

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

ALCALOIDES DE LYCOPODIUM PANICULATUM

TESIS



GLAUCO S. MORALES BORCOSQUE

1978

UCH-FC
DOC-R
M 828a
C.1

ALCALOIDES DE LYCOPODIUM PANICULATUM

Tesis

Entregada 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

por

Glauco Segundo Morales Borcosque

Julio, 1978

Patrocinante: Doctor Mariano Castillo V.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

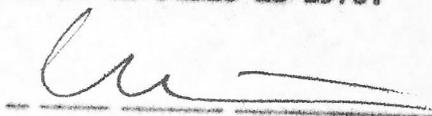
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

GLAUCO S. MORALES BORCOSQUE

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias con Mención en QUIMICA en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 18 de Julio de 1978.

Dr. Mariano Castillo
Patrocinante de Tesis



Dr. Bruce Cassels
Presidente Comisión
Informante de Tesis

Bruce Cassels

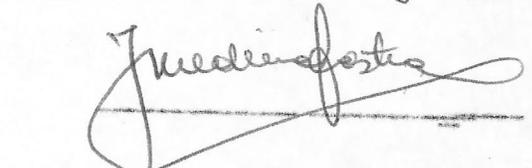
Dr. Jorge Naranjo
Comisión Informante de Tesis



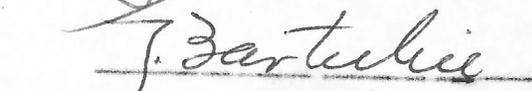
Dr. Jorge Sierra
Comisión Informante de Tesis



Dr. Jorge Medina
Comisión Informante de Tesis



Dr. Juan Bartulín
Comisión Informante de Tesis



A

Yanina, Solange y Laura

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos al Dr. Mariano Castillo V., director de esta Tesis por su constante ayuda y estímulo e inapreciable amistad,

Hago extensivos mis agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que de una u otra manera hicieron contribuciones a la realización de este trabajo, especialmente a :

- | | |
|-------------------|---|
| Dr. D.B. MacLean. | Mc Master University, Canadá. |
| Dr. J. Bartulin. | Departamento de Química, Universidad de Concepción. |
| Prof. R. Clavijo. | Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. |
| Sr. S. Alegría. | Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. |
| Sr. P. Mardones. | Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. |
| Sr. J. Muñoz. | Universidad de Concepción. |

Departamento de Química de la Facultad de Ciencias, Sede Santiago Oriente, Universidad de Chile.

Departamento de Química, Sede Antofagasta, Universidad de Chile.

Servicio de Desarrollo Científico y Creación Artística, Universidad de Chile.

INDICE DE MATERIAS

RESUMEN.	<i>xiii</i>
INTRODUCCION.	1
PARTE EXPERIMENTAL	47
2.1. APARATOS, METODOS Y MATERIALES.	47
2.2. EXTRACCION Y OBTENCION DE ALCALOIDES.	54
2.2.1. RECOLECCION 1973.	54
2.2.2. RECOLECCION 1974.	71
2.3. CARACTERIZACION DE ALCALOIDES Y DE DERIVADOS.	82
2.3.1. PANICULATINA.	82
2.3.2. PANICULINA.	104
2.3.3. DESACETILPANICULINA.	110
2.3.4. ANHIDRODESACETILPANICULINA.	111
2.3.5. DESACETILLICOCLAVINA.	125
2.3.6. LICOCLAVINA.	146
2.3.7. FLABELIDINA.	147
2.3.8. ALCALOIDE P8.	153
RESULTADOS Y DISCUSION.	155
3.1. ESTRUCTURA DE PANICULATINA.	155
3.2. ESTRUCTURA DE PANICULINA Y DERIVADOS NATURALES (DESACETILPANICULINA Y ANHIDRODESACETILPANICU- CULINA).	193

3.3. ESTRUCTURA DE DESACETILICOCLAVINA.	217
3.4. ASIGNACION ESTRUCTURAL DE LICOCLAVINA.	248
3.5. ASIGNACION ESTRUCTURAL DE FLABELIDINA.	254
REFERENCIAS.	256

