

UCH-FC  
LIC-Q  
V 145

10 ENL 1946  
BIBLIOTECA

TESIS DE LICENCIATURA PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN CIENCIAS CON MENCION  
EN QUIMICA

TITULO : Fitoquímica del Lycopodium gayanum Foster variedad  
gayanum (Remy et Fée)

AUTOR : Pablo Eugenio Valdés Pereira

DIRECTOR DE TESIS : Mariano Castillo Valenzuela, Ph.D.

RESUMEN :

De los compuestos neutros se aisló  $\alpha$ -onocerina, un triterpeno de fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O_2$ , se prepararon sus derivados diacetilado y tetrahidrogenado, los cuales fueron analizados por métodos espectroscópicos. No existen alcaloides en cantidades apreciables.

ABSTRACT :

A triterpenoid  $\alpha$ -onocerin of molecular formula  $C_{30}H_{50}O_2$  was isolated; its tetrahydro and diacetyl derivatives, were prepared, which were analyzed by spectroscopic methods. No alkaloids in appreciable amount were detected.

I N D I C E

I.	Introducción	1
	Alcaloides en <u>Lycopodium</u>	1
	Triterpenes en <u>Lycopodium</u>	7
	Objetivo	13
II.	Parte Experimental	14
III.	Resultados y discusión	27
	Alcaloide B-1	27
	Triterpeno G-1 ( $\alpha$ -onocerina)	27
	Diacetilado G-2 (Diacetil- $\alpha$ - onocerina)	35
	Tetrahidrogenado G-3 (Tetrahidro $\alpha$ -onocerina)	39
	Compuesto E	42
	Compuesto H	42
	Conclusiones	45
	Bibliografía	48



## AGRADECIMIENTOS

- Mariano Castillo V. por la dirección de esta Tesis.
- L. Alberto Loyola y Glauco Morales por sus desinteresadas colaboraciones y buenas amistades.
- Ernesto Clavijo quién realizó los espectros i.r.
- Sergio Alegría quién realizó los espectros n.m.r.
- Manuel González por su colaboración en el montaje de equipos técnicos, su ayuda prestada y su gran amistad.

## I N T R O D U C C I O N

El estudio fitoquímico de la familia de las lycopodiáceas se ha centrado principalmente en los alcaloides y recientemente en compuestos neutros (Triterpenos), debido a las características especiales que presentan.

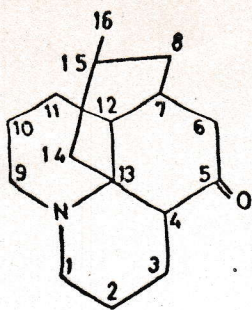
1. Alcaloides en licopodio: Licopodina 1 fue el primer alcaloide aislado de Lycopodium clavatum L. por Bodeker; Wiesner et al. elucidaron la estructura de annotinina 2 aislada del Lycopodium annotinum L. cuya estructura fue posteriormente verificada como su Bromhidrina por Przybylska y Marion. (8)

Posteriormente se elucidaron varias estructuras de alcaloides de este género y actualmente están apareciendo constantes publicaciones en las cuales se reportan nuevos alcaloides y sus estructuras. (1,2). Es así como en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile se estudian otras dos especies de Lycopodio L. paniculatum y L. magellanicum de los cuales se han aislado dos nuevos alcaloides: paniculatina y magellanina respectivamente. (3,4).

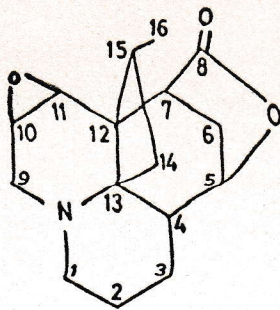
Estos alcaloides son de interés debido a su complicada estructura formada por anillos alifáticos los cuales han permitido clasificarlos en 12 grupos siendo el más abundante el de la licopodina, (Esquema #1)<sup>+</sup>. (5) La distribución taxonómica es restringida ya que no se han encontrado en otra familia vegetal.<sup>++</sup>

En referencia al análisis de este tipo de compuestos la espectrometría de masas ha sido muy útil; MacLean hizo un estudio comparativo de los alcaloides de licopodio clasificándolos en

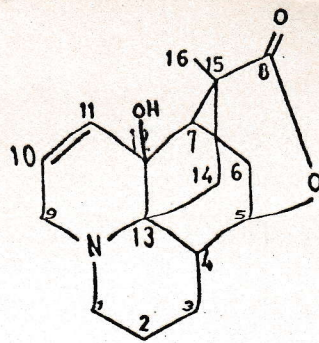




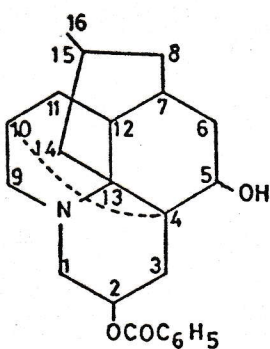
1 Licopodina



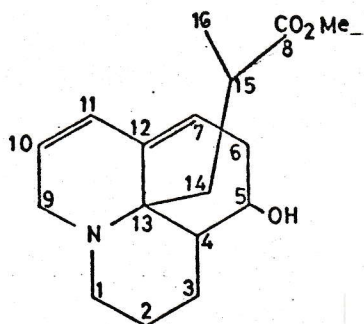
2 Annotinina



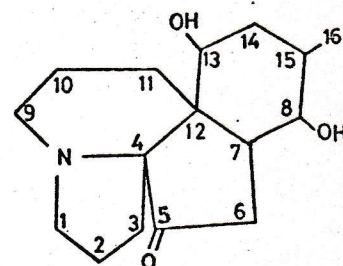
3 Annotina



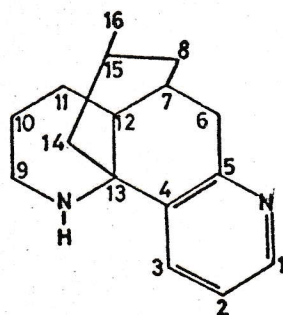
4 Alopecurina



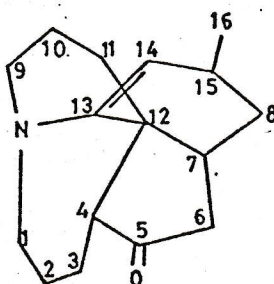
5 Liconnotina



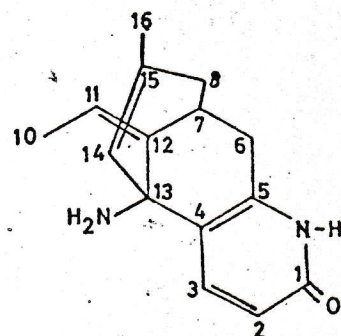
6 Serratinina



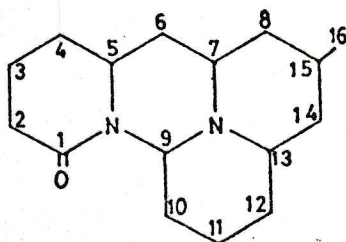
7 Licodina



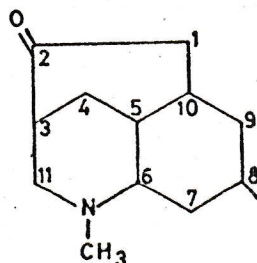
8 Fawcetidina



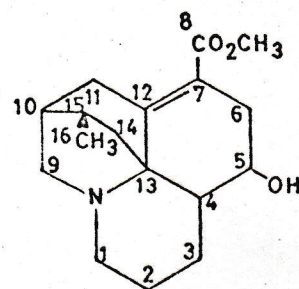
9 Selagina



10 Coccolina



11 Lucidullina

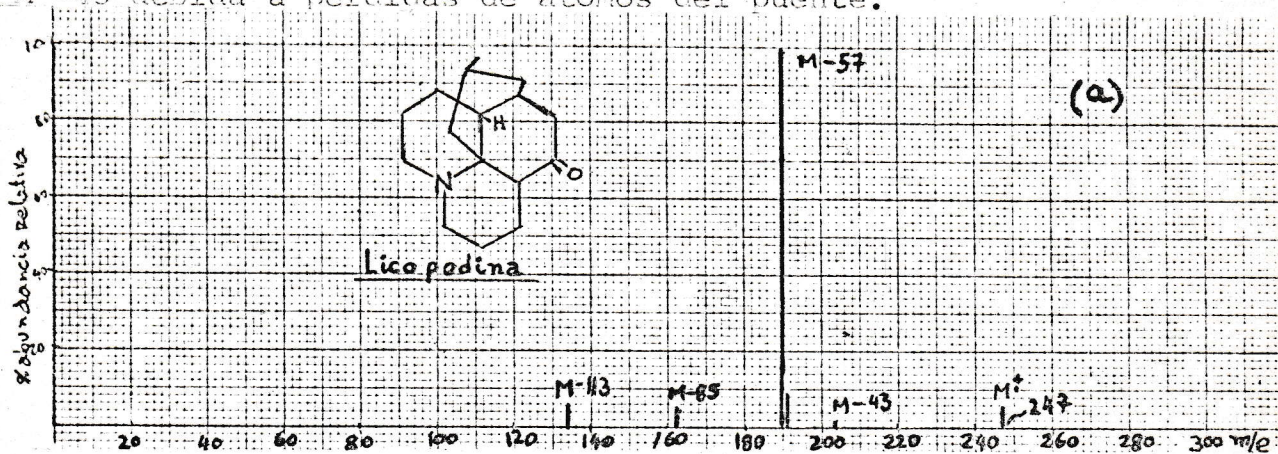


12 Annopodina

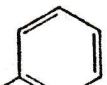
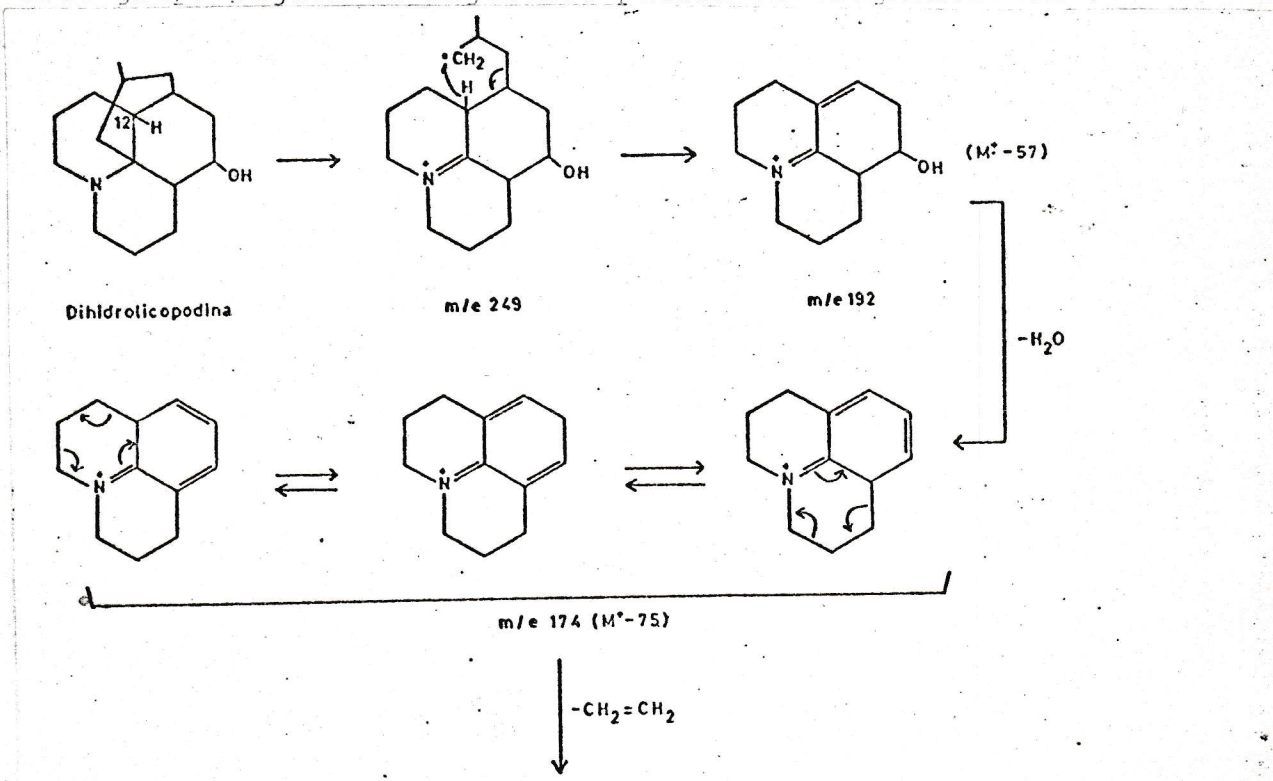


cuatro grupos relacionados a: lycopodina 1, licodina 7, annotinina 2 y selagina 9 (15).

Los alcaloides pertenecientes al grupo de lycopodina 1 (a) como por ejemplo dihidrolicopodina, acetildihidrolicopodina, anhidrodihidrolicopodina presentan una señal base a  $M^+ - 57$  la cual corresponde la pérdida del puente más un átomo de H, otra señal a  $M^+ - 43$  debida a pérdidas de átomos del puente.

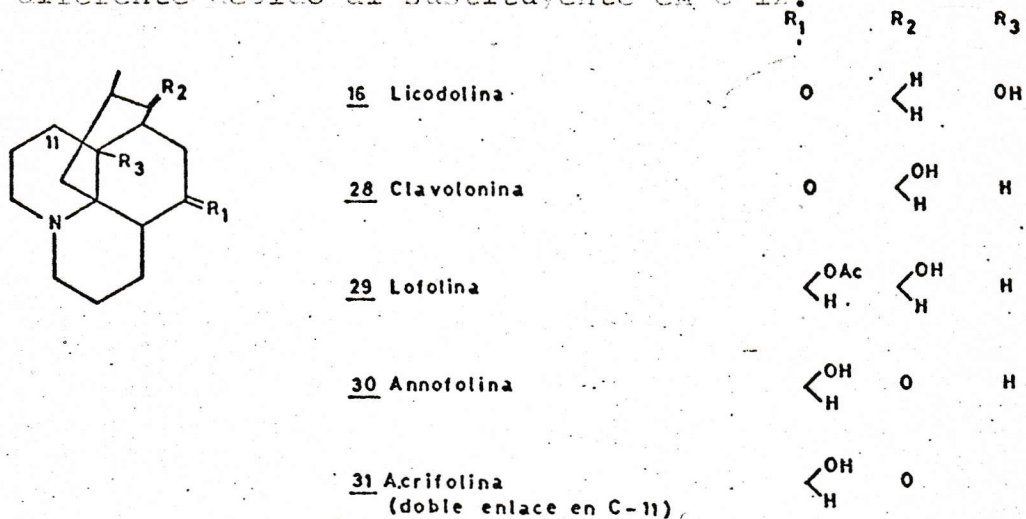


Acetil dihidrolicopodina pierde  $CH_3COOH$  a partir de  $M^+ - 57$  generando el ion base a m/e 174. Los alcaloides pertenecientes a este grupo siguen el siguiente patrón de fragmentación:

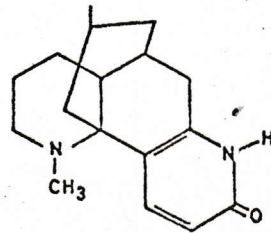
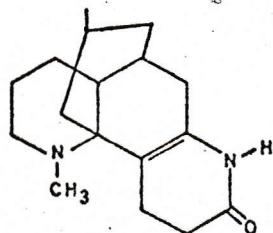
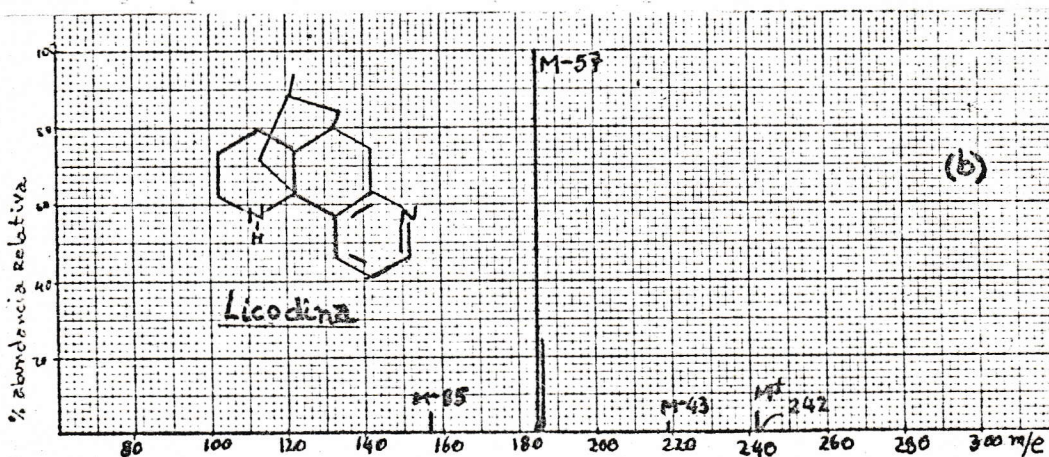




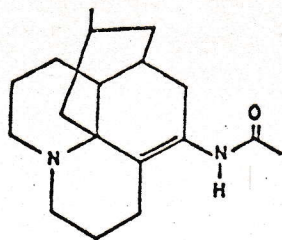
Alcaloides con sustituyentes en el puente siguen el mismo patrón de fragmentación ya que los sustituyentes son eliminados con el puente, este es el caso de clavolonina 28, lofolina 29, annofolina 30; pero licodolina 16, y acrifolina 31 tienen una fragmentación diferente debido al sustituyente en C-12.



