de acoplamiento $J_1=3,5$, $J_2=7.0$ y $J_3=14$ Hz. El mismo modelo se observó para protones C-6 (δ 3.28 y 4.25) con $J_1=4.0$, $J_2=15$ Hz. Un hecho importante de este espectro medido a 200 MHz, es la absorción metilendioxi a δ 5.95 y δ 5.97 y dos singuletes metoxílicos a δ 3.88 y δ 4.00 así también como cuatro absorciones

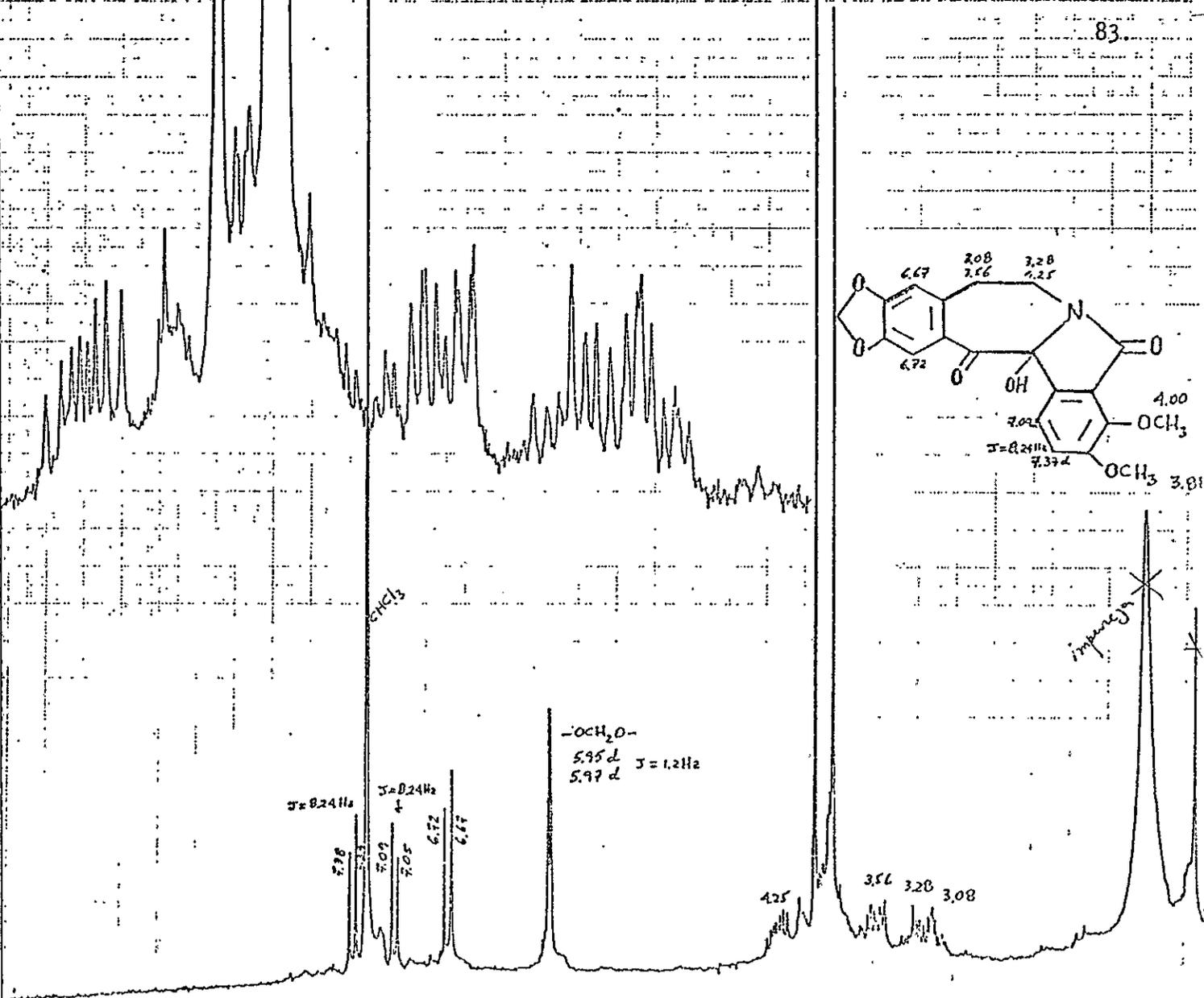


Figura 3-1. Espectro de RMN-'H (200 MHz) de chilenina

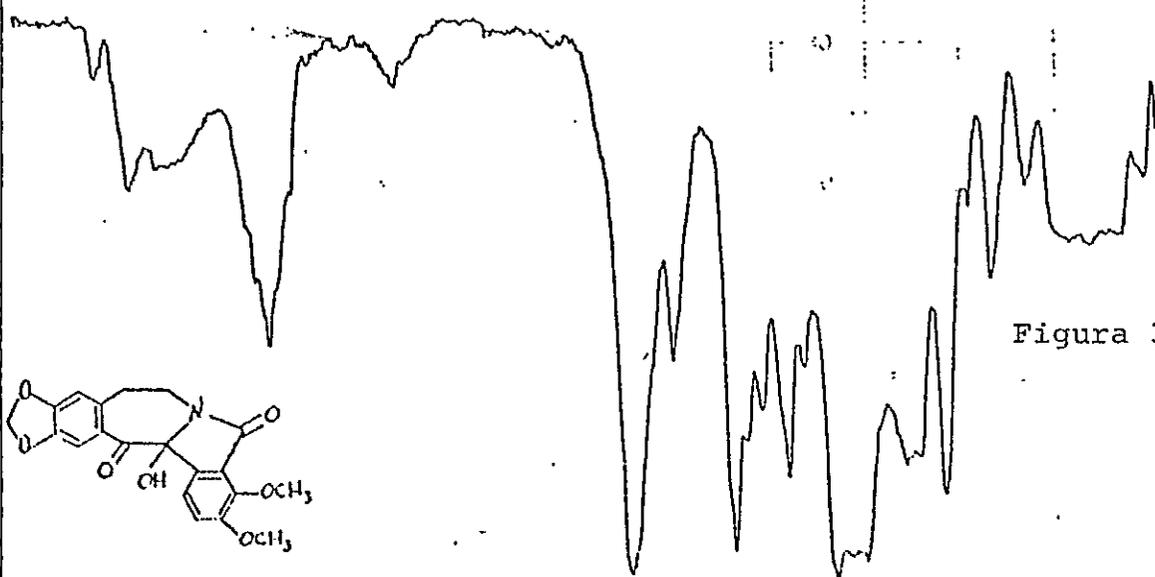


Figura 3-2. Espectro de IR de chilenina.

debidas a protones aromáticos (δ 6.67, 6.72, 7.04 y 7.37) (figura 3-1).

El espectro IR de chilénina (3-3) en cloroformo mostró absorciones a 1690 cm^{-1} (lactama), 1720 (cetona conjugada) y 3450 ancha (hidroxilo) cm^{-1} (figura 3-2).

Estos datos coincidieron con aquellos obtenidos para un producto de transformación de la berberina (3-1) sintetizado previamente¹⁸. La síntesis involucró oxidación de la berberina con ferricianuro de potasio a un compuesto dimérico, cuya estructura no ha podido ser aclarada. El dímero fue luego descompuesto en clorhidrato de piridina y la mezcla de la reacción fue posteriormente tratada con ácido acuoso, originando 8,13-dioxo-14-hidroxicanadina (3-2). Este último compuesto fue tratado en CHCl_3 con NH_4OH , dando origen al alcaloide que ahora hemos denominado chilénina. (ver figura 3-3).

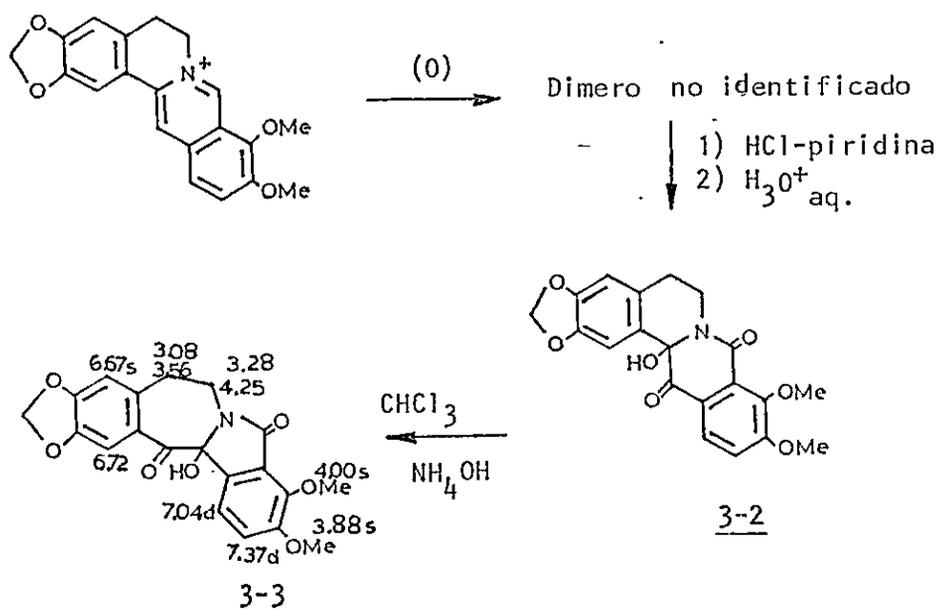


figura 3-3
Síntesis de Chilénina

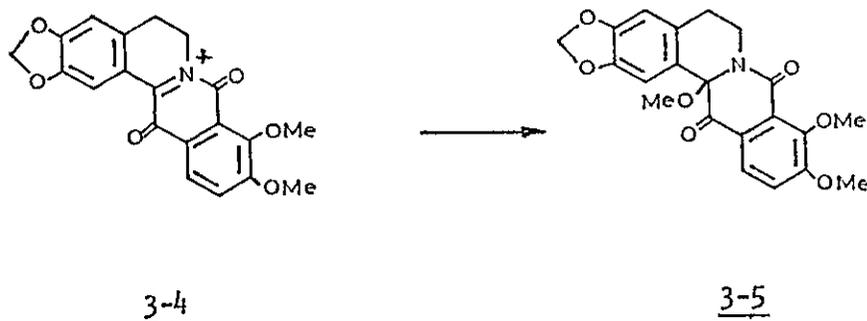
La identidad del compuesto de B. empetrifolia con este producto sintético fue establecido por comparación de sus propiedades físicas y espectrométricas.¹⁸

3.3.- Biogénesis de chilénina.

La hipótesis más lógica para la formación de (\pm)-chilénina en la naturaleza es que este alcaloide es generado por un paso paralelo a uno seguido inadvertidamente in vitro, es decir, por una oxidación inicial de berberina al intermediario (3-2) que ahora puede ser llamado prechilénina. El reordenamiento catalizado por base de prechilénina en la planta produciría entonces chilénina (3-3).

Para descartar la posibilidad que chilénina era un artefacto, debido al proceso de aislamiento, se tomó una fracción del extracto metanólico que no había sido tratado con ácido, ni con base y se cromatografió junto a la semi-sintética prechilénina obtenida por oxidación de berberina y con chilénina auténtica. Chilénina, pero no prechilénina pudo ser detectado en este material.

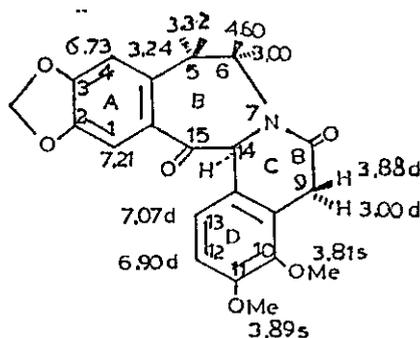
Es sabido que el hidroxilo angular de prechilénina (3-2) es lábil y puede ser fácilmente sustituido por un metoxilo a través de un intermediario azaquinonio (3-4) para formar la especie (3-5)¹⁸. Se consideró



posible, por lo tanto, que cualquier prechilenina presente en la planta debió haber sido convertido completamente a (3-5) durante el proceso de extracción metanólica. Sin embargo, realizando comparaciones en ccf de los extractos de la planta con (3-5) auténtico, no pudo detectarse tal material. (±)-chilenina (3-3) es el primer alcaloide isoindolobenzacefínico presente en forma natural y puede ser considerado así el único representante esta nueva clase de alcaloides isoquinolínicos¹⁹.

3.4.- Puntarenina (3-6)²⁰

De los 20 kg de polvo de corteza y madera de Berberis empetrifolia se aisló 46 mg de éste alcaloide racémico, cristalizado de metanol, que fundió entre 214-216°C. El espectro de IR en cloroformo mostró dos absorciones máximas características de una amida y de una cetona conjugada a ν_{\max} 1642 y 1690 cm^{-1} , resp. El espectro de UV mostró tres absorciones a $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (1 log e) 231 (3.39), 278 (3.45), y 316 nm (3.44). El espectro de RMP figura 3-5, tomado en CDCl_3 a 360 MHz está resumido en la estructura 3-6. De particular importancia es el par de dobletes de dos protones centrados

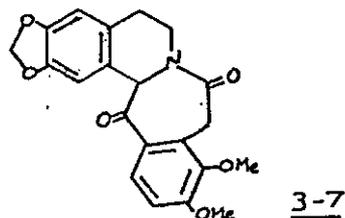


J-5: J_1 8.0, J_2 13.0 Hz

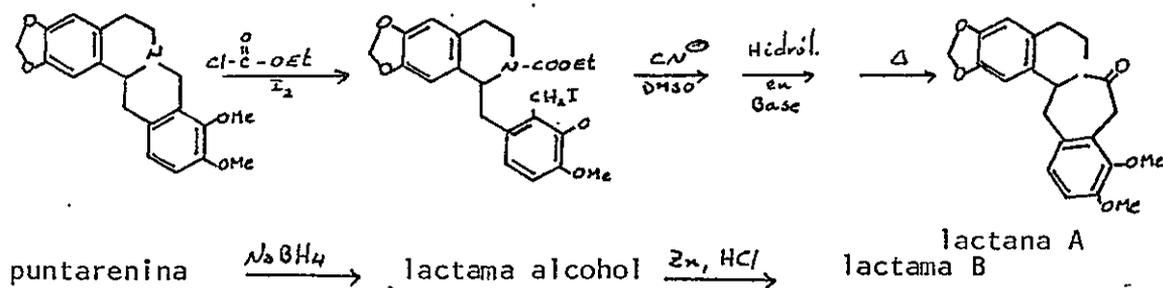
J-6: J_1 7.0, J_2 19.0 Hz

a 3.00 y 3.88 ($J_{\text{gem}} 19 \text{ Hz}$) representando los protones en C-9 y el singulete integrado para 1H a 5.16, debido a H-14.

Una estructura posible para puntarenina era 3-7, que se descartó por



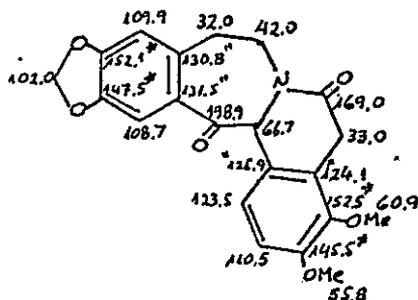
una fácil y corta ruta sintética a un análogo de puntarenina (lactama A, estructura 3-8), tal como se resume en el cuadro siguiente:



La síntesis partiendo de canadina y de puntarenina debieron originar, la misma lactama A si puntarenina respondía a la estructura 3-8, sin embargo ambas lactamas resultaron ser diferentes, lo que permitió eliminar tal posibilidad.

Otro hecho que permite descartar la estructura 3-7 para puntarenina se refiere a la pequeña diferencia de los desplazamientos químicos para el par de dobletes representando los dos hidrógenos aromáticos adyacentes del anillo D. Si este anillo estuviera conjugado a una cetona, habría una diferencia de al menos 0,5 ppm para los dos H aromáticos, mientras que en nuestro caso es de sólo 0,17 ppm²¹.

El espectro de RMN-¹³C de puntarenina en CDCl_3 exhibe picos a 169,0 ppm (C-8 amídico) y 198.9 ppm (C-15 cetónico), y está indicado en la estructura 3-6a.



DS-55 MASS INTENSITY REPORT: PSU MASS SPEC LAB
4VIF.14 (TIC=001264, 100x=67163) E1

E-24 UNK

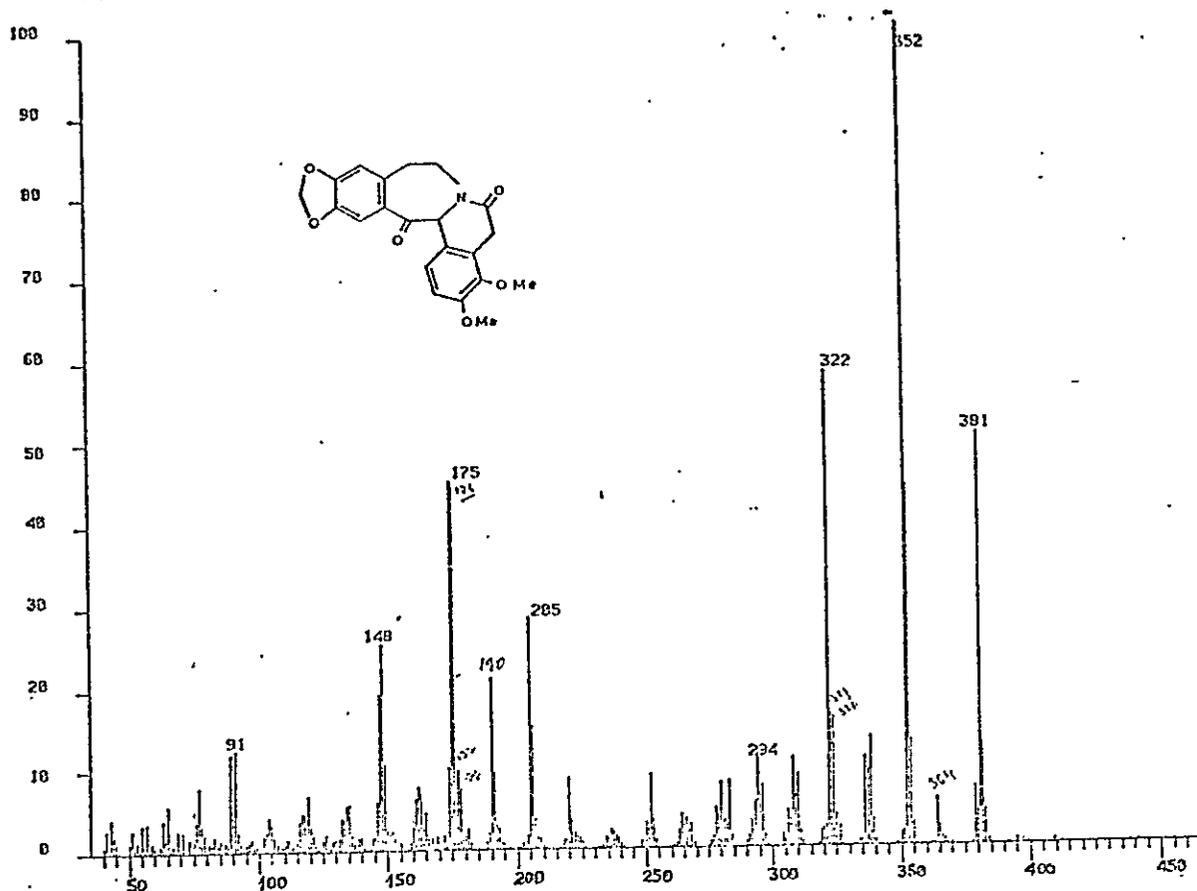


Figura 3-4. Espectro de masas de puntarenina.

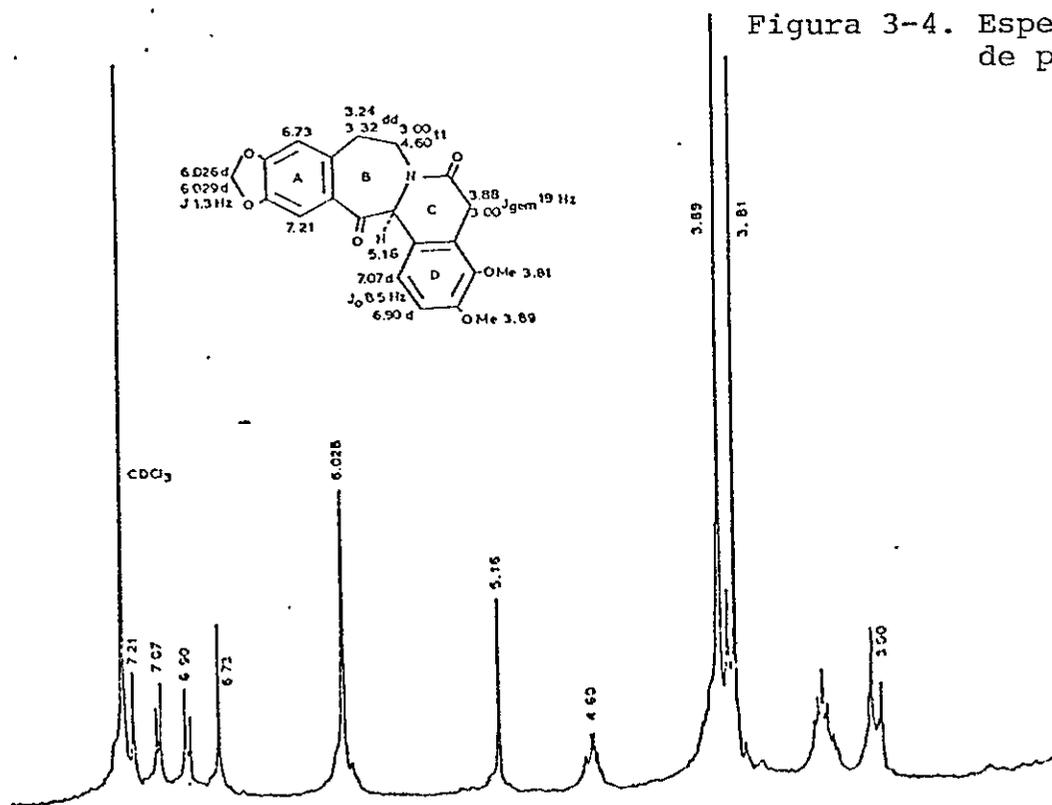


Figura 3-5. Espectro de RMN-¹H (360 MHz) de puntarenina.

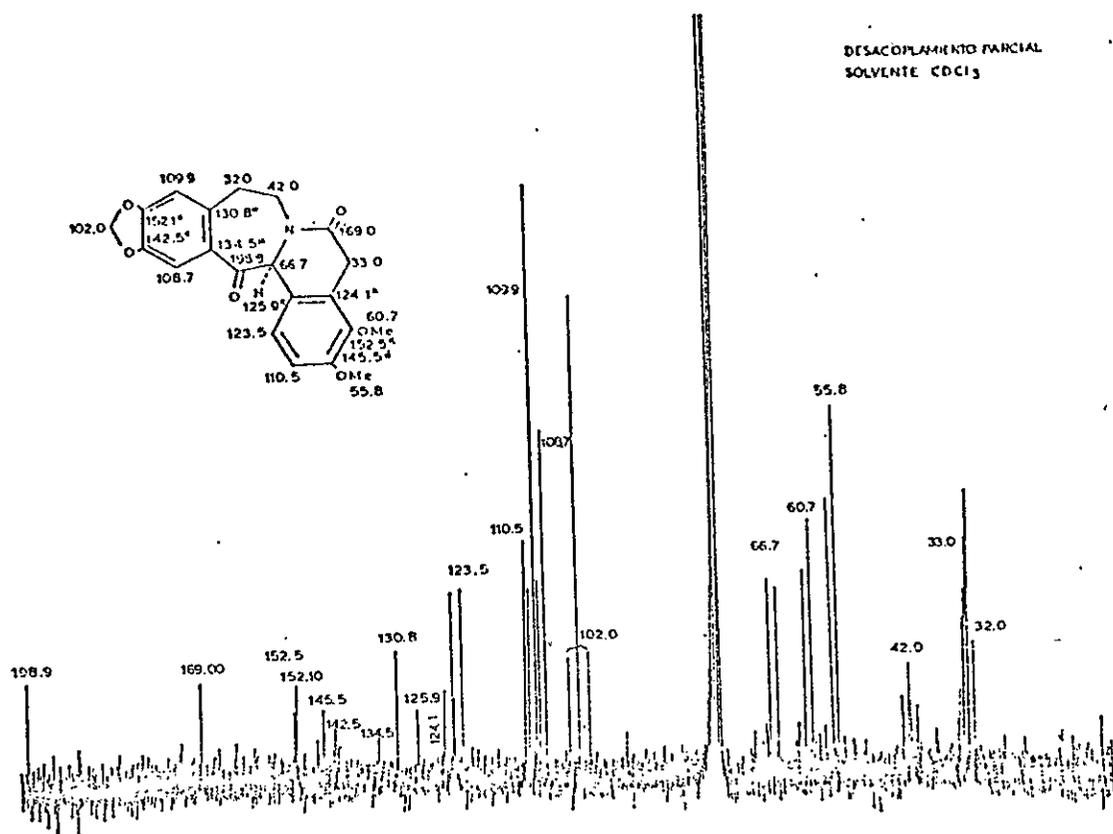


Figura 3-6. Espectro de RMN-¹³C con desacoplamiento parcial

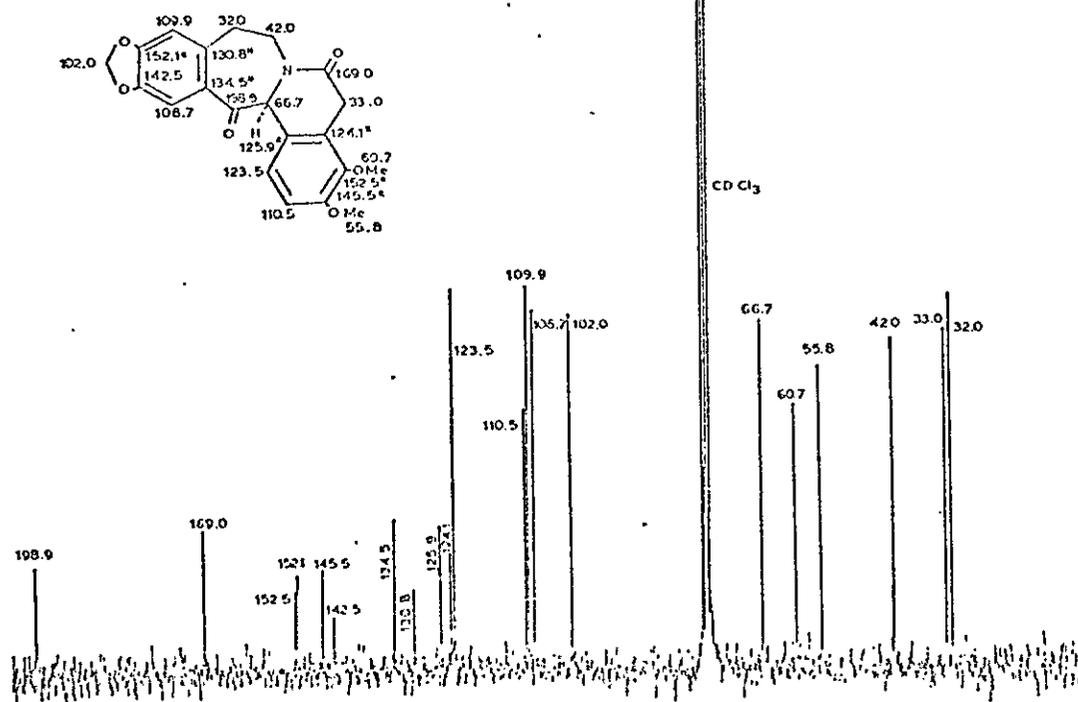
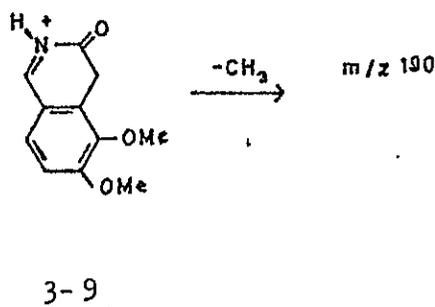
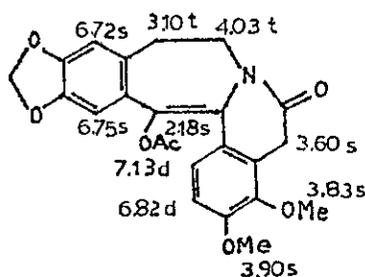


Figura 3-7. Espectro de RMN-¹³C (desacoplado) de puntarenina.

El espectro de masas de puntarenina, (3-6) mostró un pico molecular a m/z 381 (50) y un pico base a m/z 352 (M-CO-H)⁺. Relevantes son las señales a m/z 205 (28), y 190 (21) que apoyan en gran medida la estructura 3-6' para puntarenina. El primero es debido al fragmento 3-10, y el último a la pérdida de un grupo metilo de 3-9. (Figura 4).



La acetilación de puntarenina con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente condujo al acetato enólico de puntarenina 3-11, $C_{23}H_{21}O_7$, $\nu_{max}^{IR} CHCl_3$ 1655 (amida) y 1755 cm^{-1} (acetato enólico), λ_{max}^{MeOH} 210, 318 nm ($\log \epsilon$ 4.03, 3.80), cuyo espectro está caracterizado por la ausencia del singulete a δ 5.16 presente en el espectro de 3-6. Del acetato enólico de puntarenina se resumen los desplazamientos químicos en la estructura 3-11. Para espectro ver Figura 3-9.



DS-55 MASS INTENSITY REPORT: PSU MASS SPEC LAB
 18V1F.12 [TIC=3791744, 100X=679360] E1

EA-24

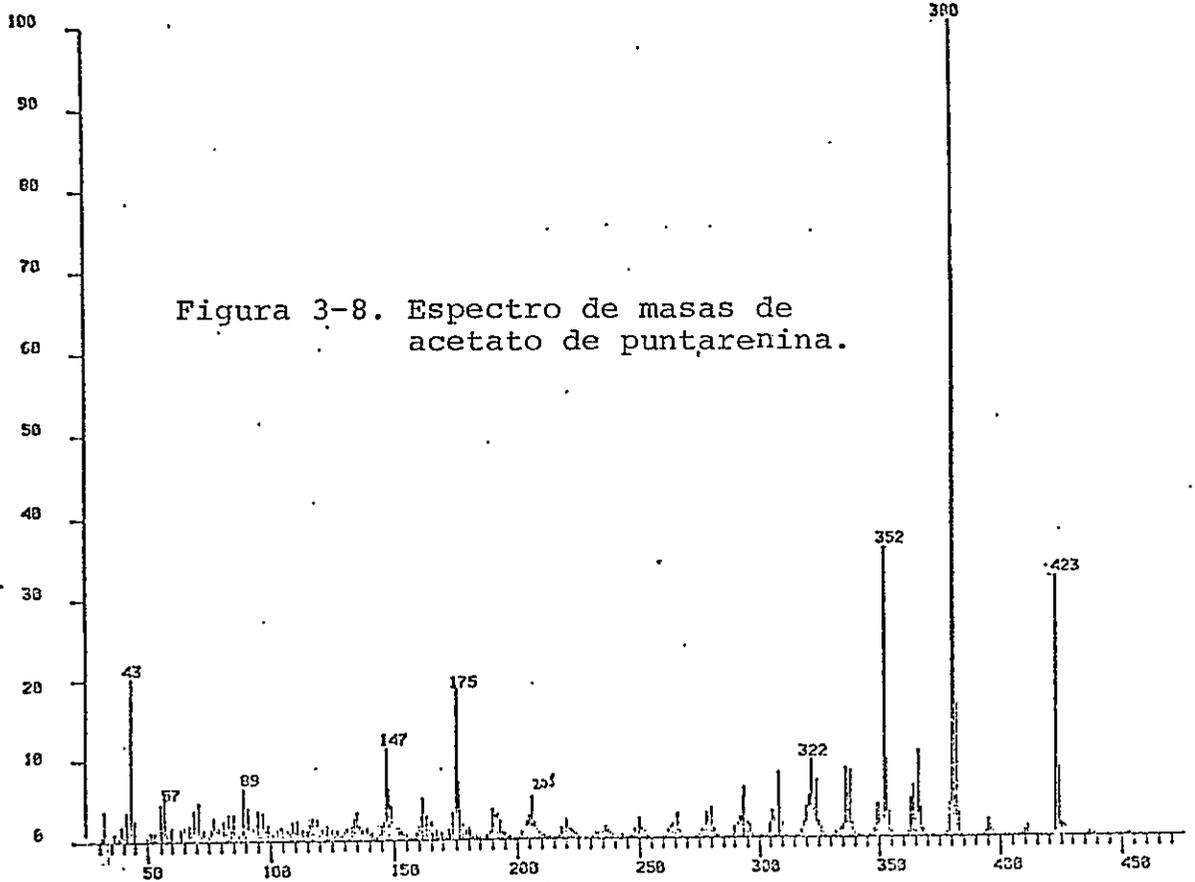
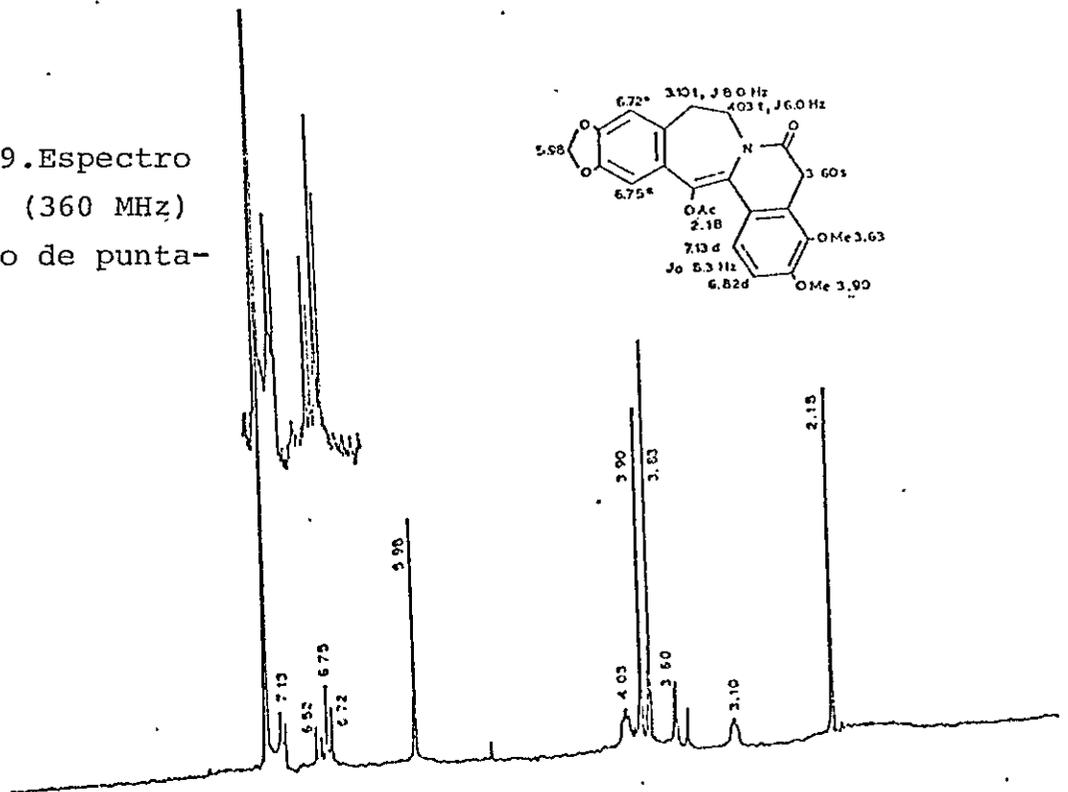
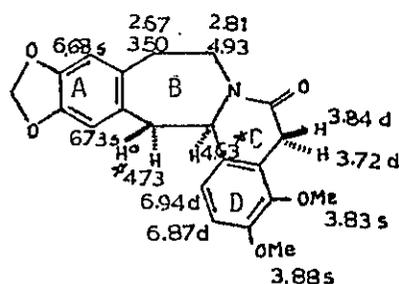


Figura 3-9. Espectro de RMN-¹H (360 MHz) de acetato de punitarenina.