Glosario

Significado	Símbolos
Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C	RMN ^{13}C
Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H	RMNP
Espectro de infrarrojo	IR
Espectro de ultravioleta	UV
Espectro de dispersión óptica rotatoria	DOR
Espectro de dicroísmo circular	CD
Espectro de masas	EM
Distribución de contracorriente	cc
Cromatografía de capa fina	c.c.f.
Cromatografía de columnas	c.c.
Cromatografía de gases	c.g.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Absorción de alcaloides del tipo de licopodina en la región de 215 - 230 nm.	7
Tabla 2.	RMN ¹³ C de alcaloides tipo licopodina.	17
Tabla 3.	Cálculo de desplazamiento químico de algunos carbonos de clavolonina.	20
Tabla 4.	Ejemplos de aplicación de la regla del benzoato.	34
Tabla 5.	DOR y CD de algunos alcaloides tipo licopodina.	44
Tabla 6.	Distancias fuera del plano .	63
Tabla 7.	RMN ¹³ C calculado para 2,2,3,5-tetrametilciclohexanol.	178
Tabla 8.	RMN ¹³ C calculado para 1,3,4-trimetilpiperidina.	179
Tabla 9.	RMN ¹³ C calculado para 1,1, 2,3,4-pentametilciclopentano.	179
Tabla 10.	RMN ¹³ C calculado para 2,3,3,4-tetrametilciclopentanona.	180
Tabla 11.	Asignaciones de RMN ¹³ C de paniculatina.	182
Tabla 12.	Masa y composición de varios iones de paniculatina.	184
Tabla 13.	Masa de algunos iones de paniculatina y derivados.	189
Tabla 14.	Resonancia de desacetillicoclavina y derivados bajo 3.4 p.p.m.	219
Tabla 15.	Algunas señales de EM de desacetillicoclavina y derivados.	221
Tabla 16.	Asignaciones de RMN ¹³ C de desacetillicoclavina.	232
Tabla 17.	Asignación de RMN ¹³ C de licoclavina.	252

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Tipos estructurales de alcaloides de <u>Lycopodium</u> .	3
Figura 2.	EM de alcaloides tipo licopodina.	10
Figura 3.	Racionalización de EM de alcaloides tipo licopodina.	13
Figura 4.	RMN ¹³ C de clavolonina. a. asignación de Ayer y b. cálculo desde licopodina.	21
Figura 5.	Regla de Horeau.	28
Figura 6.	Regla del benzoato.	31
Figura 7.	Aplicación de la Regla del benzoato a 8-episerratinina.	35
Figura 8.	Regla de octantes.	38
Figura 9.	Regla de α -haloaxialcetona	40
Figura 10.	Aplicación de la regla de octantes a licopodina y 6- α -bromoderivado.	41
Figura 11.	Aplicación de la regla de octantes a 12-epilicopodina y 12-epilicodolina.	42
Figura 12.	Extracción y fraccionamiento de <u>L. paniculatum</u> . 1973.	56
Figura 13.	Examen "Fracción soluble en éter"	64
Figura 14.	Examen "Fracción soluble en cloroformo."	70
Figura 15.	Fraccionamiento "crudo éter". 1974.	75
Figura 16.	Análisis fracción "Bases débiles pH 6".	81
Figura 17.	Análisis fracción "Bases débiles pH 10".	81
Figura 18.	IR (KBr) de paniculatina.	90

Figura 19.	IR (KBr) de hidrobromuro de paniculatina.	90
Figura 20.	RMNP (220 MHz) de paniculatina.	91
Figura 21.	RMNP (60 MHz) de paniculatina. a. en CDCl_3 y b. en $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{COOD}$.	92
Figura 22.	EM de paniculatina.	93
Figura 23.	IR (film) de acetilpaniculatina.	94
Figura 24.	RMNP de acetilpaniculatina.	94
Figura 25.	IR (Nujol) de paniculatinona.	95
Figura 26.	RMNP de paniculatinona.	95
Figura 27.	EM de paniculatinona.	96
Figura 28.	IR (KBr) deoxopaniculatina	97
Figura 29.	RMNP de deoxopaniculatina.	97
Figura 30.	EM de deoxopaniculatina.	98
Figura 31.	IR (film) de dehidrodeoxopaniculatina.	99
Figura 32.	RMNP de dehidrodeoxopaniculatina.	99
Figura 33.	EM de dehidrodeoxopaniculatina.	100
Figura 34.	DOR de dehidrodeoxopaniculatina.	101
Figura 35.	IR (KBr) benzoilpaniculatina.	102
Figura 36.	RMNP de benzoilpaniculatina.	102
Figura 37.	EM de benzoilpaniculatina.	103
Figura 38.	IR (KBr) de paniculina.	112
Figura 39.	IR (KBr) del hidrobromuro de paniculina.	112
Figura 40.	RMNP (220 MHz) de paniculina.	113
Figura 41.	RMNP (100 MHz) de paniculina.	114