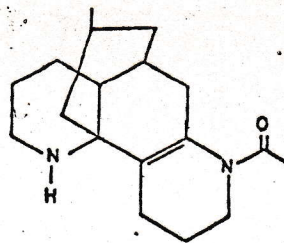
En el grupo de licodina (b) y sus derivados  $\alpha$  y  $\beta$ -obscurina 13 y 14 flabellina 17, flabellidina 18 dan una señal base a  $M^+ - 57$  y también tienen una señal a  $M^+ - 43$  pero se diferencian del grupo anterior ya que el ión molecular es par (16).







17 Flabellina

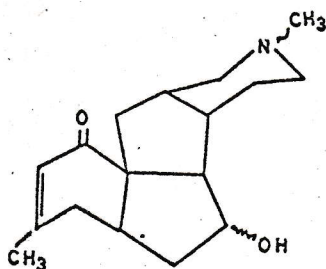


18 Flabellidina

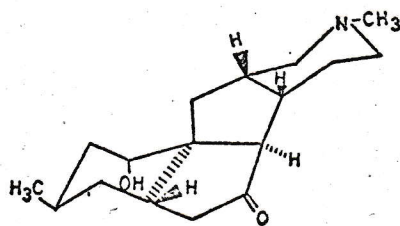
Los espectros de annotinina y selagina son casos particulares con un patrón de fraccionamiento bastante diferentes a los presentados.

Otro grupo interesante es el de la serratinina 6 y sus derivados acetilados y dihidrogenados que se caracterizan por una señal a  $M^+ - 28$ , por pérdida de  $C = O$  (17)

En el caso de los alcaloides magellanina 19 (4) y paniculatina 20 (3, 18)



19 Magellanina



20 Paniculatina

sus espectros de masas son totalmente diferentes a los de los alcaloides ya presentados. Existen señales de alta abundancia para iones con nitrógeno, pero de bajo peso molecular; por ejemplo señales a  $m/e$  58 ( $C_3H_8N$ ),  $m/e$  57 ( $C_3H_7N$ ),  $m/e$  70 ( $C_4H_8N$ ),  $m/e$  71 ( $C_4H_9N$ ),  $m/e$  97 ( $C_6H_4N$ ),  $m/e$  110 ( $C_7H_{12}N$ ) comunes todas a los dos alcaloides junto con una señal en  $M^+ - 15$ . Estos fragmentos son debidos a la presencia de un anillo del tipo II-metil



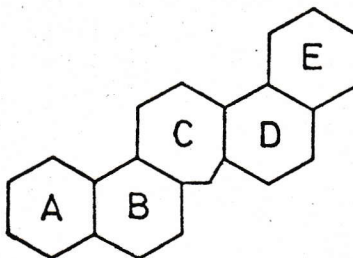
do presentan estas mismas señales. La interpretación de los espectros de masas, y las configuraciones absolutas están de terminadas\*. Por lo tanto espectrometría de masas proporciona información suficiente para la distinción entre los sistemas de anillos.

En cuanto a la biosíntesis de estos compuestos se ha de mostrado que licopodina se origina a partir de lisina y acetato y posteriormente se vió que lisina, pelletierina y acetato también son precursores de cernuina, y podrían serlo de  $\alpha$ -obscurina y licodina (9, 10, 11, 12).

\* M.Castillo, G.Morales, L.A.Loyola, próx. publicación

2. Triterpenos en Lycopodium :

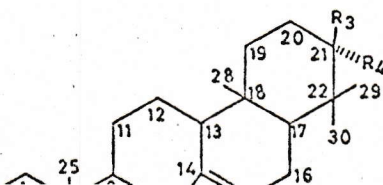
El estudio químico de la familia de las licopodáceas no sólo se ha limitado a los alcaloides, sino que se ha extendido a los triterpenos que son pentacíclicos con el anillo C es de 7 átomos de Carbono. Se les conoce como del tipo Serrateno, cuya estructura base es :



Serratenediol 21, fue primeramente aislado de Lycopodium Thumb variedad serratum f. serratum por Inubushi y posteriormente ha sido encontrado en pinillos, helechos y cortezas de pino (19) como es el caso de Picea sitchensis (Bonq) Can. (Sitka spruce) (20), por consiguiente este tipo de triterpenos no es exclusivo de la familia de las licopodáceas. No se han encontrado en angiospermas.

La familia del serrateno (serratenediol) pertenece al grupo de los hopano u hopananos modificados y tienen una cercana relación biogénética con  $\alpha$ -onocerina la cual ha sido aislada de Lycopodium clavatum (22, 23, 25)

Algunos de estos triterpenos pentacíclicos aislados se muestran en el esquema 3 :





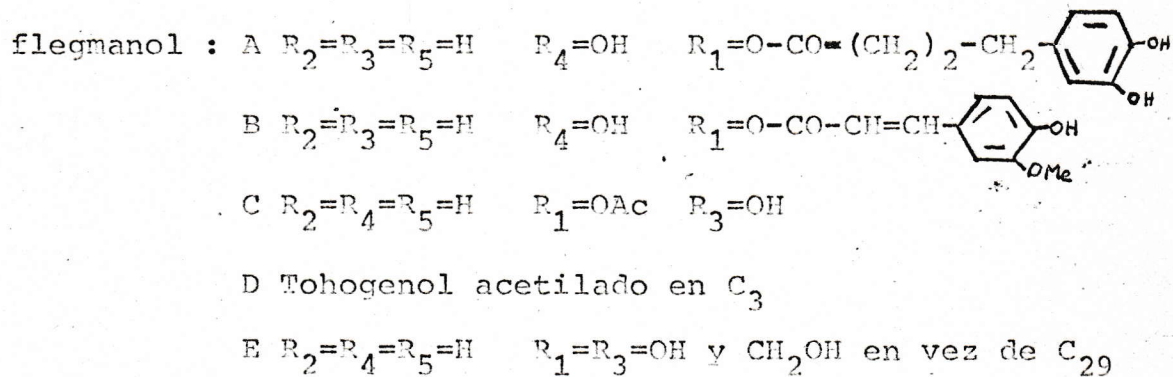
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<u>21</u> Serratenediol	OH	H	H	OH	H
<u>22</u> Licoclavanol	H	OH	OH	H	OH
<u>23</u> 21-Episerratriol	OH	H	OH	H	OH
<u>24</u> 3-hidroxiserraten-21-ona	OH	H	O		H
<u>25</u> 16-Oxoserratenediol	OH	H	H	OH	H
<u>26</u> 16-Oxoepiserratenediol	OH	H	OH	H	H
<u>27</u> Tohogenol	OH	H	H	OH	H

16-oxoserratenediol y 16-oxoepiserratenediol poseen un carboni  
lo en C-16

ESQUEMA 3

Tohogenol 27, no tiene doble enlace en C-14 pero posee un OH  
en esa posición.

Otro grupo es la serie de los Phlegmanoles :



Además están los derivados acetilados que también se han  
encontrado (21, 45, 46).

Los rasgos particulares de estos compuestos son que po  
scen en su mayoría 7 grupos metilo y un doble enlace en C-14,  
además del anillo de 7 átomos de carbono previamente menciona  
do, son compuestos que se pueden identificar por sus caracte  
rísticas espectroscópicas: así por ejemplo para el serratene

11.1.21. hay un fuerte absorción a 2950 cm<sup>-1</sup> 1640 cm<sup>-1</sup> y

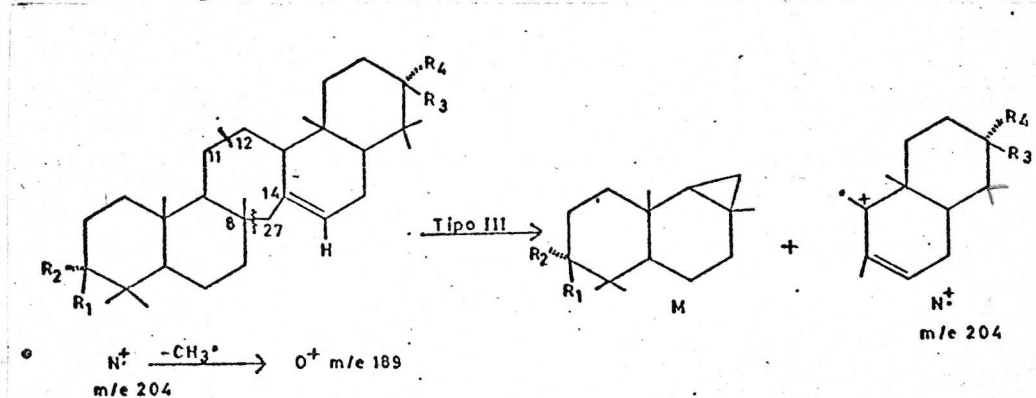


795  $\text{cm}^{-1}$  para doble enlace trisustituído y en el espectro r.m.n. señales en 4,69  $\tau$  multiplete para un H olefinico; singletes en 8,78  $\tau$  ; 9,06  $\tau$  9,35  $\tau$  para 7 grupos metilo (20). Inubushi (24), por otra parte encontró para el Serratenediol señales en 9,31  $\tau$  (3H), 9,20  $\tau$  (3H), 9,17  $\tau$  (3H) 9,14  $\tau$  (6H) y 9,02  $\tau$  (6H) y en el derivado acetilado solo 3 singletes para  $\text{>C-CH}_3$  en relación 1:5:1

La espectrometría de masas ha tenido gran importancia en la elucidación estructural de estos triterpenos ya que las fragmentaciones características del anillo de 7 átomos de carbono, permite definir modificaciones en los esqueletos y funcionalidades presentes en estas series.

Una investigación detallada de los patrones de fragmentación de la familia del serrateno fue realizada por Kutney y Eigendorf (23).

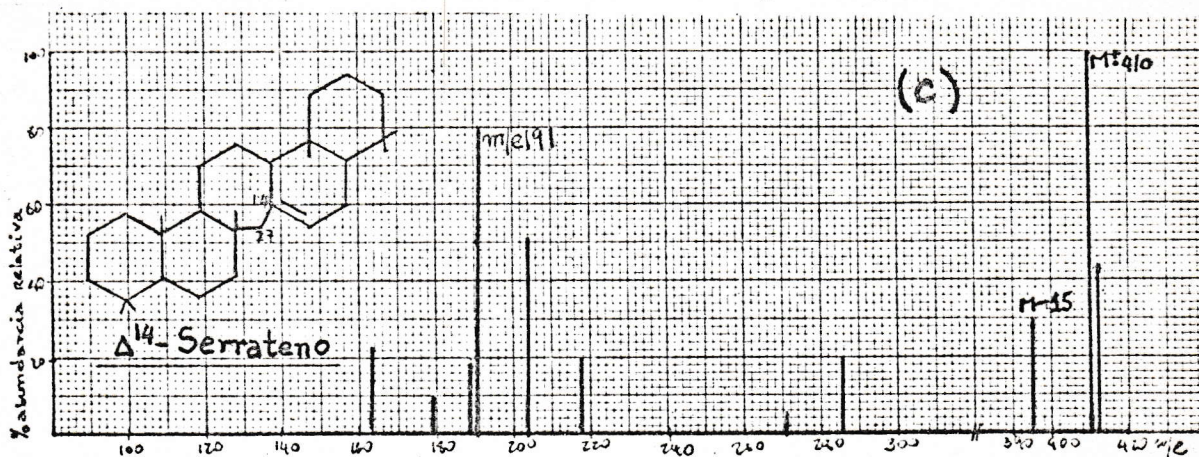
En la fragmentación de los  $\Delta^{14}$ -serratenos interviene principalmente la ruptura del anillo de 7 átomos de Carbono ya que es un punto débil de la molécula (Tipo III).



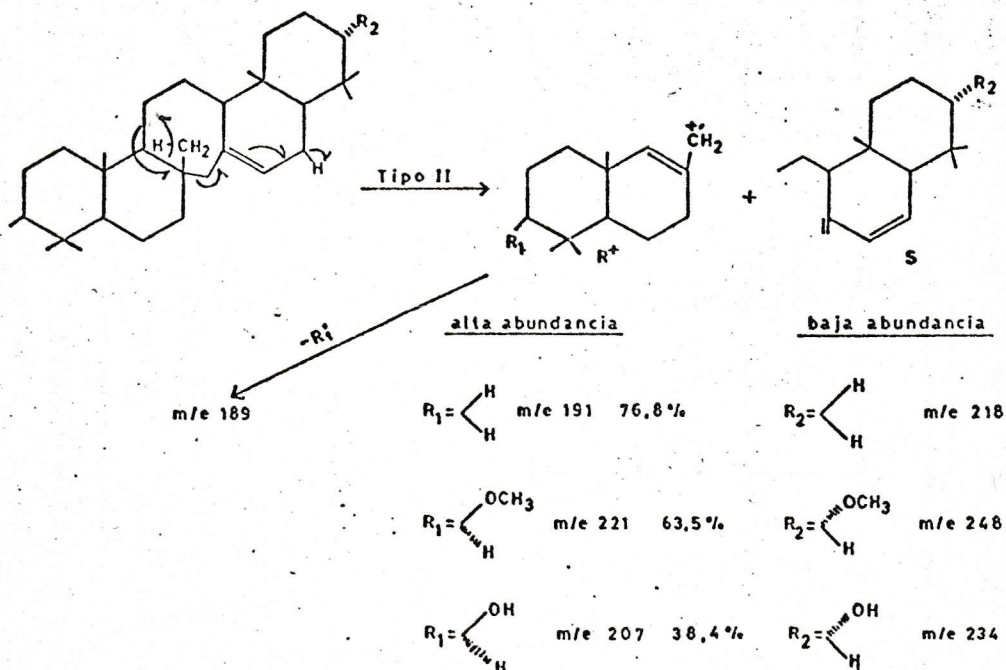
En el caso del serrateno la ruptura de los enlaces entre los C-11, C-12 y C-8 C-27 dan una señal a m/e 204 con un 46% de abundancia relativa.



Las intensidades de las señales tipo retro Diels-Alder son del orden de 7% a 15%, por ejemplo: Serratenediol 7,3%,  $\Delta^{14}$ Serrateno (c) 16,9%, 3- $\alpha$ -Metoxiserrateno-21- $\delta$ 1 13%, en comparación con otros tipos de triterpenos pentacíclicos.

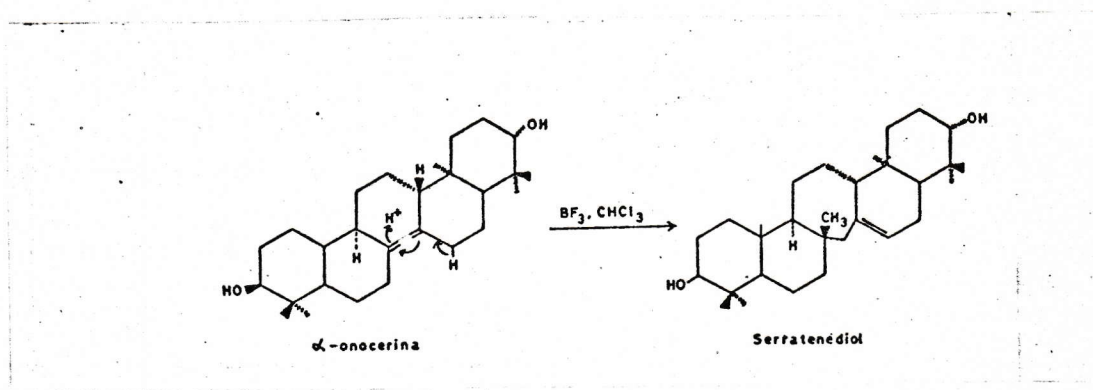


Los dos sistemas de anillo son distinguibles por la abundancia del ion  $R^+$  m/e 191 en el caso del serrateno el cual proviene de un tipo de fragmentación que involucra la migración de un H (Tipo II).