La reducción de puntarenina en metanol con borohidruro de sodio condujo a dihidropuntarenina 3-11, $C_{21}H_{21}O_6N$, ν_{\max} ($CHCl_3$) 1635 (amina) y 3610 cm^{-1} (hidroxilo) (figura 3-12); λ_{\max}^{MeOH} 212, 283 ($\log \epsilon$ 4.46, 3.65). Un hecho significativo en el espectro de masas, es que ahora el fragmento a $m/z:205$ es el pico base (ión 3-9) (figura 3-11).

El hecho más sobresaliente en el espectro de RMP de 3-11, mostrados en la misma estructura 3-11 son los singuletes a $\delta 4.63$ y 4.73 para los protones H-14 y H-15, aún cuando ellos están en átomos de carbono adyacentes (fig. 3-10). Los modelos moleculares muestran que 3-11 existe en una conformación claramente rígida 3-12a en que el anillo C es aproximadamente plano, mientras que el ángulo dihédrico entre H-14 y H-15 está cercano a los 90° , justificando la constante de acoplamiento cero.



3-11

La acetilación de 3-11, otra vez usando anhídrido acético en piridina, condujo al acetato de dihidropuntarenina (3-12), $C_{23}H_{23}O_7N$, cuyo espectro de RMP exhibe singuletes para H-14 y H-15 a $\delta 4.81$ y 5.69 , resp. (figura 3-13).

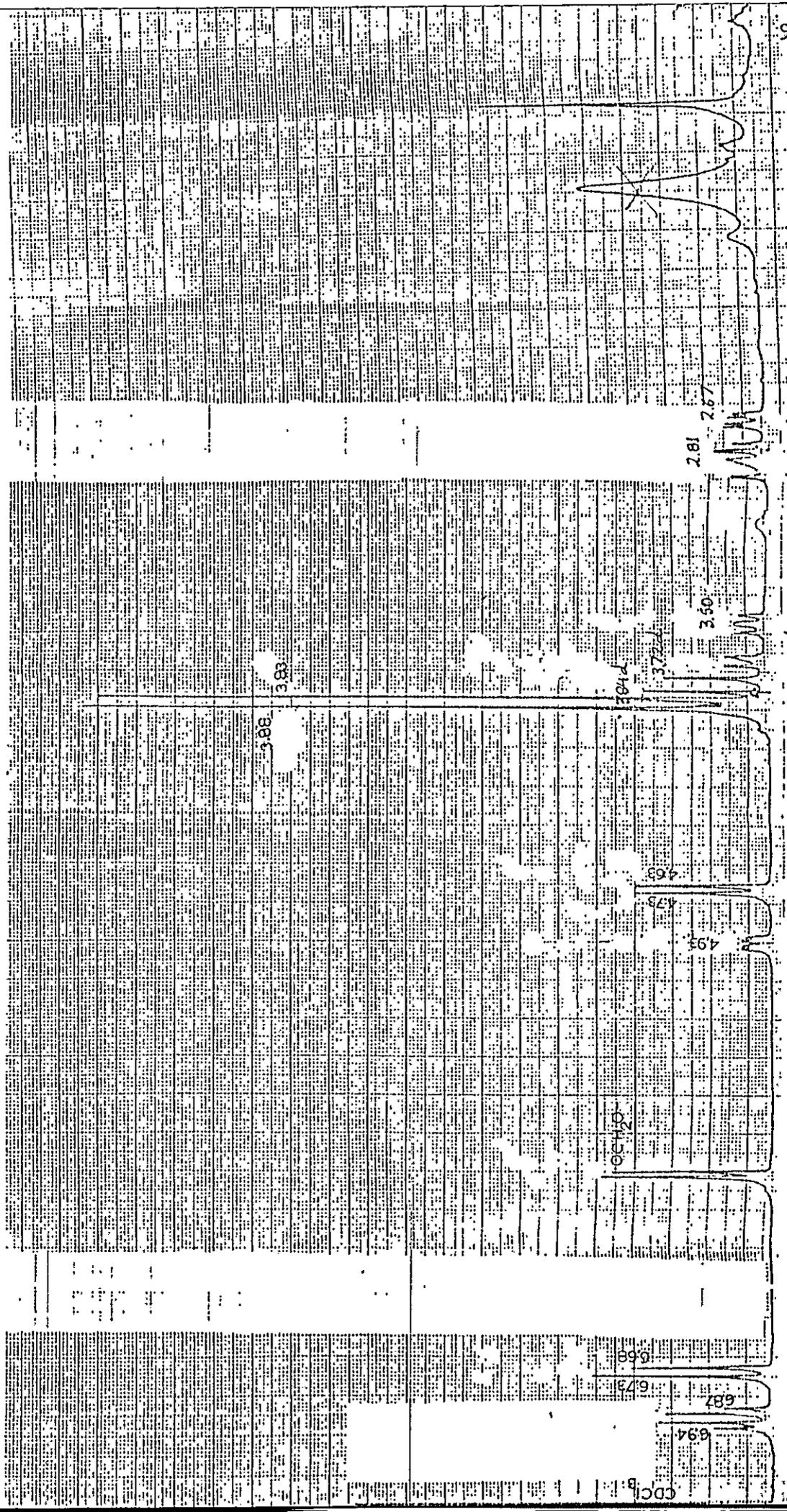


Figura 3-10. Espectro de RMN-¹H (360 MHz) de dihidropuntarenina.

DS-55 MASS INTENSITY REPORT: PGM MASS SPEC LAB
 35VIE.5 ETIC-6X390C0, 1048-475332) C1

EN-24

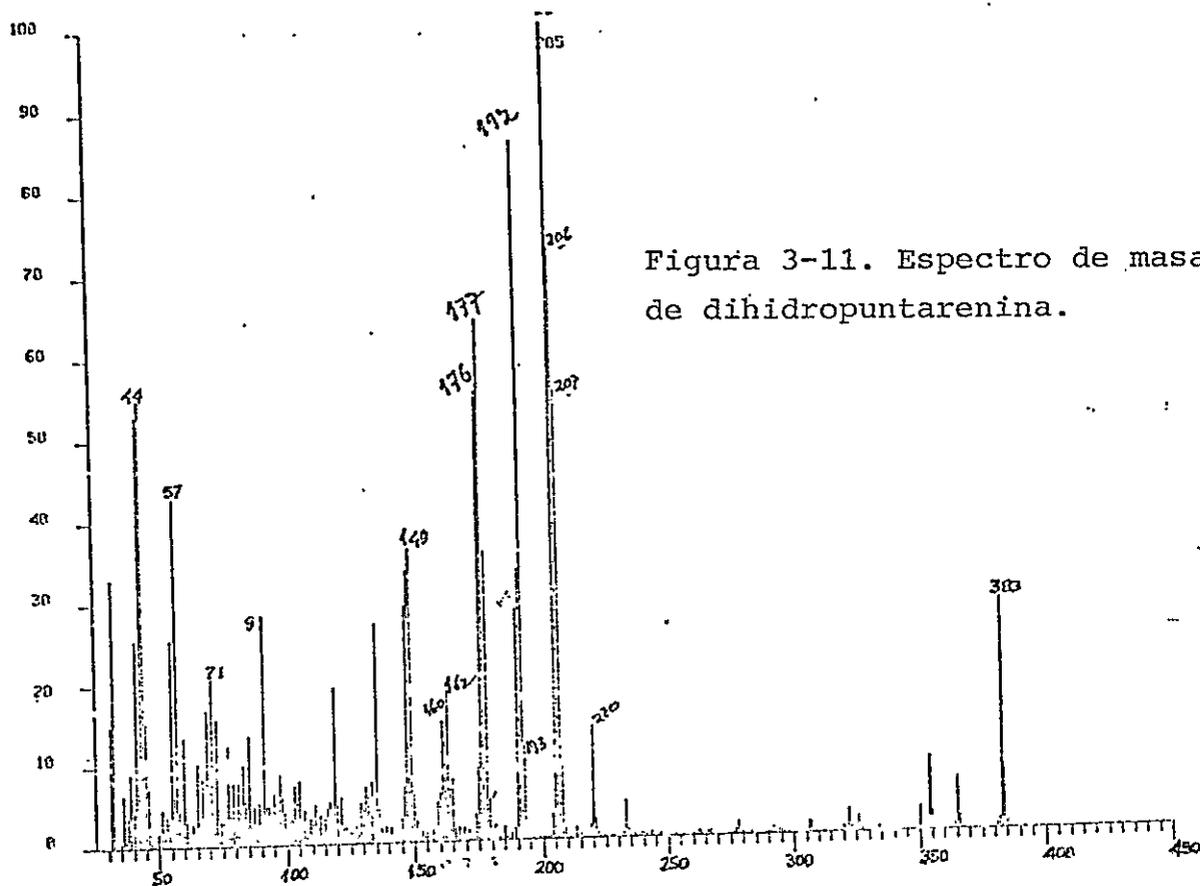


Figura 3-11. Espectro de masas de dihidropuntarenina.

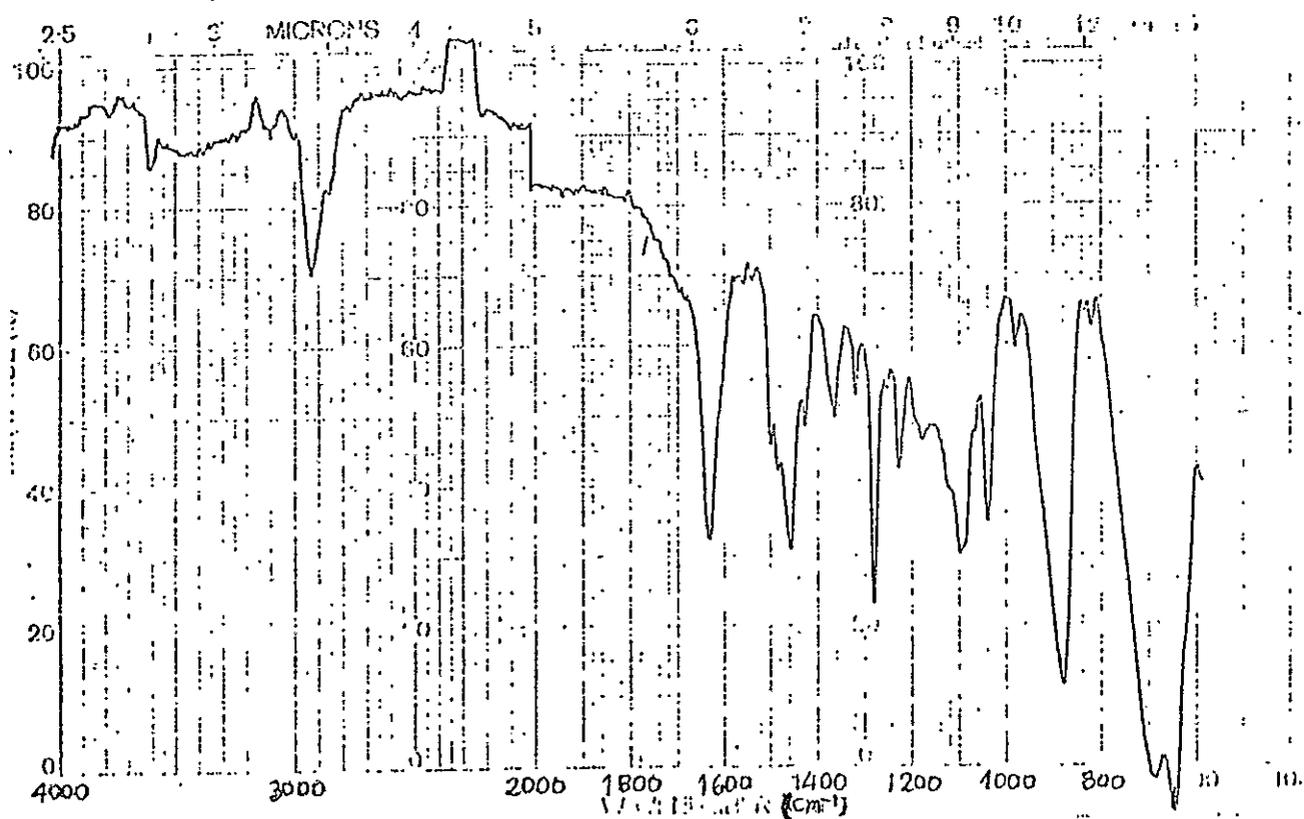


Figura 3-12. Espectro de IR de dihidropuntarenina.

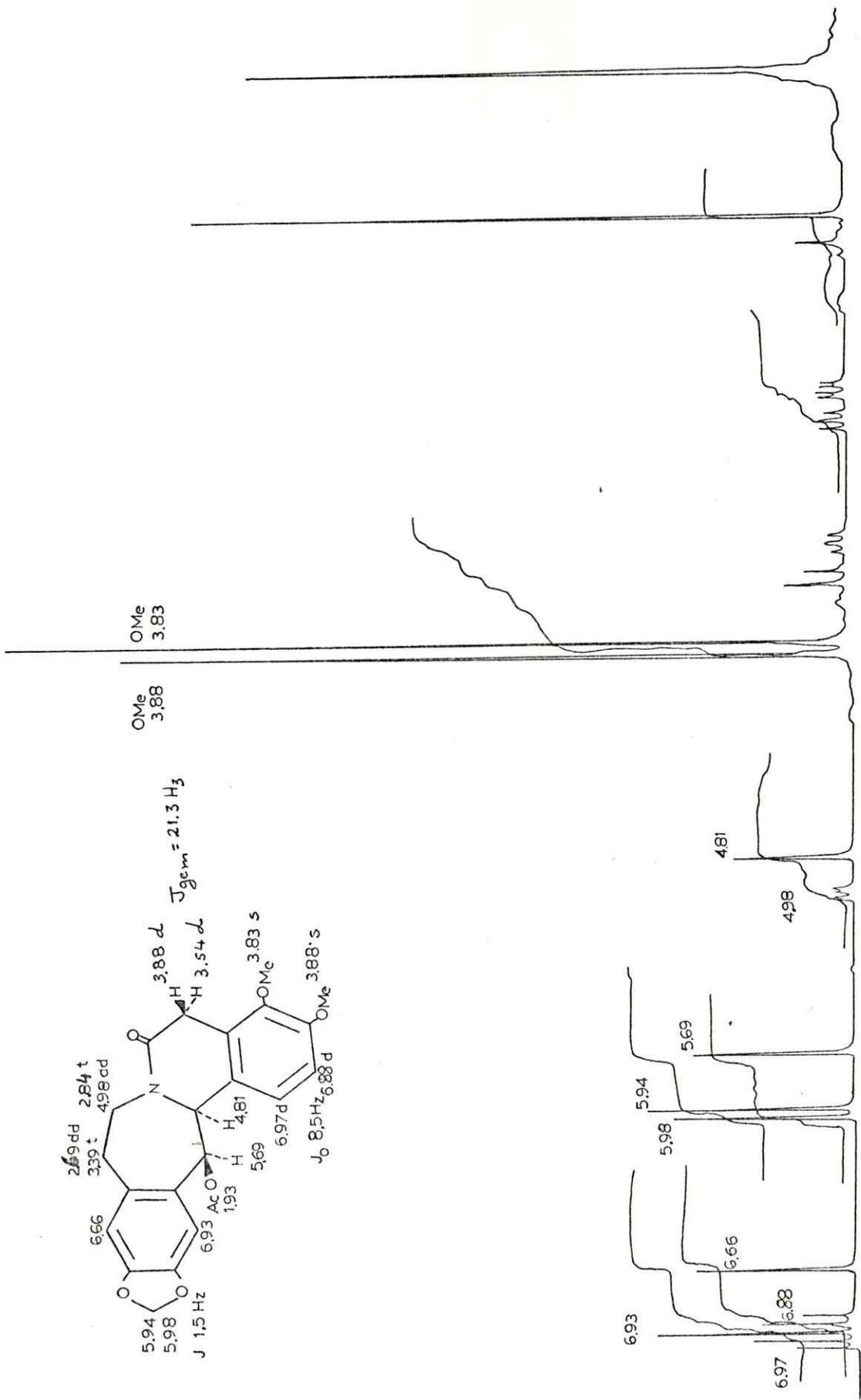
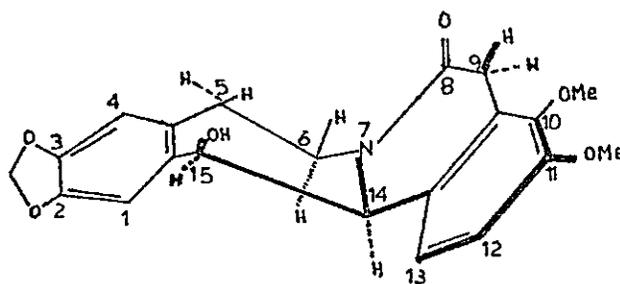
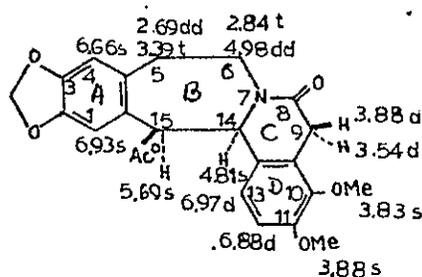


Figura 3-13. Espectro de RMN de ¹H (360 MHz,) de acetato de dihidropuntarenina.



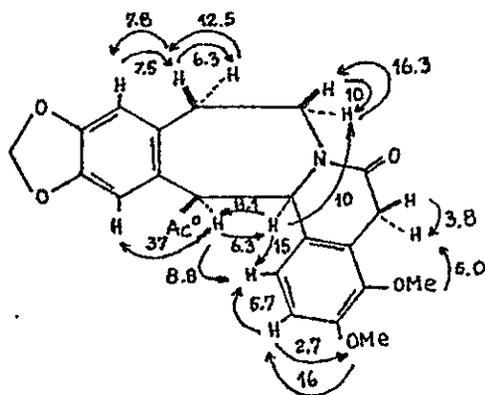
3-11a



3-12

Las pruebas concluyentes en la asignación de la estructura 3-6 para puntarenina se lograron mediante el estudio de los espectros de RMN usando el efecto nuclear Overhauser en la estructura 3-12. Este estudio se resume en la expresión 3-12a. La irradiación del protón en C-14 ($\delta 4.81$) produjo un e.n.o. de 10% para H-6 α (2.84), 8.1% para H-15 ($\delta 6.59$), y 15% para H-13 ($\delta 6.97$). La absorción de H-13 también muestra un incremento de un 5.7% por la irradiación de H-12 ($\delta 6.88$). Se desprende que los dos metoxilos en el anillo D están localizados en C-10,11 más bien que en C-12,13. Otro resultado significativo es que la irradiación del singulete

correspondiente al metoxilo en C-11 presentó un e.n.o. de 16% para H-12 (66.88).



3-12a

3.5.- Algunas notas biogénéticas acerca de puntarenina.

El alcaloide natural conocido más cercano a puntarenina es chileni-
na (3-3), que ha sido descrito previamente en este trabajo. Como se dijo,
chilenina se formó probablemente en la naturaleza a partir de berberina
(3-1), y de hecho puede derivarse de ella por una oxidación química in
vitro¹⁸. Una novedosa posibilidad sería que chileni-
na o uno de sus cercanos análogos pueda sufrir in vivo homologación para producir puntare-
nina (3-6). En tal caso estaríamos en presencia de una nueva e interesan-
te ruta biogénética para los alcaloides berbínicos.

3.6.- Determinación de Estructuras de Alcaloides Protopínicos.

3.6.1.- Protopina (3-13).

La cristalización de metanol dio prismas blancos, p.f. 205-207°. El espectro de masas mostró un pico base a m/z 148, cuya formación puede

ser visualizada como una fragmentación del ión molecular m/z 353, tal como se muestra a continuación:

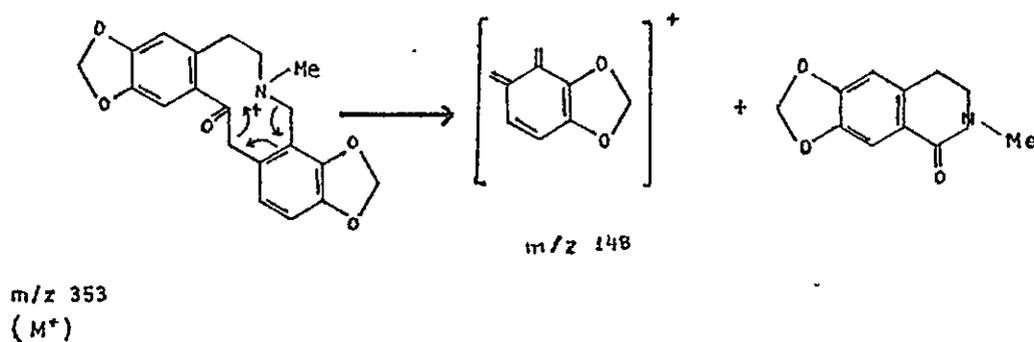
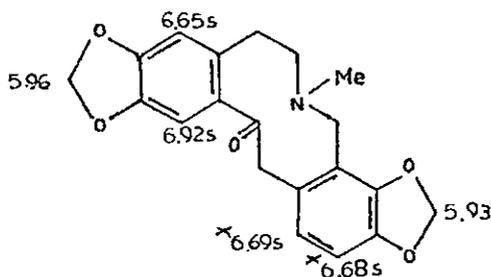


figura 3-14
Esquema de Fragmentación de Protopina

El alcaloide fue idéntico en todas sus propiedades con una muestra patrón en nuestro poder, en término de UV, RMN²² y EM²². La característica principal del espectro de RMP (figura 3-15), son los cuatro singuletes para los cuatro protones aromáticos a δ 6.65, 6.68, 6.69 y 6.92.



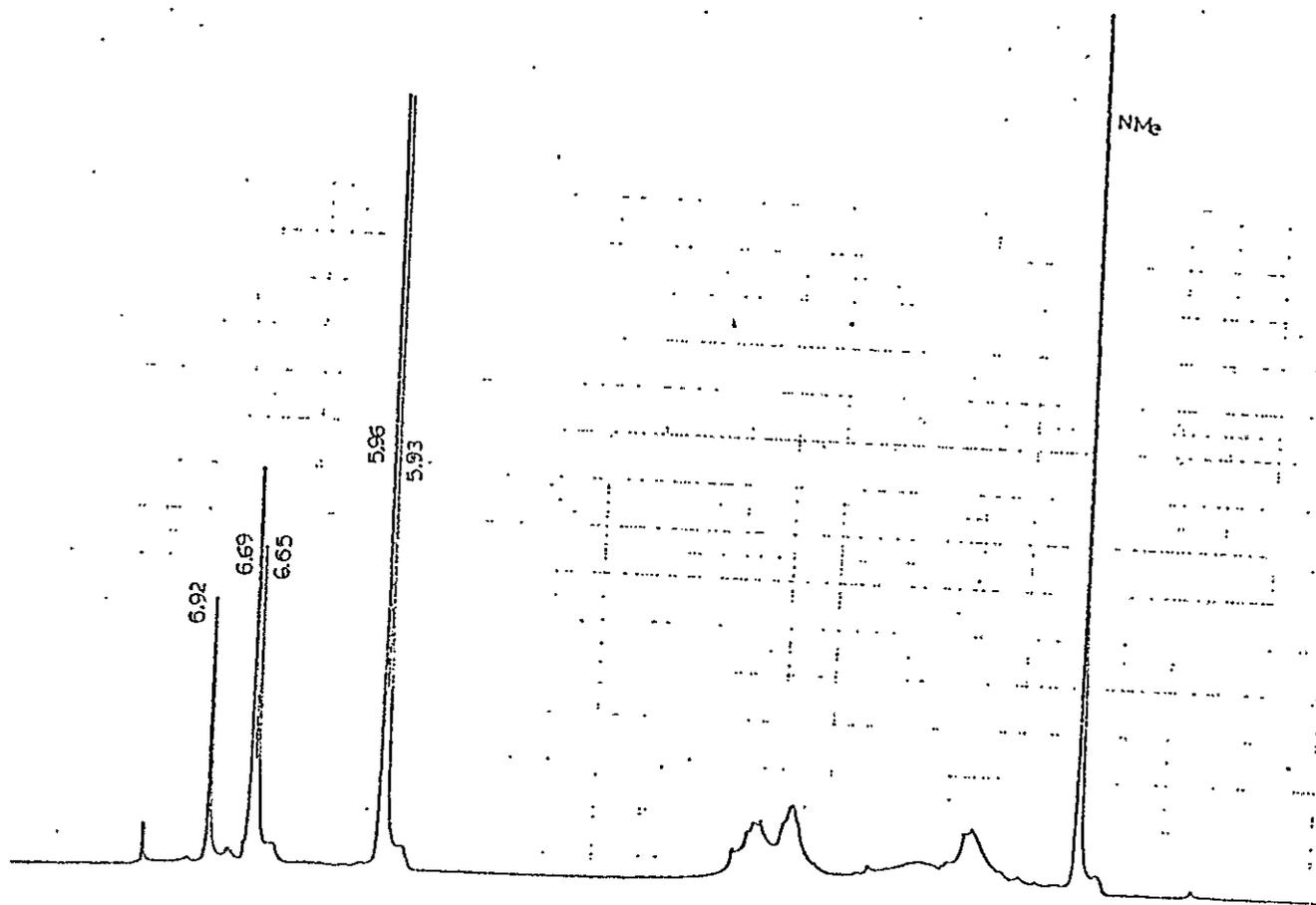
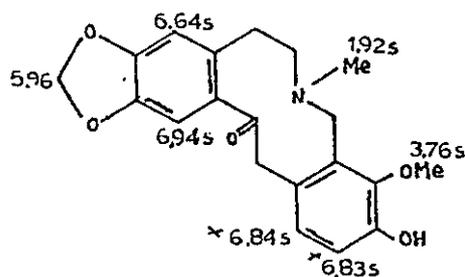


Figura 3-15. Espectro de RMN-¹H (200 MHz) de protopina.

3.6.2.- Talictricina (3-14)

Es este otro alcaloide del tipo de las protopinas y no había sido nunca aislado de especie alguna del género Berberis. El espectro de RMP se caracterizó por la presencia de un singulete correspondiente al grupo metilendioxi a 5.96, un singulete correspondiente al grupo metilendioxi a 3.76 ppm, un singulete atribuible a un NMe, pero con un desplazamiento químico a alto campo (δ 1.92), aparte de cuatro singuletes debidos a protones unidos a anillos aromáticos a δ 6.64, 6.83, 6.84, y 6.94.



3-1

El espectro de masas (figura 3-18) mostró un pico base a m/z 206. (Figura 3-16).

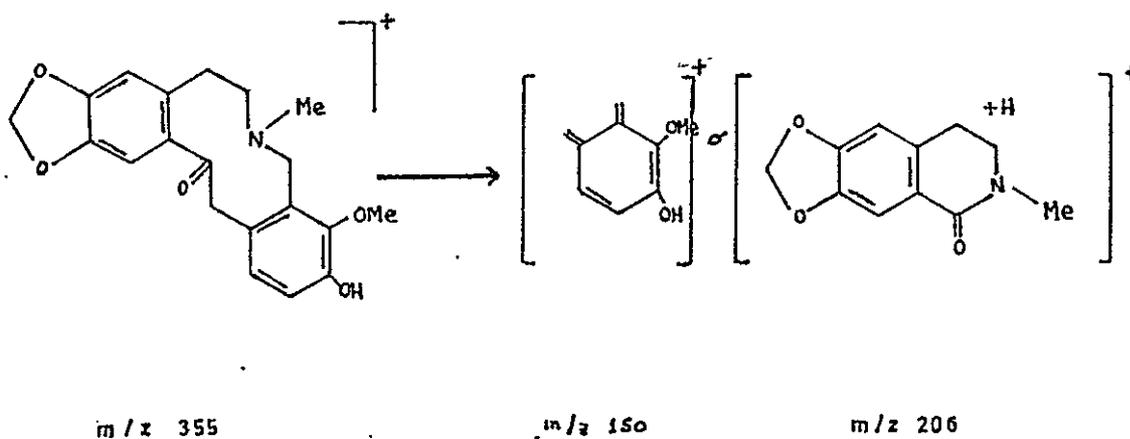


figura 3-16

Esquema de Fragmentación de Talictricina

Figura 3-17. Espectro de
RMN-¹H (200 MHz) de talictri-
cina.

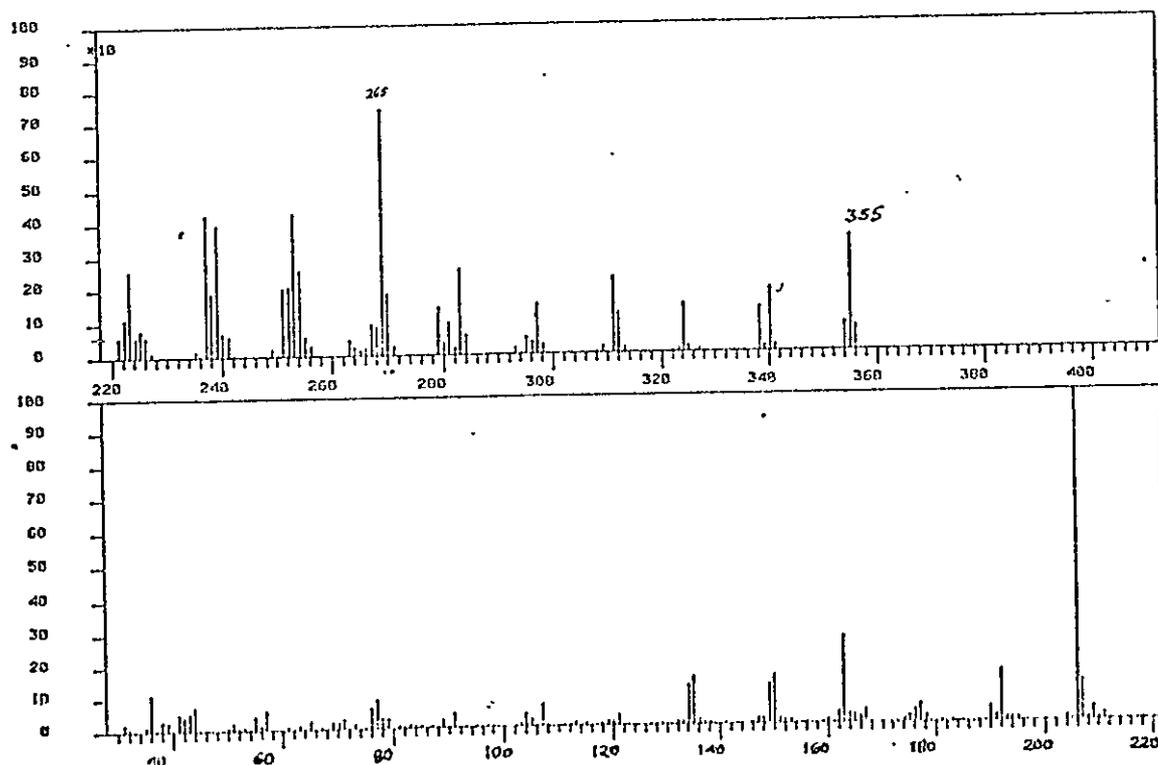
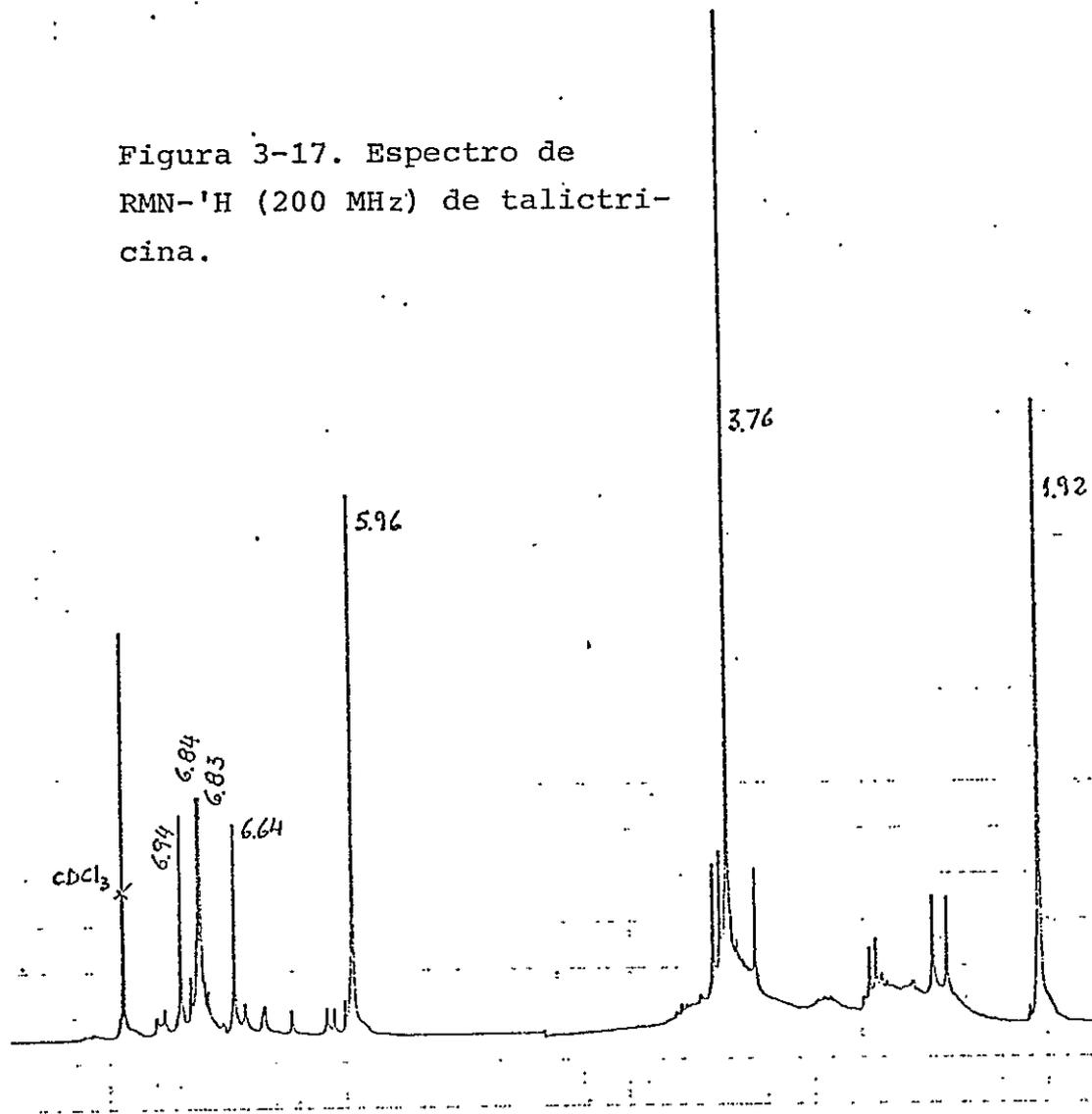


Figura 3-18. Espectro de masas de talictricina

Este alcaloide fue idéntico en todas sus propiedades con las que registra la bibliografía²³ y con las de una muestra patrón.