Figura 42.	RMNP (60 MHz) de paniculina.	115
Figura 43.	EM de paniculina	115
Figura 44.	IR (KBr) de desacetilpaniculina.	116
Figura 45.	RMNP de desacetilpaniculina.	116
Figura 46.	EM de desacetilpaniculina.	117
Figura 47.	IR (KBr) de dehidrodesacetilpaniculina.	118
Figura 48.	RMNP de dehidrodesacetilpaniculina.	118
Figura 49.	EM de dehidrodesacetilpaniculina.	119
Figura 50.	DOR de dehidrodesacetilpaniculina.	120
Figura 51.	IR (KBr) de acetilpaniculina.	121
Figura 52.	RMNP de acetilpaniculina.	121
Figura 53.	EM de acetilpaniculina.	122
Figura 54.	IR (KBr) de anhidrodesacetilpaniculina.	123
Figura 55.	RMNP. de anhidrodesacetilpaniculina.	123
Figura 56.	EM de anhidrodesacetilpaniculina.	124
Figura 57.	IR de desacetillicoclavina a. en Nujol b. en KBr.	135
Figura 58.	RMNP (220 MHz) desacetillicoclavina.	136
Figura 59.	EM de desacetillicoclavina.	137
Figura 60.	RMN ¹³ C de desacetillicoclavina.	138
Figura 61.	IR (KBr) de acetillicoclavina.	139
Figura 62.	RMNP de acetillicoclavina.	139
Figura 63.	EM de acetillicoclavina.	140
Figura 64.	IR (film) de acetildesacetillicoclavina.	141

Figura 65.	RMNP de acetildesacetillicoclavina.	141
Figura 66.	IR (KBr) diosfenol. Oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Jones.	142
Figura 67.	RMNP diosfenol. Oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Jones.	142
Figura 68.	EM diosfenol. Oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Jones.	143
Figura 69.	IR (KBr) de L-20 Oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Sarett.	144
Figura 70.	RMNP de L-20 Oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Sarett.	144
Figura 71.	EM de L-20 Oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Sarett.	145
Figura 72.	IR (KBr) de licoclavina	148
Figura 73.	RMNP de licoclavina.	149
Figura 74.	EM de licoclavina	149
Figura 75.	RMN ¹³ C de licoclavina.	150
Figura 76.	IR (film) de flabelidina.	151
Figura 77.	RMNP de flabelidina.	151
Figura 78.	EM de flabelidina.	152
Figura 79.	IR (KBr) de P8.	154
Figura 80.	RMNP de P8.	154
Figura 81.	a. Estructura del hidrobromuro de paniculatina	161
Figura 81.	b. Proyección plana de paniculatina.	162
Figura 82.	Desviación de los átomos de carbono de paniculatina relativo al plano del papel.	166

Figura 83.	Estereoquímica relativa de paniculatina.	167
Figura 84.	Derivados de paniculatina.	167
Figura 85.	Enantiómeros de paniculatina.	168
Figura 86.	Relación de la conformación del benzoato y la configuración del alcohol.	169
Figura 87.	Configuración de C13 de paniculatina, según la regla del benzoato.	171
Figura 88.	Configuración absoluta de C13 de paniculatina, según el método de Horeau.	173
Figura 89.	DOR y diagrama de octante de 13-dehidro-5-deoxopaniculatina.	174
Figura 90.	Interpretación de doble resonancia en RMNP de paniculatina.	177
Figura 91.	RMN ¹³ C calculado para compuestos modelos.	181
Figura 92.	Asignaciones de RMN ¹³ C de paniculatina.	183
Figura 93.	EM de paniculatina y derivados.	185
Figura 94.	Mecanismo de fragmentación para iones del tipo CHN de masas bajas.	187
Figura 95.	Mecanismo de fragmentación para iones del tipo CHN de masas altas.	188
Figura 96.	Mecanismos de fragmentación de 13-dehidroderivados de paniculatina.	190
Figura 97.	Relaciones estructurales de paniculatina y otros alcaloides de <u>Lycopodium</u> .	192
Figura 98.	Estructura parcial de paniculina.	200
Figura 99.	a. IR de dihidro A ¹³⁰ y b. IR de desacetilpaniculina.	205
Figura 100.	Curva DOR y diagrama de octante de dehidrodesacetilpaniculina.	207