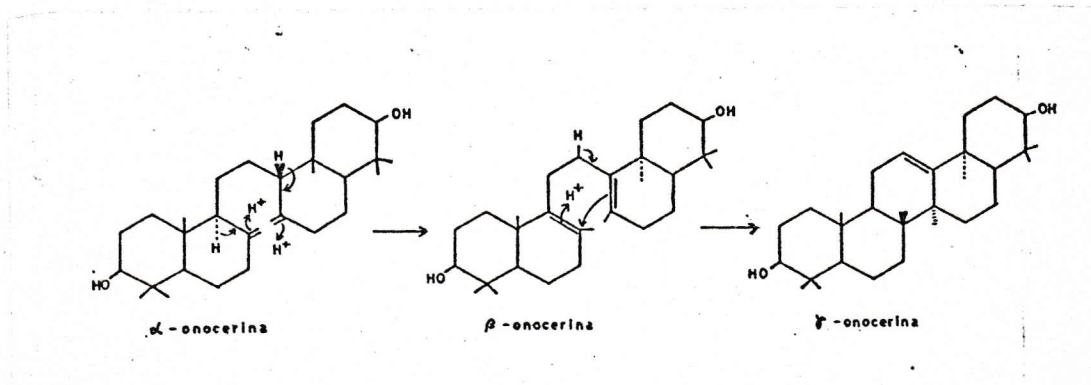


En cuanto a su biogénesis, la serie del serratenediol tiene relación con  $\alpha$ -onocerina, compuesto que ha sido aislado de Lycopodium clavatum (22, 40) de Lycopodium inundatum (25) y de Ononis spinosa (50), lo que indicaría que están interrelacionados por una simple transformación química (26). La obtención del serratenediol a partir de  $\alpha$ -onocerina se logra usando ácidos de Lewis voluminosos como por ejemplo el  $\text{BF}_3$  (27) verificándose la siguiente reacción :



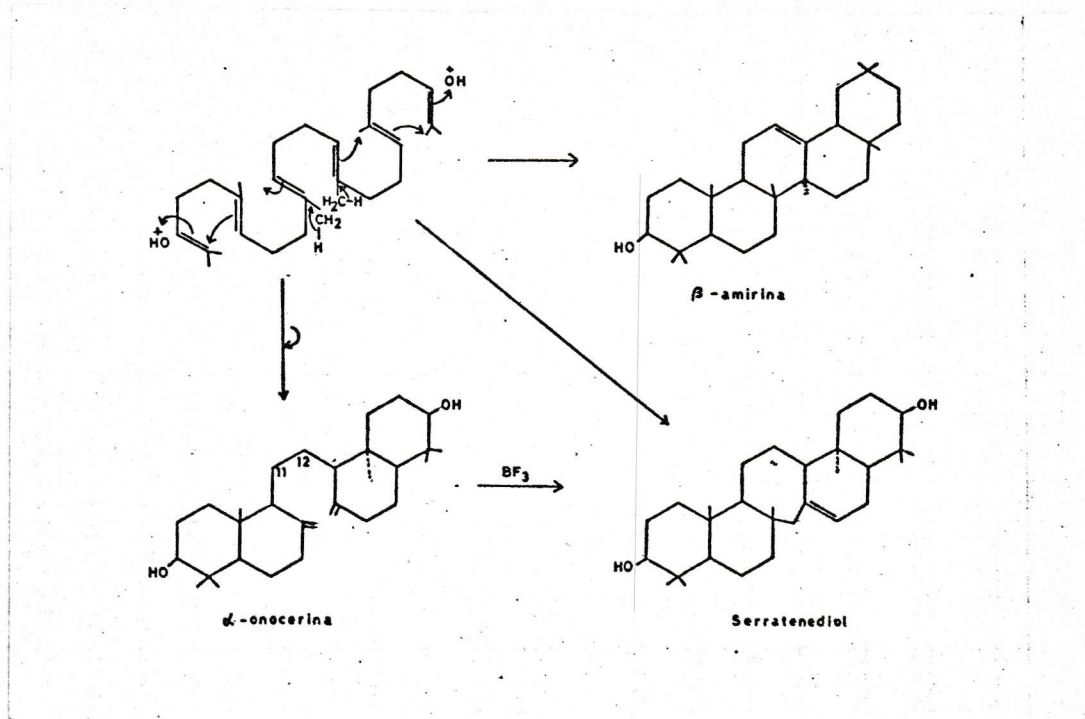
Como la síntesis de  $\alpha$ -onocerina se ha logrado (28) al agregar este paso se puede concluir que serratenediol puede ser sintetizado totalmente y sin problemas de estereoquímica ya que  $\alpha$ -onocerina tiene la misma configuración.

$\alpha$ -onocerina es isomerizada a  $\beta$  y  $\delta$ -onocerina con tratamiento con ácidos minerales.





$\alpha$ -onocerina proviene de la ciclación del escualeno el cual también puede dar origen a la familia de la  $\beta$ -amirina dependiendo de la forma en que se produzca la ciclación (29, 30).



Kutney y Rogers (31) afirman que en los Picea sitchensis solamente, los triterpenos del tipo serrateneno provienen de una ciclación poco común del escualeno, y no se han encontrado juntos con los provenientes de la ciclación habitual.

$\alpha$ -onocerina es tetracíclica y posee dos grupos metilenos en los anillos B y D, seis grupos metilos y dos hidroxilos. La no existencia del anillo C le da gran movilidad en torno a los C-11 y C-12, pero al ser hidrogenada solo forma tres productos debido a la simetría. (29) Su espectro i.r. tiene absorciones correspondientes a metileno exocíclico en  $3085 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1642 \text{ cm}^{-1}$ , y  $885 \text{ cm}^{-1}$ ; en  $3350 \text{ cm}^{-1}$  para hidroxilo. (49)

$[\alpha]_D^{15} = +17 \pm 2.0^\circ$  ( $C = 0,25 \text{ CHCl}_3$ ). El espectro r.m.n. presenta señales en  $5,18 \tau$  y  $5,35 \tau$  pertenecientes a los grupos



metilenos, y señales en 9,4  $\tau$  ; 9,22  $\tau$  ; 9,17  $\tau$  cada una para 6 H pertenecientes a los metilenos.

Además de alcaloides y triterpenos, de Lycopodium Lucidum se aisló un diterpeno: licoxantol junto con friedelanona-3, ceras, etc. (48)

Un estudio bioquímico comparativo realizado por E.White y G.H.N. Towers (32) de los licopodios estableció que la sacrosa era el azúcar predominante, glucosa y fructosa estaban en menor porcentaje y solo se detectó trehalosa en algunas especies. En cambio en las selaginelas, trehalosa era el azúcar predominante y en menor proporción sacarosa, glucosa y fructosa.

Objetivo : En el presente trabajo se examinó el contenido de alcaloides y compuestos neutros del Lycopodium gavanum Foster Var. Gavanum (Remy et Fée) que es sinónimo de Lycopodium scariosum, (y esta última denominación tiene preferencia\*) (33), contribuyendo con antecedentes sobre su clasificación taxonómica.

---

\* R.Rodríguez, Inst. de C. Biológicas, Depto. de Botánica, Universidad de Concepción.

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. Instrumentos y materiales :

La cromatografía de gases se realizó en un cromatógrafo Perkin-Elmer modelo 900, con un detector de ionización de llama a base de una mezcla de  $H_2$  y aire a una presión de  $1,4 \text{ Kg/cm}^2$ . El gas transportador era  $N_2$  con un flujo de  $70 \text{ ml./min.}$  medido a la salida de la columna.

Las columnas ocupadas fueron: SE-30 3% sobre Chromosorb W de 3 pies de largo y  $1/4$  pulgadas de diámetro y OV-17 sobre Chromosorb Q de iguales dimensiones. Las condiciones que se usaron se indican en cada caso.

Para la cromatografía en capa fina y preparativa se ocupó Silica Gel  $G_{F254}$  y Óxido de aluminio Tipo 60/E. Las placas se activaron durante  $1,5 \text{ hr.}$  a  $120^\circ\text{C.}$  Los sistemas de solventes se indican en la tabla I.

Tabla I.

Sistema	Solvente
a	Cloroformo
b	Cloroformo : Metanol (92 : 8)
c	Metanol
d	Benceno : Ciclohexano ( 1 : 1)
e	Eter de Petróleo
f	Cloroformo : Metanol (99 : 1)
g	Acetona

El proceso de revelado se realizó utilizando vapores de Iodo, o rociando con reactivo de Dragendorff para la detección de alcaloides y reactivo de Liebermann-Burchard



aluminio básico Tipo E, grado de actividad I, y cuando se estimó necesario se desactivó según ref. (39). También se ocupó Silica Gel 60 para columna. Todos los solventes y adsorbentes usados eran productos Merck de calidad analítica.

Los espectros i.r. se registraron en pastilla de KBr usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer 621.

Los espectros de r.m.n. se registraron usando un espectrómetro Varian T-60, y como referencia interna se ocupó TMS\*. Los solventes usados se indican en cada caso.

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas ECE-110B.

Los espectros se graficaron tomando como referencia a la señal más abundante a la cual se le atribuyó el 100%; se han representado las señales con intensidades superiores al 5%.

Los puntos de fusión no han sido corregidos; se tomaron en un microscopio Leitz con placa calefactora.

## 2. Recolección del material

Lycopodium gayanum (Remy et Fée) se recolectó en la primavera de 1973 en los faldeos del Volcán Osorno, Osorno.

## 3. Obtención de extractos

El proceso de extracción se realizó por medio de una percolación con ác. Tartárico -tras haber probado otras técnicas en trabajos previos realizados con esta planta (37, 38)- seguido de un lavado con éter etílico, basificación y extracción con solvente.

a) Extracto Clorofórmico : Se partió de 11,7 Kg. de planta seca y molida finamente, de los cuales 6,95 Kg. fueron percolados con 50. Tartárico al 3% p/v por 3 veces durante 2 a 3 días.



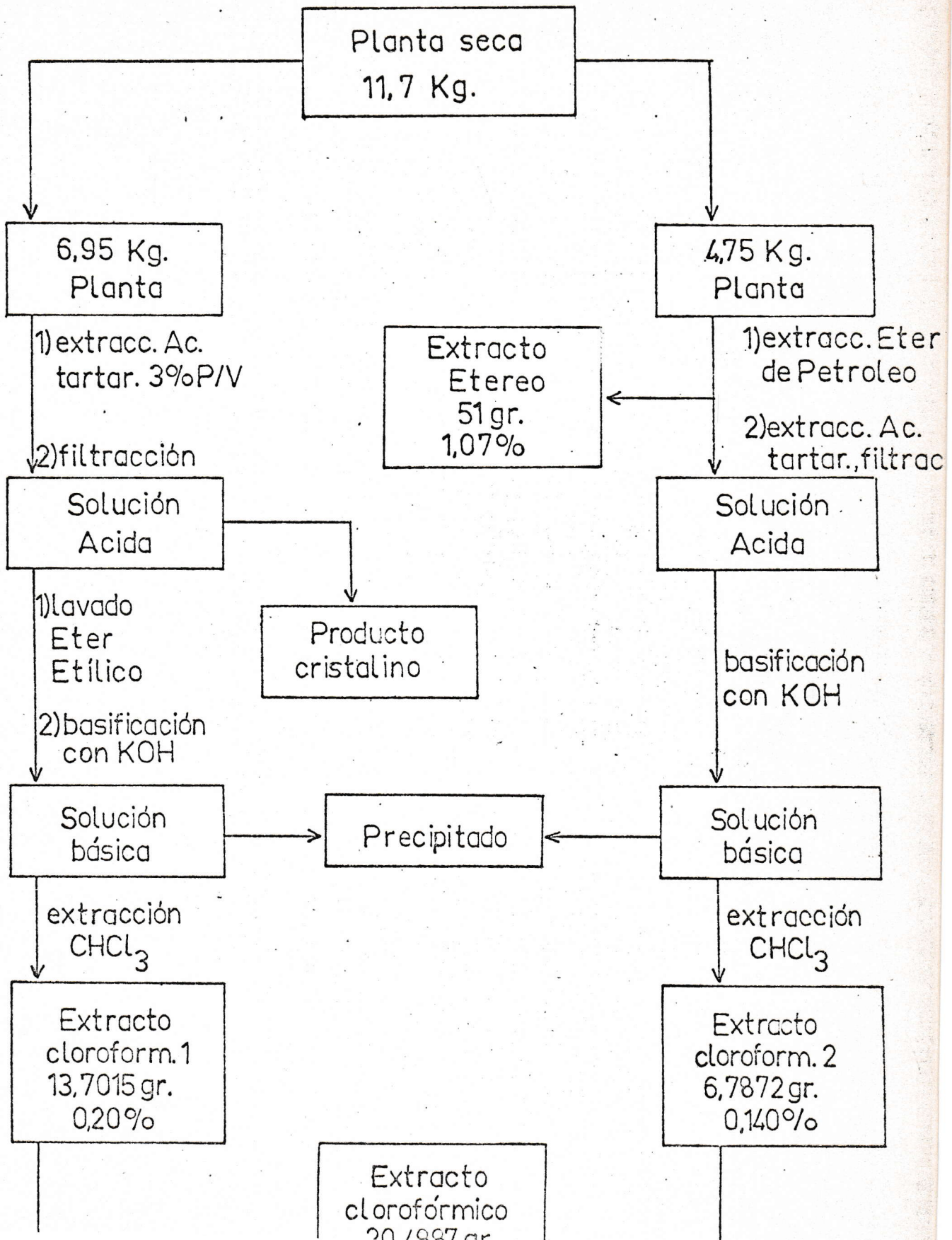
La solución ácida fue filtrada a través tierra de infusorios, y al ser guardada en el congelador se obtuvo un producto cristallino (18,1 g.) soluble sólo en agua caliente que es negativo al ensayo de Dragendorff. Este producto se hidrolizó con  $H_2SO_4$  y por c.c.f. en placas de sílice neutra impregnadas con Acetato de Sodio 0,02 M desarrolladas con  $CHCl_3$ :  $CH_3OH$  6:4 y reveladas con el reactivo N°250 (34) se vió que no correspondían a azúcares, pueden ser posibles tartratos.

La solución ácida se separó de este producto por filtración y el filtrado se lavó repetidas veces con éter etílico para así eliminar material neutro y no básico disuelto. La fase acuosa se basificó con KOH hasta pH 10-11, evitando el calentamiento. Se obtuvo un precipitado (14 g.) que dió positivo al ensayo de Benedict y en c.c.f. tenía igual  $R_f$  que glucosa. La solución fue separada de este producto y se extrajo exhaustivamente con  $CHCl_3$  en un extractor Soxhlet, obteniendo así el extracto clorofórmico 1 de color café cuyo residuo pesó 13,7015 g. que corresponde a un rendimiento de 0,20%.

Los 4,75 Kg. de planta restante se extrajeron con éter de Petróleo 40-60°C en un extractor Soxhlet durante 4 días, para eliminar los compuestos neutros y grasas presentes en la planta, la planta se dejó secar y luego se le hizo el mismo tratamiento anterior, obteniendo el extracto clorofórmico 2 de color café que pesó 6,7872 g. equivalente a un rendimiento de 0,14%.

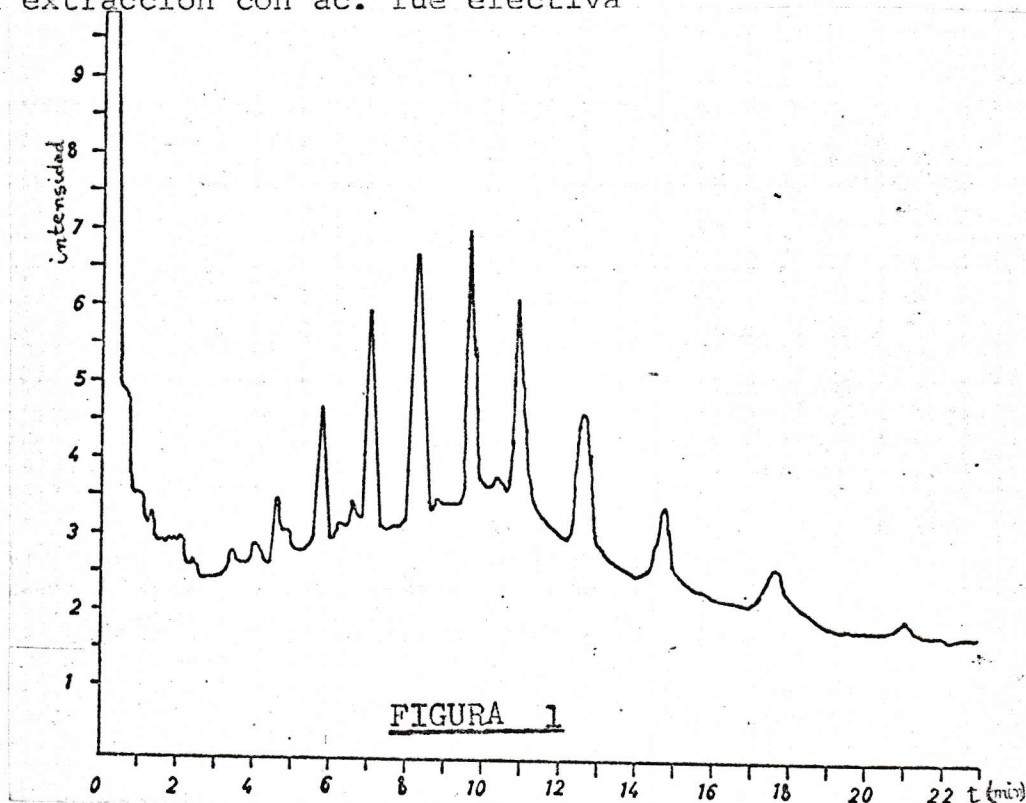
°Ambos extractos clorofórmicos se juntaron debido a su comportamiento similar en c.g. y además como se detectaba baja cantidad de alcaloides se aumentaba así la masa total de ellos. Esto dió un peso total de 20,4887 g. equivalente a un rendimiento de 0,18%.





El esquema 4 representa un diagrama del proceso de extracción. La figura 1 muestra el cromatograma del extracto clorofórmico total en una columna OV-17 y un programa 130-230°C a 6°C/min. con 1 min. a la temperatura inicial.

Parte de la planta ya extraída se reextrajo con Metanol y siguiendo el método tradicional para la obtención de alcaloides, se tuvo un rendimiento de un 0,017%, lo cual indica que la extracción con ác. fue efectiva.



b) Extracto Etéreo : El procesamiento con éter de petróleo que se le hizo a 4,75 Kg. de planta dió el extracto etéreo cuyo residuo pesó 51 g. y era de color verde y olor poco agradable, correspondiendo al 1,07% del material seco. (23)

#### 4. Método de separación

##### 4.1. Alcaloides

El extracto clorofórmico fue sometido a una distribución contracorriente (40) a pH 5,6 en la que la fase móvil era el



Ilvaine (36) a través de 9 embudos, ocupando 250 ml de  $\text{CHCl}_3$  y de tampón en cada uno.

Se obtuvieron así 9 fracciones, las cuales por c.c.f. y c.g. se agruparon de la siguiente manera :

Fracción A : embudo #1 17,63 g.

Fracción B : embudos #2 al 5 1,24 g.