3.7.- Determinación de Estructuras de Alcaloides Isoquinolónicos

3.7.1.- Noroxihidrastinina (3-15).

Este compuesto fue purificado por ccf preparativa, usando el sistema B, p.f. 182-183°C. No había sido nunca aislado de una Berberis y en general ninguna isoquinolona lo ha sido. El espectro de IR (figura 3-21) noroxihidrastina mostró una absorción intensa a ν_{\max} 1.660 cm^{-1} , característico del carbonilo de la δ -lactama (figura 3-21). El espectro de masas mostró el ión molecular a m/z 191 ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$), además de otros fragmentos importantes a m/z 162, 134, 104 y 76. (figura 3-19).

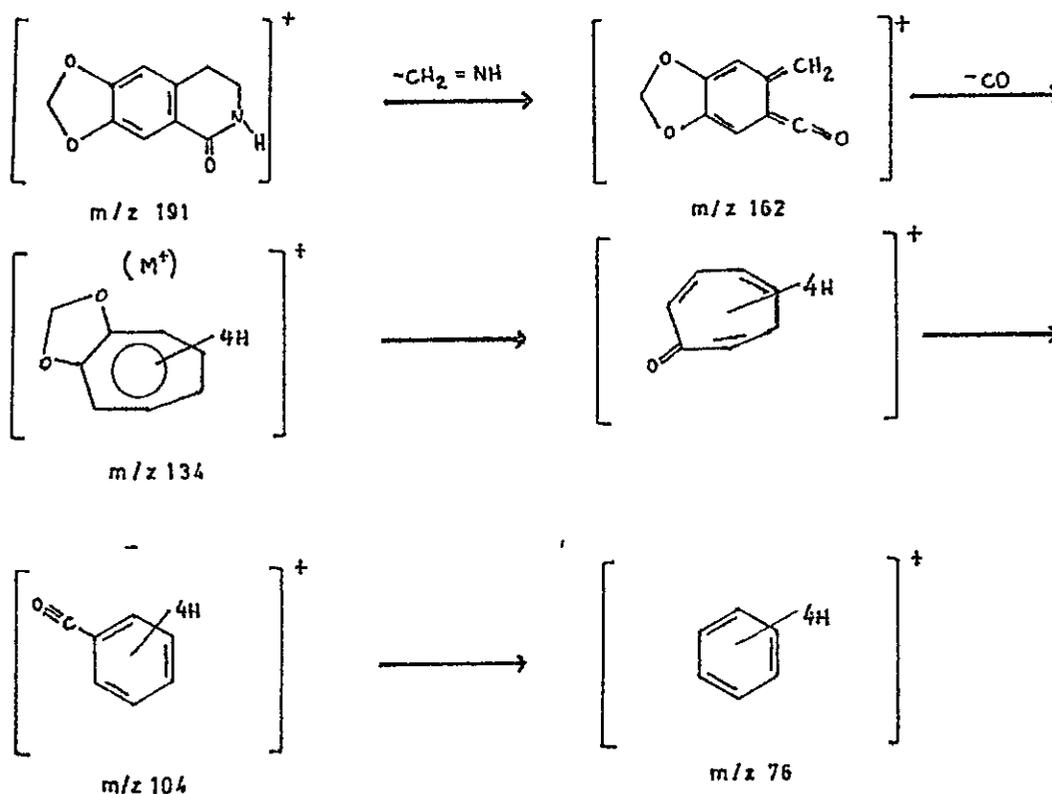


figura 3-19
Esquema de Fragmentación de noroxihidrastinina

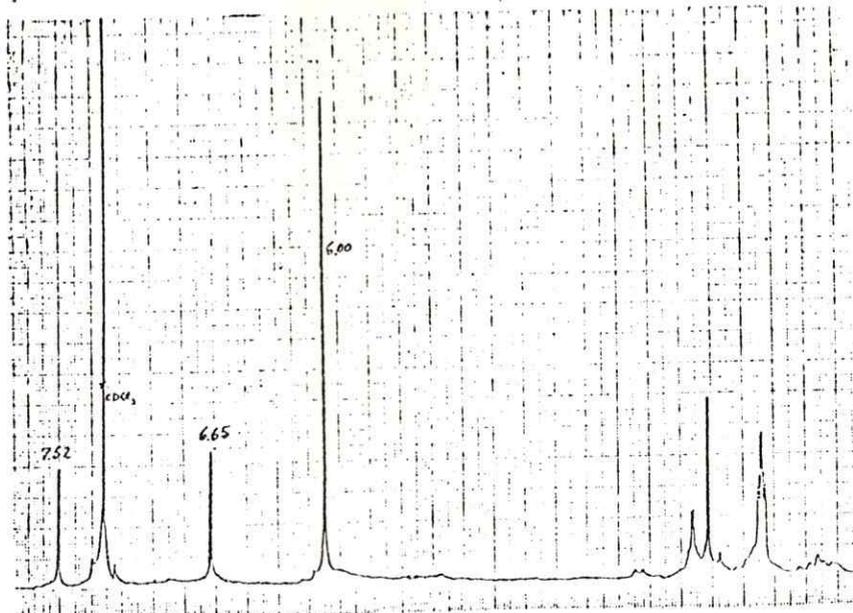


Figura 3-20. Espectro de RMN-¹H (200MHz) de noroxihidrastinina.

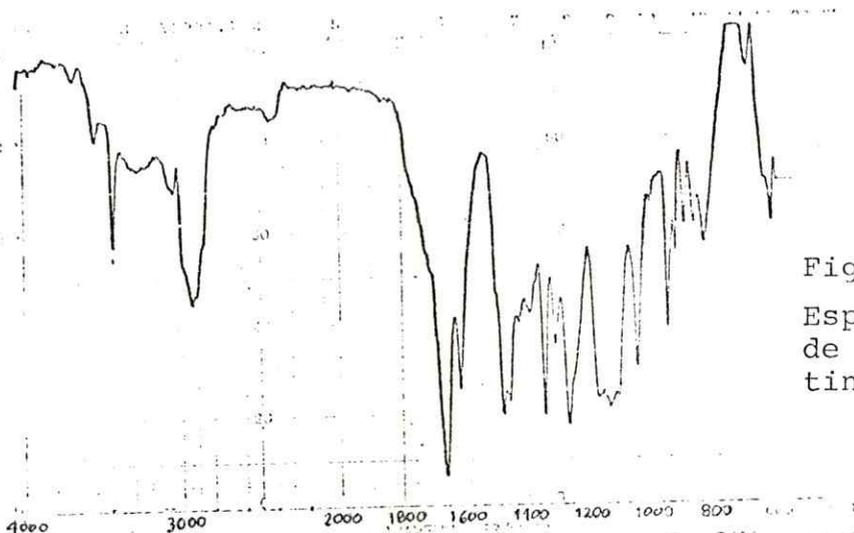


Figura 3-21. Espectro de IR de noroxihidrastinina.

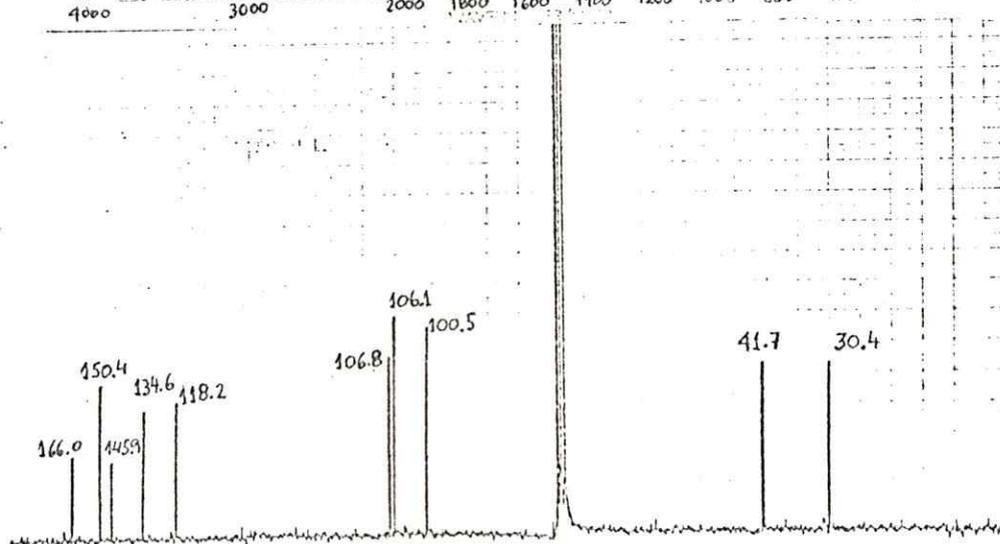
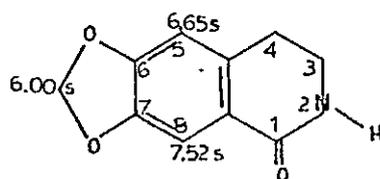


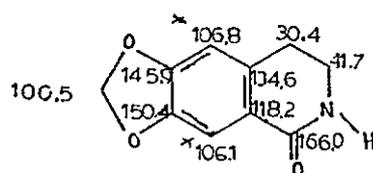
Figura 3-22. Espectro de RMN de ¹³C de noroxihidrastinina.

El espectro de RMP (figura 3-20) mostró un singlete a $\delta 6.0$ correspondiente al grupo metilendioxi, aparte de otros dos a $\delta 6.65$, y 7.52 para los protones aromáticos en C-5 y 8, resp.



3-15

El espectro de RMP de ^{13}C (figura 3-22)^{24,25} mostró las señales que se anotan en la expresión 3-15a.



3-15a

3.7.2.- Dorifornina (3-16).

Fue obtenido como un sólido que funde a $210-213^\circ\text{C}$. El espectro de masas (figura 3-25) mostró un pico base a m/z 205, correspondiente también al ión molecular ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$). En general, su fragmentación es la misma que la exhibida por noroxihidrastinina (3-15) (figura 3-23).

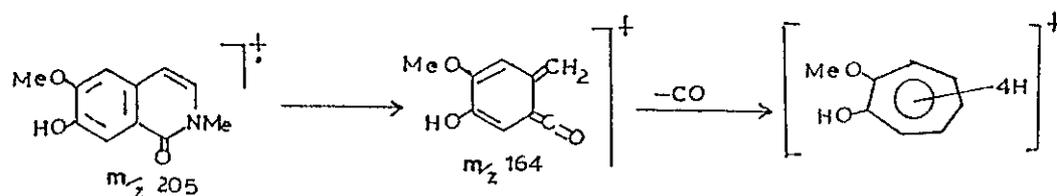
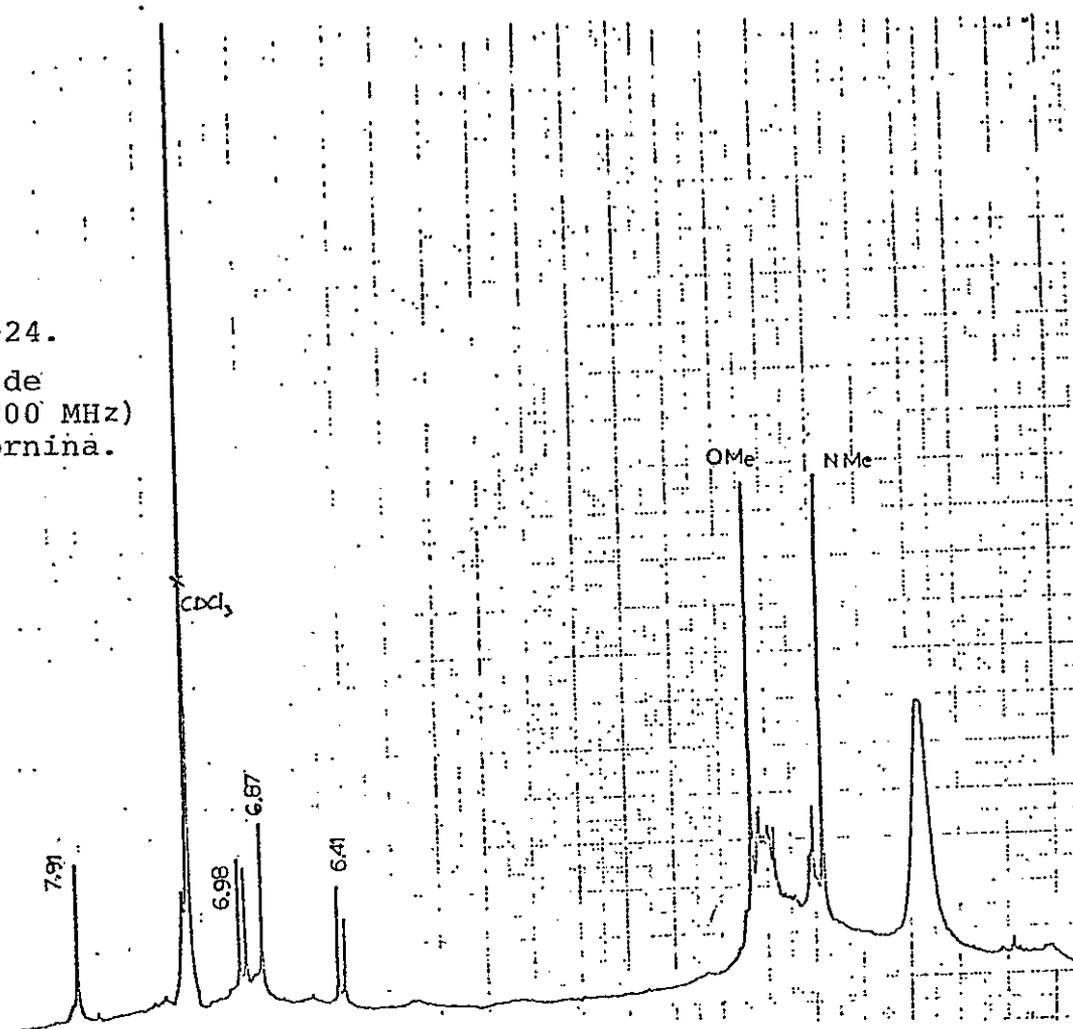


figura 3-23
Esquema probable de Fragmentación de dorifornina

Figura 3-24.

Espectro de
RMN-¹H (200 MHz)
de dorifornina.



DS-55 MASS INTENSITY REPORT: PSU MASS SPEC LAB
91VIF.23 (TIC-22119424, 1000-919466) EI

DST-84

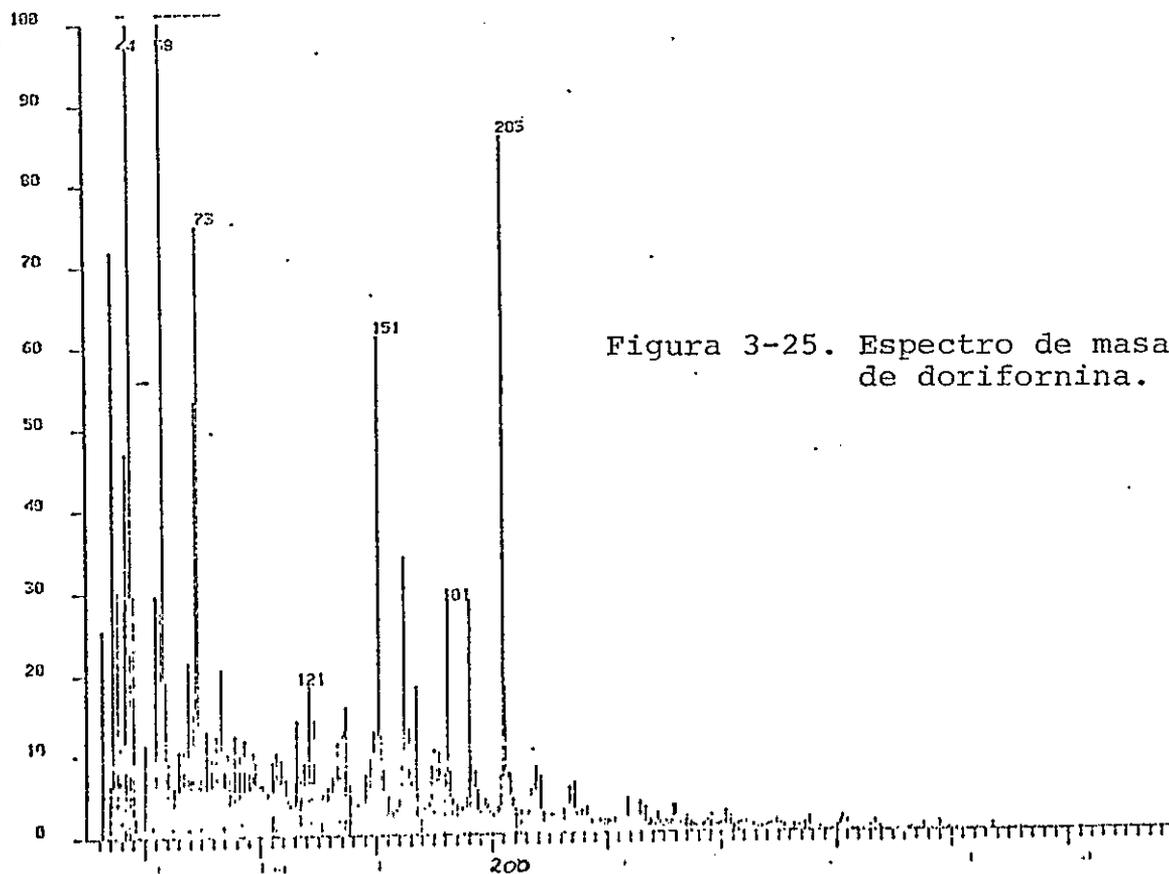
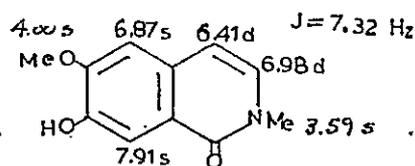


Figura 3-25. Espectro de masas
de dorifornina.

Este alcaloide obtenido por primera vez en Doryphora sassafras²⁶, mostró un espectro de RMP (figura 3-24), bastante sencillo: a $\delta 3.59$ un singulete para el grupo NMe, a $\delta 4.00$ un singulete para el grupo OMe, a $\delta 6.41$ un doblete ($J = 7.32$ Hz) para el protón en C-4, a $\delta 6.87$ un singulete para H-5, a $\delta 6.98$ un doblete para un protón acoplado con aquel que da el doblete a $\delta 6.41$, y por último está el protón que resuena a $\delta 7.91$ (H-8).

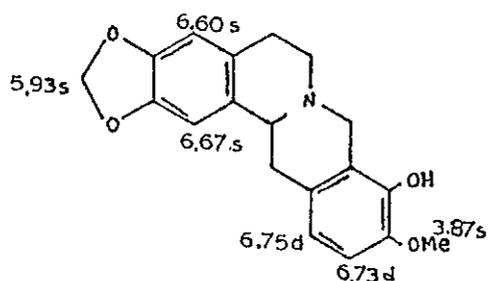


3-16

3.8.- Nandinina (3-17).

Este compuesto fue obtenido como un sólido amorfo, que no pudo ser recristalizado, debido a que descompone rápido. Cada vez que era necesario determinar alguna propiedad física debía ser purificado, lo que se lograba mediante ccf en el sistema C. El espectro de UV mostró λ_{\max} (MeOH) 205,285 nm ($\log \epsilon$ 4.11, 3.32), típico de un sistema tetrahidroprotoberberínico. La adición de base produjo un cambio batocrómico.

El espectro de RMP (figura 3-27) mostró un singulete a $\delta 3.87$ para el grupo OCH_3 , un singulete a $\delta 5.93$ para la señal de un grupo metilendioxi, así también como dos singuletes para protones unidos a anillo aromático a $\delta 6.60$ (H-4), y 6.73 (H-1), aparte de dos dobletes para dos protones acoplados entre sí a $\delta 6.67$ y 6.75 (H-11 y 12 resp.) con $J_o = 8,5$ Hz.



3-17

El espectro de masas (figura 3-28), mostró tres fragmentos importantes y característicos de un sistema berbínico (figura 3-26).

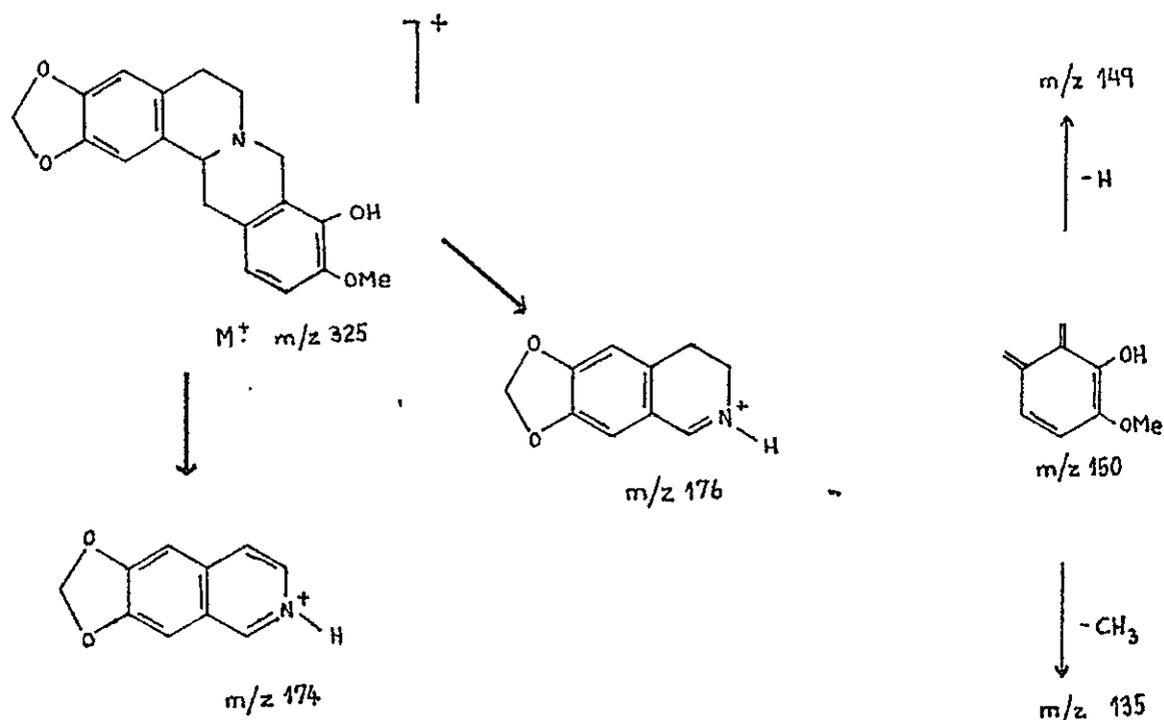
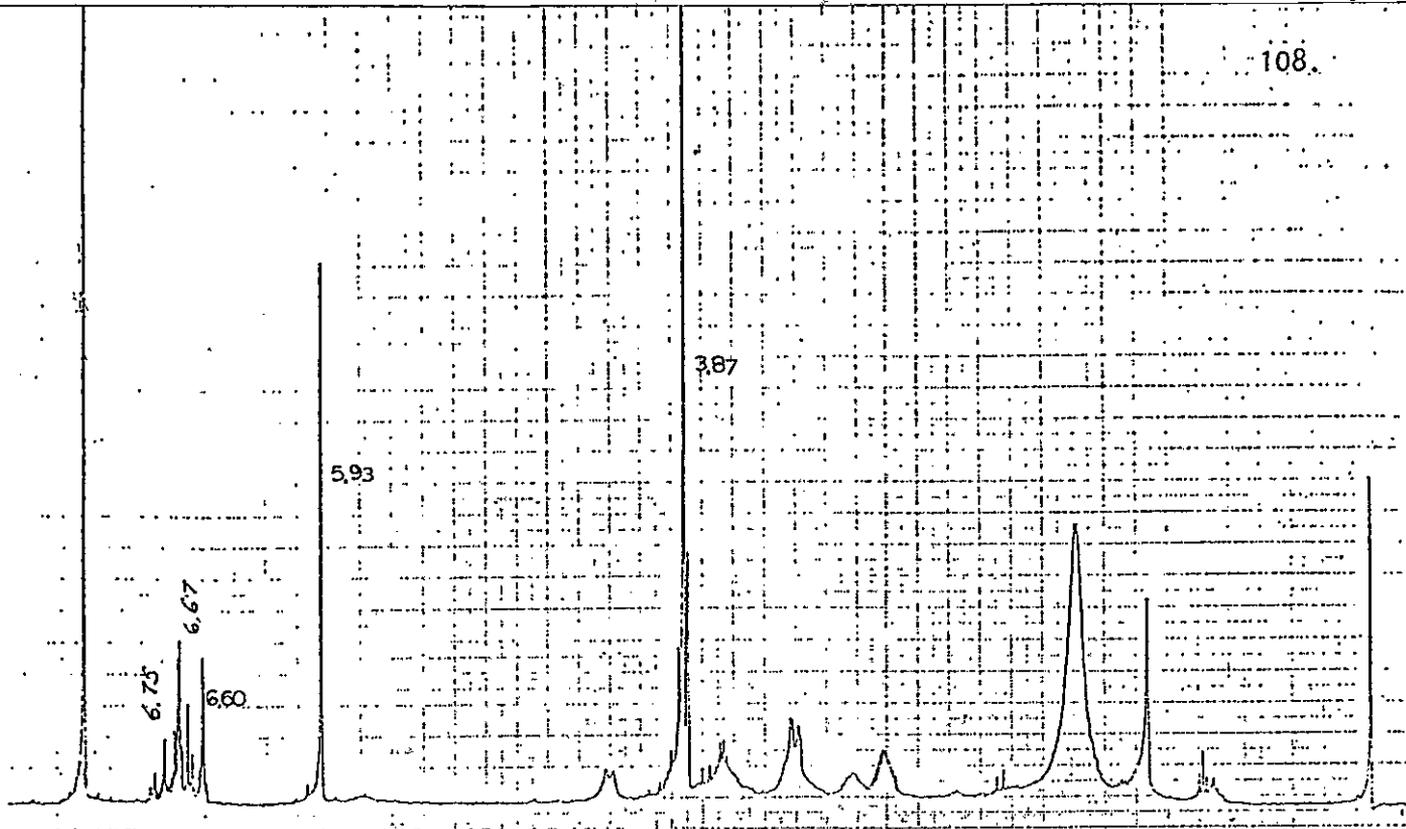


figura 3-26

Esquema de Fragmentación de Nandinina



85-85 MASS INTENSITY REPORT: PSU BYSS SPEC LAB
 DIVISION (110-215-1112) 1000-320163 ES

Figura 3-27. Espectro de RMN-¹H (360 MHz) de nandinina.

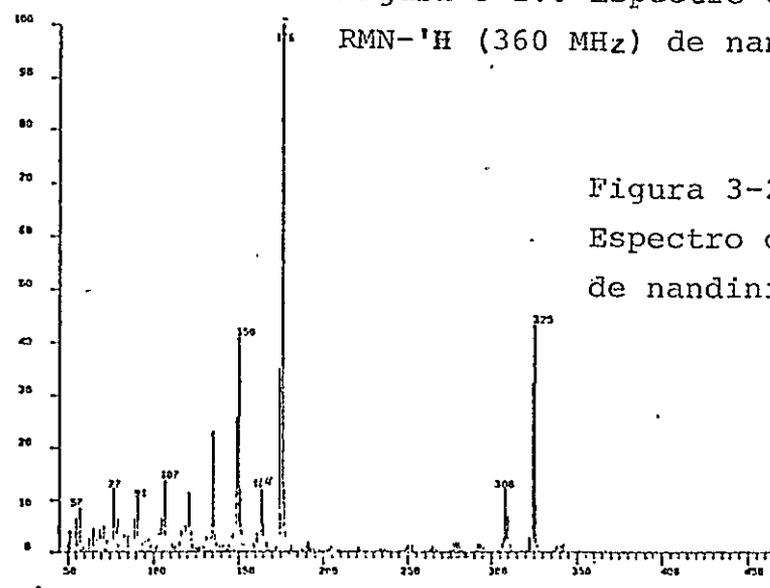
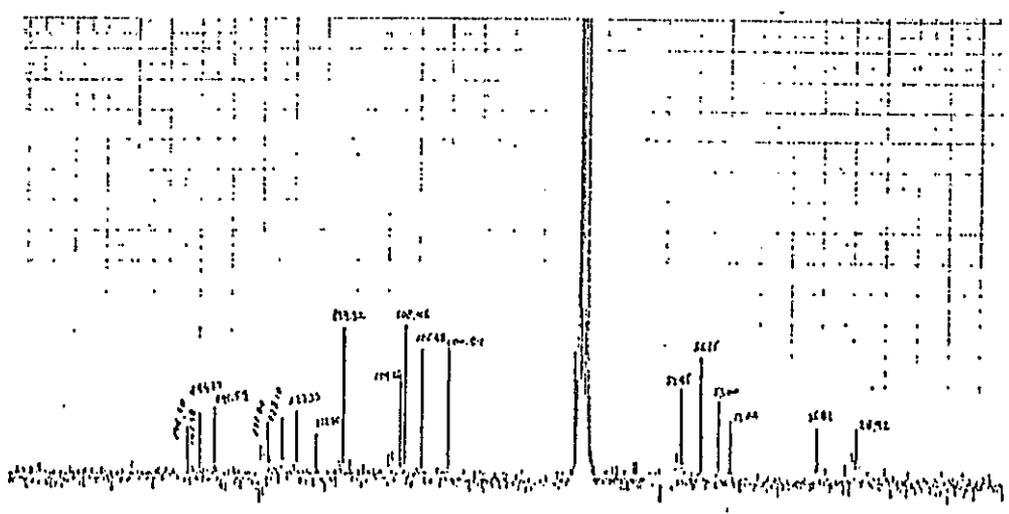
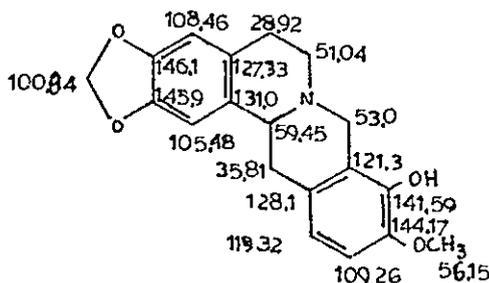


Figura 3-28. Espectro de masas de nandinina.

Figura 3-29. Espectro de RMN-¹³C de nandinina.

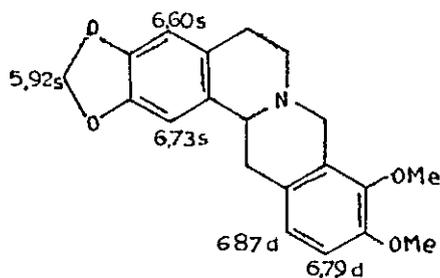


El espectro de RMN- ^{13}C (figura 3-29)²⁵, fue registrado en un aparato Bruker-200 en solución de CDCl_3 , y mostró los desplazamientos químicos que se anotan en la estructura 3-17a. Los datos son concordantes con los que aparecen en la bibliografía²⁵.

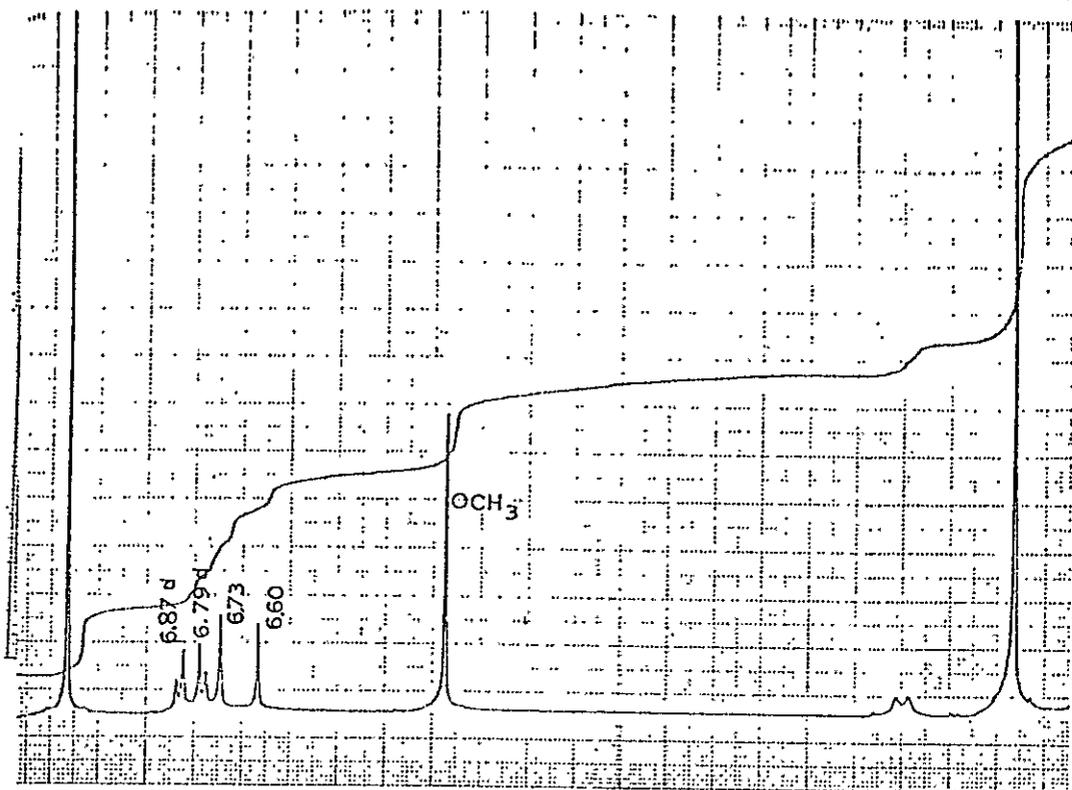


3-17 a

Como una prueba estructural se realizó la síntesis de canadina (3-18) que resultó idéntica en todos sus aspectos físicos y cromatográficos con una muestra patrón en nuestro poder. (ver figura 3-30 y 3-31).