Figura 101.	Estructuras de paniculina, desacetilpaniculina y anhidrodesacetilpaniculina.	208
Figura 102.	EM de paniculina y derivados.	212
Figura 103.	Mecanismos de fragmentación de paniculina y derivados	215
Figura 104.	Mecanismos de fragmentación de dehidro y anhidro derivado de desacetilpaniculina.	216
Figura 105.	EM de desacetillicoclavina y derivados.	222
Figura 106.	Estructura de desacetillicoclavina	227
Figura 107.	Síntesis de desacetillicoclavina.	230
Figura 108.	Asignaciones de RMN ¹³ C de desacetillicoclavina	233
Figura 109.	Mecanismo de fragmentación de desacetillicoclavina.	238
Figura 110.	RMNP (2.9-3.6 p.p.m.) de desacetillicoclavina.	240
Figura 111.	RMNP (2.9-3.6 p.p.m.) de paniculina.	241
Figura 112.	Estructura de licoclavina.	248
Figura 113.	Relación química de licoclavina y desacetillicoclavina.	250
Figura 114.	Asignación de RMN ¹³ C de licoclavina.	253
Figura 115.	Estructura de flabelidina.	255

RESUMEN

Se describe la aislación, identificación y elucidación estructural de 10 alcaloides presentes en Lycopodium paniculatum Desvaux. Cinco de estos alcaloides corresponden a bases aisladas anteriormente de otras especies de Lycopodium: licopodina, acetildihidroliscopodina, dihidroliscopodina, licoclavina y flabelidina. Paniculatina, paniculina, desacetilpaniculina y anhidrodesacetilpaniculina son alcaloides nuevos. El alcaloide restante, desacetillicoclavina, conocido como producto derivado de licoclavina, ha sido aislado por primera vez como base natural.

La estructura de paniculatina se obtuvo por estudio de sus propiedades espectroscópicas y químicas y por un análisis de Rayos-X. de su hidrobromuro. Estos estudios revelan que paniculatina posee en su estructura un nuevo sistema de anillos no reportados a la fecha en los alcaloides de Lycopodium conocidos. La estructura revelada por Rayos-X es analizada en función de la información proporcionada por los espectros de resonancia magnética nuclear de protones y carbono-13, como asimismo por los espectros de masas de paniculatina y sus derivados.

Finalmente, se determinó su configuración absoluta a

través de la aplicación de tres métodos independientes, con resultados totalmente concordantes.

La elucidación de la estructura de paniculina y derivados naturales se determinó en base a la evidencia espectroscópica y química de estos alcaloides. Su estructura corresponde a un derivado del tipo de licopodina con un sustituyente hidroxilo en C7. La configuración absoluta de la hidroxiketona derivada de desacetilpaniculina corresponde a la misma serie enantiomérica de licopodina.

Desacetillicoclavina fue identificada como el alcaloide obtenido anteriormente por hidrólisis de licoclavina mediante comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas y por sus transformaciones en otros alcaloides conocidos. Se analizan los resultados obtenidos por resonancia magnética nuclear de C-13 de este alcaloide y algunos derivados y su correlación con resultados obtenidos del estudio de otros alcaloides del tipo de licopodina.

La identificación de los alcaloides descritos anteriormente en la literatura se efectuó a través de comparación de propiedades espectroscópicas y/o con muestras auténticas.

INTRODUCCION

El análisis fitoquímico de las especies del género Lycopodium ha aumentado considerablemente en los últimos años.

De los extractos neutros ha sido posible detectar, aislar y determinar la estructura de un gran número de triterpenoides pentacíclicos¹, diterpenoides², hidratos de carbono³, ácidos grasos e hidrocarburos⁴.

El estudio del contenido químico de los extractos básicos ha permitido aislar, caracterizar y resolver estructuralmente un gran número de alcaloides; bases naturales que, debido a su exclusiva distribución taxonómica* y características estructurales, se han reunido en la llamada familia de "alcaloides de Lycopodium"⁵⁻⁸.