Fracción C : embudos #6 al 9 0,53 g.

a) Fracción A: Esta fracción se hizo pasar por una columna de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  de actividad II eluyendo con los siguientes solventes :

Tabla 2

Fracción	Solvente	Volumen (ml)	peso (g.)	Reactivo Draggen-dorf
1	Benceno	250	5,6112	-
2-13	Benceno: $\text{CHCl}_3$	250	aceite	-
14	$\text{CHCl}_3$ :MeOH (98:2)	250	1,98	+
15-27	$\text{CHCl}_3$ :MeOH 10% , 50%, MeOH	2000	5,1144	+

250 mg. de la fracción 1 se aplicaron en una placa preparativa de Silica Gel Neutra de 2mm. de espesor, y después de desarrollar con el sistema d se separaron 3 productos E,F,H con  $R_f$  de 0,80; 0,52; 0,10 respectivamente. El producto E se purificó a través de otra placa preparativa en iguales condiciones anteriores deteniendo así 33,4 mg. de E.

COMPUESTO E : Tiene un aspecto de cera y no es cristalizabile.

Su espectro de i.r. presenta una banda en  $1740 \text{ cm}^{-1}$ . El espectro r.m.n. tomado en  $\text{CDCl}_3$  da un singlete en 8,65



COMPUESTO H : Su espectro de i.r. tiene las siguientes bandas: 1730  $\text{cm}^{-1}$  1600 y 1580  $\text{cm}^{-1}$ , 1290 y 1140  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro de r.m.n. da un multiplete en 2,4 y un doblete en 5,8

Con la fracción 14 se intentó la preparación de un hidrobromuro (39, 40) formándose un precipitado el que fue separado y no era alcaloide. La solución se basificó, se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  y el residuo se aplicó en una placa preparativa de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , desarrollada en el sistema a, se separaron dos fracciones: B-2 de 0,44 g. con un  $R_f$  0,8 y B-4 de 0,5426 g. con un  $R_f$  0,2. El alcaloide B-2 no se ha podido purificar, y en c.g. se ve un pico mayoritario en 4'12" y otro de menor intensidad a 4'43" relativos al solvente en la columna OV 17 a 230°C constante. Al revelar con reactivo de Dragendorff las placas de c.c.f., el color desaparece rápidamente.

Por c.g. la fracción B-4 no fue resuelta ya que era una mezcla de más de 5 compuestos de los cuales ninguno predominaba.

La fracción 15-27 es de contenido alcaloidal muy bajo y no fue analizada.

b) Fracción B : Esta fracción se pasó por una columna de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  de actividad I pero no se pudo separar ningún alcaloide puro debido a la complejidad de la fracción. Además se aprecia por análisis cromatográfico que su contenido de alcaloides es bajo.

c) Fracción C : Esta fracción se pasó por una columna de 25 g. de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  de actividad II y fue eluida de la siguiente forma :

Tabla 3

Fracción	Solvente	Volumen (ml.)	peso (g.)
B <sub>C</sub> 1-10	Benceno: $\text{CHCl}_3$	1000	0,350
B <sub>C</sub> 11-13	$\text{CHCl}_3$ : MeOH (98:2)	450	0,0389
B 14-21	$\text{CHCl}_3$ : MeOH (96:4)	1000	0,0425



B <sub>c</sub> 22-32	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 6%,10%,50%	1000	0,0259
B <sub>c</sub> 33-40	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 50% y MeOH	1000	0,0056

Estas fracciones se agruparon así por comparación en c.c.f. y c.g.

La fracción B<sub>c</sub> 1-10 fue cromatografiada en una columna de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de actividad I y de 20 g., recolectándose la fracción 47-49 (56 mg.) eluída con CHCl<sub>3</sub> Metanol al 10%, de la cual se separó la sección de R<sub>f</sub> 0,35 en una placa preparativa de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> desarrollada en el sistema b, obteniendo 1,4 mg. del alcaloide B-1.

ALCALOIDE B-1 : Cristaliza en acetato de etilo, en c.g. tiene un tiempo de retención de 5'10" relativo al solvente en la columna SE-30 a 230°C constante. Su punto de fusión es de 120-124°C. El espectro de i.r. tiene una absorción importante en 3350 cm<sup>-1</sup>.

De la fracción B<sub>c</sub> 14-21 se separó en una placa preparativa de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> usando el sistema c, la sección con R<sub>f</sub> = 0,1, obteniendo 5,3 mg. de un alcaloide B-3. Este producto no se ha purificado, ya que en c.c.f. se ven dos compuestos de R<sub>f</sub> 0,10 y 0,15 en placas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> con el sistema b.

En c.g. hay dos tiempos de retención 3'36" y 4'12" en la columna OV 17 a 230°C constante, además de algunas impurezas.

Las demás fracciones B<sub>c</sub> 11-13, B<sub>c</sub> 22-32, B<sub>c</sub> 33-40 se revelaron como mezclas complejas de compuestos no todos alcaloidicos y debido a su bajo peso no se trataron de resolver.

El esquema 5 describe el proceso de separación de compuestos del extracto clorofórmico.

4.2. Triterpenos : 5 g. del extracto etéreo se pasaron por una columna de 130 g. de Silica Gel Neutra y se eluyó de la siguiente





Tabla 4

Fracción	Solvente	Volumen (ml)	Peso (g.)
T017	Benceno, Benceno : CHCl <sub>3</sub> 20%	1000, 200	aceite
18-33	Benceno: Cloroformo 50 %	900	0,516
34-57	Cloroformo	500	1,043
58-79	Cloroformo:MeOH 50%	1000	2,812

La fracción 58-79 se decoloró con carbón activado, y luego cristalizaron en cloroformo, 259 mgr. de G-1, que da positivo el ensayo de Liebermann-Burchard para triterpenos.

Compuesto G-1 : Es de baja solubilidad en compuestos orgánicos. En c.c.f. sobre Silica Gel Neutra usando los sistemas f, a, g tiene los siguientes  $R_f$ : 0,21 ; 0,18 ; 0,8 respectivamente. Su punto de fusión es 208-209°C. Las absorciones más principales en el i.r. son 3350  $\text{cm}^{-1}$  estiramiento de O-H, 3080  $\text{cm}^{-1}$ , 1642  $\text{cm}^{-1}$ , 1400  $\text{cm}^{-1}$  bandas correspondientes a metileno terminal. El espectro r.m.n. muestra señales para 6 grupos CH<sub>3</sub>, dos H geminales de OH en 7  $\tau$  y 4 H de grupos metilenos en 5,5  $\tau$  y 5,22 cada una para 2 H. Su fórmula molecular fue determinada por e.m. y es C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>.

En la fracción 18-33 se ve la presencia de otro triterpeno el cual se trató de purificar, sin buenos resultados a través de una columna de Silica Gel Neutra 40 gr. y recogiendo la fracción T-12 eluída con Benceno: CHCl<sub>3</sub> 50% (100 ml) y CHCl<sub>3</sub> (100 ml). Tiene un  $R_f = 0.35^\circ$  en Silica Gel Neutra sistema a.

Los 46 g. restantes del extracto etéreo se extrajeron en

tor Soxhlet (21, 41, 42) obteniendo así los extractos E-1, E-2, E-3 respectivamente. El extracto E-2 fue pasado por una columna de 400 g. de Silica Gel Neutra.

Tabla 5

Fracción	Solvente	Peso (g.)
R <sub>1</sub>	Benceno	0,2282
R <sub>2</sub>	Benceno: CHCl <sub>3</sub> 50%	0,0747
R <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	0,318
R <sub>4</sub>	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 50%	0,1177
R <sub>5</sub>	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 50%	1,244
86	Metanol	5,312
87	Metanol	1,0057
R <sub>6</sub>	Metanol	1,300

Las fracciones R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> se juntaron con T-12 dando un peso total de 695 mg. para separar el otro triterpeno presente, pero no se logró. De la fracción 86 se cristalizaron en cloroformo 81 mg. de un compuesto con iguales características cromatográficas que G-1, además sus espectros eran idénticos. Por cristalizaciones sucesivas de los líquidos madres se obtuvieron 67, 45 mg. de G-1.

De la fracción 87 se cristalizaron 169,67 mg. de G-1.

• De la fracción R<sub>6</sub> se obtuvieron 170,2 mg. de G-1.

E-3 produjo 93,46 mg. de G-1 al cristalizar el cloroformo.

El esquema 6 representa todo el tratamiento que se le hizo al extracto etéreo.

G-2 (Diacetil G-1) : 100 mg. de G-1 fueron disueltos en 4 ml.



hidrido acético y dejando a temperatura ambiente durante la noche se obtuvo el derivado diacetilado de G-1, el cual fue disuelto en cloroformo y lavado con agua para eliminar la Piridina. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro. Se recrystalizaron en cloroformo: metanol 44 mg. de G-2.

Compuesto G-2 : Cristaliza de cloroformo-metanol y su p.f. es 197-199°C (el producto sublimado tiene un p.f. de 195-199°C). En c.c.f. tiene un  $R_f = 0,81$  en Silica Gel Neutra sistema a. Su espectro i.r. tiene las siguientes bandas : 1730  $\text{cm}^{-1}$  tensión C = O de éster, 1280  $\text{cm}^{-1}$  estiramiento C=O de acetato, 3080 y 1640  $\text{cm}^{-1}$  absorciones de metileno terminal.

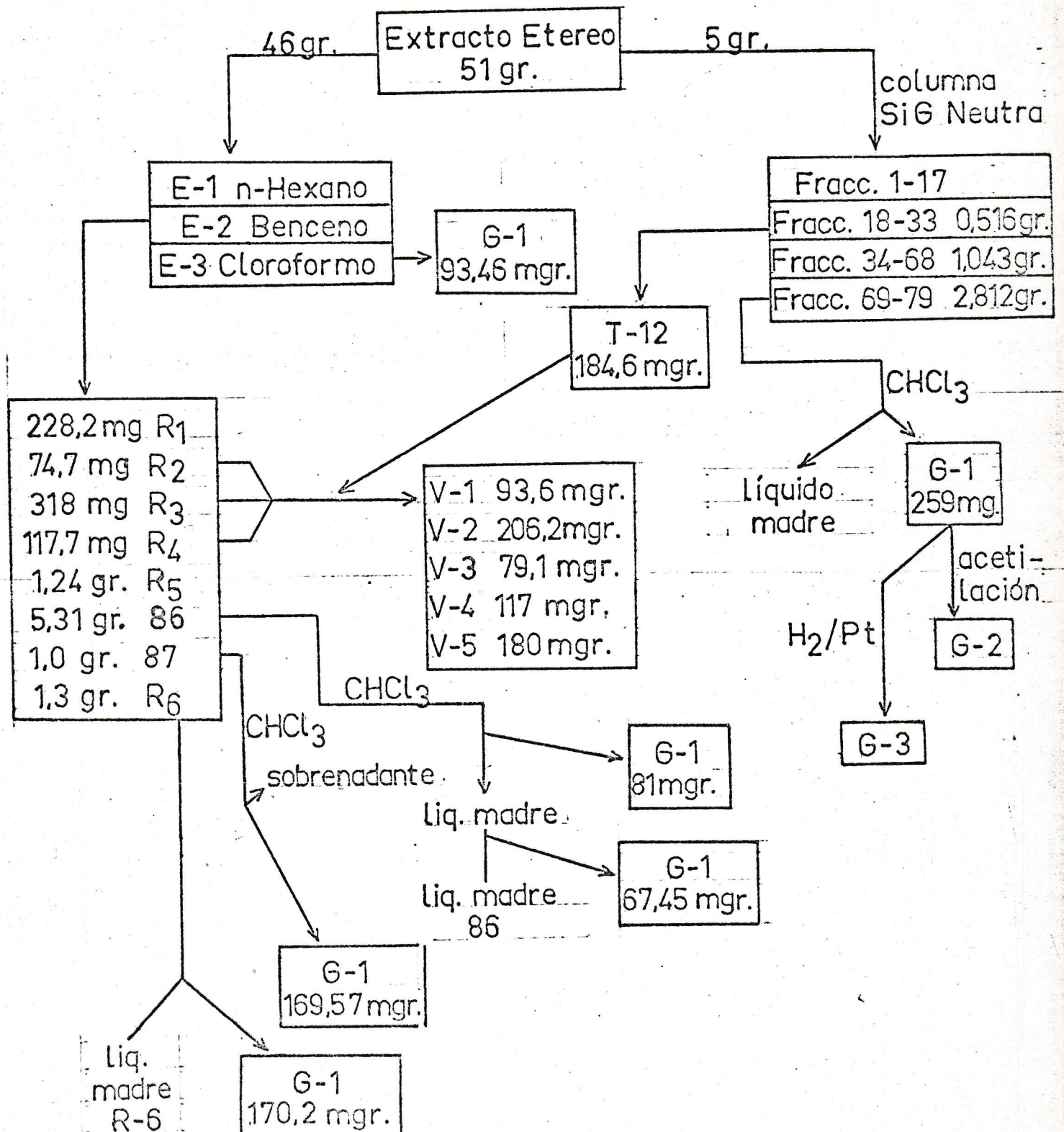
El espectro r.m.n. muestra singlete en 8,0  $\tau$  para 6 H asignables a  $\text{CH}_3\text{-O-C=O}$  y señales para 6 grupos  $\text{CH}_3$  a alto campo.

Su fórmula molecular es  $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4$  con un peso molecular de 526, determinados por e.m.

G-3 (Producto de hidrogenación de G-1): 200 mg. de G-1 se disolvieron en cloroformo-metanol, se agregaron 70 mg. de  $\text{PtO}_2$  y se dejó la mezcla por una hora bajo hidrógeno a temperatura ambiente, la c.c.f. indicaba la formación de tres productos en que uno de ellos era aparentemente G-1. Se agregaron otros 100 mg. de  $\text{PtO}_2$  y al cabo de 14 horas de mantener la solución en ambiente de hidrógeno aún quedaba G-1 pero en menor proporción. Se agregó ác. acético (5 ml) y se dejó por dos horas más con hidrógeno, al parecer sin lograr que la reacción fuera total (si lo era, uno de los compuestos tiene igual  $R_f$  que G-1).

El ác. acético se neutralizó con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y se lavó con cloroformo. La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se filtró. Del filtrado se obtuvieron 93,2 mg. de G-3, al cristalizar en  $\text{CHCl}_3$ .







Compuesto G-3 : Su punto de fusión es 218-220°C de baja solubilidad en compuestos orgánicos. En c.c.f. tiene un  $R_f=0,31$  en Silica Gel Neutra sistema f. El espectro i.r. muestra absorción a  $3350 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a estiramiento O-H. Su espectro de r.m.n. indica la presencia de dos H geminales a OH en  $7,05 \tau$  .

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

Alcaloide B-1 : En el espectro i.r. (fig. 2) se ha asignado la siguiente absorción :

$3350 \text{ cm}^{-1}$  estiramiento de enlace O-H o N-H

Dada la pequeña cantidad aislada no fue posible obtener mayor información acerca de su composición.

Triterpeno G-1 : Su espectro i.r. ( Fig. 3) muestra absorciones más importantes se han atribuido a :

$3350 \text{ cm}^{-1}$  banda ancha de estiramiento de enlace O-H

$3080 \text{ cm}^{-1}$  estiramiento enlace C-H de alqueno

$1642 \text{ cm}^{-1}$  estiramiento enlace C=C alqueno aislado.

$1400 \text{ cm}^{-1}$  deformación enlace C-H de metileno terminal  $\text{>C=CH}_2$

$900 \text{ cm}^{-1}$  vibración de dirección opuesta de los H terminales de  $\text{>C=CH}_2$

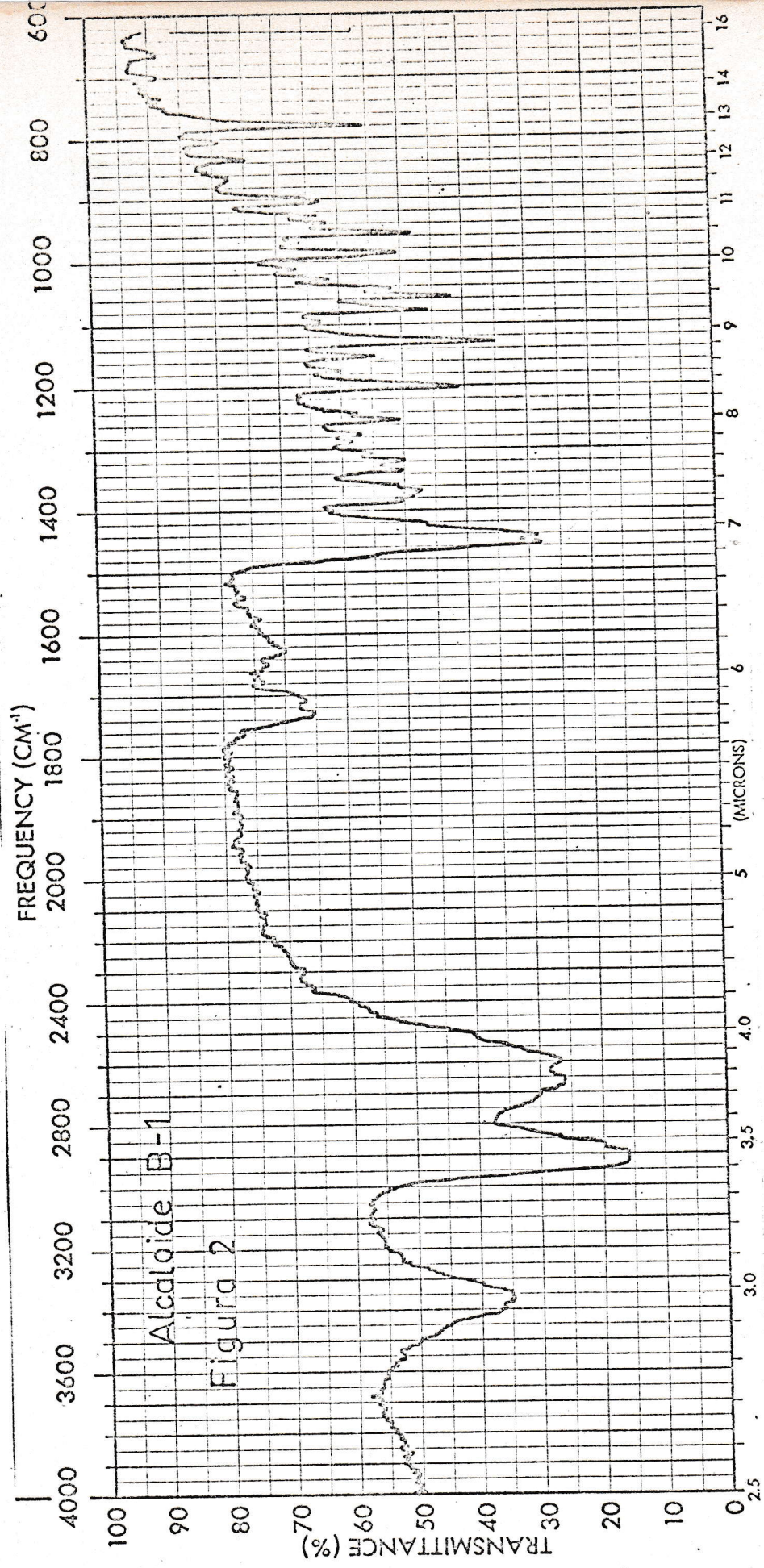
$790 \text{ cm}^{-1}$  rocking de  $\text{-(CH}_2\text{)}_n$

El espectro de r.m.n. tomado en  $\text{CDCl}_3$  y gotas de DMSO (Fig. 4) muestra señales que se han asignado a los siguientes grupos: (43, 44).