3-18



DS-55 MASS INTENSITY REPORT; PSU MASS SPEC LAB
 107VIF.5 [TIC=1340608, 100%+42123] EI
 107VIF.13 [TIC=401440, 100%+27330] EI

Figura 3-30. Espectro de RMN-¹H
 (200 MHz) de canadina.

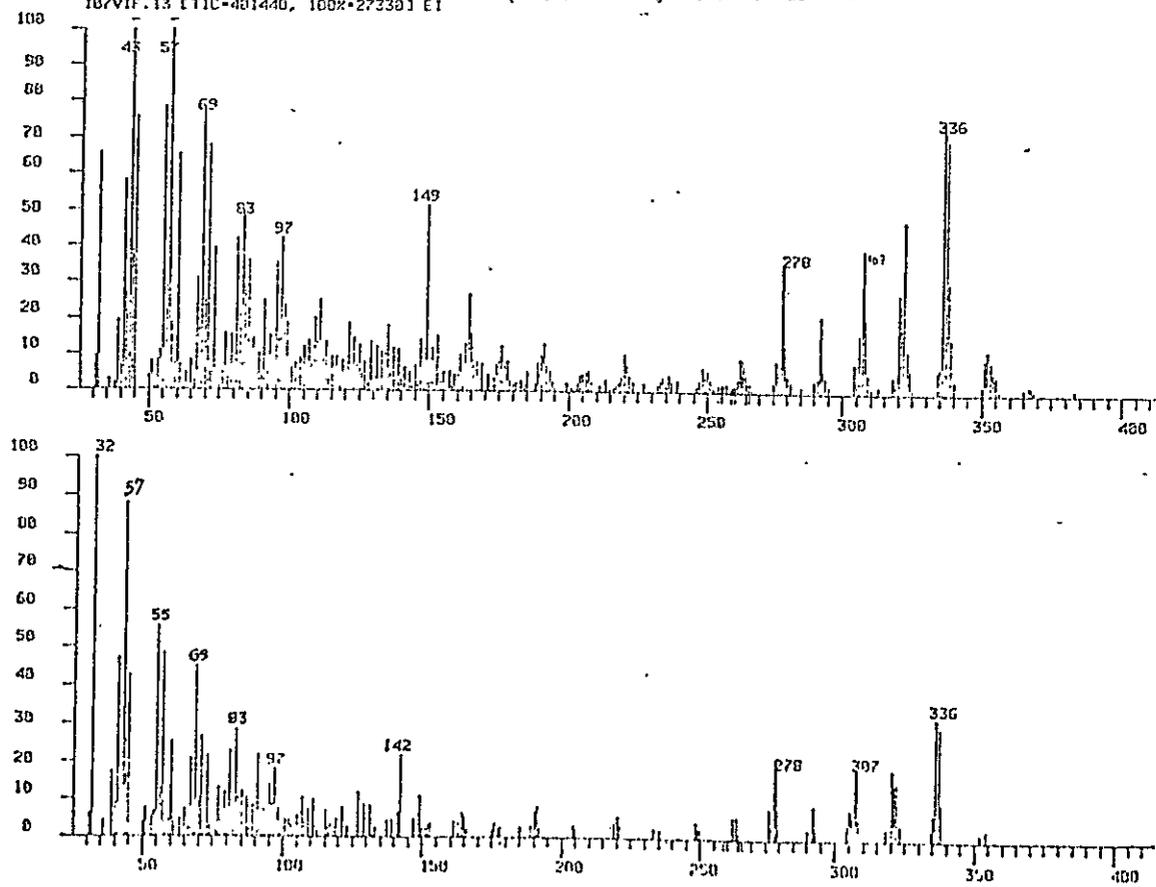


Figura 3-31. Espectro de masas de canadina.

Figura 3-32.
Espectro de RMN-¹H
(200 MHz) de ace -
tato de nandinina.

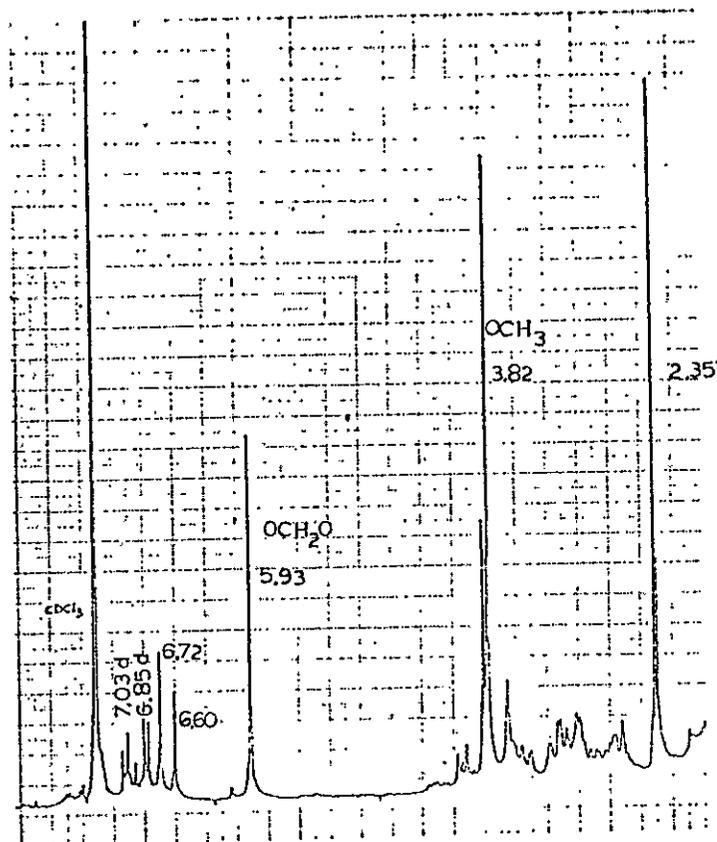
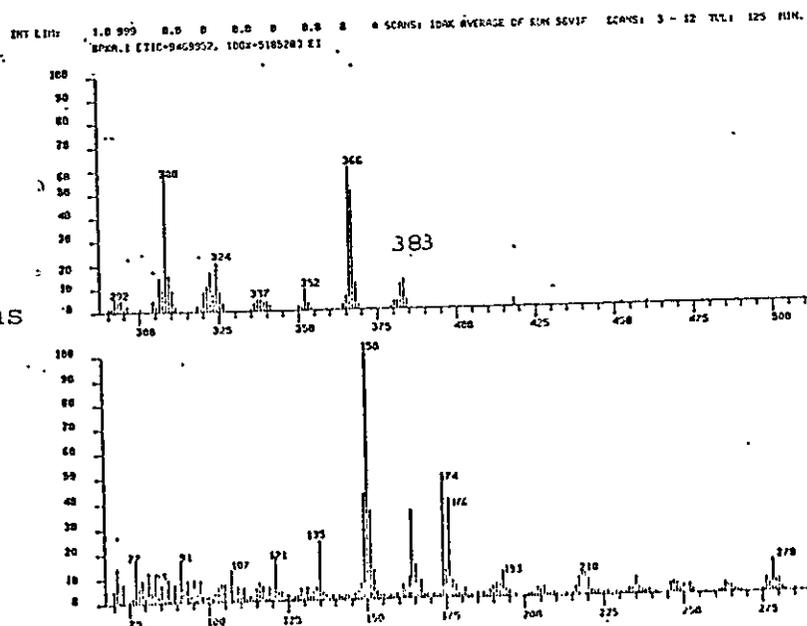
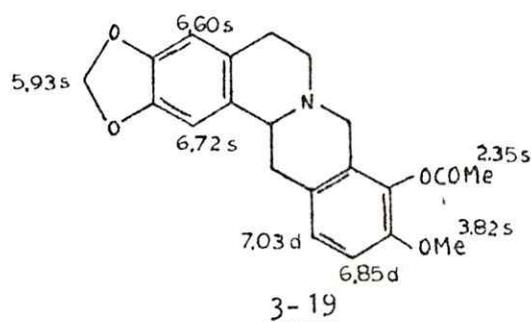


Figura 3-33.
Espectro de masas
de acetato de
nandinina.

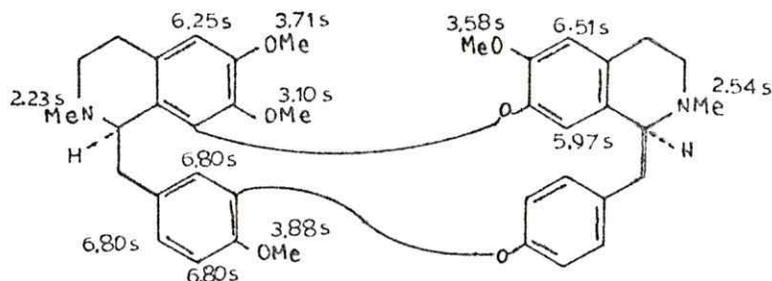


La acetilación de nandinina (3-17), produjo el acetato de nandinina (3-19), cuya dilucidación estructural se realizó analizando el espectro de RMP (figura 3-32) y el espectro de masas (figura 3-33). El modelo de fragmentación es equivalente al mostrado por nandinina misma y por canadina.



3.9.- Isotetrandina (1-19).

Isotetrandina es una base dimérica, bisbencilisoquinolínica, aislada pocas veces de Berberis, pero íntimamente relacionada con la berbamina (1-15) ampliamente distribuida en el género. El estudio espectrométrico (figuras 3-35 y 3-36) y su comparación con un patrón condujeron fácilmente a su identificación.



1-19

La fragmentación mostrada por el espectro de masas es la siguiente:

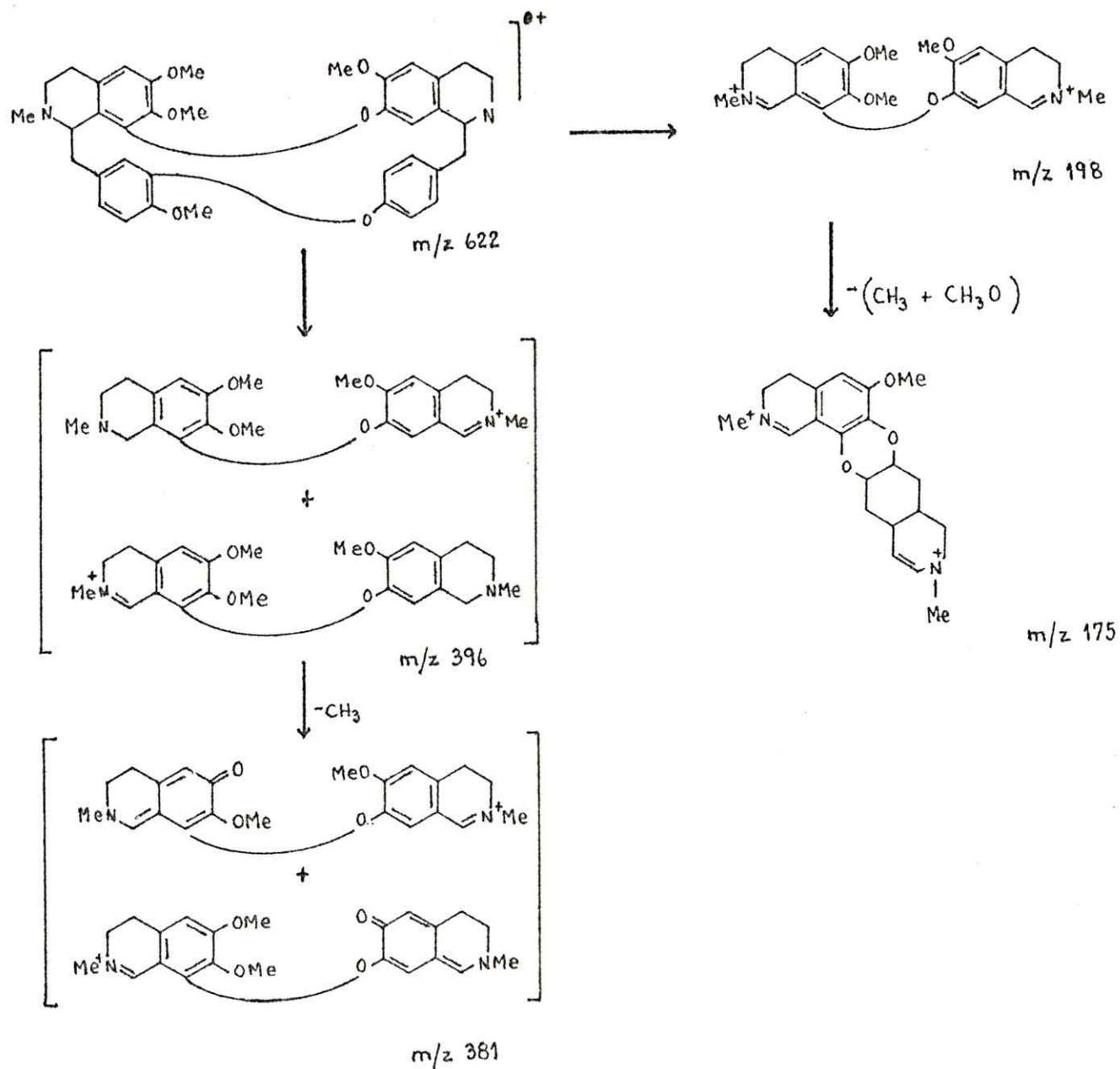


figura 3-34

Esquema de fragmentación de la Isotetrandina

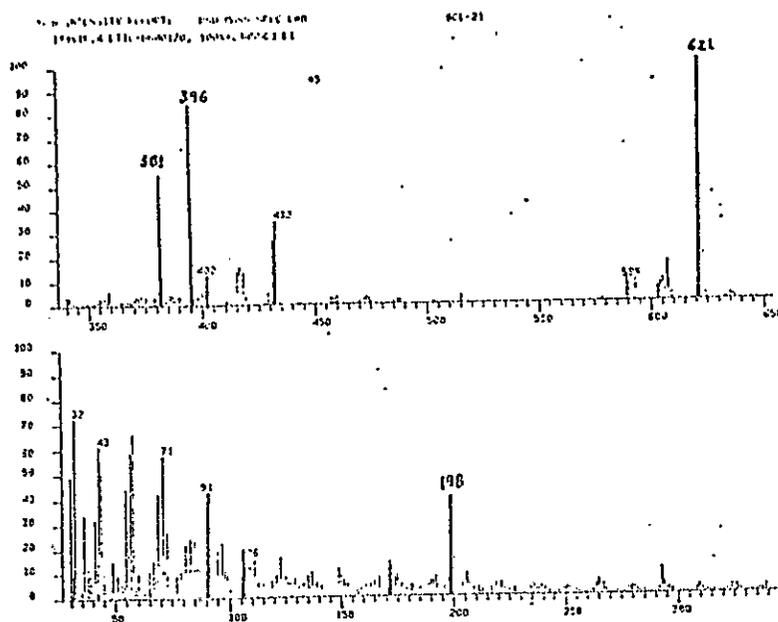


Figura 3-35. Espectro de masas de isotetrandina

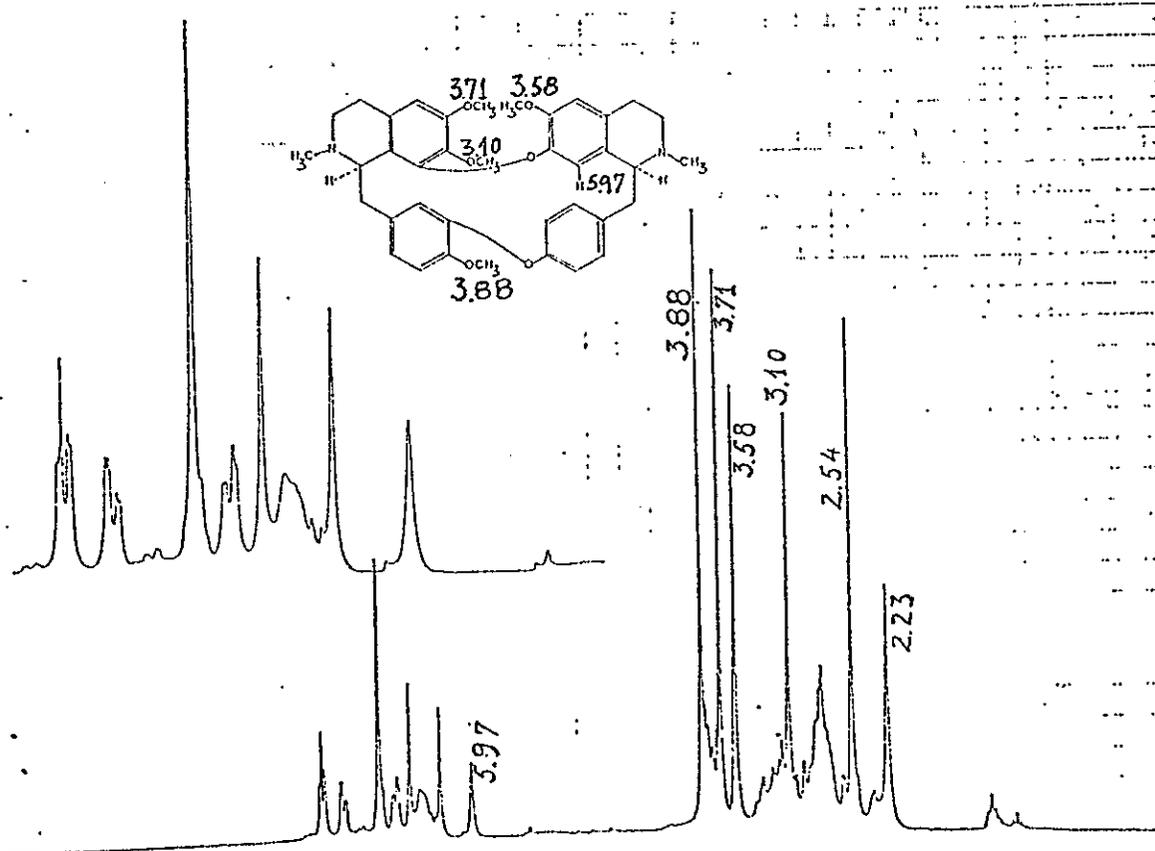
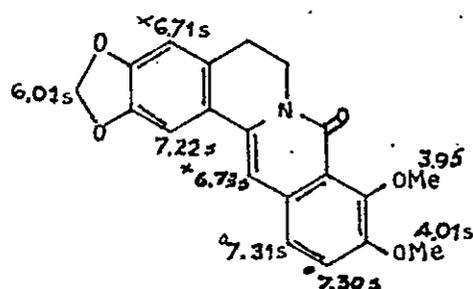


Figura 3-36. Espectro de RMN-¹H (200 MHz) DE isotetrandina

3.10 .- Oxiberberina (3-20)

Oxiberberina (3-20), es un alcaloide que probablemente es un artefacto, que se produce facilmente por oxidación al aire de la pseudobase de la berberina. Su espectro de RMP (figura 3-38) mostró cinco singuletes para protones unidos a anillos aromáticos a δ 6.71, 6.73, 7.22, 7.30 y 7.31, para los hidrógenos en C-1,2, 11 y 12, dos singuletes a δ 3.95 y 4.01 para los grupos O-Me en C-9, y 10, resp.



3-22

El espectro de masas (figura 3-37) se caracterizó porque el pico base correspondía también al ión molecular (m/z 351), existiendo otro fragmento a m/z 336 que caracteriza la pérdida de un grupo metilo del ión molecular.

El compuesto está de acuerdo con los datos que se entregan en la bibliografía en cuanto a RMN, UV y EM²⁴.

3.11.- Determinación de Estructuras de Alcaloides Diméricos aporfina-bencilisoquinolina.

3.11.1.- Generalidades espectroscópicas

Generalmente la primera técnica espectroscópica usada en la determinación estructural de alcaloides isoquinolínicos es UV, que en todos

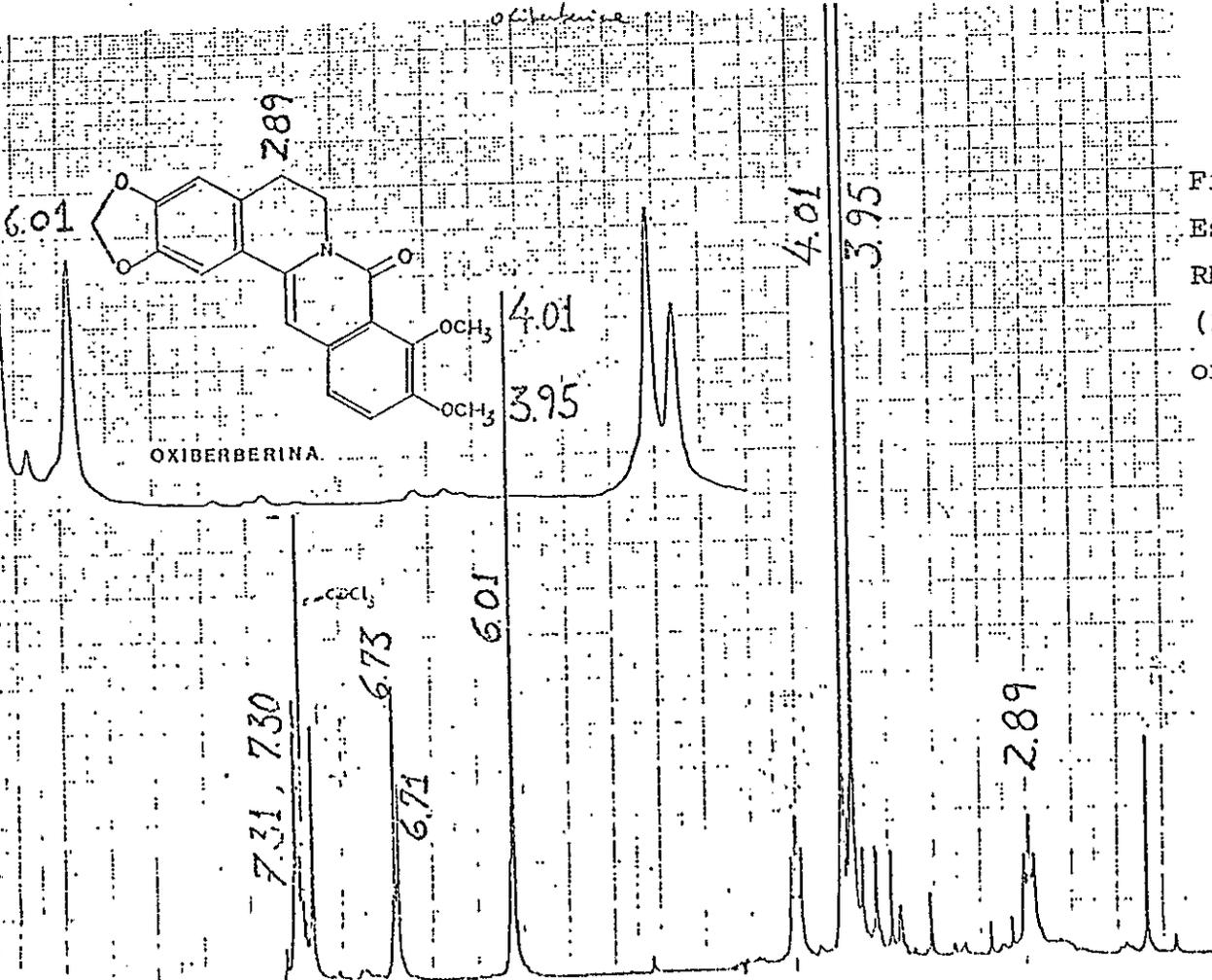
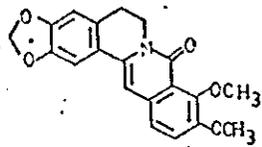
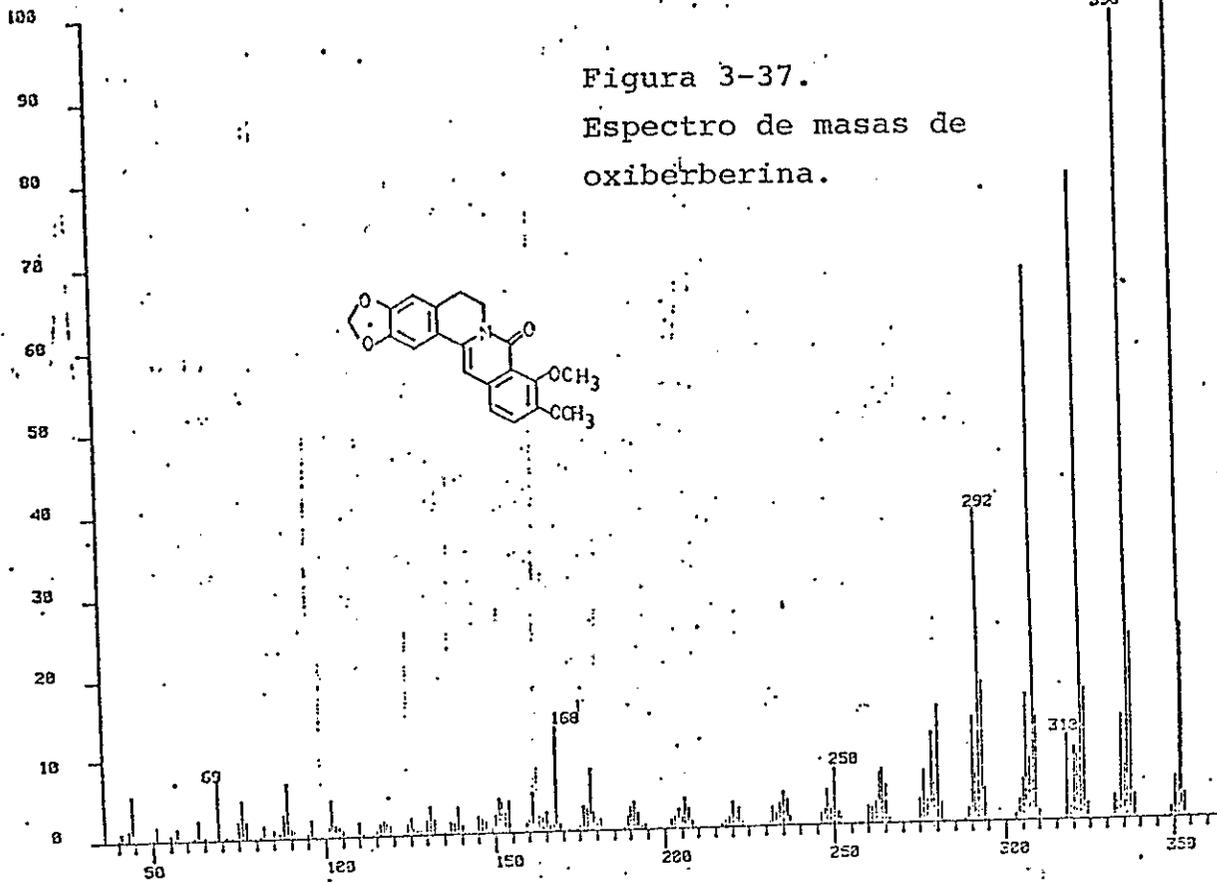


Figura 3-38
Espectro de RMN-¹H (200 MHz) de oxiberberina.

los casos de alcaloides diméricos del tipo de la pakistanina (1-37) muestra curvas muy características con λ_{max} (MeOH) 224, 267, 278 y 308 nm ($\log \epsilon$ 4.61, 4.13, 4.21 y 4.07).

Al observar las curvas de dicroísmo circular de pakistanina, (1-36), chitralina (1-38), porveniramina (3-22) y la base obtenida por el reordenamiento de patagonina 3-27, es posible concluir que todos estos compuestos presentan igual configuración en ambos centros asimétricos, C-6a y C-1'. (Tabla 3-1).

Tabla 3-1

Datos de DC de los alcaloides diméricos aporfina-bencilisoquinolinas

Compuesto	$\Delta\epsilon$				nm
	310	274	244	212	
pakistanina	+5.03	+7.63	-18.02	+22.56	
chitralina	+4.79	+6.44	-21.96	+19.65	
porveniramina	+5.4	+8.2	-24.0	+22.0	
<u>3-27</u>	+2.6	+7.2	-33.0	+27.0	

El modelo de fragmentación del espectro de masas de pakistanina y sus derivados es característico de los dímeros aporfina-bencilisoquinolinas¹⁶ con un ión molecular muy débil (0.2 % de intensidad relativa) a excepción de la pakistanina que mostró un fragmento bastante significativo (20%), y un pico base, que corresponde al fragmento a, es decir a los anillos A' y B' de la mitad bencilisoquinolínica. Otros fragmentos importantes son aquellos a m/z (M-a), (M-b), (M-c), y $M^+ - c - a$ que apoyan el

hecho que las dos mitades isoquinolínicas están unidas a través de un enlace eter difenílico cola-cola (figura 3-39).

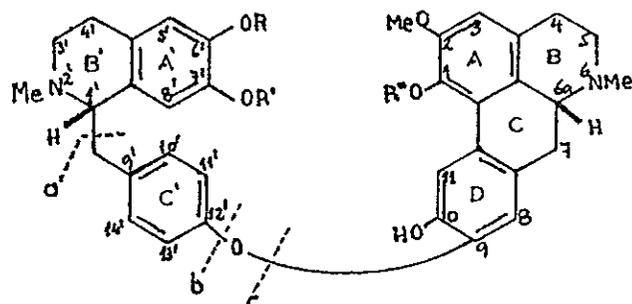


figura 3-39

Esquema de Fragmentación de los dímeros aporfina-
benzilisoquinolinas

En el espectro de RMN las dos señales para los grupos N-Me resuenan a campos muy parecidos, a una diferencia no mayor de 0.3 ppm. De los grupos OCH_3 , el que absorbe a campo más alto es el que se encuentra en C-7', por efecto del apantallamiento ejercido por el anillo A de la mitad aporfínica. El mismo apantallamiento se observa para el protón ubicado en C-8', resonando en todos estos compuestos entre 5.90 y 6.35 ppm. Para los protones aromáticos en los carbonos C-10', 14', 11' y 13' se observa un cuarteto A_2B_2 centrado alrededor de 7.0 ppm. Para los hidrógenos H-8', H-5', H-3 y H-8 se observan cuatro singuletes. Existe además, otro singulete muy característico de la mitad aporfínica, y es aquel enlazado al carbono 11, con un desplazamiento químico de 8.11 ppm, indicativo de que no hay sustitución en ese carbono.

3.11.2.- Pakistanina (1-37)

Pakistanina con más de 5 g de rendimiento en B. empetrifolia fue el segundo en importancia en cuanto a la cantidad obtenida, después de berberina. Cristalizó de metanol, fundiendo a 155°C. El espectro de masas (figura 3-41) mostró un ión molecular m/z 608, y un pico base a m/z 206, que corresponde a los anillos A' y B' de la mitad bencilisoquinolínica. Otros fragmentos obtenidos se visualizan en el esquema (fig. 3-40) y son indicativos de la unión de ambas mitades por los anillos inferiores por medio de un puente éter diarílico.