Aún cuando la aislación de un alcaloide de una especie de Lycopodium se informó por primera vez hace ya casi un siglo, el estudio sistemático se inició aproximadamente en 1940.

La estructura de licopodina (1), el alcaloide más ampliamente distribuido en el género, fue propuesta por MacLean y Harrison^{9,10} en 1960, tres años después que Wiesner¹¹ hiciera lo propio con annotinina (2) en 1957.

* gymnamina, un alcaloide traza, aislado desde Gymnema sylvestre R. Br. (Asclepiadaceae) ha sido propuesto como la primera base tipo Lycopodium que se encuentra fuera de la familia licopodiáceas¹².

A la fecha se ha examinado unas veinte especies del género de unas cuatrocientas que existen¹³ lográndose caracterizar y definir estructuralmente alrededor de unos ciento diez alcaloides^{6,7}.

Los métodos de extracción de alcaloides de Lycopodium son, más bien, convencionales e incluyen técnicas usando solventes orgánicos¹⁴⁻¹⁷ y soluciones acídicas¹⁸⁻²⁰.

Entre las técnicas de separación y purificación de alcaloides de Lycopodium son comunes las cromatografías de adsorción^{15,17,21,22}, distribución en contracorriente^{18,23,24}, cromatografía de columna seca¹⁷, formación de derivados, y cristalizaciones y cromatografía de gases preparativas²⁵.

Las estructuras de los alcaloides de Lycopodium que han sido propuestas muestran que, en general, estas bases naturales poseen moléculas alifáticas policíclicas: tres, cuatro o cinco anillos, con uno o dos átomos de nitrógeno.

En términos de sus esqueletos carbonados los alcaloides de Lycopodium se han reunido en catorce grupos, familias o tipos estructurales que se muestran en la figura 1.

El sistema de numeración utilizado es el propuesto por Wiesner²⁶.

La mayoría de estos alcaloides pertenecen estructuralmente al tipo de licopodina (1)⁽⁶⁾. Otro número importante de bases se reúnen bajo los esqueletos de licodina (11)^(27,28) serratinina (5)⁽²⁹⁻³³⁾, cernuina (8)⁽³⁴⁻³⁶⁾, y alopecurina (7)⁽¹⁷⁾. No obstante, hay algunos tipos estructurales que tienen