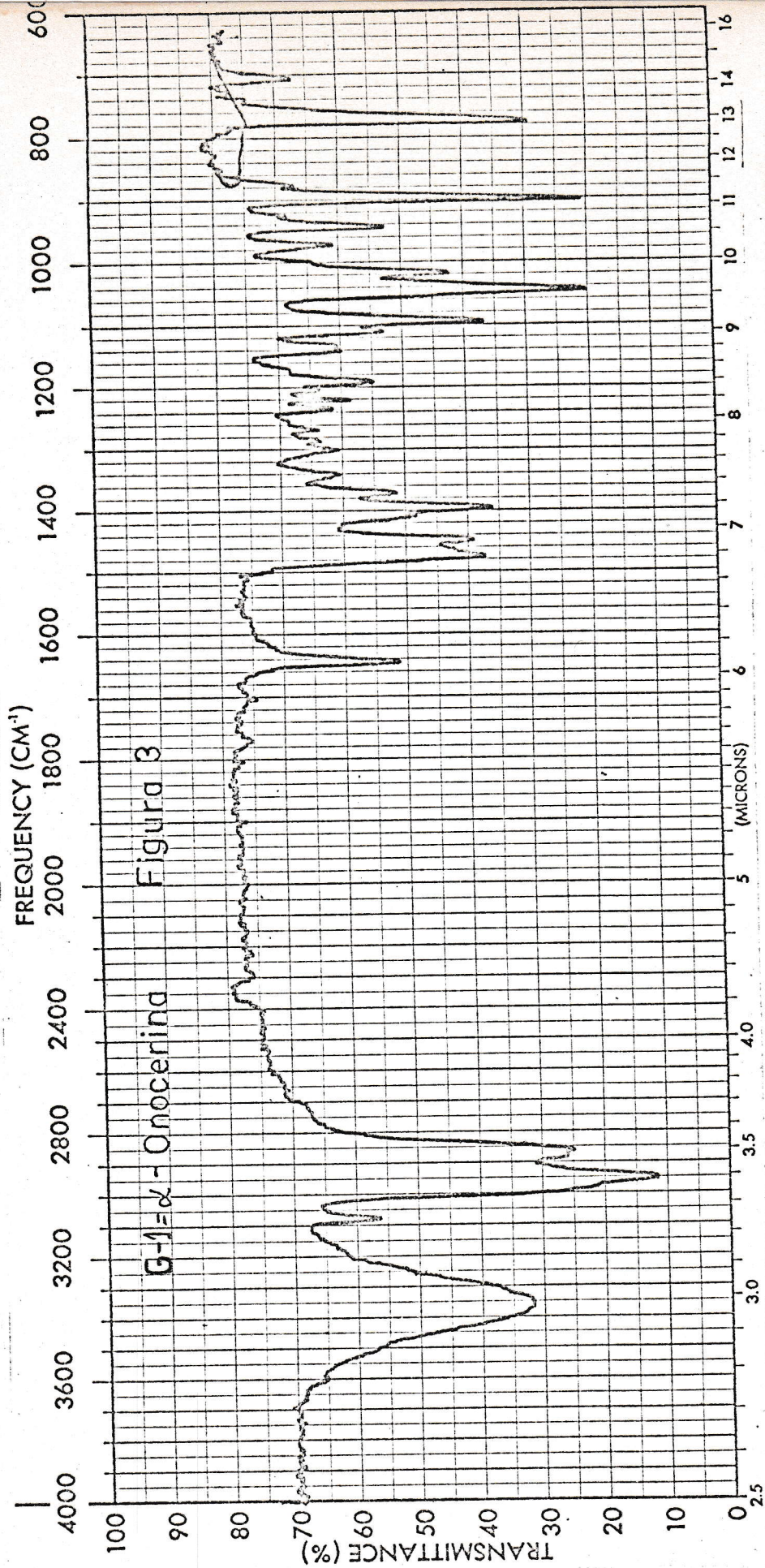
Singletes a :  $9,43 \tau$  (6H)  $\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \text{C} \\ \text{C} \end{array} - \text{C}$

$9,4 \tau$  (6H)  $\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \text{C} \\ \text{C} \end{array} - \text{C}$











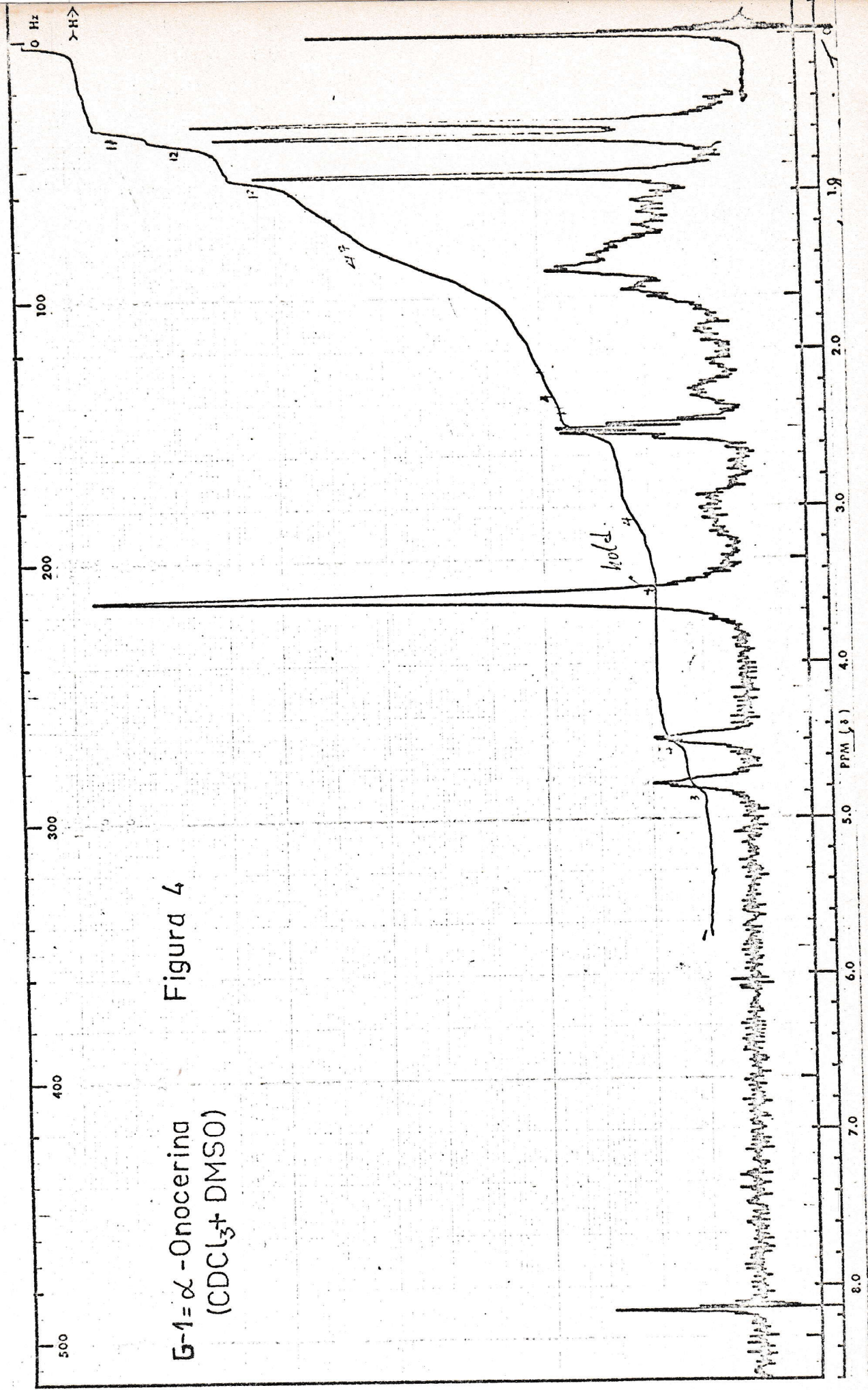
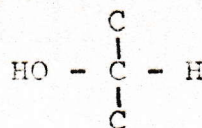


Figura 4

G-1 =  $\alpha$ -Onocerina  
(CDCl<sub>3</sub> + DMSO)



Multiplete centrado en 7  $\tau$  (2H)



señales en 5,5  $\tau$  (2H)  $\text{>C} = \text{CH}_2$

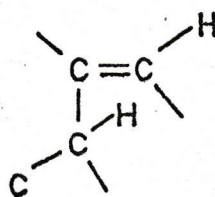
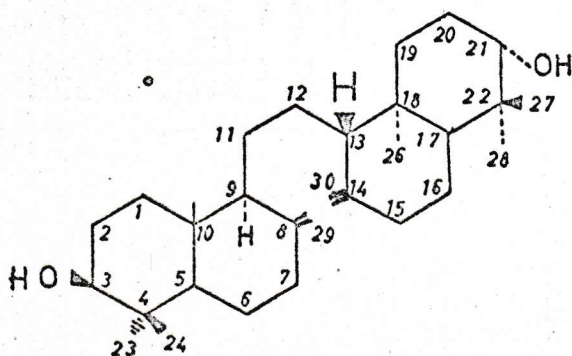
5,22  $\tau$  (2H)  $\text{>C} = \text{CH}_2$

Su fórmula global es  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$  determinada por e.m. de alta resolución y su espectro de masas es el de la figura 5.

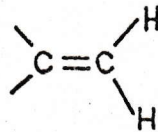
	m/e	pérdidas
$\text{M}^+$	442	
$\text{M}^+ - 15$	427	$\cdot\text{CH}_3$
$\text{A}^+ = \text{M}^+ - 18$	424	$\text{H}_2\text{O}$
$\text{A}^+ - 15$	409	$\cdot\text{CH}_3$

Tenemos entonces 6 grupos  $\text{CH}_3$ , 2 grupos metileno terminales y dos grupos hidroxilo. La fórmula  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$  indica que hay 6 in saturaciones; por lo tanto es un compuesto tetracíclico y entre los triterpenos con estas características G-1 se asemeja a  $\alpha$ -onocerina.

El análisis del espectro r.m.n. indica que los metilenos 25 y 26, 24 y 28, 27 y 23 serían equivalentes y darían 3 señales con la relación de intensidades 1:1:1: los 2 hidrógenos de cada grupo metileno exocíclico no serían equivalentes pero si deben serlo entre un protón de un grupo y otro H del otro grupo dando así dos señales y deben ser un cuadruplete debido a :



$J = 0,5 - 2,5$  cps

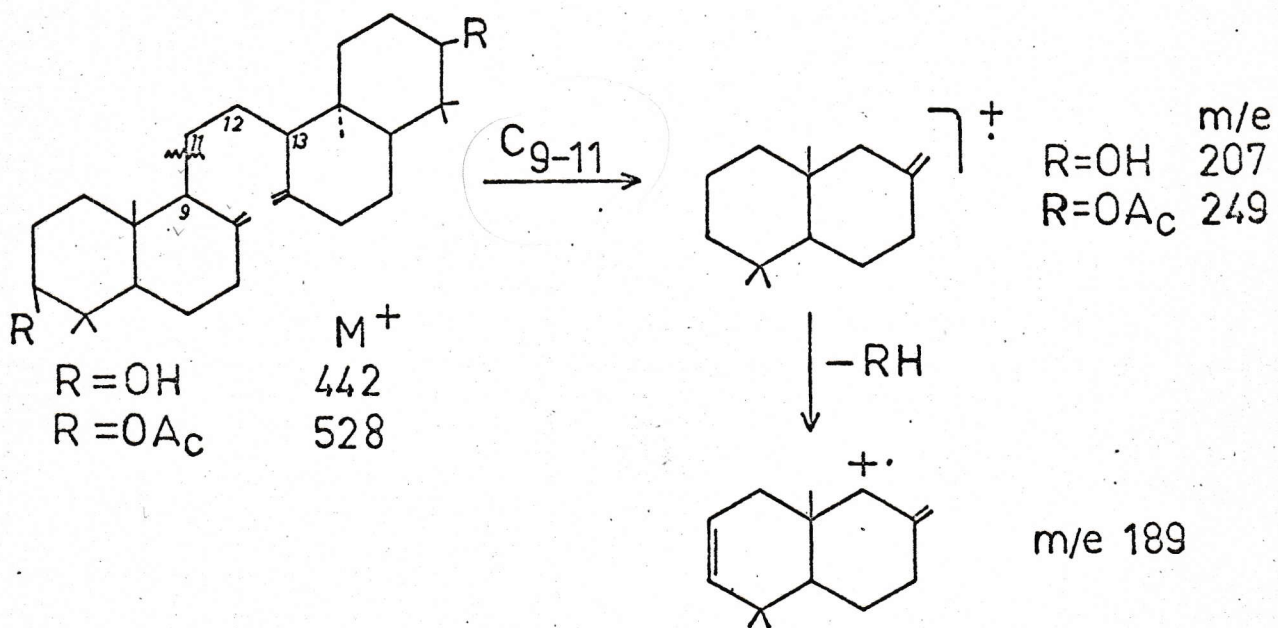


$J = 0,5 - 3$  cps

En el espectro, se aprecia que la señal a 5.22  $\tau$  es un multiplete con un ancho a media altura de 4.5 c.p.s.