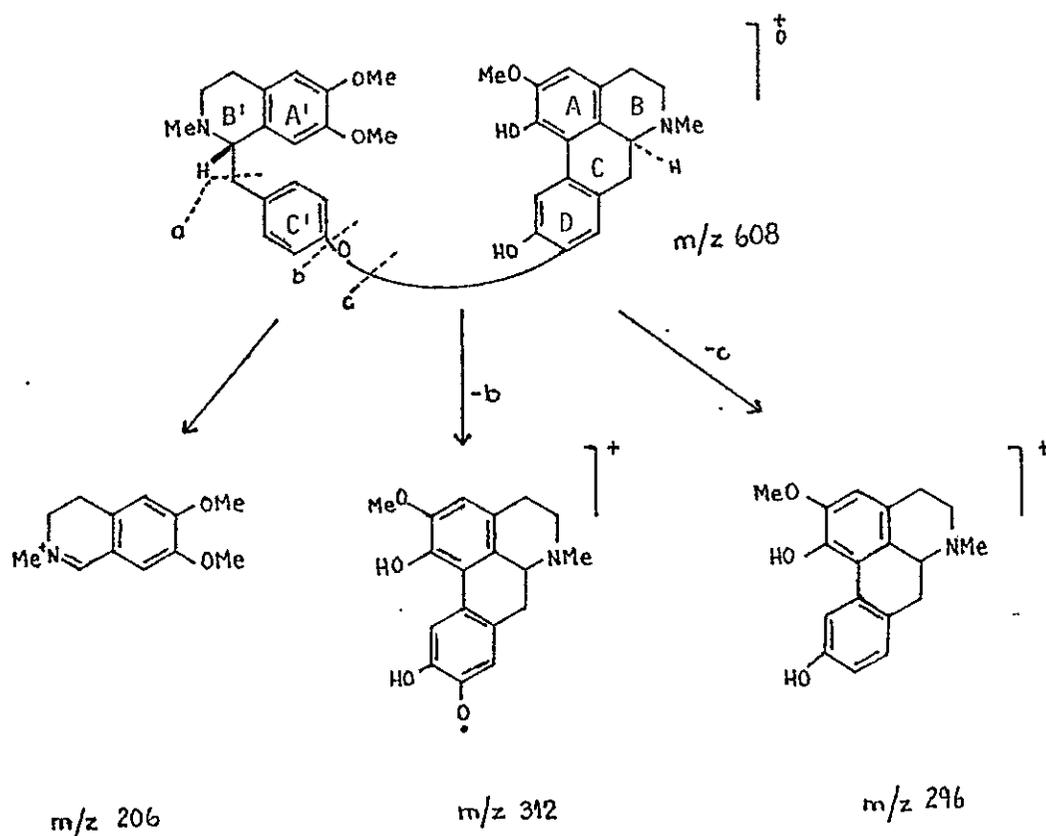
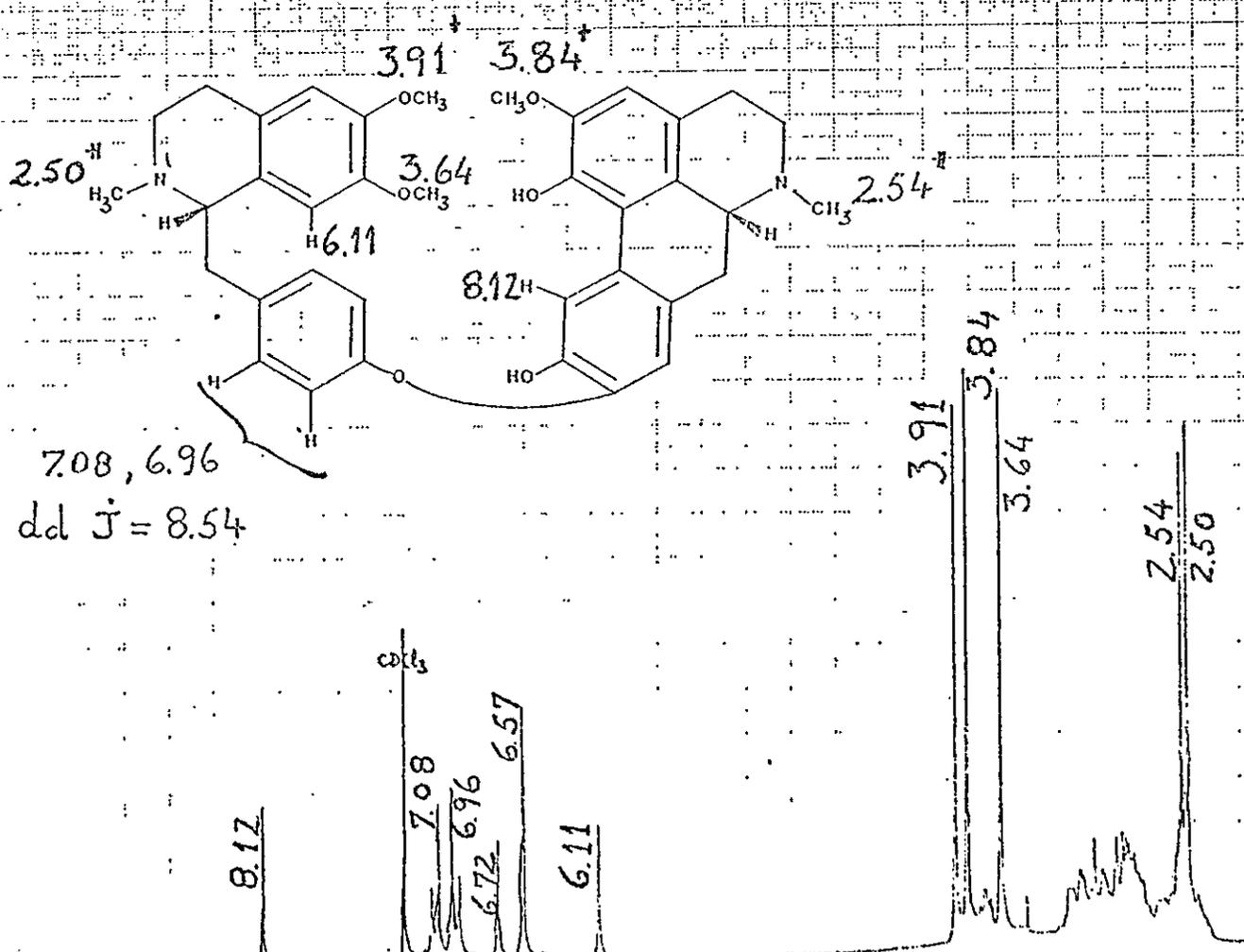
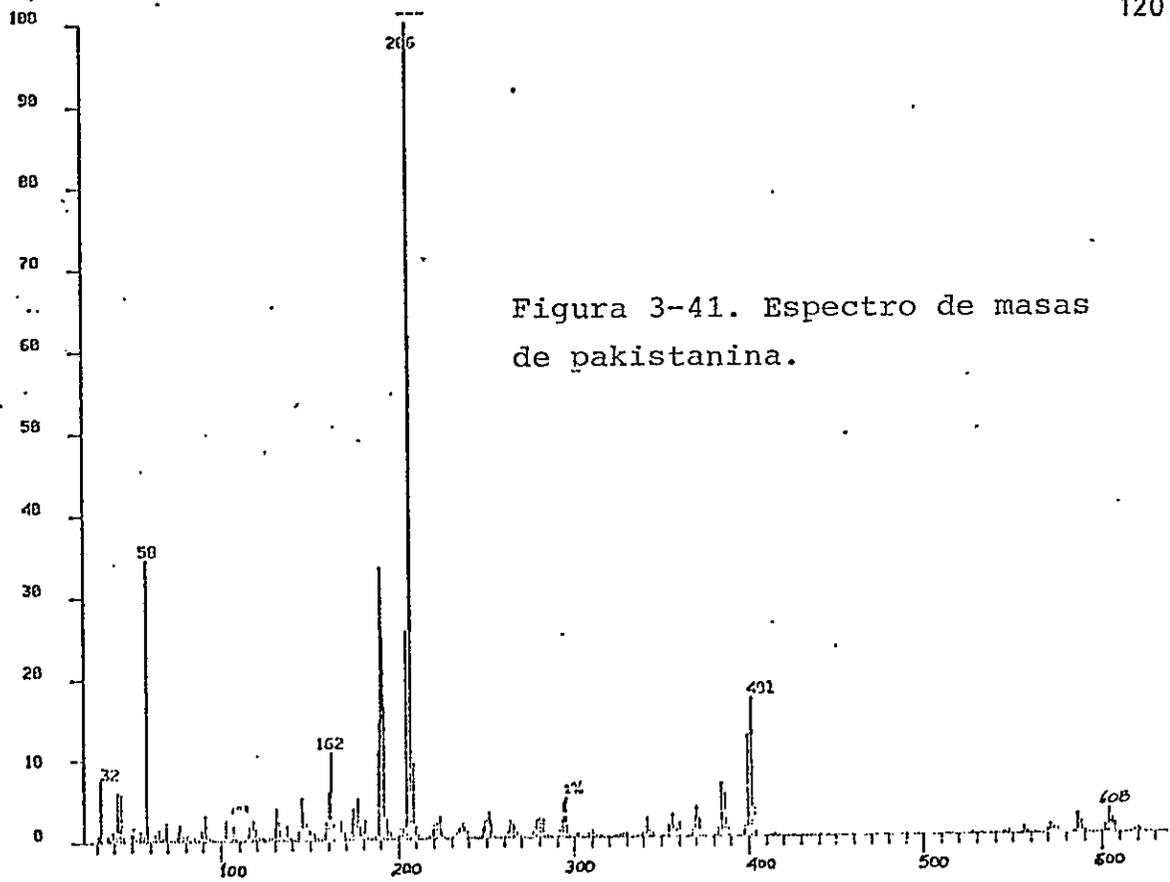


figura 3-40

Esquema de Fragmentación de Pakistanina (1-37)

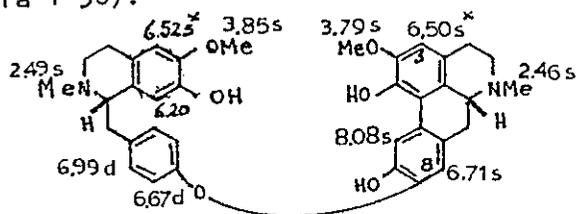


El espectro de RMP (figura 3-42) mostró dos NMe a δ 2.50 y 2.54, tres metoxilos a δ 3.64, 3.84 y 3.91, cuatro singuletes aromáticos a δ 6.11, 6.57 (\times_2), 6.72 y 8.12, y un par de dobletes a δ 6.96 y 7.08 como un sistema A_2B_2 ($J_o=8.54$ Hz). El protón aromático a más alto campo δ 6.11 estuvo de acuerdo con el hecho que es el más protegido por el anillo A de la mitad aporfínica.

Con los datos indicados y la comparación con una muestra patrón, se pudo postular que la estructura correspondía a la pakistanina, aislada previamente de algunas especies de Berberis cosechadas al Norte de Pakistán¹⁵⁻¹⁷.

3.11.3.- Chitralina (1-38).

Chitralina fue obtenido como un sólido amorfo, que cambia a verde cuando se le deja estar al aire. Su espectro de RMP (figura 3-44) mostró dos singuletes a δ 2.46 y 2.49 para los dos grupos NMe, cinco singuletes a 6.20, 6.50, 6.52, 6.61 y 8.08 para los protones en C-8', 5', 3, 8, 11 (estructura 1-38).



1-38

El espectro de masas (figura 3-43) mostró un ión molecular a m/z 594 muy débil (0.3%) y su pico base correspondió al fragmento 3-23 de m/z 192.

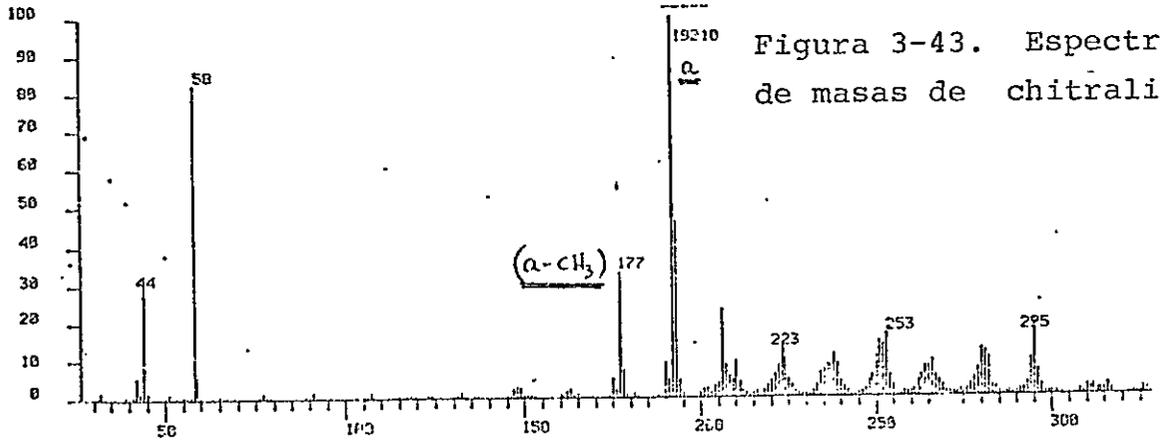
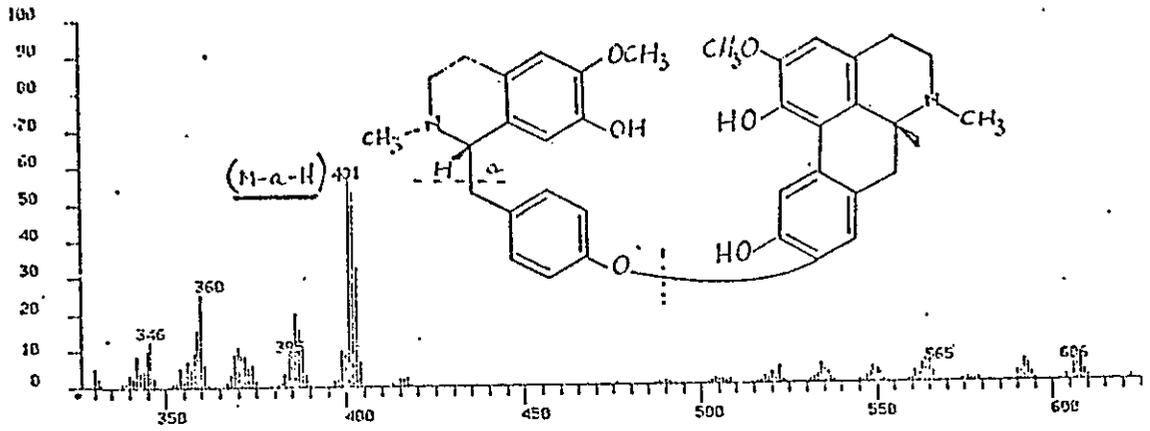


Figura 3-43. Espectro de masas de chitralina.

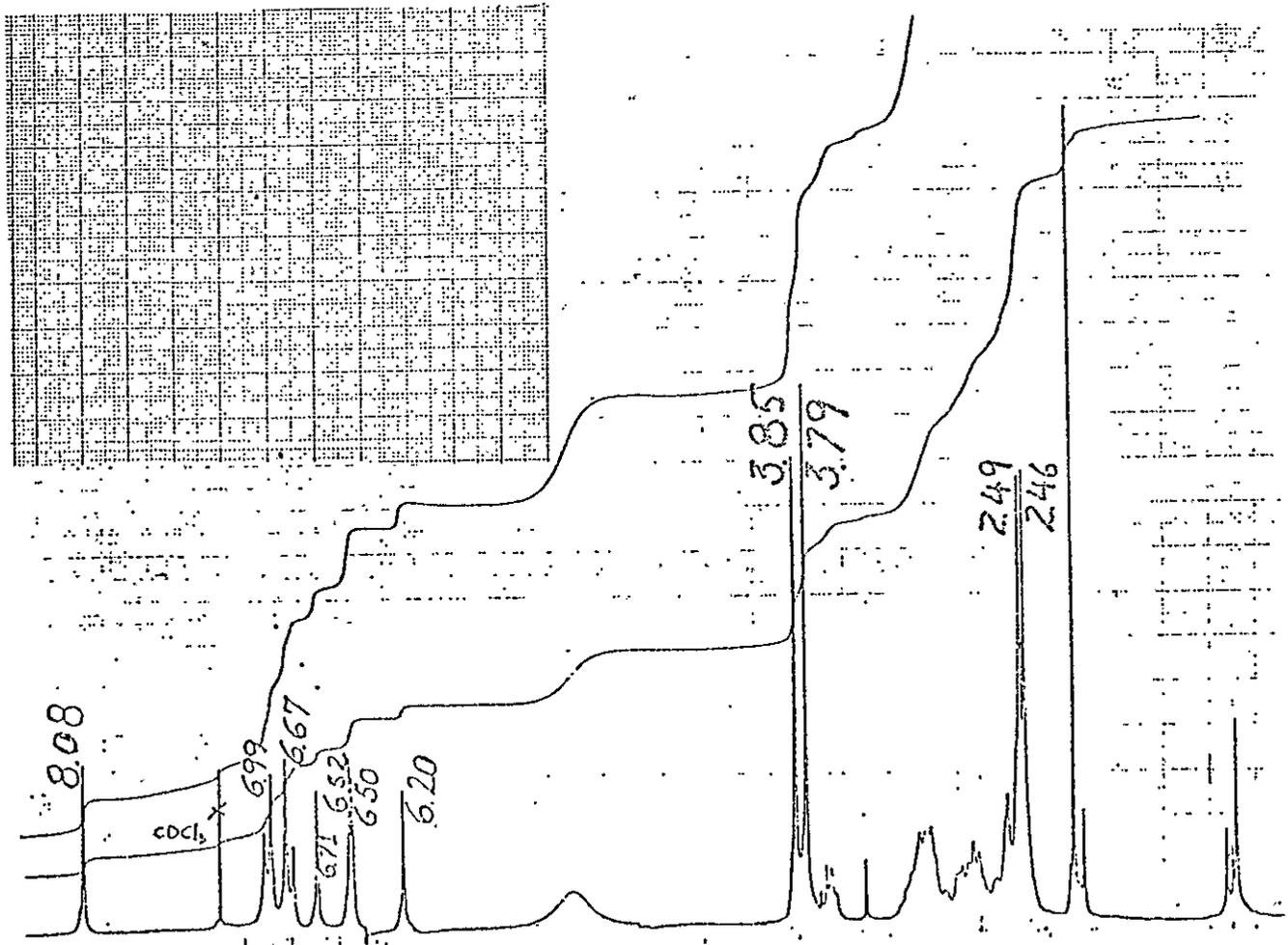
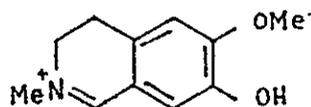


Figura 3-44. Espectro de RMN-¹H (200 MHz) de chitralina.



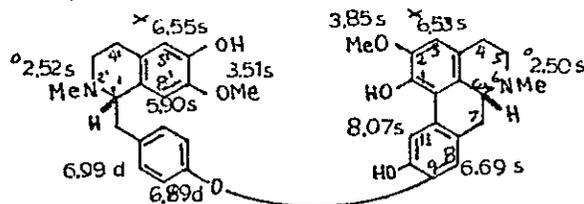
3-21

El resto de los fragmentos es el mismo que se anotó para pakistanina. Chitralina fue comparado por espectroscopía¹⁵ y co-cromatografía con una muestra patrón en nuestro poder, resultando idéntico en todas sus propiedades.

3.11.4.- Porveniramina (3-22)

Porveniramina al igual que todas las otras bases diméricas aisladas del tipo aporfina-bencilisoquinolinas mostró una curva de DC (figura 3-47) que está de acuerdo con la configuración S,R de estos alcaloides. Su análisis por espectrometría de masas mostró un ión molecular muy débil (0.2%) y un pico base a m/z 192.

El espectro de RMP (figura 3-45) mostró dos singuletes a δ 3.51 y 3.85 para dos grupos OMe, cinco singuletes para los hidrógenos en C-8', 3, 5', 8 y 11a δ 5.90, 6.53, 6.55, 6.69 y 8.07; y dos dobletes correspondientes a 4 protones acoplados de acuerdo a un sistema A_2B_2 con $J_o = 8.8$ Hz a δ 6.99 (H-10', 14') y 6.89 (H-11', 13') (estructura 3-22).



3-22

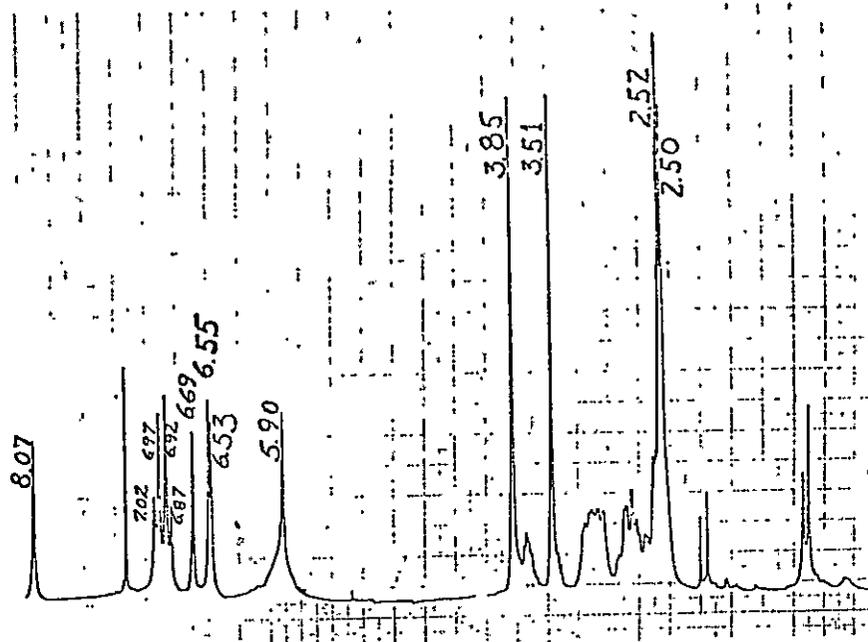


Figura 3-45
Espectro de
RMN de ^1H
(200 MHz) de
porveniramina.

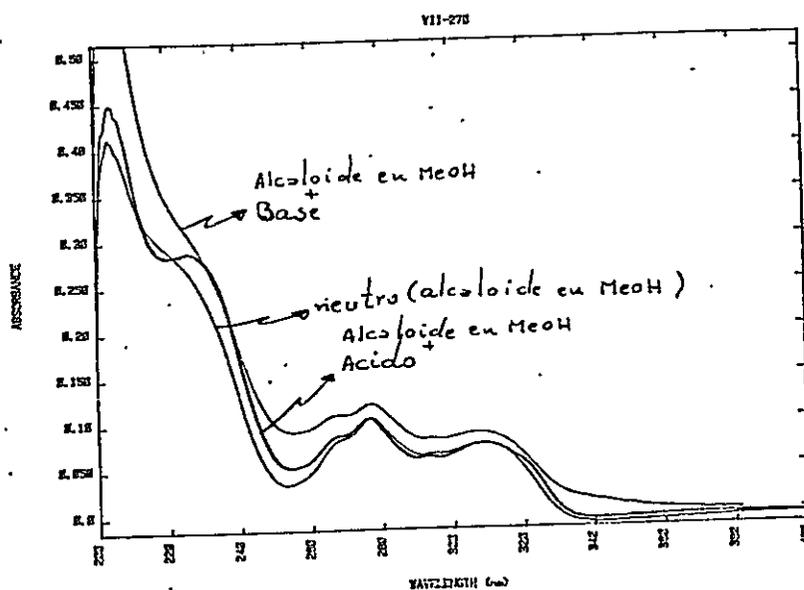


Figura 3-46
Espectro de
UV de porvenir-
amina.

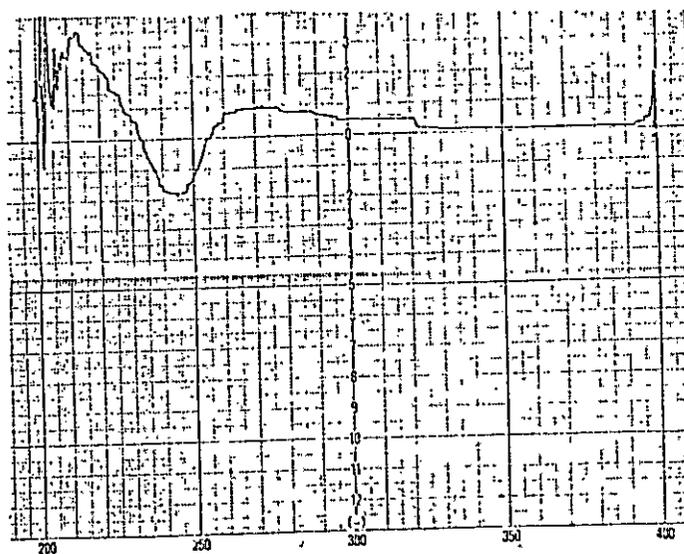


Figura 3-47
Curva DC de
porveniramina.

Esté alcaloide nuevo para la ciencia, fue obtenido también por reordenamiento de berbivaldina (3-30), obtenido de Berberis valdiviana. Este tema es discutido más adelante.

3.12.- Determinación de estructuras de alcaloides seco aporfínicos

3.12.1. Generalidades.

Concordante con la vía biogenética bisbencilisoquinolina → proaporfina-bencilisoquinolina → aporfina-bencilisoquinolina, hay en la planta una reacción lateral que se originó por el ruptura oxidativo del enlace C-1, C- α de la mitad tetrahydroisoquinolínica. De esta forma B. empetrifolia debió producir estos nuevos tres alcaloides: natalinamina (3-23), natalinina (3-24), y natalamina (3-25). Ellos son probablemente el resultado de la oxidación in vivo, de alguno de los dímeros aporfina-bencilisoquinolina encontrados en la misma planta. Por ejemplo natalinina y natalamina pudieron generarse a partir de pakistanina (1-37) por un ruptura oxidativo enzimático, especialmente en vista que se encontró pakistanina en grandes cantidades. Es necesario indicar que el proceso oxidativo catabólico ocurre prescindiendo si la mitad acompañante del dímero es una bencilisoquinolina, una proaporfina, o una aporfina²⁷.

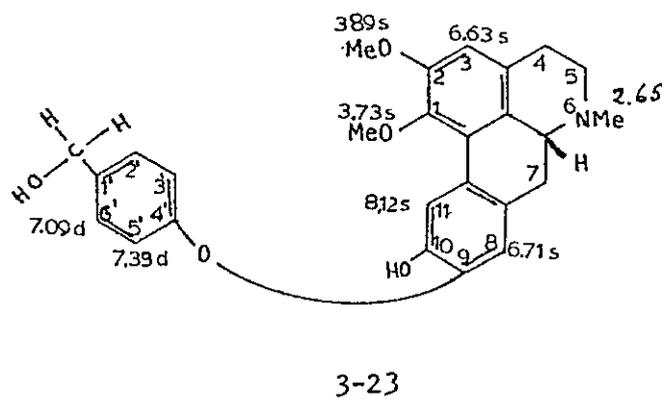
Todos los espectros de UV presentan λ_{\max} 217, 277, 303 (log 4.07, 3.82 y 3.69 (típicos de una aporfina tetrasustituída en C-1, 2, 9 y 10). Las curvas de DC muestran una curva positiva a 213 nm, característico de una aporfina de configuración R.

Los espectros de RMP, incluyen un NMe y en algunos casos uno o dos singuletes OCH₃, tres singuletes de protones aromáticos y otros 4 protones aromáticos como un Sistema A₂B₂. Significativamente, un singulete

a bajo campo (δ 9.95) indica la presencia de un protón aldehído para la natalina (3-24) y entre 4.67 y 4.70 ppm para los CH_2OH correspondiente a la reducción del grupo benzaldehído que resulta del clivaje oxidativo C-1, C- α . de algunos de los dímeros apropiados aporfinas-bencilisoquinolinas.

3.12.2.- Natalinamina (3-23)

Este alcaloide fue obtenido como un sólido amorfo, $(\alpha)_D^{25} - 29^\circ$ ($c=0.04$, metanol), cuya curva de DC $\Delta\epsilon$ (nm) muestra los siguientes valores + 1.9 (300), + 4.2 (274), y -23 (239). La herramienta principal en la determinación estructural de los tres alcaloides de este tipo obtenidos, es la RMP. El espectro de resonancia magnética nuclear protónica (figura 3-49) mostró un singulete a δ 2,65 para el grupo NMe, dos singuletes a δ 3.73 y 3.89 para los OMe en C-1 y 2 resp., un singulete a δ 4.70 para los dos protones del grupo CH_2OH , dos singuletes a δ 6.63 y 6.71 para H-3 y 8, resp., y por último el par de dobletes como un sistema A_2B_2 a δ 7.09 y 7.39 para los protones en C-2', 6' y C-3' y 5' resp.



Este compuesto fue idéntico en todos sus aspectos con aquel obtenido mediante el reordenamiento ácido de coyhaiquina (3-35).

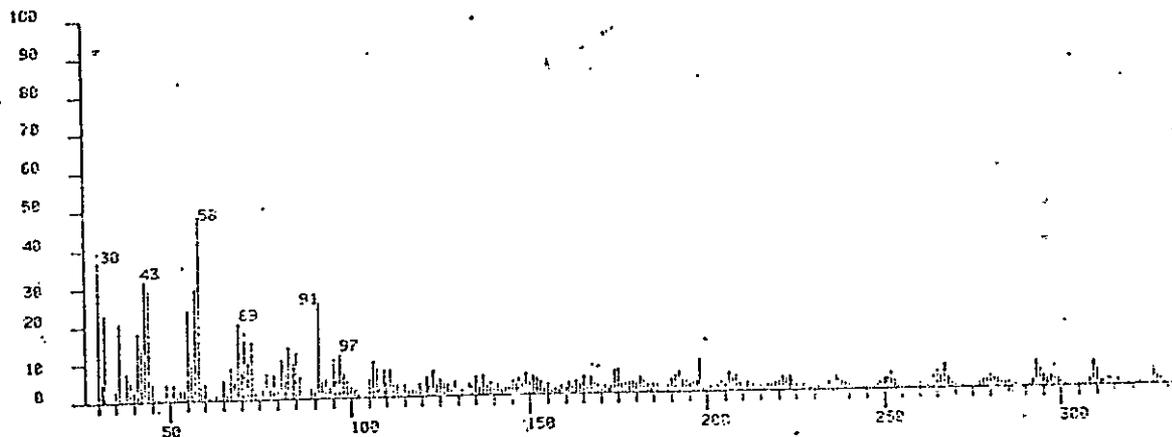
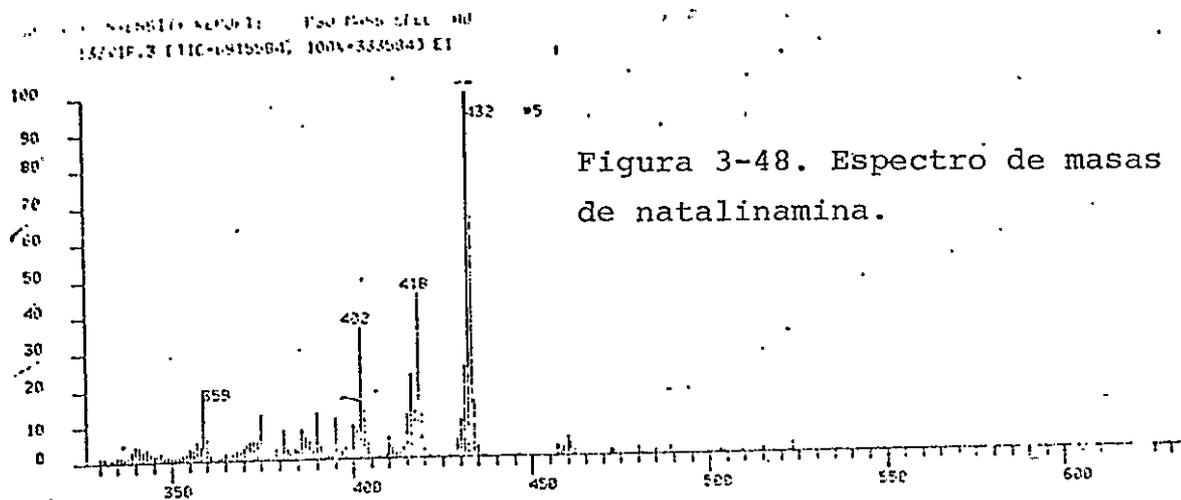
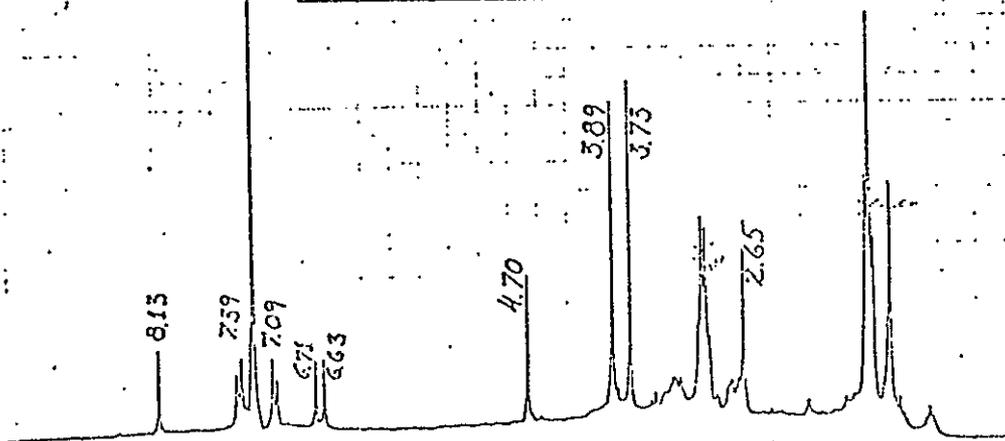
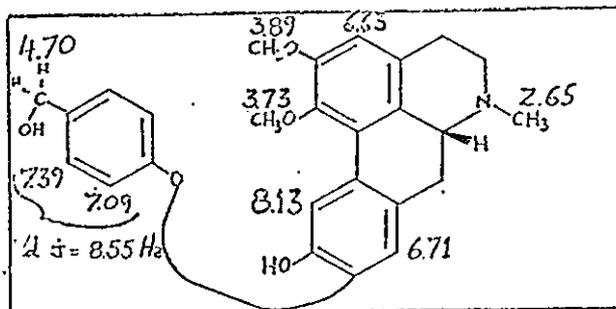
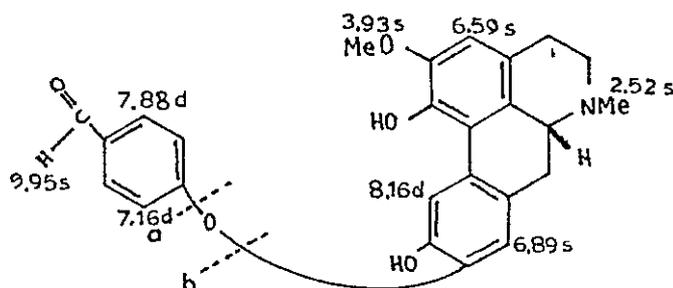


Figura 3-49. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz) de natalinamina.



3.12.3.- Natalinina (3-24).

Al igual que el anterior, el espectro de RMP fue clave en la dilucidación estructural (figura 3-51). Como en general mostró el mismo modelo que natalinamina (3-23) y natalamina (3-25), solo se anotan sus datos en la misma estructura.



3-24

En cuanto al espectro de masas, en todos estos compuestos el ión molecular es muy intenso, llegando a ser el pico base. Otros fragmentos pueden ser obtenidos por un rompimiento a través de a o b (ver figura 3-50 y 3-53).