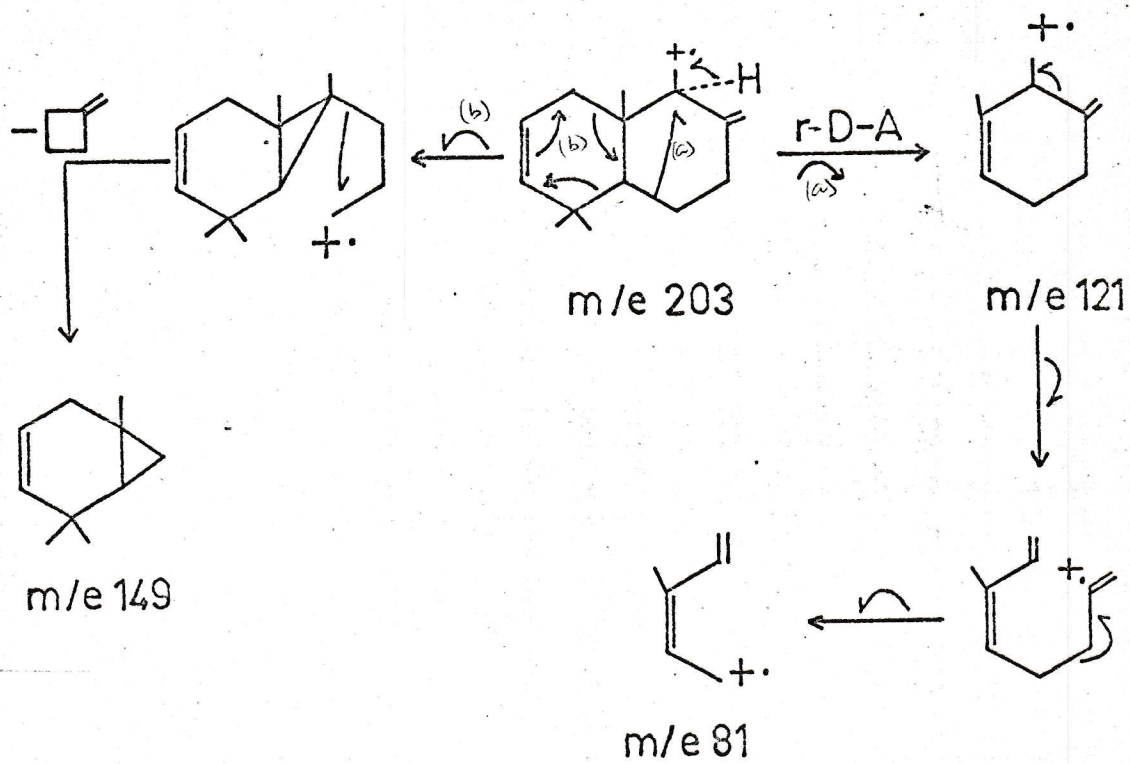
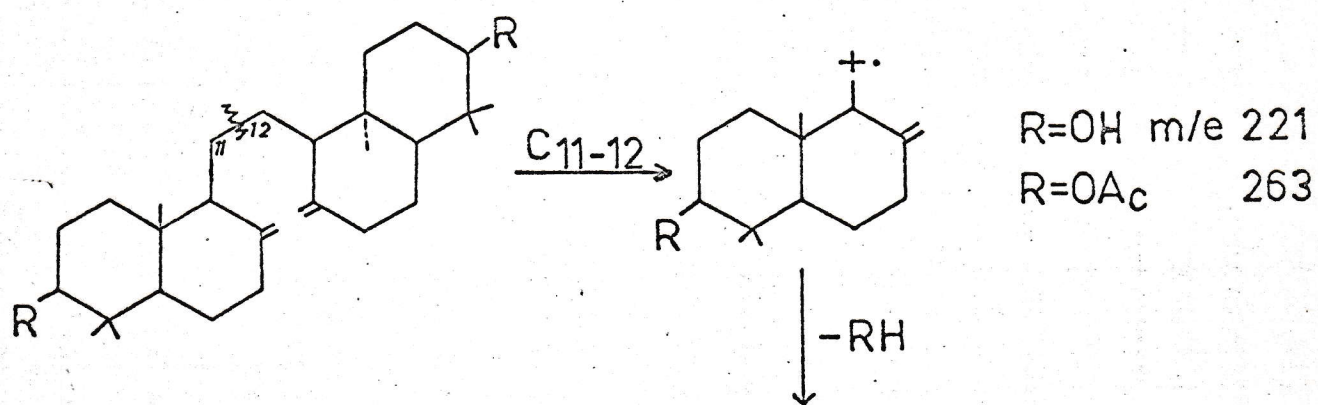
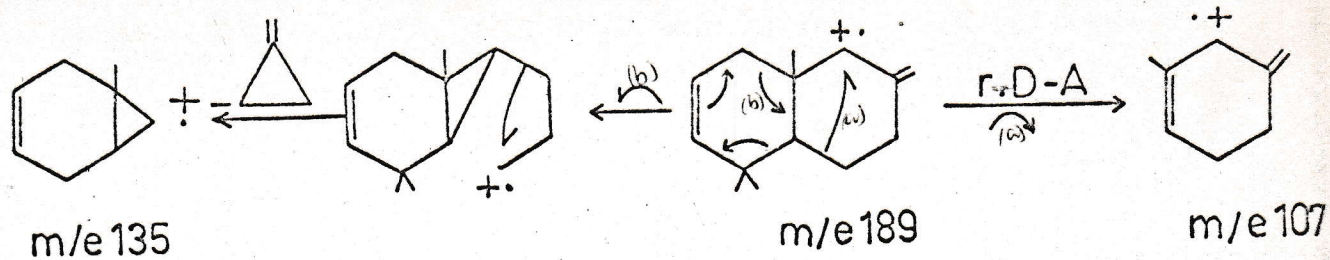
El esquema de fragmentación postulado para la  $\alpha$ -Onocerina corresponde a las señales encontradas en el espectro de masas.

Por comparación directa (i.r., r.m.n. y c.c.f.) Con una muestra auténtica de  $\alpha$ -Onocerina\* se comprobó su identidad.



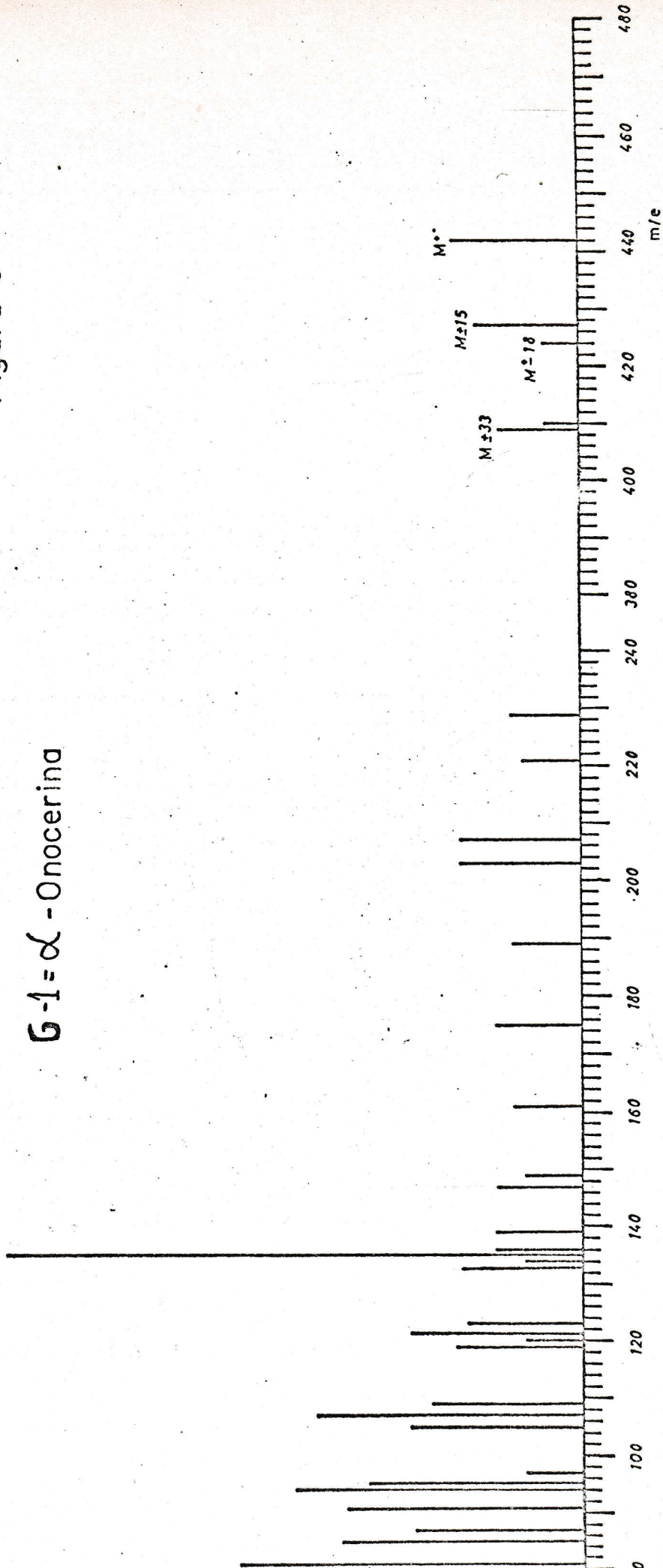
\* La muestra fue proporcionada por H.Ageta.





G-1 =  $\alpha$  - Onocerina

Figura 5





G-2 (diacetil G-1) : Su espectro i.r. (Fig. 7) presenta las siguientes bandas que se han asignado a :

3030.	cm <sup>-1</sup>	estiramiento enlace C-H de alquenos
1730	cm <sup>-1</sup>	estiramiento C=O de éster
1280	cm <sup>-1</sup>	estiramiento C-O de acetato
1640	cm <sup>-1</sup> y 890 cm <sup>-1</sup>	deformación enlace C-H de metileno terminal
		$>C = CH_2$ .

El espectro de r.m.n. tomado en CDCl<sub>3</sub> (Fig. 8) muestra las siguientes señales :

Singletes	9,4	γ (6H)	CH <sub>3</sub> - $\overset{ }{\underset{ }{C}}$ -
	9,22	γ (6H)	CH <sub>3</sub> - $\overset{ }{\underset{ }{C}}$ -
	9,17	γ (6H)	CH <sub>3</sub> - $\overset{ }{\underset{ }{C}}$ -
	8,0	γ (6H)	CH <sub>3</sub> - C = O
Multipletes	5,30	γ (4H)	CH <sub>2</sub> = C < y HO - $\overset{ }{\underset{ }{C}}$ - <u>H</u>
	5,05	γ (2H)	CH <sub>2</sub> = C <

El espectro de masas (Fig. 6) indica que su peso molecular es de 526 y corresponde a la fórmula global C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub>.

Su esquema de fragmentación es igual al de G-1, además de las pérdidas de CH<sub>3</sub>COOH.  $M^+ 526 \xrightarrow{-CH_3COOH} M^+ -60 \xrightarrow{-CH_3} M^+ -75 \xrightarrow{-CH_3COOH} M^+ -135$ .

La resonancia magnética de los H de los grupos metilenos es desplazada aproximadamente en igual medida a más bajo campo debido al efecto del DMSO.

Este compuesto corresponde a diacetil onocerina :

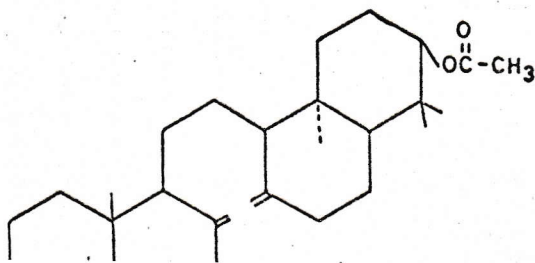
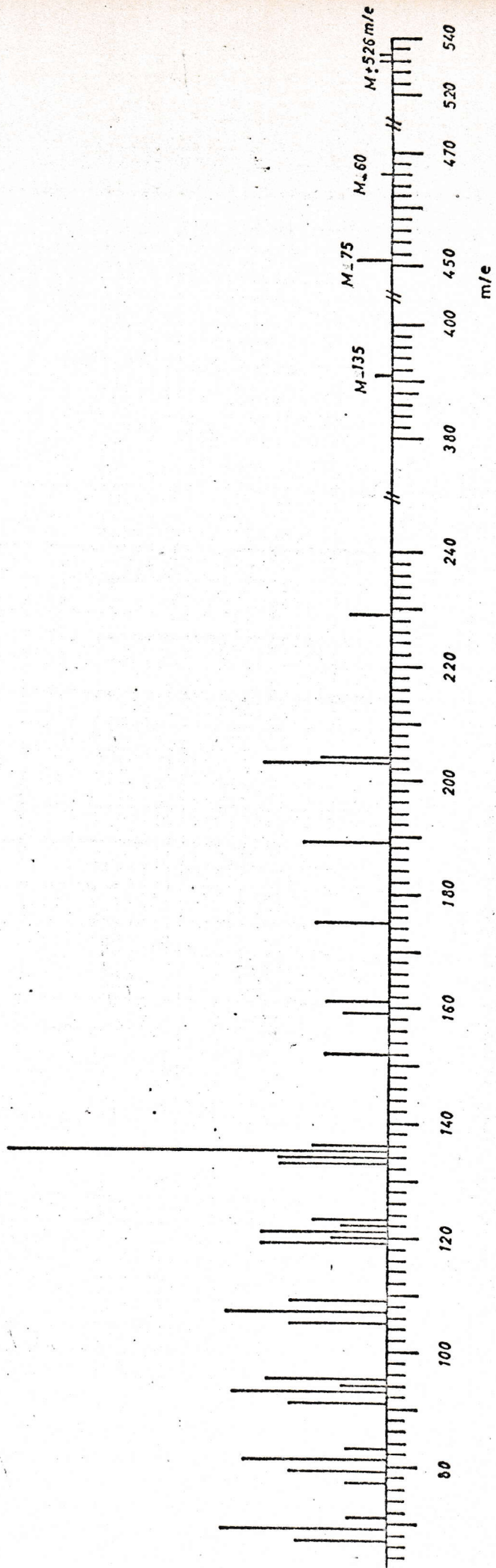
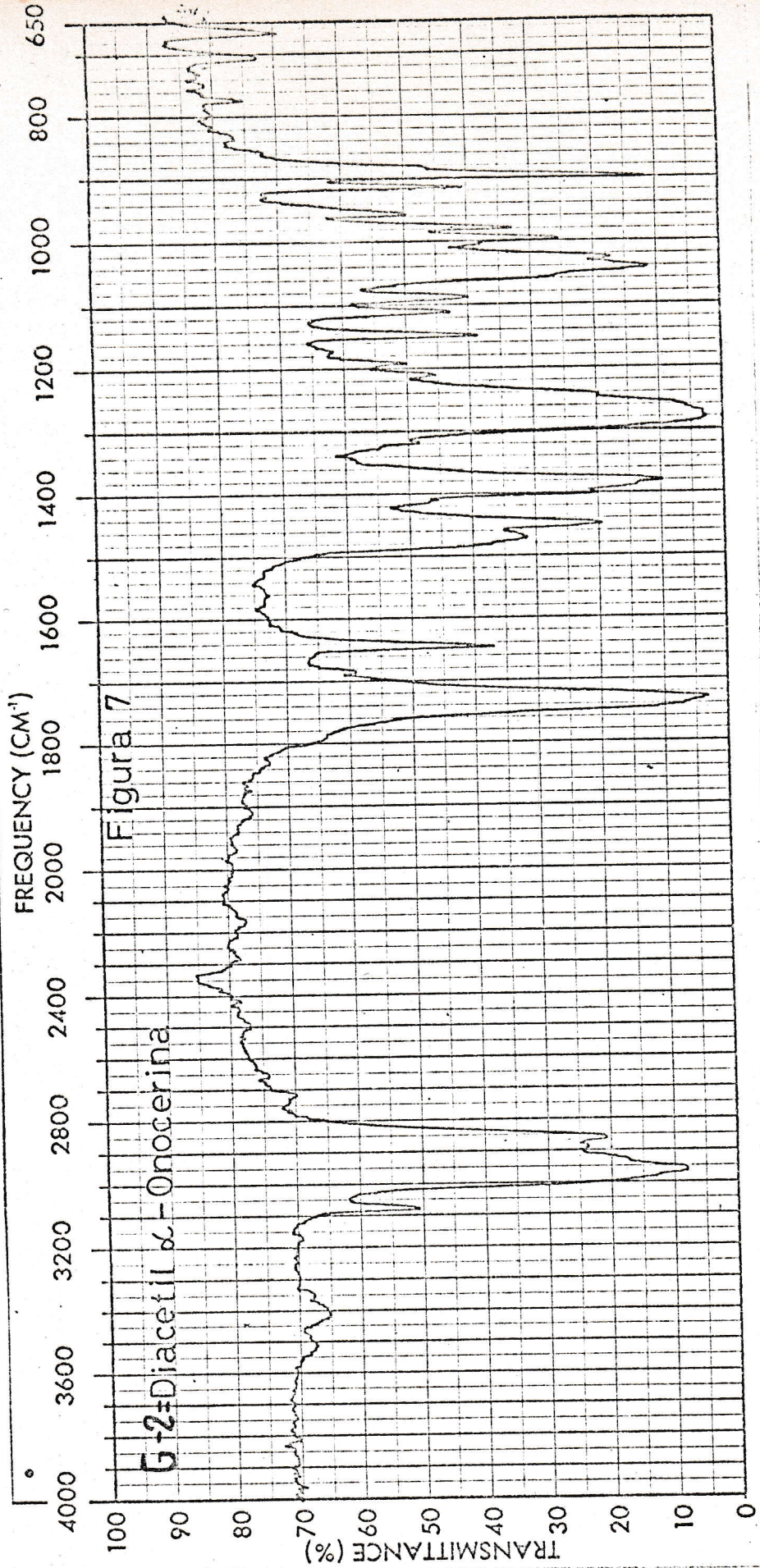


Figura 6

G-2=Diacetil  $\alpha$ -Onocerina









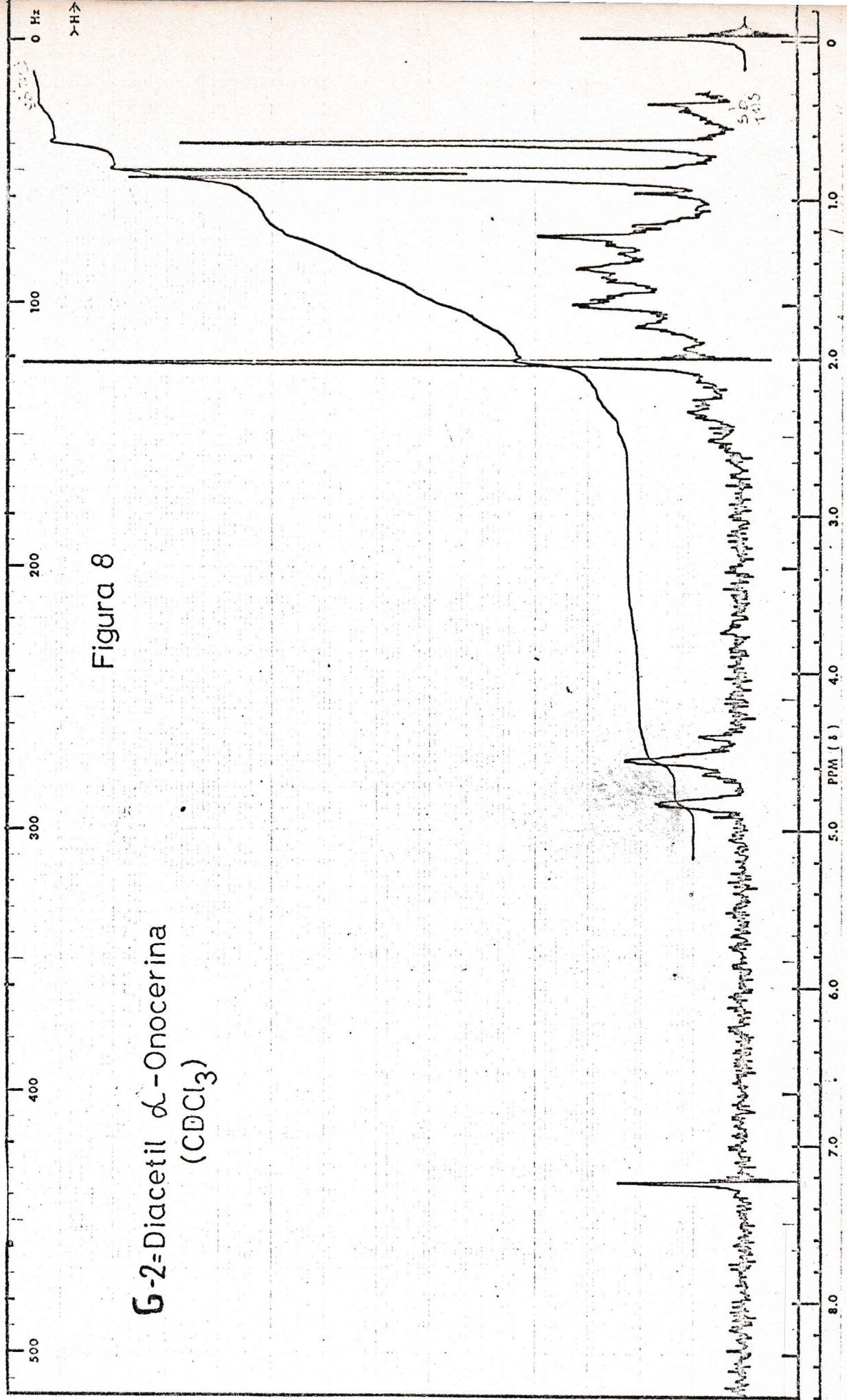


Figura 8

G-2-Diacetil  $\alpha$ -Onocerina  
( $\text{CDCl}_3$ )



ya que fue comparado en c.c.f., r.m.n., i.r., con una muestra auténtica proporcionada por J.C. Braekman.