3.12.4.- Natalamina (3-25)

Este fue el último compuesto obtenido de la columna cromatográfica. El espectro de masas (figura 3-53) mostró un ión molecular a m/z 419 correspondiente a la fórmula molecular $C_{25}H_{25}O_5N$. El espectro de UV (figura 3-52) mostró λ_{max} (MeOH) 215, 267 h, 276 y 308 nm

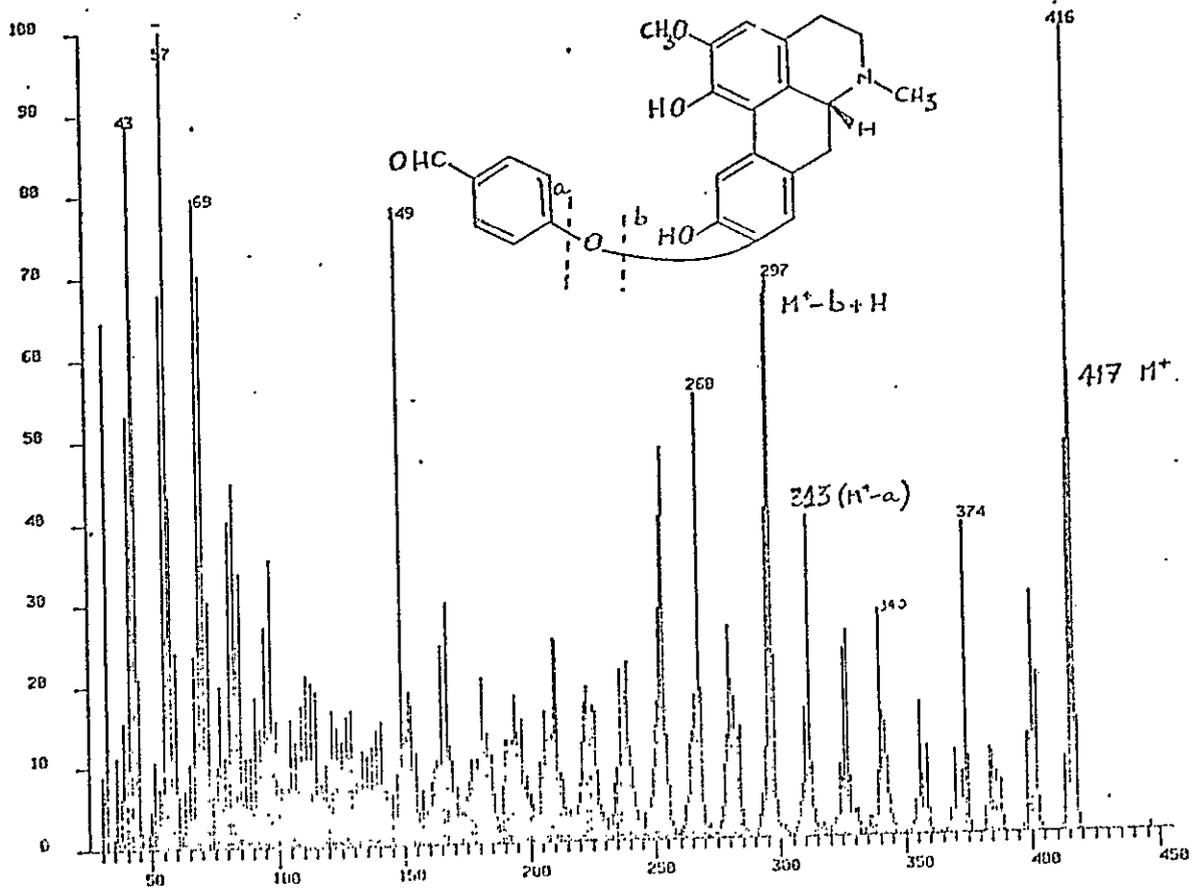


Figura 3-50. Espectro de masas de natalinina.

Figura 3-51. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) de natalinina.

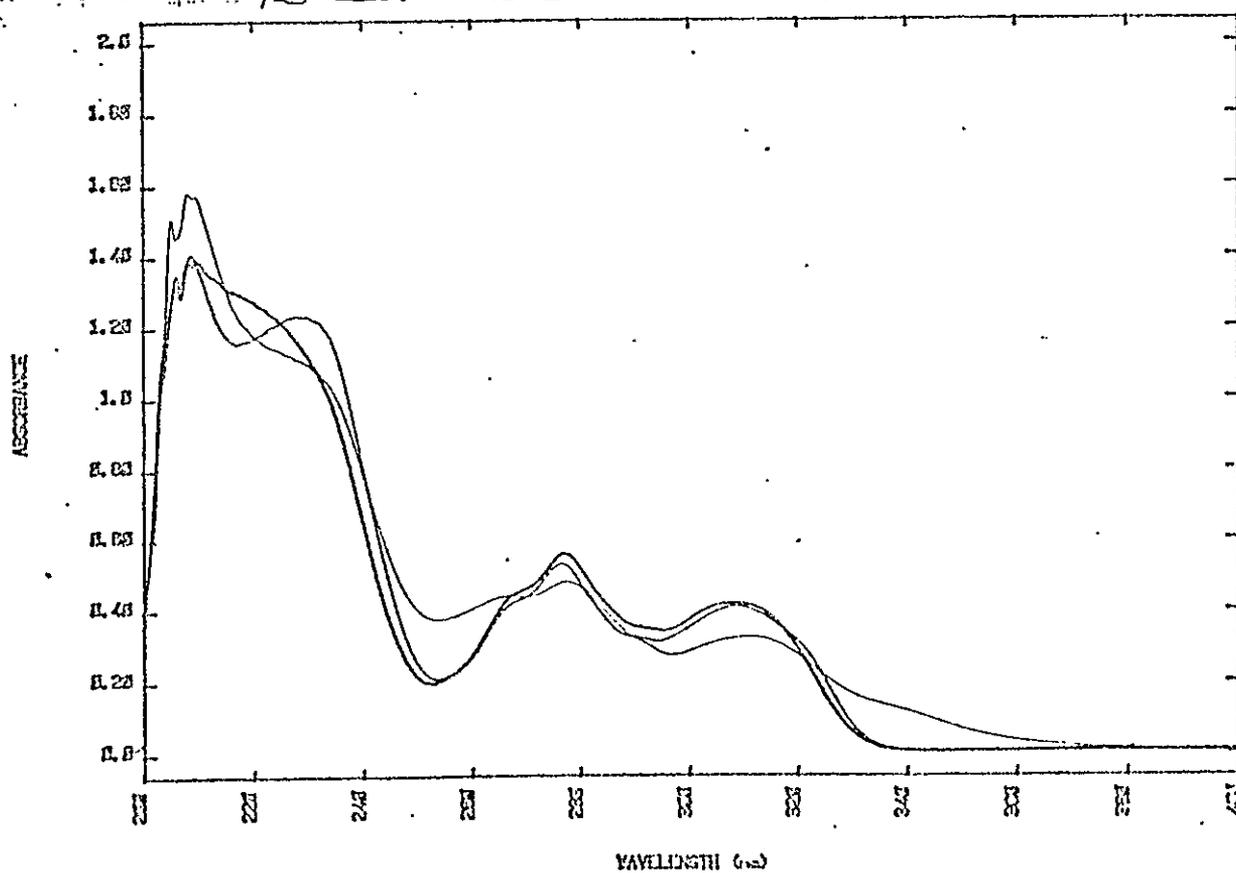
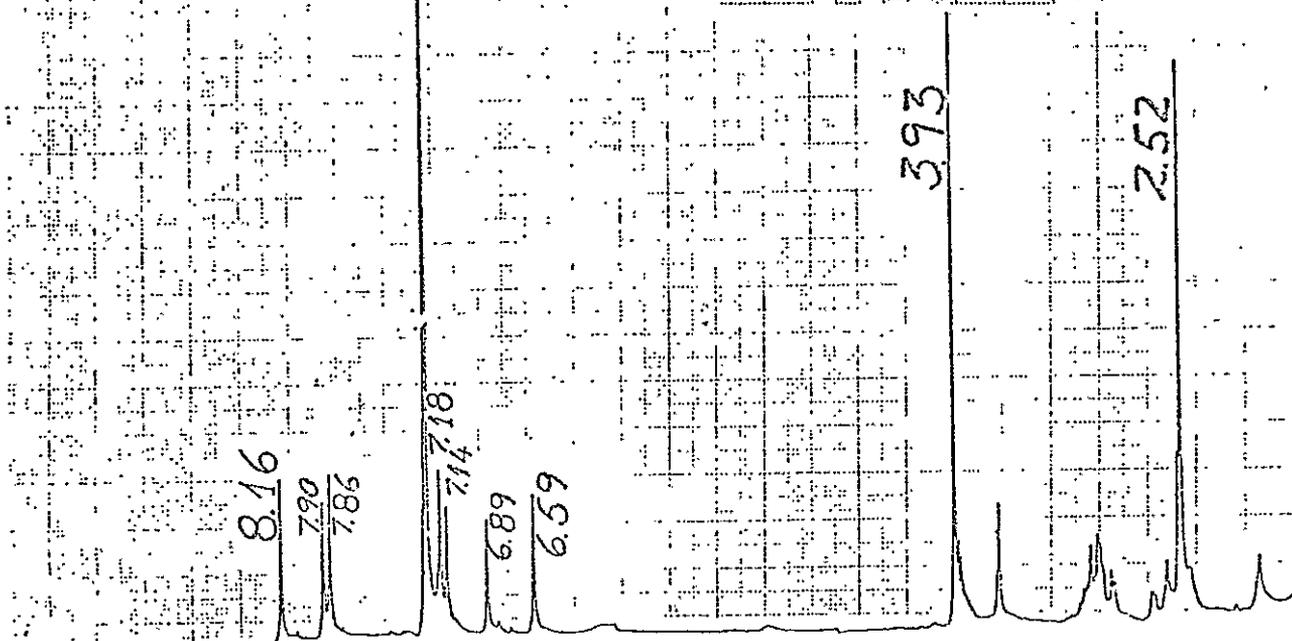


Figura 3-52. Espectro de UV de natalamina.

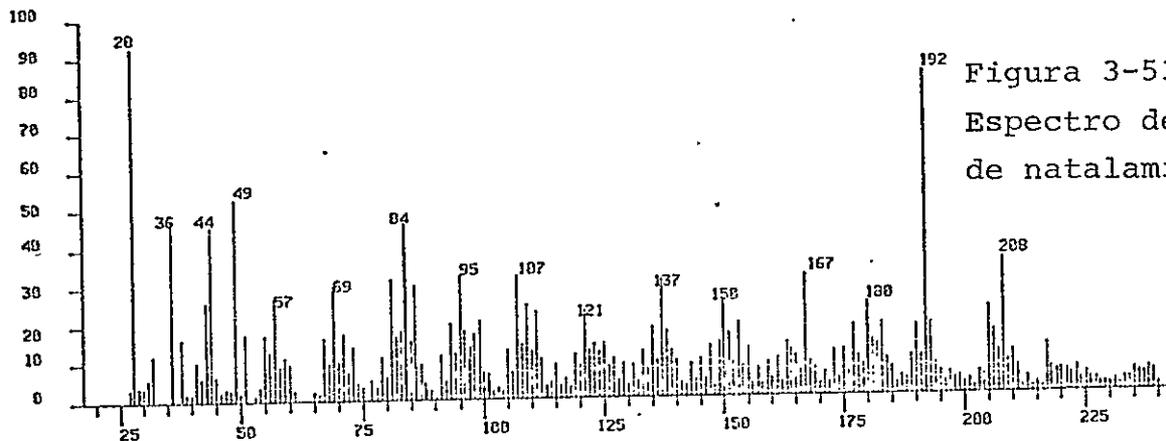
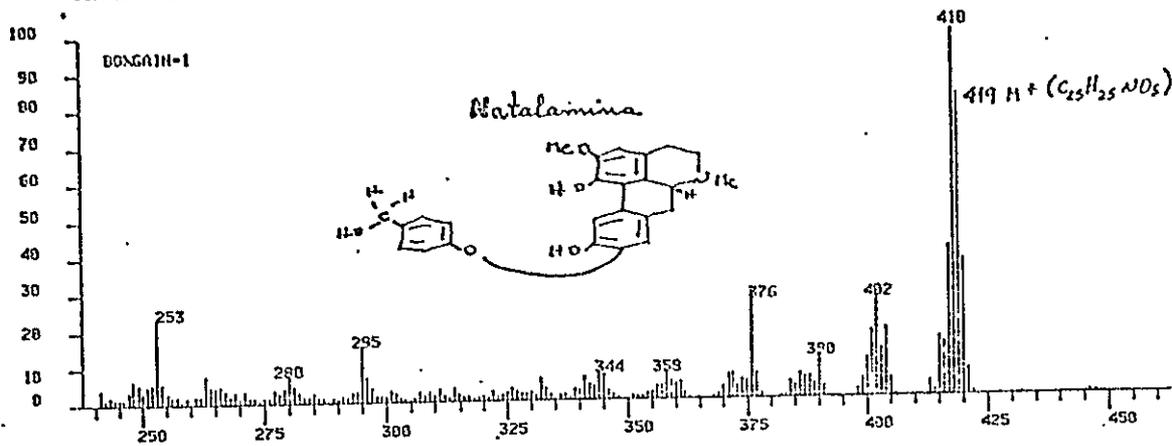
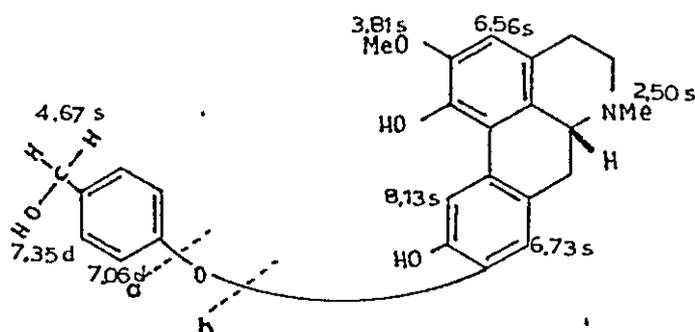


Figura 3-54.
Espectro de
RMN de ¹H
(200 MHz) de
natalamina.

(log ϵ 4.25, 3.74, 3.83 y 3.77). El espectro de RMP mostró los valores que se anotan en la estructura 3-25a (fig. 3-54).



3-25a

La conclusión que puede sacarse al examinar estos compuestos secoa porfínicos, es que los procesos oxidativos son capaces de participar en la construcción de alcaloides isoquinolínicos, así también como en procesos degradativos ²⁷. Para la elaboración de formas estructurales más complejas, la oxidación toma la forma de un acoplamiento fenólico; mientras que la ruptura de las tetrahydroisoquinolinas ocurre por oxidación del enlace central C-1, C- α .

3.13.- Determinación de estructura de alcaloides diméricos proaporfina-bencílicoisoquinolinas.

3.13.1. Generalidades espectroscópicas.

En la dilucidación estructural de estas bases diméricas fueron muy útiles los espectros de rmn usando el e.n.o. y experimentos de doble irradiación ²⁸. Es así como fue posible conocer la estereoquímica de los alcaloides patagonina (3-26) y valdivianina (3-28), en el spiro centro C-13. Los

espectros (360 MHz) mostraron señales a δ 2.35 y 2.55 para los dos grupos NMe, a δ 5.95 para H-8' (un protón que está muy apantallado por el anillo A de la mitad proaporfínica), a δ alrededor de 7.0 ppm un singulete ancho correspondiente a 4 H en C-10', 11', 13', y 14'. Las señales de los protones debidas al anillo ciclohexanadienónico, es decir H-8 (doblete, $J_m = 2.5$ Hz), H-11 (doblete, $J_o = 9.8$ Hz) y H-12 (dd, $J_m = 2.5$, $J_o = 9.8$ Hz) están centrados a δ 6.19, 6.34 y 6.99, resp.

Los espectros de masas mostraron fragmentos a m/z M-a, M-b, M-c, junto con el fragmento correspondiente al pico base a m/z 206 ó 192. Estos dos fragmentos representan a los anillos A y B de la mitad bencilisoquinolínica, con uno o dos grupos metoxilos, según sea el compuesto de que se trate.

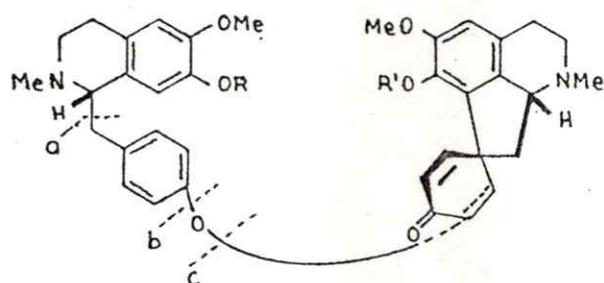


figura 3-55

Esquema de fragmentación de diméros proaporfina-bencilisoquinolinas

Como los datos de patagonina (3-26) y valdivianina (3-28) de DC parecidas (Tablas 3-2), los alcaloides poseen idéntica quiralidad.

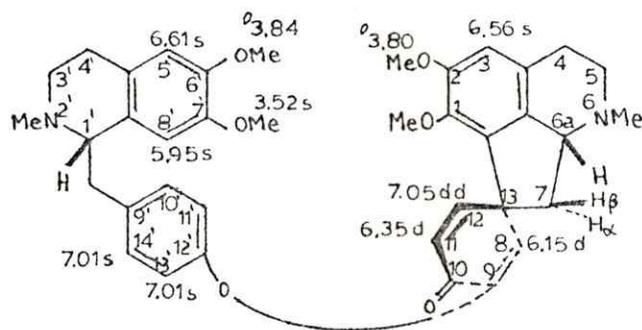
Tabla 3-2

Compuesto	$\Delta\epsilon$ (nm)
1-0-acetilvaldivianina	+9.2(276)+5.3(249)+19(229)
7'-0-acetilpatagonina	+8.7(273) 0.0(249)+14(232)

Valores de DC para los alcaloides diméricos proaporfina-bencilisquinolinas.

3.13.2.- RMN-ENO de los alcaloides diméricos proaporfina-bencilisoquinolinas.

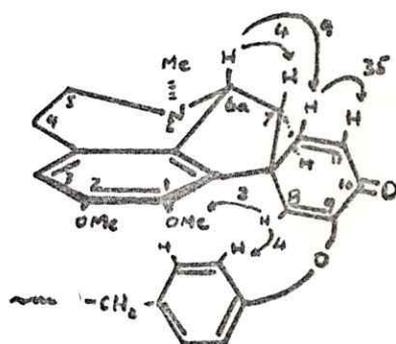
Con la finalidad de resolver la estereoquímica de los alcaloides 3-26 y 3-28 en el espiro centro se usó RMN-ENO. Los desplazamientos químicos para H-6a (δ 3.41, J_1 6.1 Hz, J_2 10 Hz), H-7 α (δ 2.16, J_1 10.4 Hz, J_2 12 Hz) en pakistanamina (1-35) fueron primero asignados por experimentos de desacoplamiento.



1-35

La irradiación de H-6a (δ 3.41) en pakistanamina (ver 1-35a) mostro un incremento de 9% para H-12 (δ 7.05) y 4% para H-7 β (δ 2.45). Cuando fue irradiado H-7 α (δ 2.16), H-7 β (2,45) y H-8 (δ 6.15) experimentaron un

incremento de 11% y 13% resp. Igualmente, la irradiación de H-12 ($\delta 7.05$) produjo incrementos de 35% para H-11 ($\delta 6.35$) y 8% para H-6a ($\delta 3.41$). Por otra parte, la irradiación de H-8 ($\delta 6.15$) condujo a un e.n.o. de 4% para H-10', 12', 13' y 14' ($\delta 7.01$ singulete ancho), y 2% para el 1-OMe ($\delta 3.63$) y 8% para H-7 α ($\delta 2.16$). Por lo tanto se puede asegurar que la estereoquímica para (+)-pakistanamina (1-35) es la que se muestra en la estructura 1-35a. Los datos de RMN para los dímeros se discuten a continuación.



(1-35a)

3.13.3.- Patagonina (3-26)

Patagonina fue obtenido como un sólido amorfo, que mostró un $(\alpha) + 190^\circ (c=0.2, \text{metanol})$ y una curva de DC $\Delta \epsilon (\text{nm}) + 8.8(279), +5.5(248), +32(230)$ que indicó que el alcaloide tenía la configuración mostrada en 3-26. El espectro de RMP (figura 3-56) mostró dos singuletes para los grupos NMe a $\delta 2.37$ y 2.55 , tres singuletes para $1'-\text{OCH}_3$, $6'-\text{OCH}_3$ y $2-\text{OCH}_3$ a $\delta 3.65$, 3.79 y 3.78 , tres singuletes a $\delta 5.55$, 6.48 y 6.58 para los protones en H-8', H-3 y H-5' un singulete ancho a $\delta 6.98$ para H-10', 14', 12' y 13'. Los protones del anillo ciclohexadienónico presenta señales a $\delta 5.95$ (1H,d, $J_{8,12}=2.5\text{Hz}$) para el proton en H-8, a $\delta 6.32$ (1H,d,

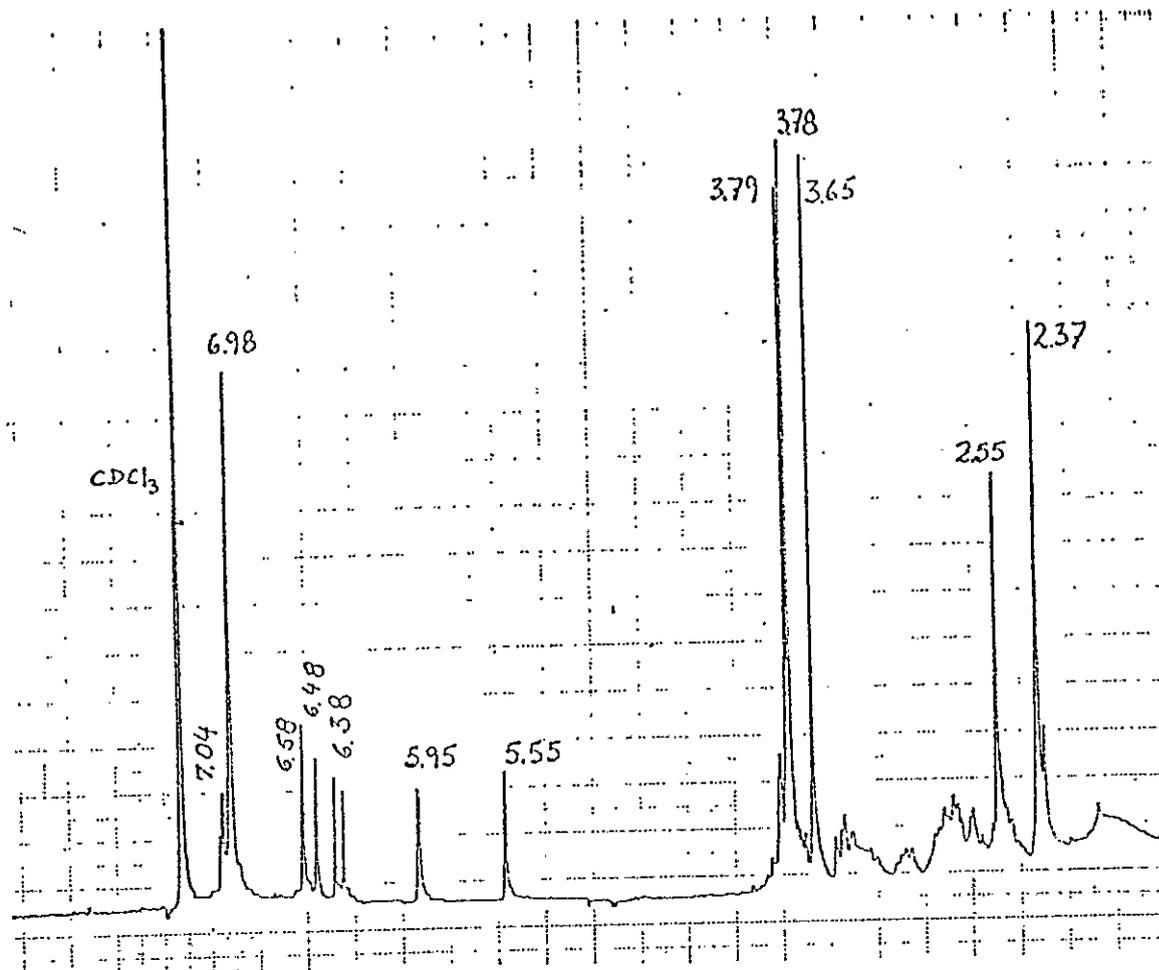
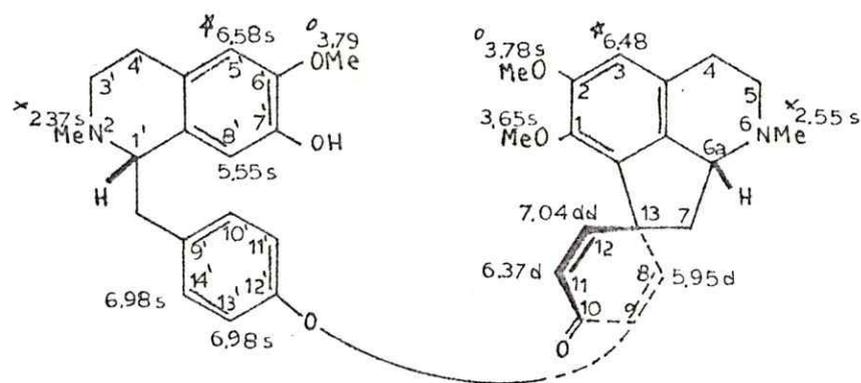


Figura 3-56. Espectro de RMN de ^1H (360 MHz) de patagonina.

$J_{11,12}=9.8$ Hz) para H-11, y a $\delta 7.04$ (1H, dd, $J_{8,12}=2.5$ y $J_{11,12}=9.8$ Hz) para el protón H-12.



3-26

El espectro de masas mostró los fragmentos que se anotan en la figura 3-57. La característica principal del espectro, es el ión a m/z 192 correspondiente a los anillos A y B de la mitad bencilisoquinolinica, tal como acontece con dímeros aporfina-bencilisoquinolinas.

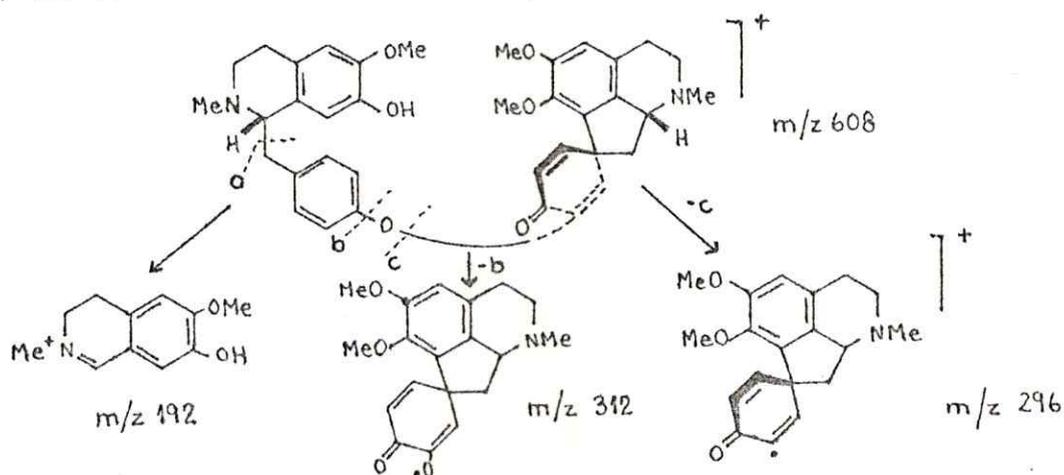


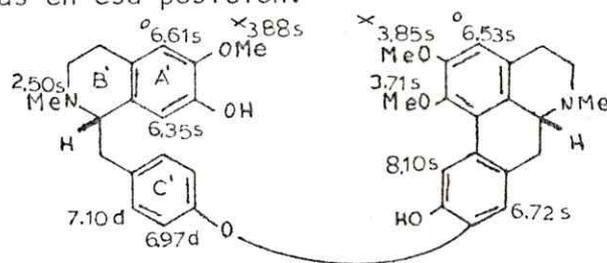
Figura 3-57

Esquema de Fragmentación de Patagonina

Patagonina (3-26), fue sometido a reordenamiento catalizado por ácido¹⁶, dando como producto un nuevo dímero, 3-27 que no ha sido aislado hasta el momento en planta alguna. Este nuevo compuesto presentó una curva de DC similar a las observadas para los otros dímeros aporfina- bencilisoquinolinas por lo cual debe incorporar la misma configuración.

El espectro de masas mostró un ión molecular muy débil (0.2%), como es común en este tipo de alcaloides. Su pico base correspondió al fragmento a m/z 192, es decir a los anillos A y B de la mitad bencilisoquinolínica.

El espectro de RMP de 3-27 mostró un singulete a δ 2.50 para los dos grupos NMe, tres singuletes para los tres metoxilos a δ 3.71, 3.85 y 3.88, dos dobletes a δ 6.97 (2H, $J_o=8.5$ Hz) y 7.10 (2H, $J_o=8.5$ Hz) para los protones en C-11', 13' y 10', 14'; y por último está la señal a δ 8.10 para el protón en C-11, característico de todas las aporfinas no sustituidas en esa posición.

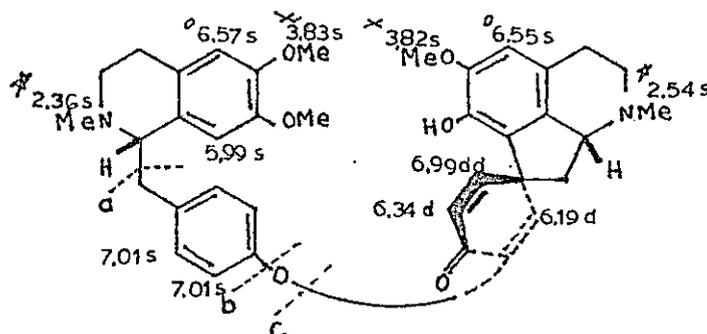


3-27

3.13.4.- Valdivianina (3-28).

Es este un alcaloide amorfo, que descompone al igual que todos los dímeros, sean aporfinas o proaporfinas-bencilisoquinolinas. También con los datos de DC se pudo determinar la configuración de sus centros asimétricos C-1' y C-6a. La estereoquímica del espiro centro fue determinada, aplicando los valores de RMN-NOE realizado en el alcaloide pakistanamina

(1-35). El espectro de RMN (figura 3-58) mostró dos singuletes para los grupos NMe a 2.36 y 2.54, los cuales son intercambiables, dos singuletes para los grupos OCH₃ a δ 3.54 (7-Ome) y 3.83 (6H, 2,6'-Ome), cuatro singuletes para 7 protones aromáticos a δ 6.55 (H-3), 6.57 (H-5'), 5.99 (H-8'), y 7.01 (4H, H-10', 13', 11', 14'). También se observó el modelo que es común del sistema dienónico, es decir un doblete a δ 6.34 (H-11, $J_o=9.8$ Hz), un doblete de dobletes δ 6.99 (H-12, $J_m=2.5$ y $J_o=9.8$ Hz), y otro doblete a δ 6.19 (H-8, $J_m=2.5$ Hz).



3-28

El espectro de masas mostró la fragmentación común de estos compuestos, es decir fragmentos a m/z M-a, M-b, M-c (ver 3-28) y anillos A y B de la mitad bencilisoquinolínica, que representa nuevamente al pico base.

El reordenamiento catalizado por ácido diluido, produjo pakistanina (1-37), lo que hizo más simple su identificación. Pakistanina incorpora la misma configuración en C-1' y C-6a que su precursor valdivianina (3-28).

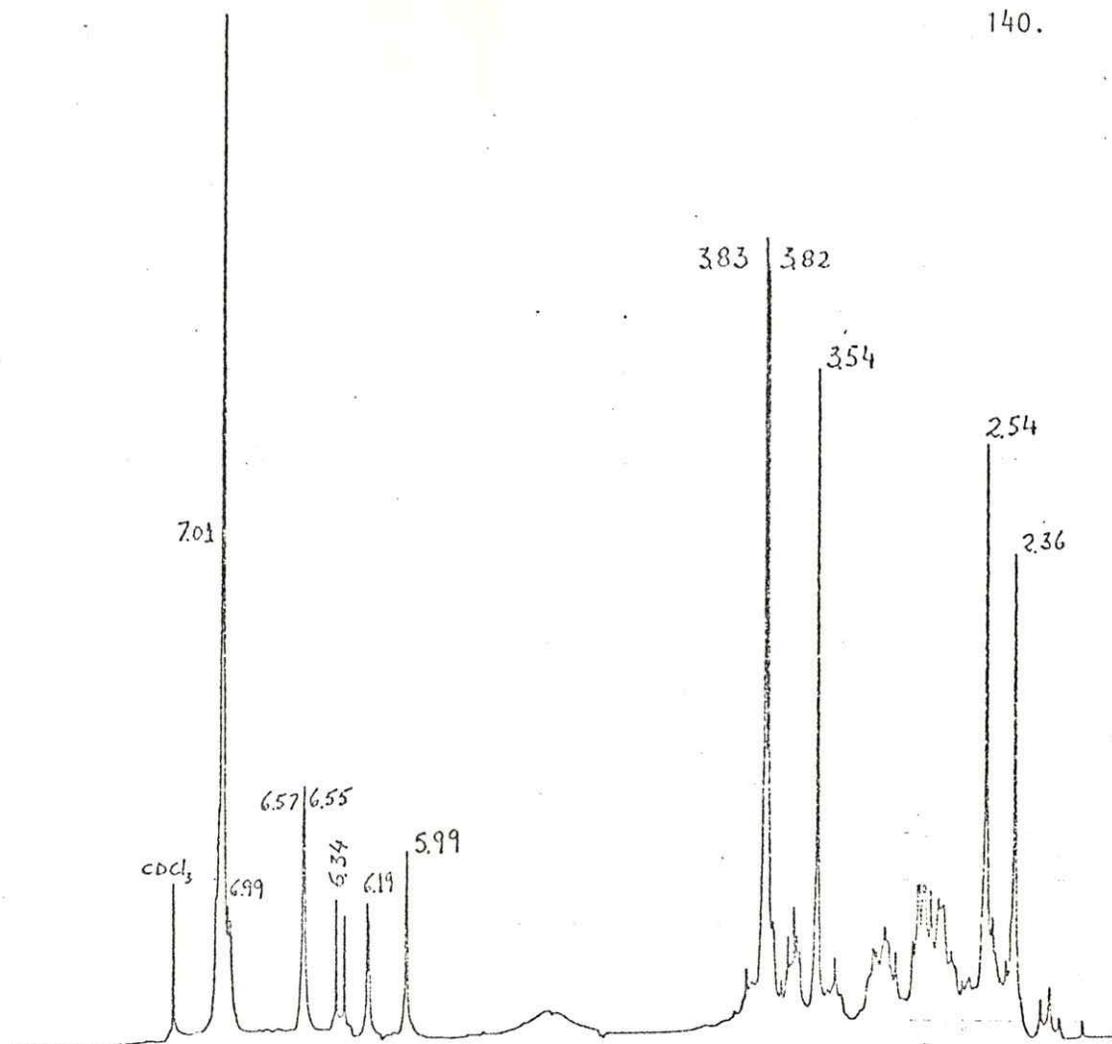


Figura 3-58. Espectro de RMN de ^1H (360 MHz) de valdiviamina.

3.13.5.- Estereoquímica del Reordenamiento Dienona-Fenol en la Transformación de Proaporfinas en Aporfinas.

La transformación de proaporfinas en aporfinas es un proceso que de alguna manera ocurre enzimáticamente en la naturaleza. En el laboratorio se repitió el método usado en la transformación de (+)-pakistanina (1-35) en (+)-1-0-metilpakistanina (ec.1)¹⁶. Pakistanina era el único representante del grupo de los dímeros proaporfinas-bencilisoquinolinas. Fue aislado previamente de Berberis baluchistanica, B. calliobotrys y B. orthobotrys, todas especies de Pakistán. La intención al trabajar con estas especies era justamente aislar nuevos dímeros, que apoyaran las hipótesis biogénicas, que hasta el momento se habían planteado¹⁶.

Los esfuerzos al trabajar con esas plantas fueron vanos y sólo tuvieron éxito en los estudios realizados en las especies chilenas, B. empetrifolia y B. valdiviana.

Los nuevos dímeros, fueron reordenados en solución diluida de ácido clorhídrico (figura 3-59) a sus análogos aporfinas-bencilisoquinolinas (ecuación 1 y 2). Se incluye en esta lista, los nuevos dímeros encontrados en B. valdiviana, valdiberina (3-29) y epivaldiberina (3-31).

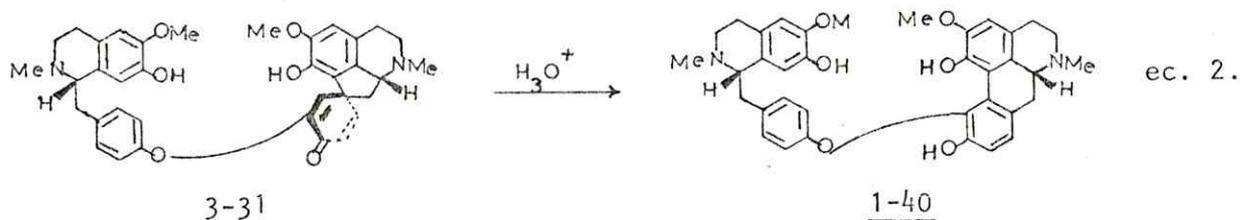
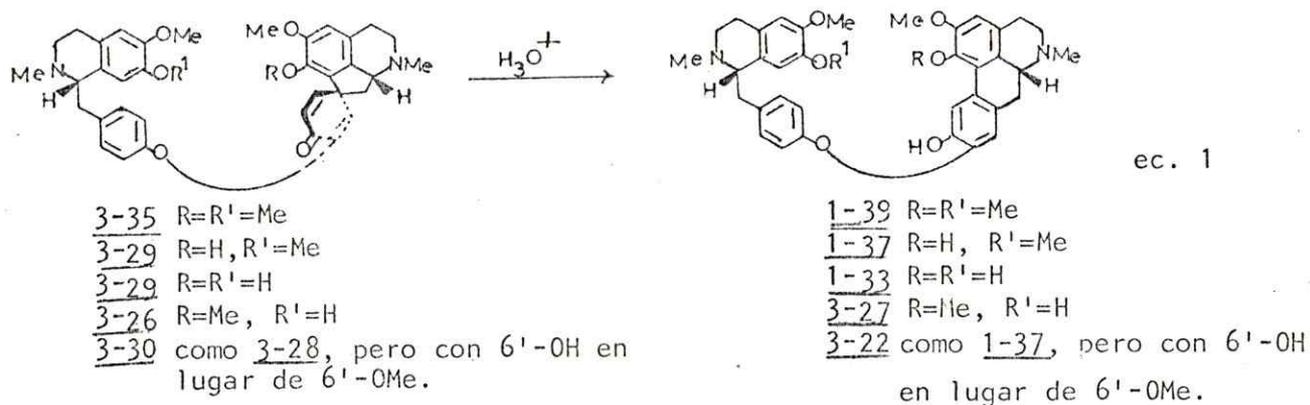
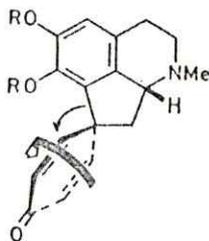


fig. 3-59
Reordenamiento dienona-fenol

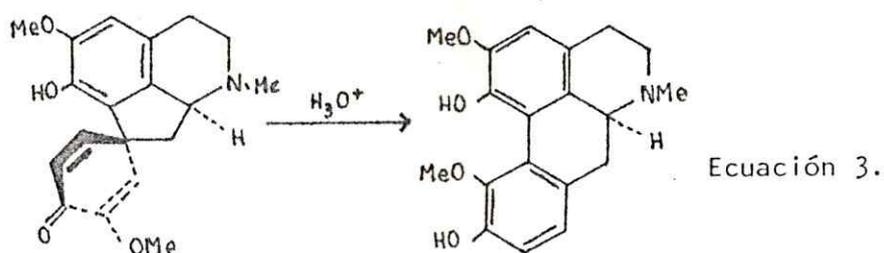
Los reordenamientos de proaporfina a aporfina de configuración R se producen mediante una migración del anillo arílico desde C-13 a C-12 del anillo dienónico que es *syn* a H-6a, por medio de una rotación en sentido contrario a los punteros del reloj del anillo D, como se indica a continuación:



Configuración R

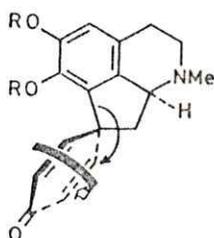
La inspección de los modelos moleculares indica que en los dímeros proaporfínicos de partida (3-28)-(3-30), así también como en 3-31, es el impedimento estérico entre C-1 sustituido y H-8 el que induce el movimiento en sentido contrario a los punteros del reloj, apoyado por la proximidad de H-12 y H-6a, y también entre H-8 y H-7 α . El alivio del impedimento estérico es así el factor que gobierna la estereoquímica (de estas interacciones) del reordenamiento de una proaporfina en una aporfina.

Luego se puso atención en el conocido alcaloide (-)-orientalinona (3-32), investigado en el año 1960, y cuya estereoquímica en C-13 no era conocida³⁰. El reordenamiento dienona-fenol de (-)-orientalinona, produce (+)-1,10-dihidroxi-2,11-dimetoxiaporfina (3-33) (ecuación 3). Como (-)-orientalinona es epimérico con los compuestos 1-35, 3-26, 3-28, 3-30 en C-6a, el producto aporfínico 3-33 puede ser racionalizado como el resultado de la migración arflica desde C-13 a C-8, que otra vez es syn a H-6a por medio de un movimiento en sentido de los punteros del reloj del sistema dienónico de la orientalinona, como se dibuja en la estructura 3-34. En esta oportunidad es el impedimento estérico entre C-1 sustituido y H-12, junto con la repulsión entre H-12 y H-7 β el factor que gobierna el reordenamiento dienona-fenol.

3-323-33

Se puede sacar una simple generalización de estos reordenamientos:

1. Proaporfinas pertenecientes a la configuración C-6a -(R) darán una rotación del sistema dienónico en sentido contrario de los punteros del reloj.
2. Proaporfinas pertenecientes a la configuración C-6a-(S) exhibirán una rotación del sistema dienónico en sentido de los punteros del reloj, como se indica en 3-34.

3-34

Configuración (S)

3.14.- Determinación de estructuras de alcaloides secoproaporfina-
bencilisoquinolinas.

3.14.1. Coyhaiquina (3-35)²⁷

(+)-Coyhaiquina (3-35), $C_{26}H_{27}O_5N$ exhibe λ_{max} (MeOH) 210, 231 h, 283 nm ($\log \epsilon$ 4.44, 4.24 y 3.63). El espectro de masas (figura 3-62) presentó un pico base a m/z 433, que corresponde también al ión molecular. Otros fragmentos importantes se producen por la pérdida de un hidroxilo del ión molecular y por la ruptura a través de a y b (ver figura 3-60).

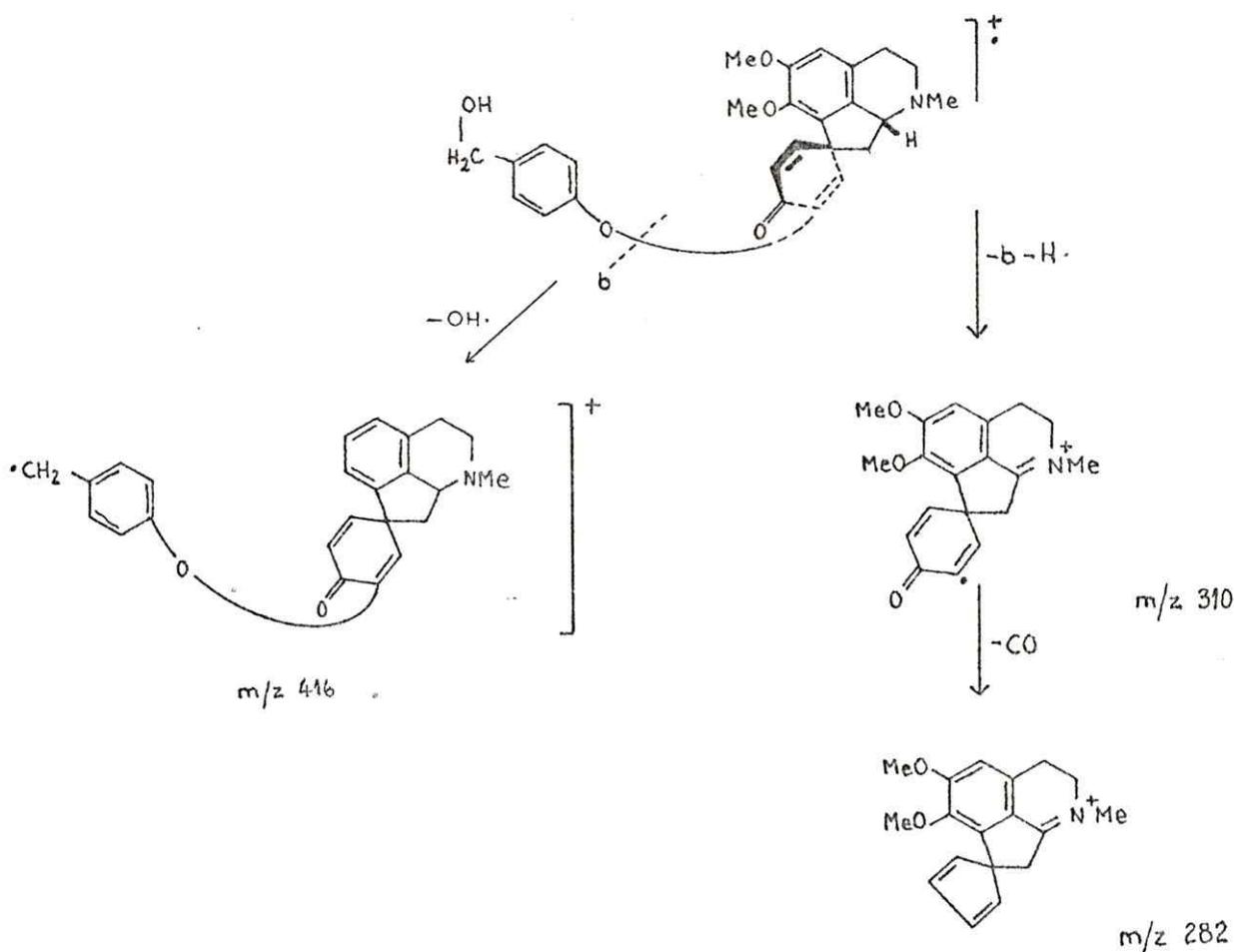
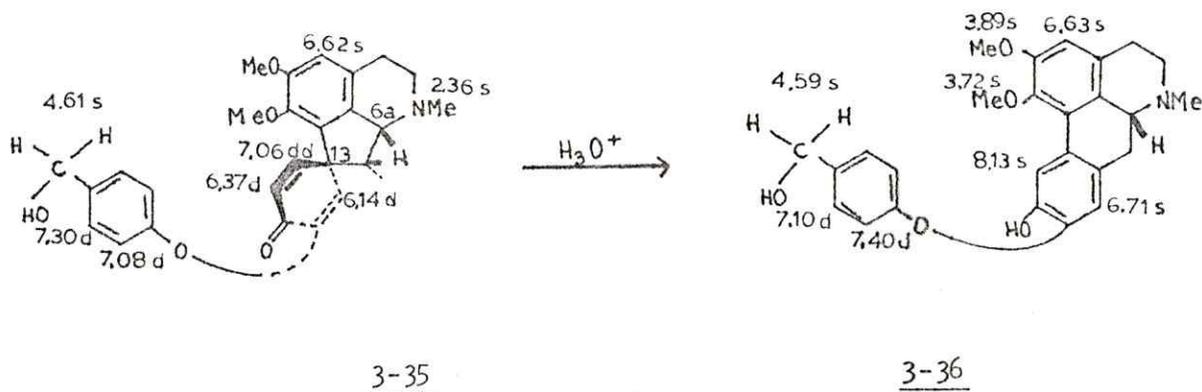


figura 3-60

Esquema de Fragmentación de Coyhaiquina

El reordenamiento dienona-fenol catalizado por ácido de 3-35, produjo una aporfina sustituida en C-1,2,9 y 10 (3-36) cuya curva de DC mostró una depresión negativa a 239 nm indicativo de una configuración R en C-6a²⁹. Por lo tanto, coyhaiquina (3-35) debe incorporar la misma configuración en C-6a.



La reacción catalizada por ácido produce un reordenamiento dienona-fenol que implica una rotación en sentido contrario a los punteros del reloj, tal que el anillo arílico A migra al lado terminal del sistema dienónico conjugado que está syn a H-6a²⁸.

El espectro de RMP (figura 3-61) de coyhaiquina mostró un singulete a δ 2.36 para el grupo NMe, dos singuletes a δ 3.64 (1-OCH₃) y 3.81 (2-OCH₃), un doblete a δ 6.14 (1H, $J_m=2.4$ Hz) para el protón en C-8, un doblete a δ 6.37 (1H, $J_0=9.8$ Hz) para H-11, un dd a δ 7.06 (1H, $J_m=2.4, J_0=9.8$ Hz) para H-12, un doblete a δ 7.08 (2H, $J_0=8.5$) para H-3', 5', y por último otro doblete a δ 7.30 (2H, $J_0=8.5$ Hz).

Para determinar la estereoquímica relativa en el espiro centro C-13, se realizó un estudio de RMN usando el efecto nuclear Overhauser del alcaloide coyhaiquina. El desplazamiento químico para H-6a (δ 3.43,

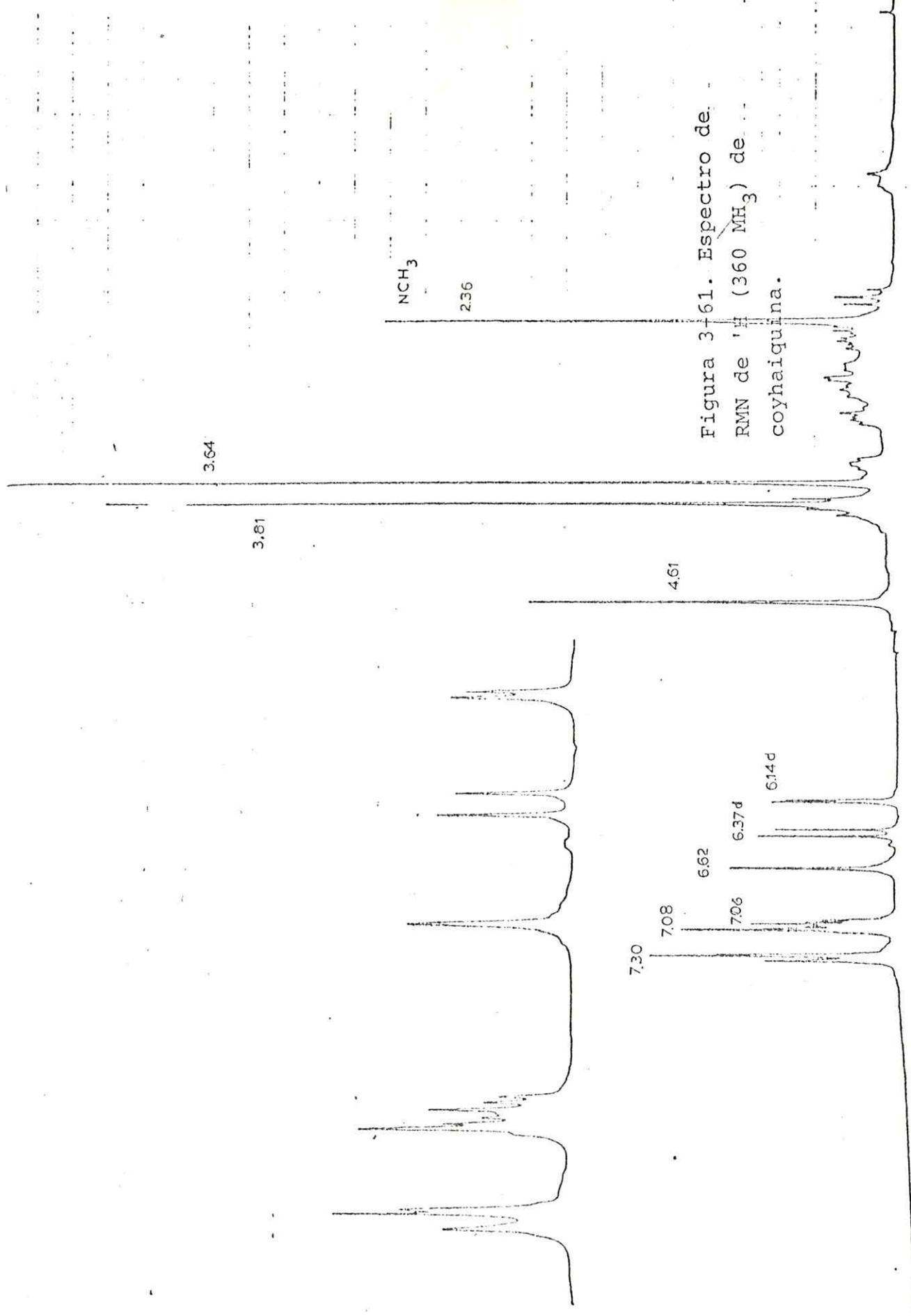


Figura 3-61. Espectro de RMN de ^1H (360 MHz) de coyaiguina.

DS-83 MASS INTENSITY REPORT: PSU INVS SPEC LAB
 30VIT.13 LTIC-270908. 1008-7.2000 E1

Figura 3-62. Espectro
 de masas de coyhai -
 quina.

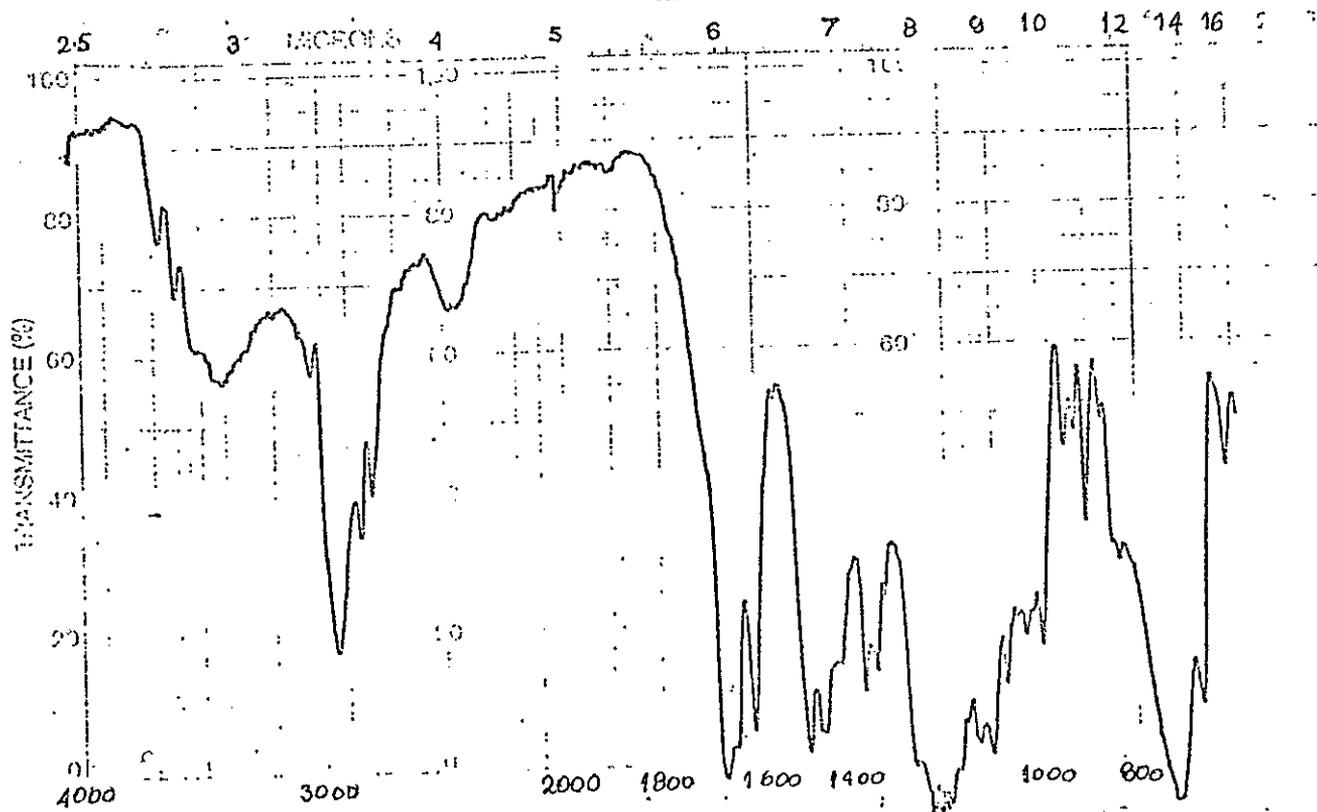
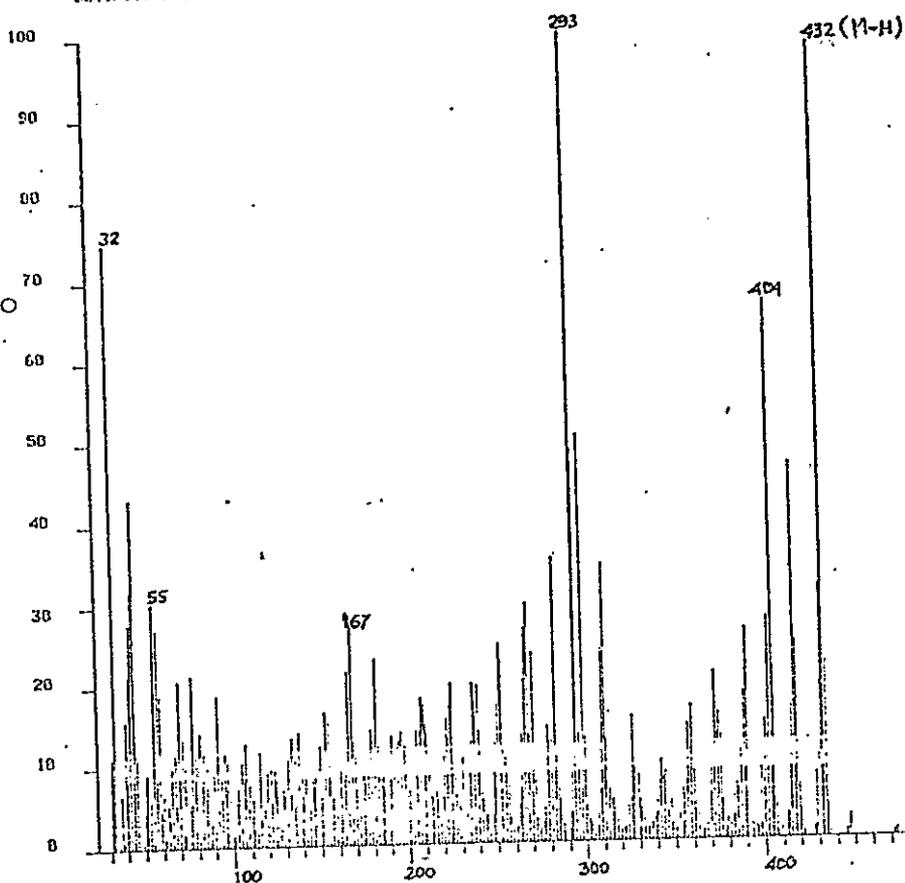
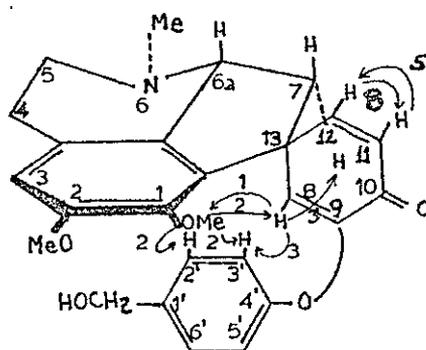


Figura 3-63. Espectro de IR de coyhaiquina.

$J_1=6.1$ Hz, $J_2=10.8$ Hz), H-7 β (δ 2.41, J_1 5.8, $J_2=12$ Hz), y H-7 α (δ 2.17, $J_1=10.7$, $J_2=11.6$ Hz) fueron primero asignados por experimentos de desacoplamiento. La irradiación de H-8 (δ 6.14) produjo un e.n.o. de 1% para el metoxilo en C-1 (δ 3.64), de 3% para las señales a H-3', 5' (δ 7.08), y 3% para H-7 α (δ 2.17). La irradiación del metoxilo en C-1 (δ 3,64) provocó un e.n.o. de 2% para H-8 (δ 6.14), y 2% para la señal a 3', 5' (δ 7.08). Por otra parte irradiando H-12 (δ 7.06) resultó un incremento de un 8% de H-11 (δ 6.37), mientras que la irradiación de H-11 (δ 6.37) produjo un 5% de e.n.o. de H-12 (δ 7.06), (ver estructura 3-37).



3-37

3.14.2. Coyhaiquinina (3-38)

(+)-Coyhaiquinina (3-38), $C_{26}H_{25}O_5N$ es un alcaloide sumamente inestable y fue obtenido luego de una serie de ccf preparativas. Cada vez que se requería un análisis debía ser purificado, y todo el proceso debía realizarse en el menor tiempo posible. El espectro de IR (figura 3-67) mostró una absorción $\lambda_{\max}(\text{CHCl}_3)$ 1660 cm^{-1} para la presencia de la

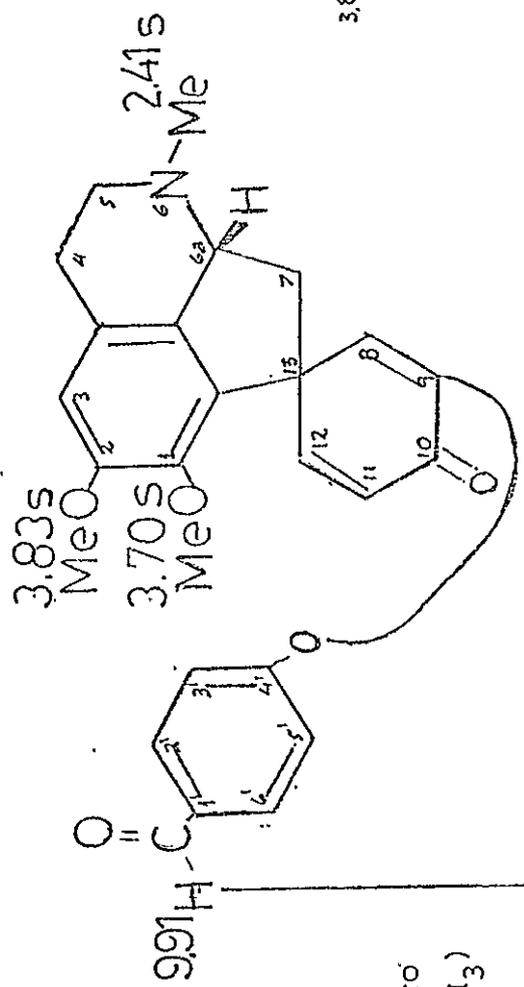


Figura 3-65. Espectro de RMN de ¹H (360 MHz) de coyhaiquin

7.86
7.19
7.06
6.6
6.58
6.38

3.83
3.70

2.41

150.

cetona de la mitad dienónica. El espectro de masas (figura 3-66) es concordante con el mostrado por (+)-coyhaiquina, es decir mostró fragmentos debidos a la ruptura a través del enlace eter aril-dienónico, y perdida de una molécula de CO a partir del fragmento a m/z 310 (figura 3-64).

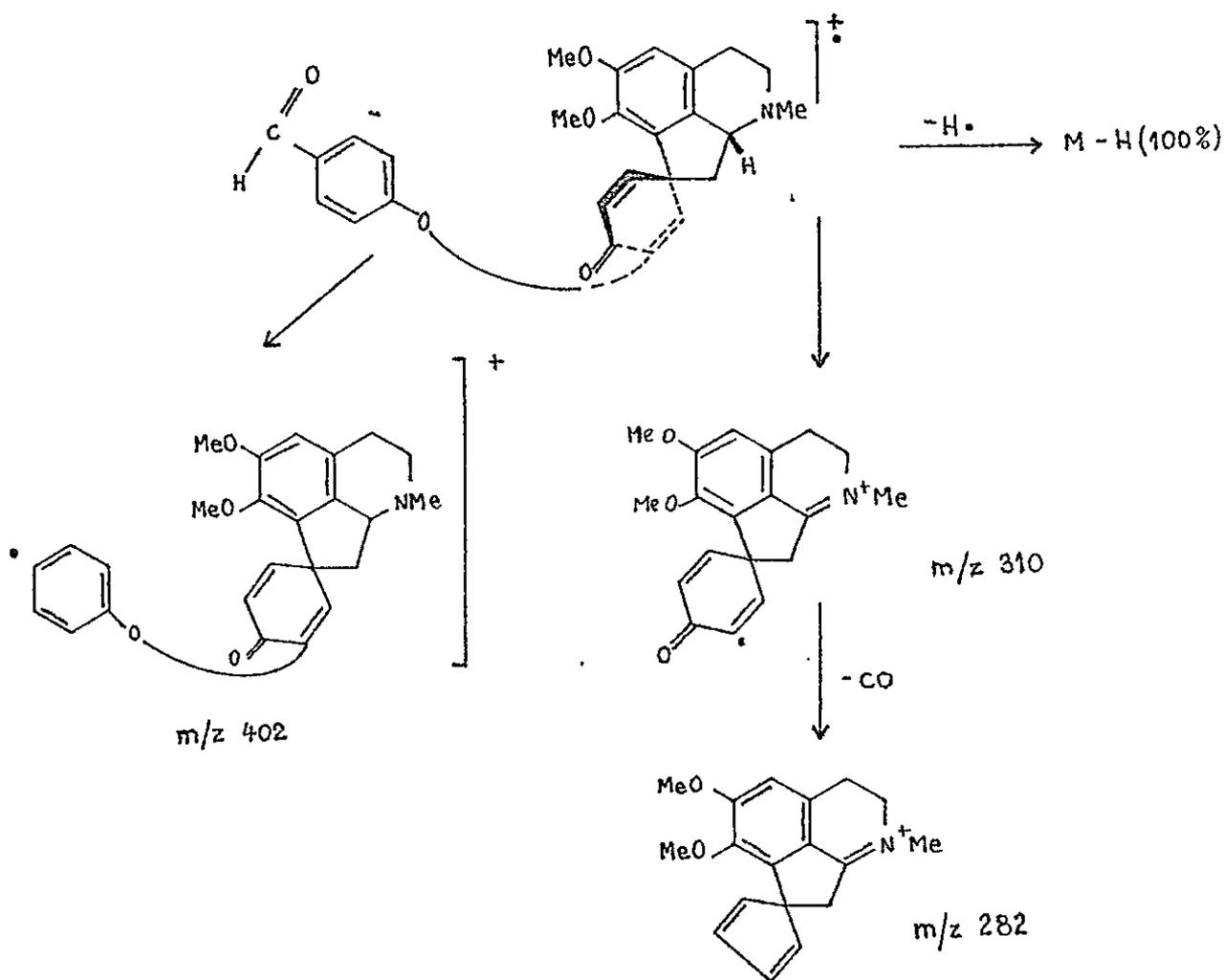


figura 3-64
Esquema de fragmentación de Coyhaiquinina

Es razonable pensar que este alcaloide incorpora la misma configuración que (+)-coyhaiquina, y los demás dímeros aislados en B. empetrifolia. El espectro de RMP (figura 3-65) mostró un singulete a δ 2.41 para NMe,

DS-55 MASS INTENSITY REPORT: PSU MASS SPEC LAB
20VIE.13 LTIC-7116032. 100X-2002961 EI

04-93

Figura 3-66.
Espectro de
masas de coy-
haiquinina.