G-3 (Producto de Hidrogenación de G-1) (Tetrahydro G-1) : Su espectro i.r. (Fig. 9) tiene las siguientes absorciones :

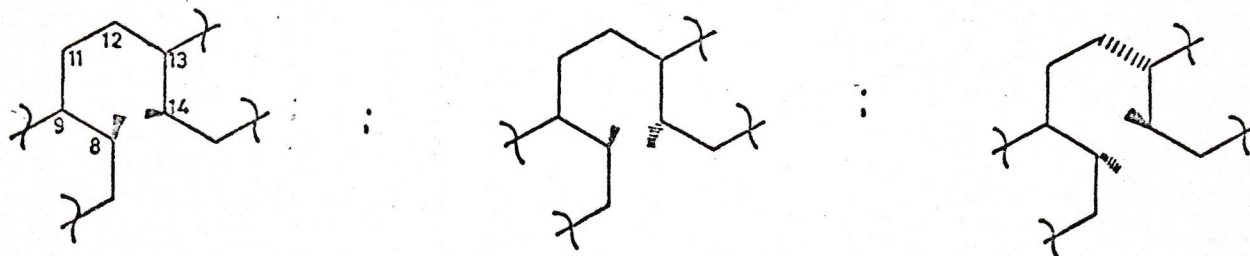
3350 cm <sup>-1</sup>	banda ancha de estiramiento de enlace O-H
3000 cm <sup>-1</sup>	tensión C-H de alcanos
1390 cm <sup>-1</sup> y 1450 cm <sup>-1</sup>	deformación enlace C-H de CH <sub>3</sub>
770 cm <sup>-1</sup>	Rocking de (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>

Es espectro de r.m.n. (Fig. 10) tomado en CDCl<sub>3</sub> y DMSO da las siguientes señales :

Singletes en	9,3 τ	(3H)	CH <sub>3</sub> - C -
	9,25 τ	(9H)	CH <sub>3</sub> - C -
	9,15 τ	(12H)	CH <sub>3</sub> - C -
Multiplete en	7,05 τ	(2H)	HO - C - H

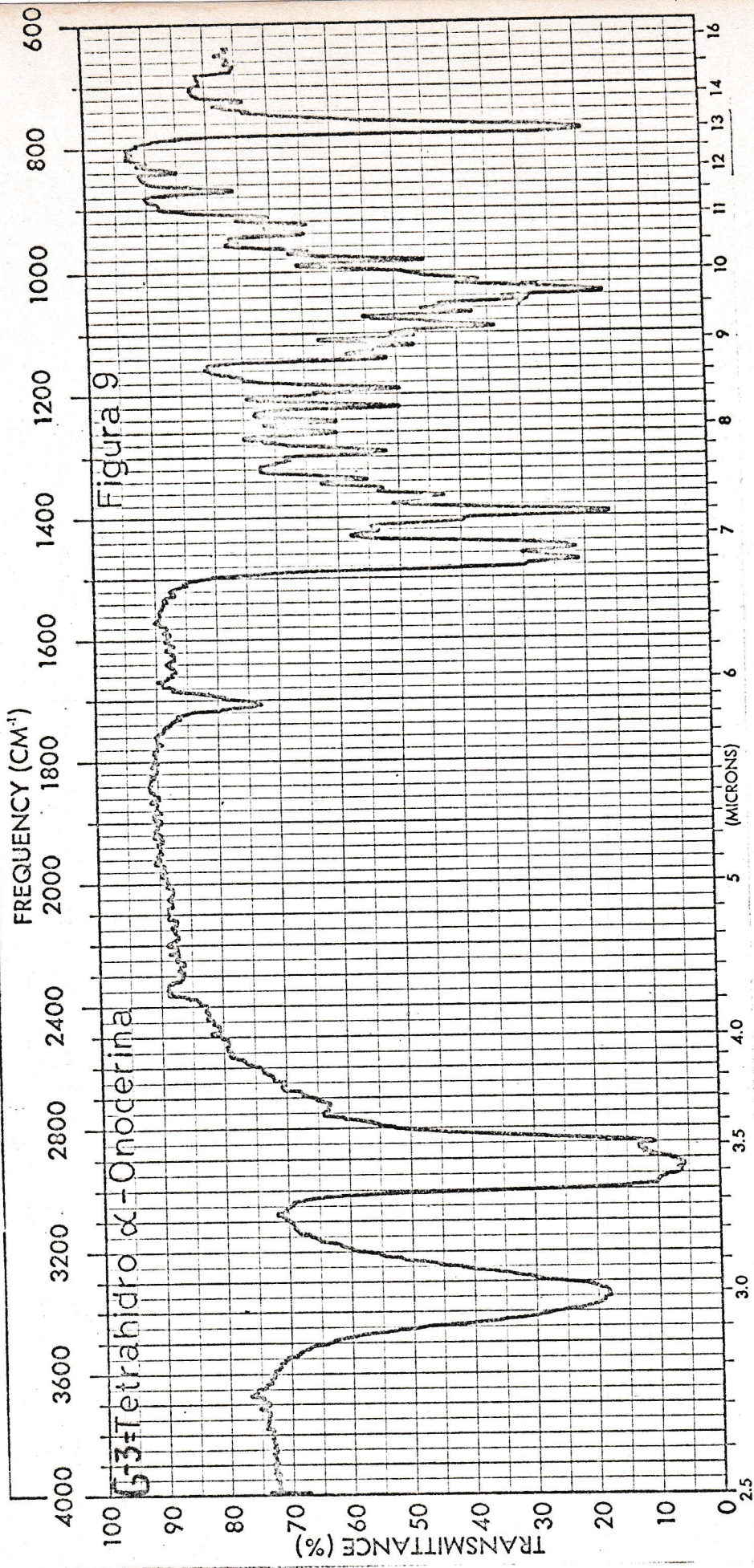
El análisis del espectro de r.m.n. indica que no hay dobles enlaces es decir que se han hidrogenado los metilenos dando origen a α-onoceranadiol. Según Hendrixon (29) la hidrogenación de α-onoceradienodiol, da origen a tres productos -los cuales se obtuvieron en este trabajo.

Los tres productos deben ser :

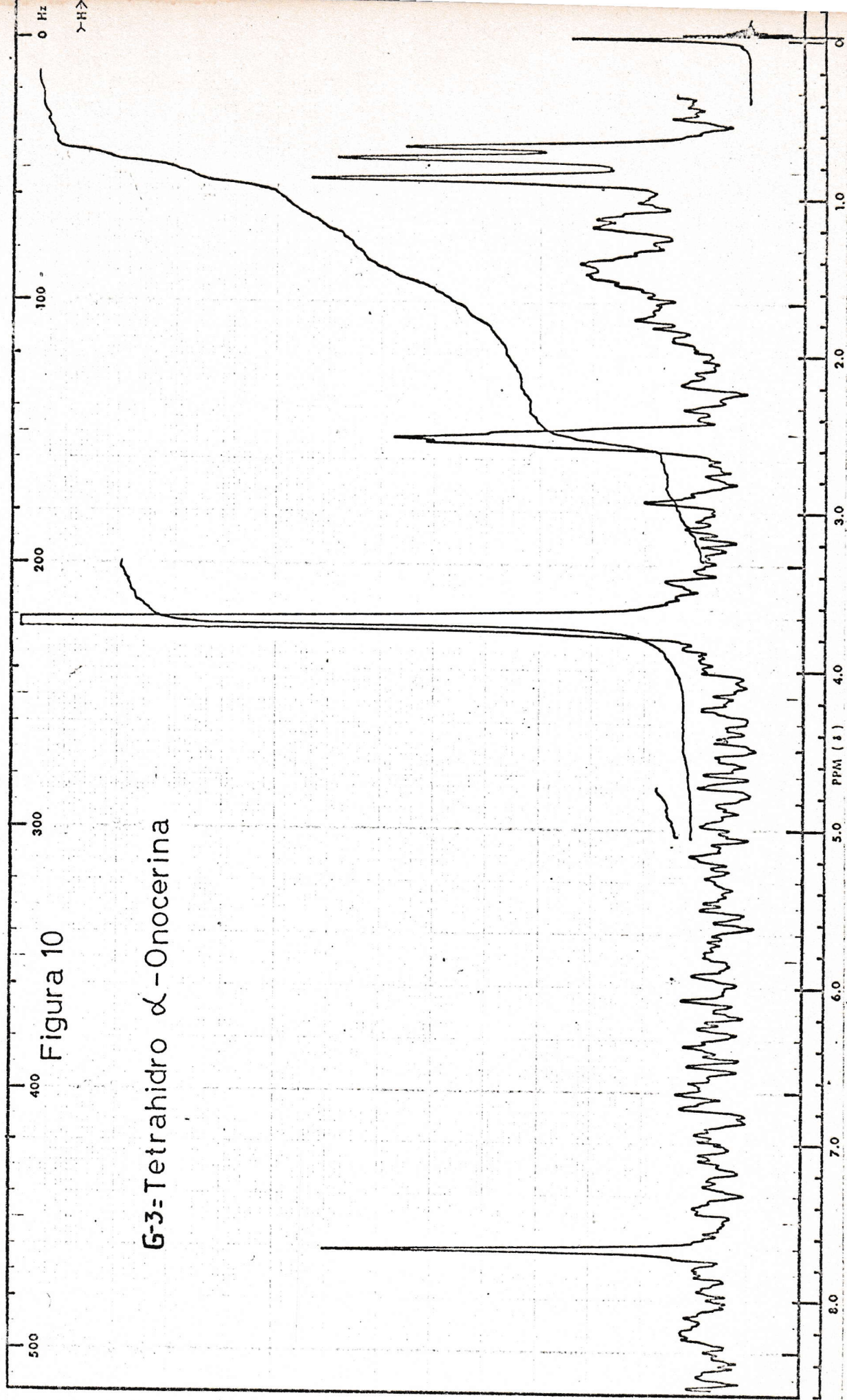


y por lo tanto son isómeros de fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>O<sub>2</sub>









Compuesto E

Tiene un aspecto de cera, y no es cristalizable. En Silica Gel Neutra sistema e tiene un  $R_f = 0,77$

Las figuras 11 y 12 muestran los espectros i.r. y r.m.n. respectivamente.

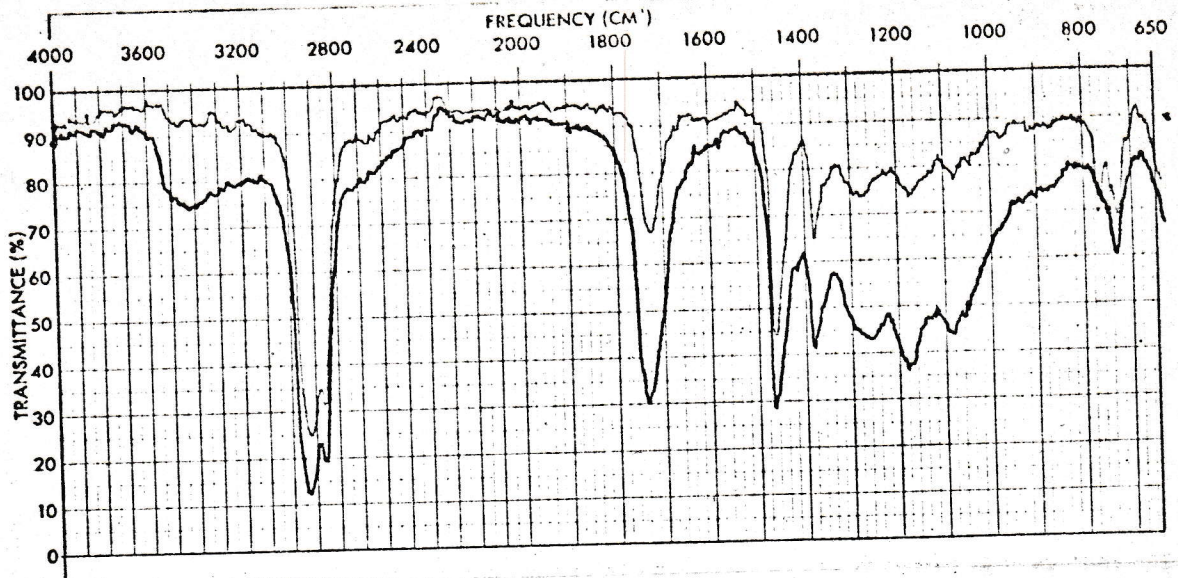
La identificación de este compuesto no se ha realizado ya que no se conocen más datos.

Compuesto H

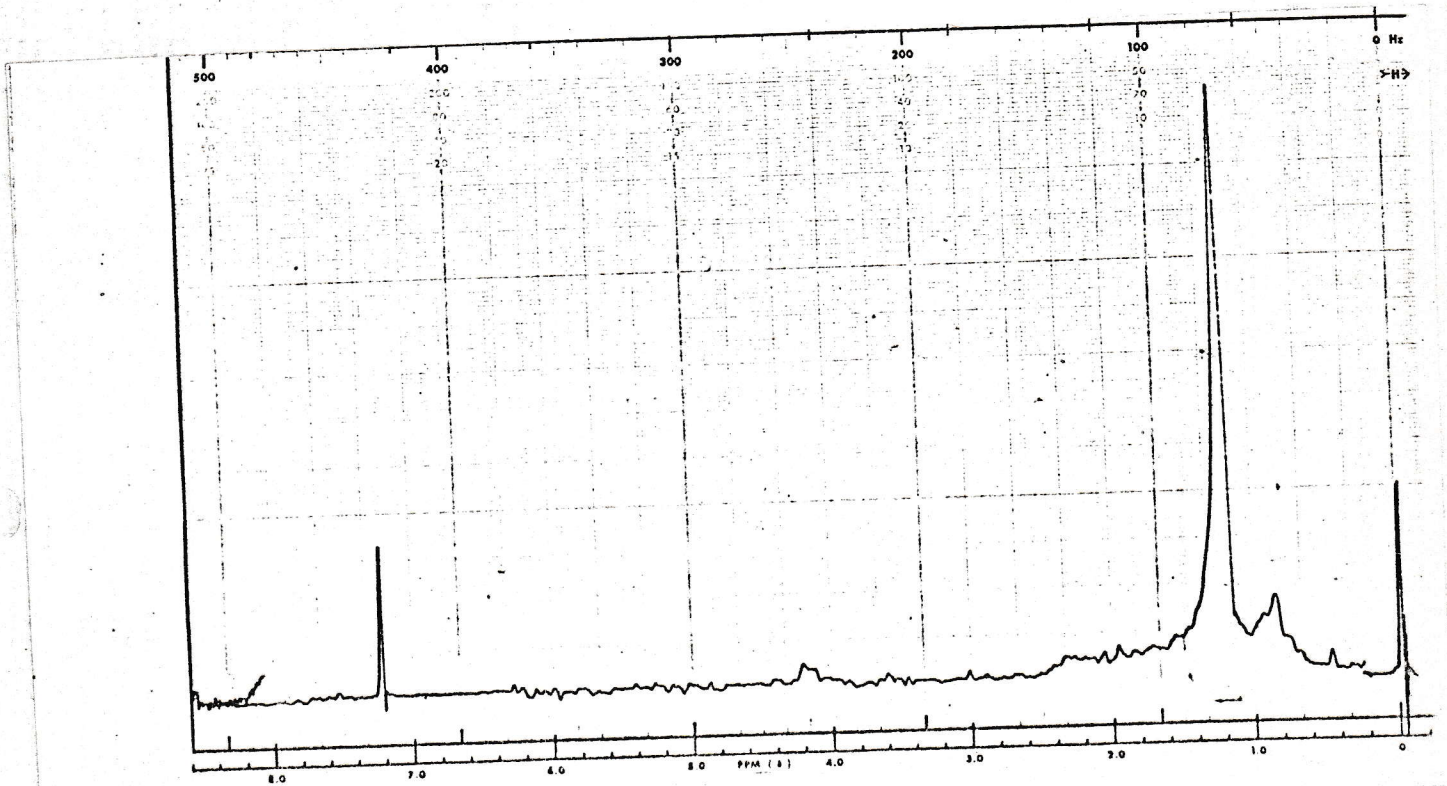
Posee un  $R_f = 0,6$  en Silica Gel Neutra sistema a. Soluble en cloroformo, no se ha podido cristalizar.

Las figuras 13 y 14 muestran los espectros i.r. y r.m.n. respectivamente. La composición y estructura de este compuesto no se ha determinado.



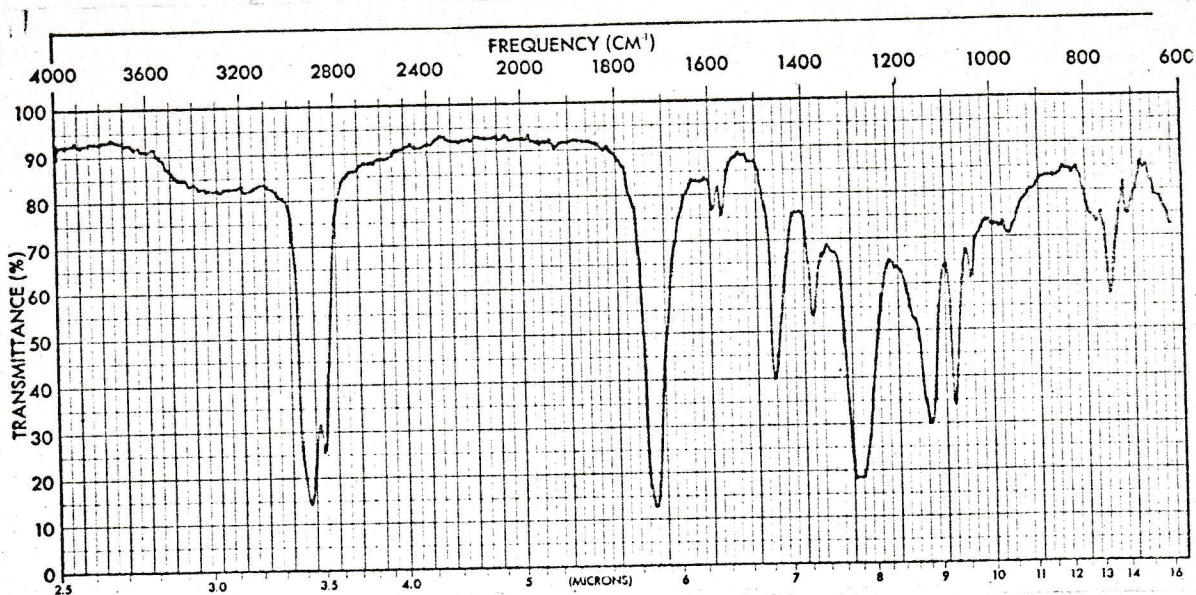


Compuesto E  
Figura 11

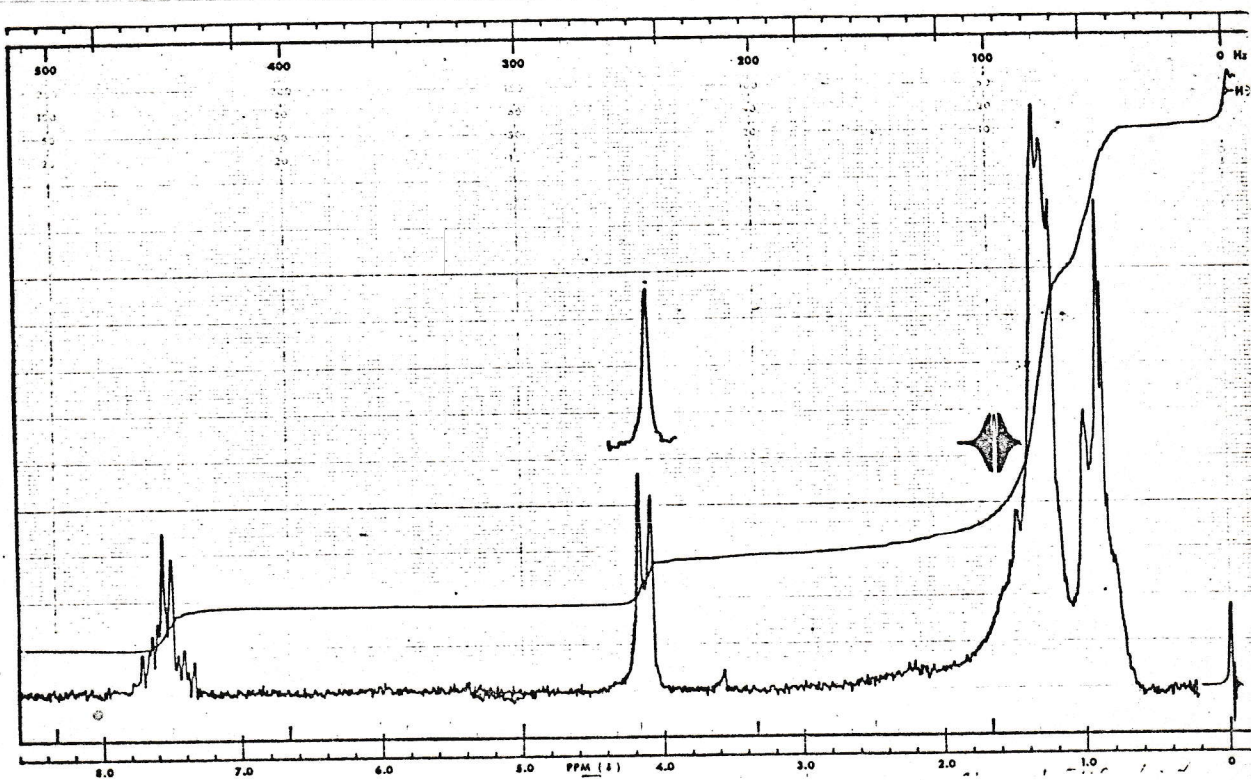


Compuesto E  
Figura 12





Compuesto H  
Figura 13



Compuesto H  
Figura 14



### Conclusiones

El extracto clorofórmico que contenía el material básico (20,4887 gr.) que corresponden a un rendimiento de 0,18% y recuerda los resultados obtenidos en otras especies de esta familia como es el caso de L.alopecuroides L., L.magellanicum y L.paniculatum, L.lucidulum (49, 39, 40). El aspecto del extracto era aceitoso lo cual hacía dificultoso el ensayo Dragendorff e hizo suponer que el rendimiento de alcaloides sería bajo. Si se analiza el gráfico de la distribución en contracorriente (Fig. 15) se ve que el porcentaje de bases fuertes es aproximadamente  $4,5 \times 10^{-3}\%$  de la planta seca, y cabe hacer notar que esta distribución se hizo a un pH bastante bajo con lo cual no solo se arrastraron las bases más fuertes sino que también algunas más débiles. De la fracción B no se pudo separar ningún alcaloide y como se dijo anteriormente su contenido de bases era bajo.

La fracción A donde deberían estar las bases débiles se puede apreciar que menos del  $8,3 \times 10^{-3}\%$  con respecto a la planta son en realidad alcaloides.

La planta contiene alcaloides pero en cantidades pequeñísimas. Braekman en un estudio comparativo de los alcaloides (51) encontrados en licopodios encontró que este género es homogéneo en su contenido de alcaloides puesto que son bases que derivan bioquéticamente de la Lisina, y en las especies de las Selaginelas e Isoveraceas (Isoates) no estaban presentes o los pesos de la fracción básica era inferiores al 0,11%. El contenido de alcaloides, entonces es un rasgo que distingue las licopodáceas de las Selaginelas e Isoveraceas.



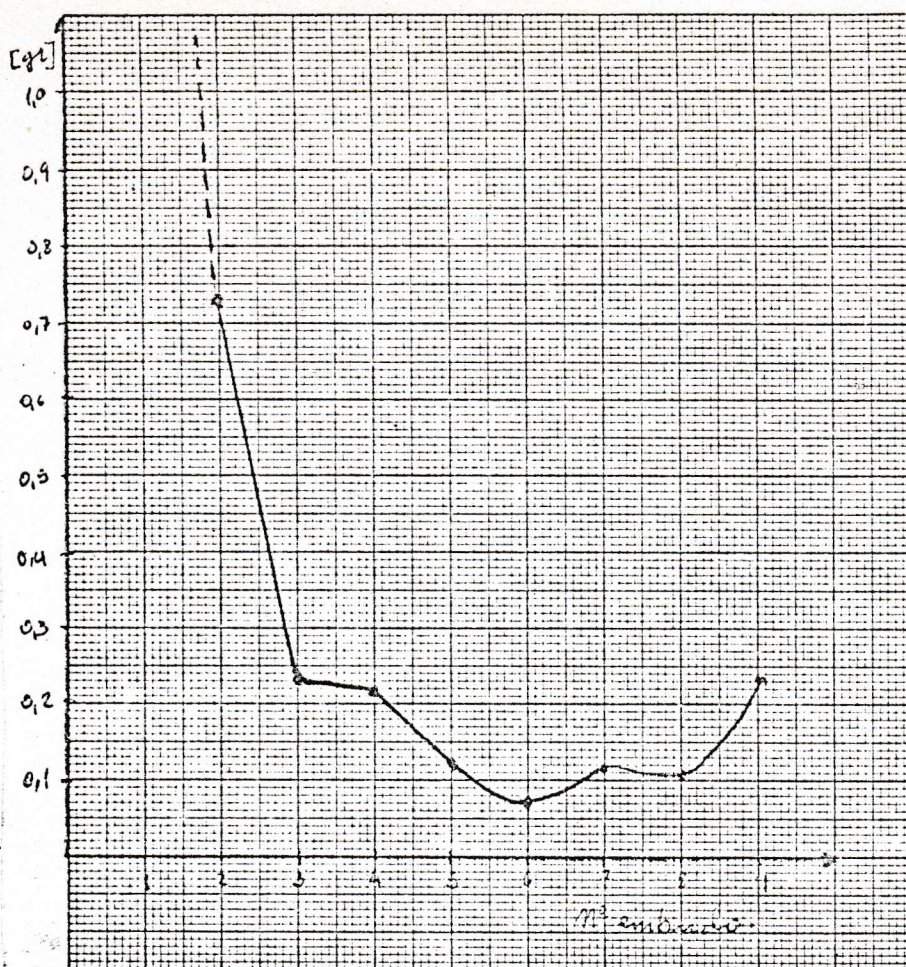


Figura 15

El rendimiento real de alcaloides con respecto a la planta seca es del orden de  $8,6 \times 10^{-3}\%$  considerando todas las bases obtenidas. Este rendimiento es bastante inferior a los encontrados en otras especies Chilenas. (39, 40), pese a que el momento de recolección de la planta - primavera - es la permitido obtener mayor rendimiento de bases. (39)

Se sugiere una revisión de la clasificación taxonómica de la planta ya que plantas de una misma familia generalmente tienden a producir alcaloides de un mismo tipo estructural (6).



El extracto etéreo reveló la presencia de  $\alpha$ -onocerina (G-1) y otro triterpeno en muy pequeña cantidad,  $\alpha$ -onocerina ha sido encontrado en otras especies como el Lycopodium inundatum L. (25) Lycopodium clavatum L. (49), pero también en Onosis spinosa (50). Estos antecedentes hacen ver que

$\alpha$ -onocerina no es exclusiva del género lycopodium y su presencia no decidiría sobre su clasificación taxonómica. No se aislaron triterpenos del tipo serratenos.

No se obtuvo mayor información acerca de los azúcares ya que solo se hizo un análisis cromatográfico y no un estudio comparativo de los posibles azúcares presentes. Un estudio de estos compuestos teniendo presente las observaciones de White y Towers (32) ayudaría bastante a la clasificación de la planta.

Del presente trabajo lo más importante es que el comportamiento de la planta en cuanto a alcaloides no es lo común.



B I B L I O G R A F I A

1. W.A.Ayer, B.Altenkirk e Y.Fukazawa. Tetrahedron 30, 4213 (1970)
2. H.Ishii, B.Yasui, R.Nishino, T.Harayama e Y.Inubushi, Chem. Pharm. Bull. 18 (9), 1380 (1970).
3. M.Castillo, G.Morales y L.A.Loyola, Can. J. Chem. 53 N°16, 2513 (1975).
4. M.Castillo, L.A.Loyola y G.Morales, Próxima publicación.
5. D.B.MacLean "The Alkaloids" Vol. XIV, 347, Acad. Press. New York, 1973.
6. A.W.Sangster, J.Chem. Ed. 37, 454 (1960).
7. H.Conroy. Tetrahedron Letter N°10, 34 (1960).
8. D.B.MacLean "The Alkaloids" Vol. X, 305 (1968).
9. R.N.Gupta, M.Castillo, D.B.MacLean, I.D.Spencer y J.T.Wrobel J.Amer. Chem. Soc. 1360 (1968).
10. M.Castillo, Ph.D. Thesis, Mc Master University (1969).
11. M.Castillo, R.N.Gupta, Y.K.Ho, D.B.MacLean e I.D.Spencer. J.Am.Chem.Soc. 1074 (1970).
12. Y.K.Ho, R.N.Gupta, D.B.MacLean e I.D.Spencer, Can. J. Chem. 49, 3352 (1971).
13. G.S.Rao, Chem. and Ind. (1972) pág. 537.
14. W.A.Ayer, B.Altenkirk y Y.Fukazawa. Tetrahedron 30, 4213 (1974).
15. D.B.MacLean, Can. J. Chem. 41, 2654 (1963).
16. S.N.Alam, K.A.H.Adams y D.B.MacLean, Can. J. Chem. 42, 2456 (1964).
17. Y.Inubushi, T.Ibuka, T.Harayama, H.Ishii, Tetrahedron 24, 3541 (1968).
18. M.Castillo, G.Morales, L.A.Loyola. Próx. publicación.
19. Y.Inubushi, T.Hibino, T.Harayama y T.Hasegawa, J. Chem. Soc. (C) 3109 (1971).
20. I.H.Rogers y L.R.Rozon, Can. J. Chem. 48, 1021 (1970).
21. J.P.Kutney, I.H.Rogers y J.W.Rowe. Tetrahedron 25, 3731 (1969).



22. Y. Inubushi, Y. Tsuda y T. Sano, Yakugaku Zasshi 82, 1083 y 1537 (1962).
23. J.P. Kutney y G. Eigendorf, Tetrahedron 25, 3753 (1969).
24. Y. Inubushi, Y. Tsuda, T. Sano, T. Konita, S. Sussuki, H. Ageta y Y. Otake, Chem. Pharm. Bull. 15 (8), 1153 (1967).
25. J.C. Braekman, C. Hootele y W.A. Ayer, Bull. Soc. Chim. Belges, 8, 83 (1971).
26. Y. Inubushi, T. Sano e Y. Tsuda, Tetrahedron Letters 1303 (1964).
27. Y. Tsuda, T. Sano K. Kawaguchi e Y. Inubushi. Tetrahedron Letters 1279 (1964).
28. G. Stork, A. Meisels y J.E. Davies, J. Am. Chem. Soc. 85, 3419 (1963).
29. Hendrickson "The Molecules of Nature". W.A. Benjamín, New York 1965.
30. Xorge Domínguez "Métodos de Investigación Fitoquímica" 51 - 56 Centro Regional de Ayuda Técnica, México, 1973.
31. J. Kutney e I. Rogers, Tetrahedron Letters 761, (1968).
32. E. White y G.H.N. Towers, Phytochemistry 6, 663 (1967).
33. G. Loosser "Los Pteridofitos o helechos de Chile" Revista Univ. (Universidad Católica de Chile) 231-262 (1961).
34. Egon Stahl "Thin Layer Chromatography" 855-902 Springer 1969.
35. B. Loer y M. Goodman, Chem. and Ind. 2026 (1967).
36. Handbook of Chemistry and Physics 40th ed. 1715 (1958-1959).
37. L.A. Loyola. Unidad de investigación en Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (1972).
38. P.E. Valdés. Unidad de investigación en Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (1973).
39. G. Morales, Tesis de Licenciatura, Universidad de Chile (1974).
40. L.A. Loyola, Tesis de Licenciatura, Universidad de Chile,



42. Y. Inubushi, T. Harayama y T. Hibino, Chem. Comm. 1118 (1970).
43. K. Nakanishi "Infrared Absorption Spectroscopy" Holden Day San Fco. California 1962.  
J. Dyer "Aplicaciones de Espectroscopía de absorción en compuestos Orgánicos", Prentice Hall Inter. 1973.
44. L.J. Jackman y S. Sternhells "Applications of N.M.R. in Organic Chemistry". Pergamon Press, Oxford, 2nd Ed. 1969.
45. Y. Tsuda y M. Hatanaka, Chem. Comm. 1040 (1969).
46. Y. Tsuda y T. Fujiomoto, Chem. Comm. 1042 (1969).
47. K. Randerath "Thin Layer Chromatography" Verlag-Chemie. Acad. Press, 1966.
48. R.H. Burnell, L. Moo y M. Moinas, Phytochemistry 11, 2815 (1972).
49. H. Ageta, K. Iwata y Y. Ootake, Chem. Pharm. Bull. Japan 10, 637 (1962).
50. K. Yamaguchi Spectral data of Natural Products. Vol 1, Elsevier Amsterdam 1970.
51. J.C. Braeckman, L. Nyembo, P. Bourdoux, N. Kahindo y C. Hootele, Phytochemistry 13, 2519 (1974).