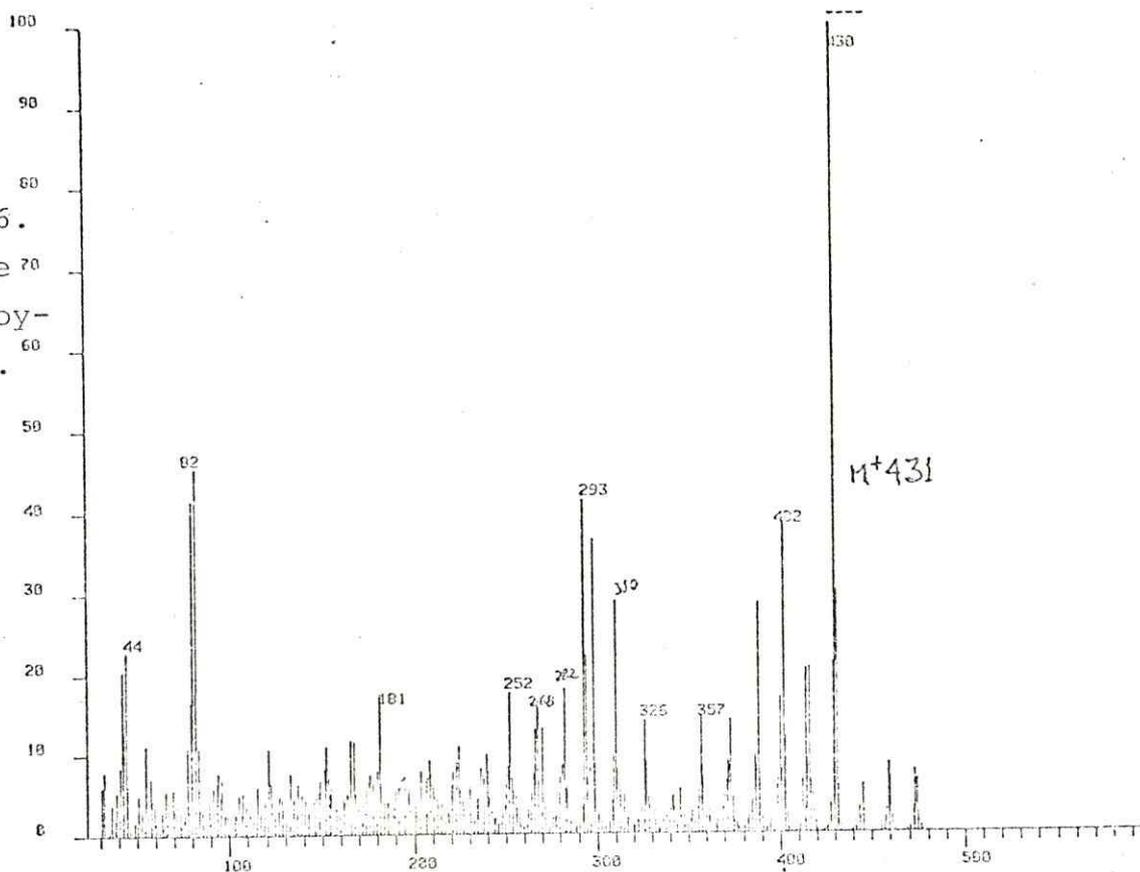
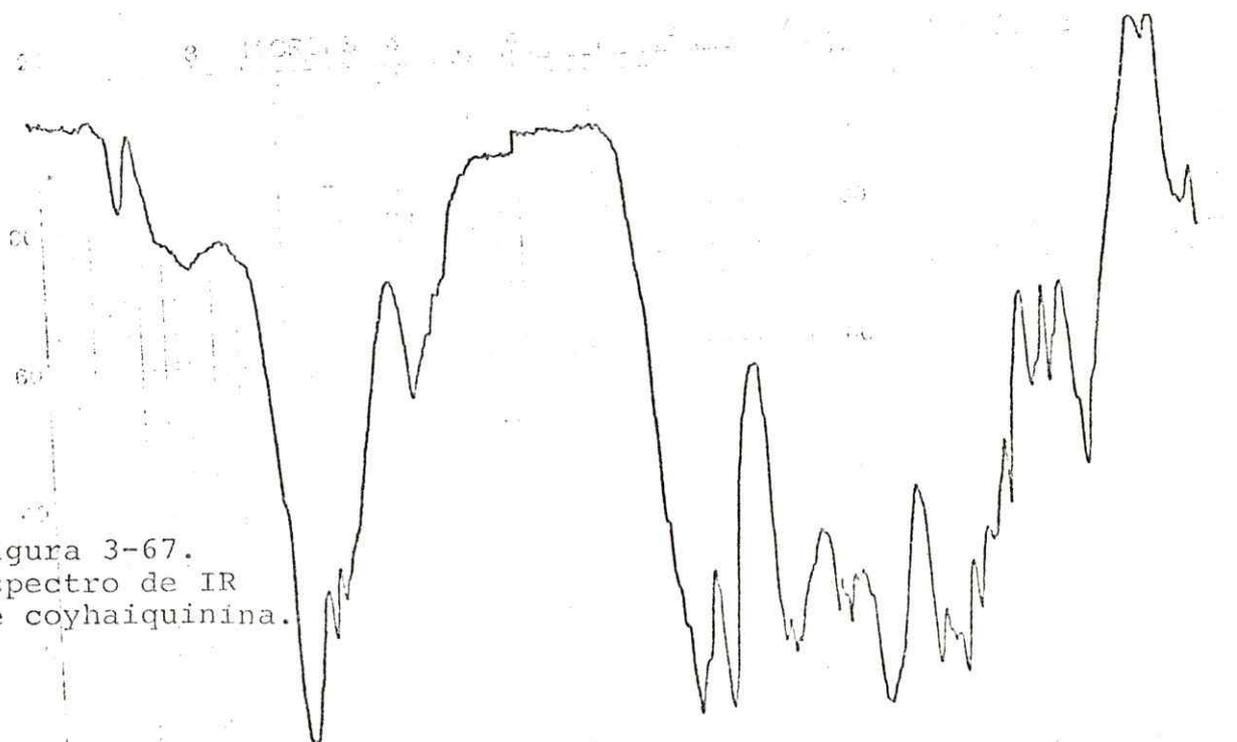
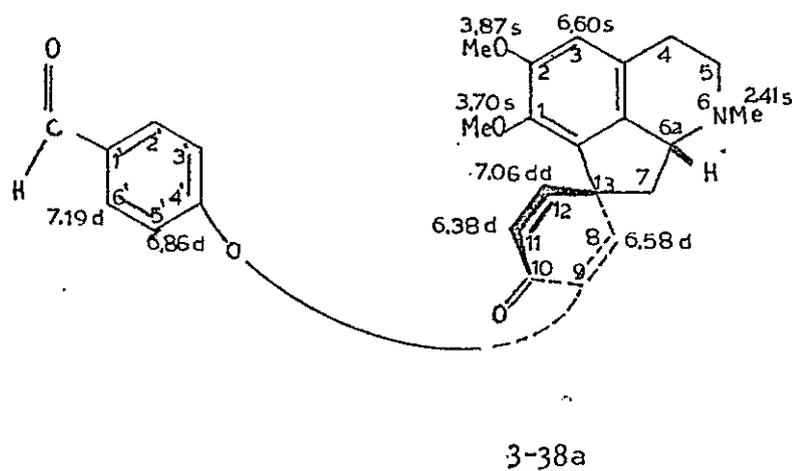


Figura 3-67.
Espectro de IR
de cohaiquinina.



dos singuletes a $\delta 3.70(1-\text{OCH}_3)$ y $3.83(2-\text{OCH}_3)$, un doblete a $\delta 6.38$ (H-11, $J_o=9.77$ Hz), otro doblete a 6.58 ppm para H-8 ($J_m=2.75$ Hz), un doblete de dobletes centrados a $\delta 7.06$ para H-12 ($J_m=2.75$, $J_o=9.77$ Hz), y por último mostró un par de dobletes centrados a 7.19 (2H, $J_o=8.85$ Hz) para H-2', 6' y a $\delta 7.86$ (2H, $J_o=8.85$ Hz) para H-3' y 5'. La señal para el protón del grupo aldehído resonó a 9.91 (ver 3-38a).



3.15.- Conclusiones acerca del estudio realizado en compuestos Proaporfínicos.

Ya se mencionó un método para diferenciar entre proaporfinas de la serie *syn* representadas por coyhaiquina (3-35), pakistanamina (1-35), patagonina (3-26), valdivianina (3-28), coyhaiquinina (3-38), y valdiberina (3-29); y las proaporfinas de la serie *anti*, ejemplificadas por epivaldiberina (3-31) y orientalinona en que los dos hidrógenos vinílicos vecinales del anillo D permanecen sobre el lado opuesto a H-6a.

Se puede también establecer la configuración relativa de los alcaloides proaporfínicos, sin haber realizado los experimentos de doble irradiación usando e.n.o., para determinar la exacta posición de los protones

vinílicos con relación al protón en C-6a. En otras palabras se puede establecer si el alcaloide corresponde a la serie syn o a la anti, con solo el hecho de conocer los desplazamientos químicos de los protones vinílicos.

Para la serie syn, los dos hidrógenos vinílicos adyacentes del anillo D, que permanecen syn a H-6a tienen una gran diferencia relativa en los desplazamientos químicos de alrededor de 0.7 ppm (por ejemplo para coyhaiquina (3-35), $\delta 7.06-6.37 = 0.69$ ppm, para pakistanamina $7.05-6.35 = 0.7$ ppm; y para coyhaiquinina $7.06-6.38 = 0.68$ ppm (ver datos figura 3-68).

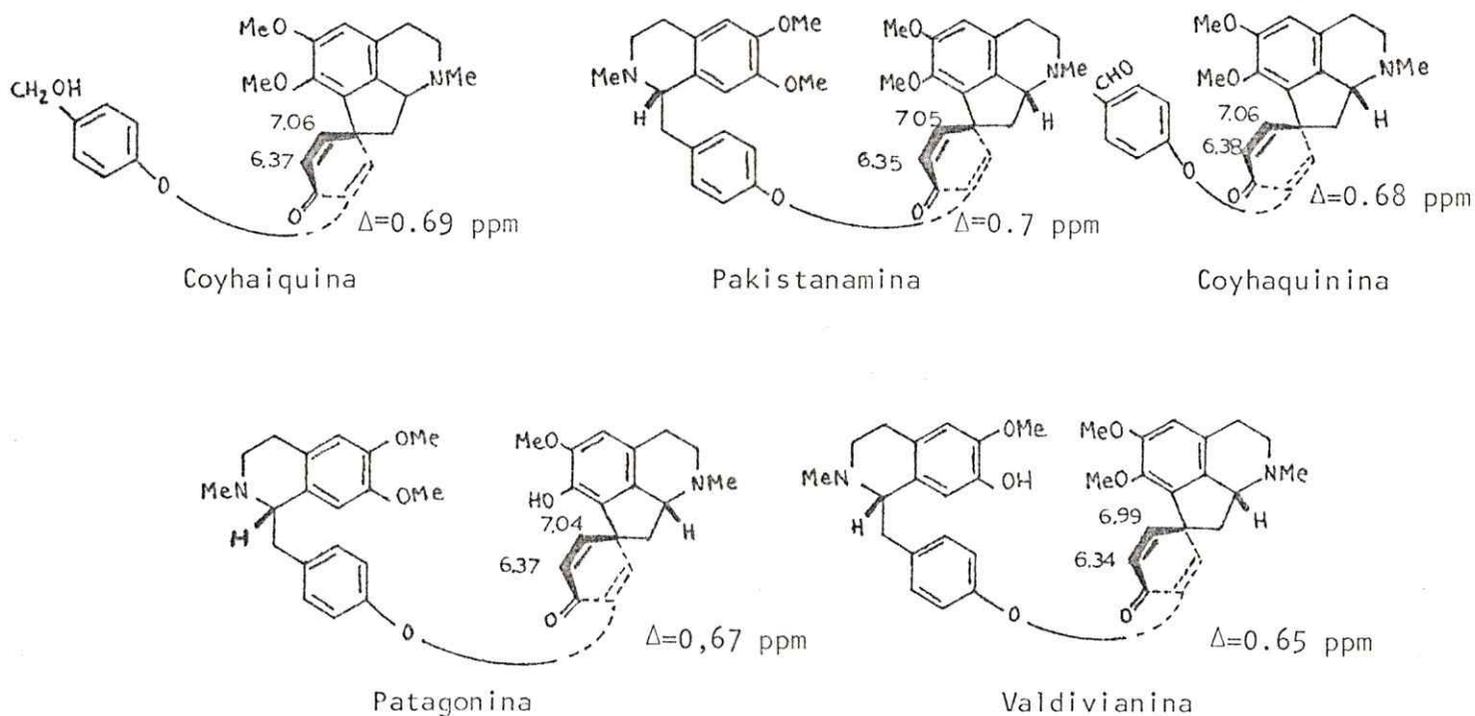


Figura 3-68

Desplazamientos químicos de protones vinílicos en Proporfinas de la serie syn.

Con proaporfinas de configuración anti los dos hidrógenos vinílicos adyacentes, que ahora son anti a H-6a, están representados por señales separadas por solo ≈ 0.44 ppm como en la epivaldiberina (3-31), $6.89-6.46=0.43$ ppm; y en la orientalinona (3-32), $6.88-6.43$ ppm = 0.45 (figura 3-69).

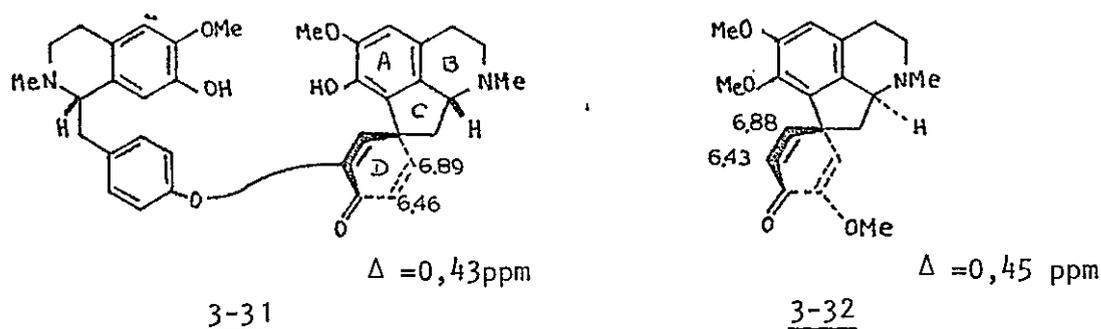


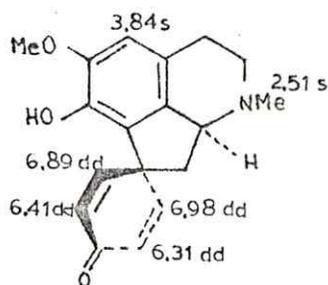
figura 3-69

Desplazamientos químicos de protones vinílicos en proaporfinas de la serie anti.

Se puede concluir que no es necesario llevar a cabo análisis de RMN-ENO para establecer la configuración relativa de una proaporfina sus tituída en el anillo D. Sólo será necesario simples sustracciones de los desplazamientos químicos para los dos protones vinílicos adyacentes de la dienona, para saber si la proaporfina pertenece a la serie syn o a la anti.

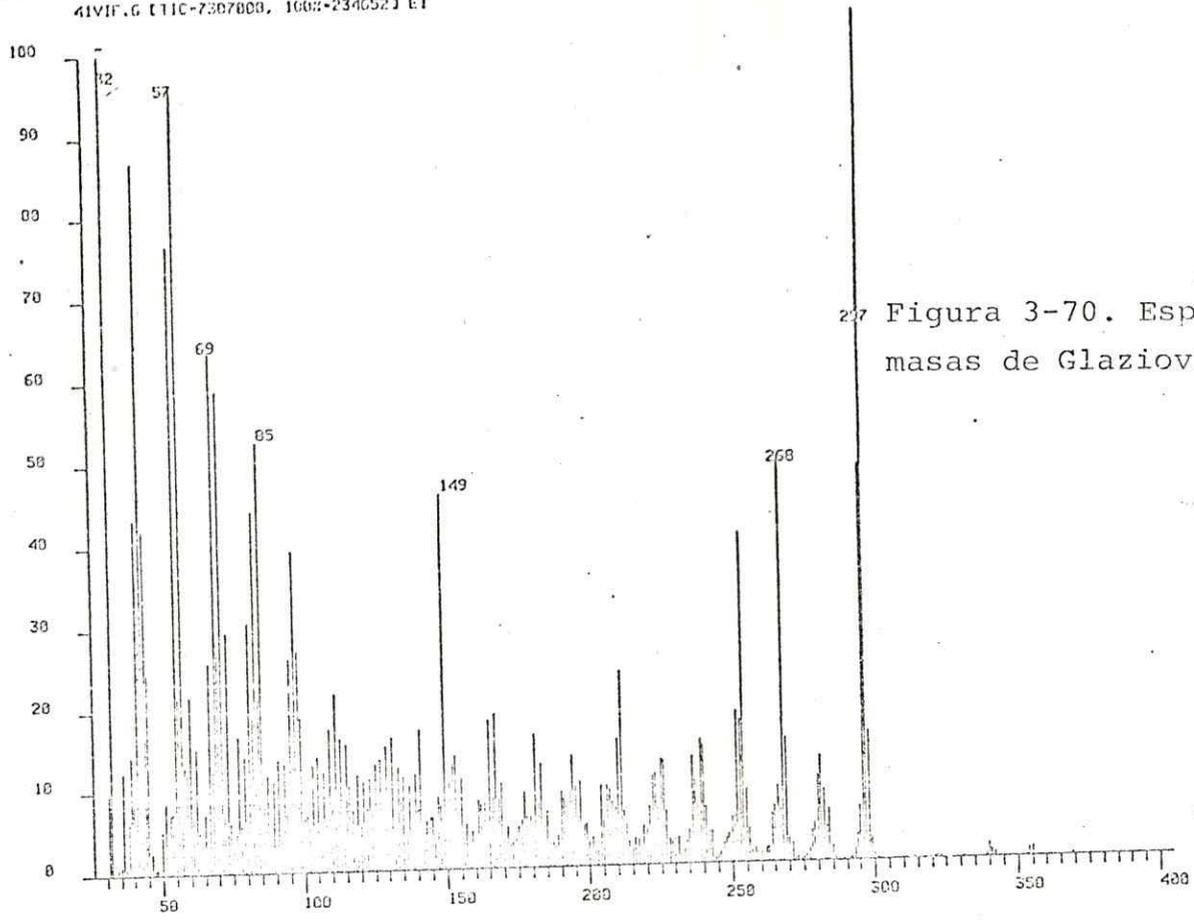
3.16.- Glaziovina (3-39)

Es un alcaloide que se encontró en muy pequeña cantidad en B. empetrifolia (3,5 mg). Aún cuando este compuesto era conocido previo a este trabajo, no estaban bien determinados los desplazamientos químicos de los protones del sistema dienónico. Con los datos obtenidos del espectro de RMP corrido a 360 MHz (figura 3-71) y la generalización que se ha sacado del estudio de los compuestos proaporfínicos, se puede indicar que los desplazamientos químicos son los que a continuación se anotan en la estructura 3-39. El espectro de glaziovina corrido a 360 MHz desa

3-39

coplamiento de spin mostró un conjunto de dos protones vinílicos adyacentes con una relativa gran diferencia en los desplazamientos químicos ($\Delta 6.98 - 6.31 = 0.67$ ppm) que deben permanecer syn a H-6a. Los correspondientes pares de protones anti a H-6a están representados por señales que están separados por sólo 0.48 ppm ($\Delta 6.89 - 6.41 = 0.48$ ppm).

En general, glaziovina fue comparado con una muestra patrón obtenida a partir de Berberis lycium, y fue equivalente en todas sus propiedades físicas, incluyendo un pequeño efecto Cotton negativo a 235 nm y otro mayor a 275 nm que indica una configuración S para el alcaloide²⁹.



297 Figura 3-70. Espectro de masas de Glaziovina.



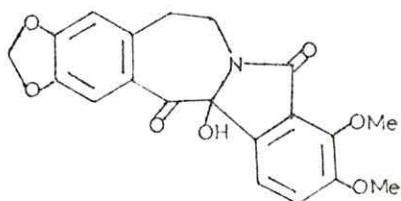
Figura 3-71. Espectro de RMN de ¹H (360 MHz) de Glaziovina.

CONCLUSIONES

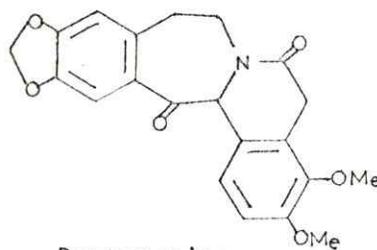
Berberis empetrifolia Lam. es un subarbusto que crece en ambas vertientes de la Cordillera de los Andes desde cerca de los 30° de latitud, donde se encuentra por encima de los 2.800 msnm, hasta el Estrecho de Magallanes, donde baja hasta el nivel del mar. Con respecto a su química sólo se sabía que la berberina es el alcaloide principal de las raíces, al igual que ocurre en muchas otras especies del género.

Con el objeto de conocer algo acerca de los componentes minoritarios de B. empetrifolia se trabajó con 20 kg de polvo de tallos aéreos y subterráneos secados al aire, recolectados cerca de Punta Arenas.

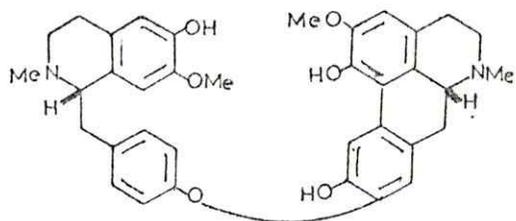
Aparte de Berberina, detectada en grandes cantidades se aisló una serie de otros 20 alcaloides, diez de los cuales resultaron compuestos nunca encontrados en forma natural. Responden a las estructuras siguientes:



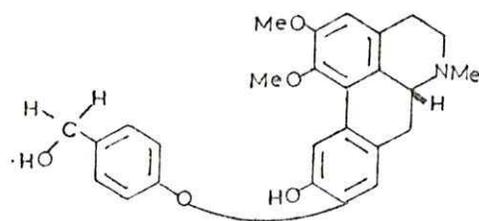
Chilenina



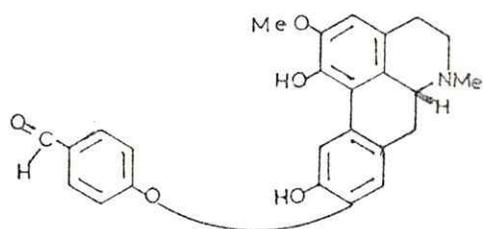
Puntarenina



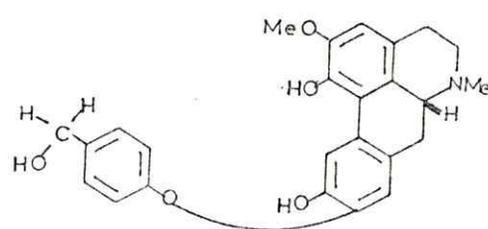
Porveniramina



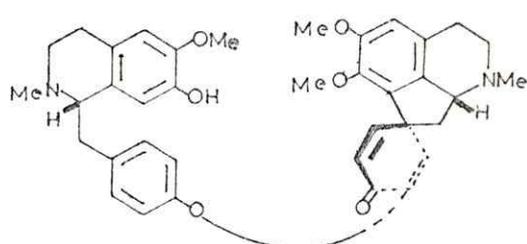
Natalinamina



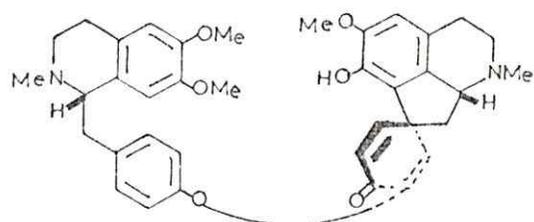
Natalinina



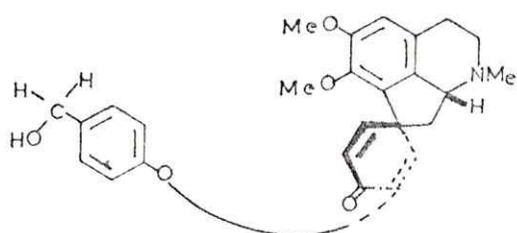
Natalamina



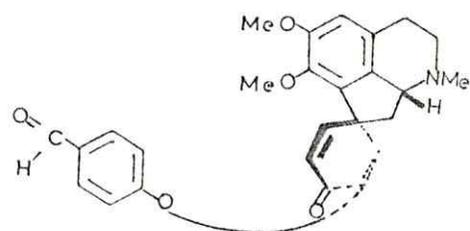
Patagonina



Valdivianina

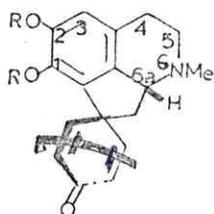


Coyhaiquina



Coyhaiquinina

Estudiando los reordenamientos dienona-fenol catalizados por ácido en los nuevos dímeros proaporfinas bencilisoquinolinas se estableció que las proaporfinas que pertenecen a la configuración C-6a (R) sufrirán rotación contra los punteros del reloj del sistema dienónico durante su reordenamiento a aporfinas, mientras que aquellos de configuración (S) darán origen a rotaciones en sentido de los punteros del reloj. Así el anillo arílico migrará desde el espiro centro C-13 al carbono de la dienona que está syn a H-6a.

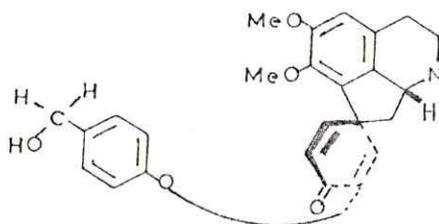


Configuración (R)



Configuración (S)

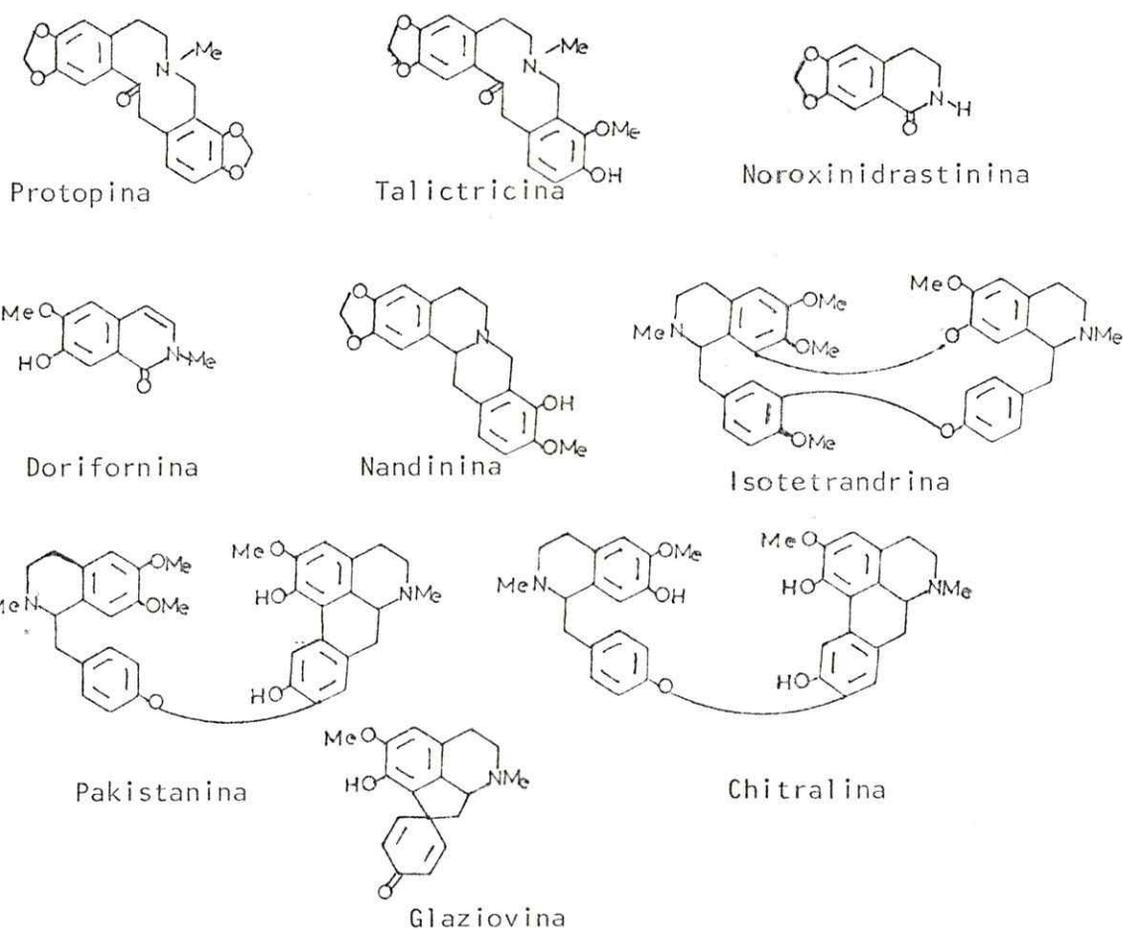
Un estudio del espectro de rmn de coyhaiquina, la primera proaporfina-bencilisoquinolina oxidada, permitió establecer un sencillo método para la asignación de la estereoquímica en el carbono C-13 de las proaporfinas.



Coyhaiquina

Como se observa, la presente tesis cumplió plenamente los objetivos planteados, en cuanto a encontrar otros dímeros del tipo de la pakistanina, con los cuales se establecieron interesantes correlaciones, además de determinar con éxito las estructuras de novedosos alcaloides que mostraron modelos isoquinolínicos únicos.

Una serie de alcaloides conocidos aislados mediante el trabajo fueron también de interés especialmente si se considera que algunos de ellos se les encuentra por primera vez en el género Berberis:



Trabajos futuros en el género Berberis informarán con seguridad otros alcaloides novedosos e interesantes, como ha sido la característica de las especies chilenas estudiadas hasta ahora.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fajardo, V., Urzúa, A. y Cassels, B.K. 1979. Calafatine, an unusual bisbenzylisoquinoline alkaloid. *Heterocycles*, 12, 1559.
- 2.- Fajardo, V., Urzúa, A., Torres, R. Cassels, B.K. 1979. "Meta**bolitos** secundarios de Berberis buxifolia. *Rev. Latinoam. de Química*, 10, 131.
- 3.- Fajardo, V., Garrido, M. y Cassels, B.K. 1981. A. new imine-bisbenzilisoquinoline alkaloid. *Heterocycles*, 15, 1137.
- 4.- Buchheim, G. en H. Melchior (ed.) 1964. *Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*, 12^a. ed., vol. 2, 131-147, Borntraeger, Berlin.
- 5.- Leet, J.E., Fajardo, V., Freyer, A. y Shamma, M. 1983. Some dimeric benzylisoquinoline alkaloids with an unusual oxygenation pattern. *J. Nat. Product*.
- 6.- Wu, J., Beal, J.L., y Duskotch, R.W. 1980. The structure of thalibrumine, a reinvestigation and revision. *J. Org. Chem.*, 45, 208.
- 7.- Baldas, J., Bick, I.R.C., Ibuka, T., Kapil, R.S. y Porter, Q.N. 1972. Mass spectrometry of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *J. of the Chem. Soc. Perkin Transactions I*, 592.

- 8.- Craig, J.C., Martín-Smith, M. Roy, S.K. y Stenlake, J.B. 1966.
Optical rotatory Dispersion and absolute configuration.
Tetrahedron, 22, 1335.
- 9.- Torres, R., Monache, F.D. y Marini-bettollo, G.B. 1979.
bisbenzylisoquinoline alkaloids from Berberis chilensis.
Gazzette Chimica Italiana, 109, 567.
- 10.- Torres, R. Monache, F.D. y Marini-Bettollo, G.B. 1979. Biogenetic
relationships between ligands and alkaloids in Berberis genus
Planta Medica, 37, 32.
- 11.- Torres, R. 1983. Un nuevo dimero bisbencilisoquinolinico en
Berberis chilensis. Bol. Soc. Chil. Quím., 28 (2), 381.
- 12.- Falco, M.R., De vries, J.X., De Brovetto, A.G. Maccio, Z., Rebuffo,
S. y Bick, I.R.C. 1968. Two new alkaloids of Berberis laurina.
Tetrahedron Letters, 1968, 1953.
- 13.- Navas, L. 1976, Flora de la cuenca de Santiago, Ed. Universitaria
de Chile. Santiago de Chile, Vol. II.
- 14.- Dominguez, J.A. 1928. Contribuciones a la materia Médica Argentina
(Instituto de Botánica y Farmacología, Buenos Aires, 91).
- 15.- Fazal Hussain, S. Khan, L. y Shamma, M. 1981. New alkaloids from
Berberis orthobotrys. J. Nat. Products, 44 (3), 274.
- 16.- Shamma, M., Moniot, J.L., Yao, S.Y., Miama, G.A. e Ikram, M. 1973.
Pakistanine and pakistanamine, two new dimeric isoquinoline
alkaloids. Am. Chem. Soc., 95, 5742.

- 17.- Fazal Hussain, S., y Shamma, M. 1980. Kalashine, a novel type aporphine-benzylisoquinoline alkaloid. Tetrahedron Letters, 21, 3315.
- 18.- Moniot, J.L., Hindenlang, D.M. y Shamma, M. 1979. Chemistry of highly oxidized aporphoheadanes. J. Org. Chem., 44 (24), 4347.
- 19.- Fajardo, V. Elango, V., Cassels, B.K. y Shamma, M., 1982. Chilenine : an isoindolobenzazepine alkaloid. Tetrahedron Letters, 23 (1), 39.
- 20.- Fajardo, V., Elango, V., Chattopadhyay, S., Jackman, L.M. y Shamma, M. 1983. Puntarenine : an unusual isoquinoline alkaloid. Tetrahedron Letters. 24 (2), 155
- 21.- Lu, S.-T., Su, T.-L., Kametani, T., Ujiie, A. Ihara, M. y Fukumoto, K. 1976, J. Chem. Soc., Perkin I, 63.
- 22.- Shamma, M. 1972 "The isoquinoline alkaloids", Academic Press, N.Y. London.
- 23.- Umarov, Kh. S., Ismailov, Z.F. y Yu Yunusov, S. 1968. Khim. Priir. Soedim 4 (5), 329, C.A. 70: 88017 q.
- 24.- Hindenlang, D.M. 1979. Tesis de Doctorado, Universidad del Estado de Pennsylvania.
- 25.- Shamma, M. Hinderlang, D.M. 1979. "Carbon-13 NMR Shift Assignments of amines and alkaloids", Plenum Press, N.Y.
- 26.- Dосkotch, R.W., Schiff, P.L. y Beal, J.L. 1969. Alkaloids of Thalictrum. Tetrahedron, 25, 469.

- 27.- Fajardo, V., Guinaudeau, H., Elango, V. y Shamma, M. 1982.
Coyhaiquine : an oxidized proaporphine-benzylisoquiniline alkaloid.
J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1350.
- 28.- Guinaudeau, H., Elango, V., Shamma, M. y Fajardo, V. 1982.
Importance of steric factors in the conversion in the proaporphines
into aporphines. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1122.
- 29.- Ringdahl, B., Chan, R.P.K., Craig, J.C., Cava, M.P. y Shamma, M.
1981. Circular Dichroism of aporphines. J. Nat. Products. 44, 80.
- 30.- Battersby, A.R., y Brown, T.H. 1964. Proc. Chem. Soc., 85.

A P E N D I C E



Este trabajo ha dado origen hasta el momento de su presentación a las siguientes publicaciones:

- 1.- Fajardo, V., Elango, V., Cassels, B.K. y Shamma, M. 1982. Chile-nine: an isoindolobenzazepine alkaloid. Tetrahedron Letters, 23, (1), 39.
- 2.- Fajardo, V., Elango, V., Chattopadhyay, S., Jackman, L.M. y Shamma, M. 1983. Puntarenine: an unusual isoquinoline alkaloid. Tetrahedron Letters, 24 (2), 155.
- 3.- Fajardo, V., Guinaudeau, H., Elango, V. y Shamma, M. 1982. Coyhaiquine: an oxidized proaporphine-benzylisoquinoline alkaloid. J. Chem. Soc., Chem Commun., 1350.
- 4.- Guinaudeau, H., Elango, V., Shamma, M. y Fajardo, V. 1982. Importance of steric factors in the conversion in the proaporphines into aporphines. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1122.