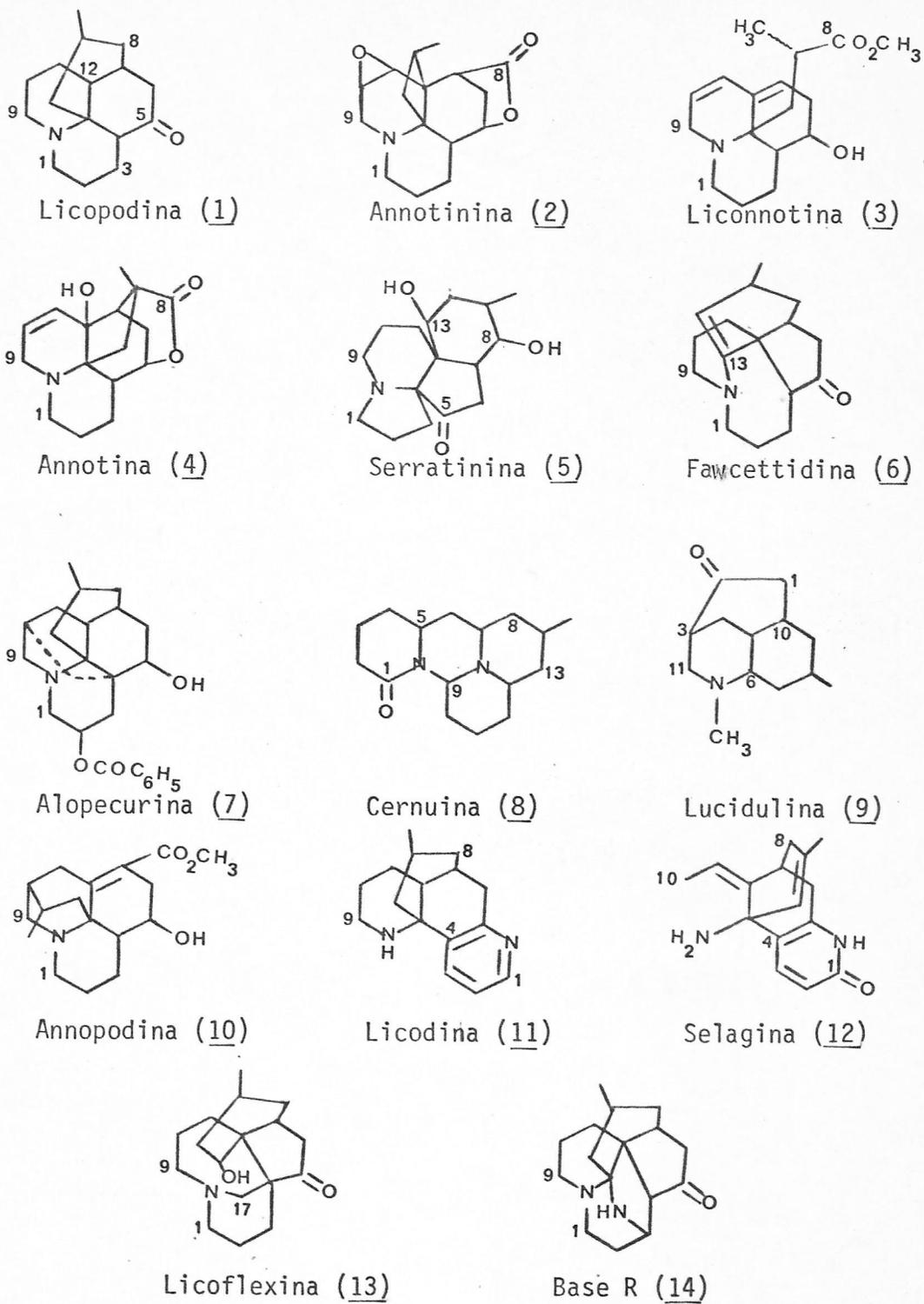
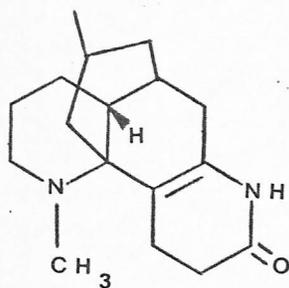


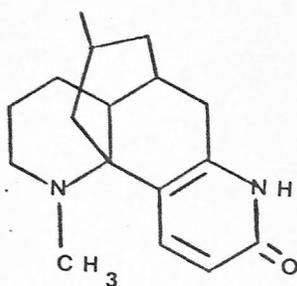
Figura 1. Tipos estructurales de alcaloides de Lycopodium.

como único representante al alcaloide que le ha dado origen. Así ocurre con: lucidulina (9)⁽²³⁾, annotinina (2)⁽¹¹⁾, annopodina (10)⁽³⁷⁾, selagina (12)⁽³⁸⁻³⁹⁾, liconnotina (3)⁽⁴⁰⁾ y licoflexina (13)⁽⁴¹⁾.

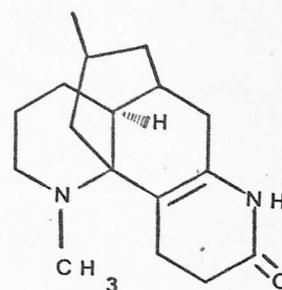
Desde otro punto de vista, las funciones químicas más frecuentemente encontradas en alcaloides de Lycopodium son alcoholes (secundarios y terciarios), acetatos y cetonas. Los enlaces dobles se encuentran más escasamente. Contrariamente a otros tipos de alcaloides, en Lycopodium sólo se ha demostrado la existencia de cuatro alcaloides que poseen el grupo N-CH₃: lucidulina (9)⁽²³⁾, α-obscurina (15), β-obscurina (16)⁽⁴²⁻⁴³⁾ y sauroxina (17)^(19,44). Lactonas, se han verificado en solo dos alcaloides de Lycopodium^{17,45}.



(15)



(16)



(17)

Una parte importante en la investigación química actual de los componentes básicos de los extractos de Lycopodium, se ha dirigido hacia la aislación y determinación de las estructuras de aquellos alcaloides que se encuentran en pequeñas cantidades. Esto es posible gracias al extraordinario avance instrumental de técnicas fisico-químicas de análisis, que

permiten con análisis no destructivos y usando pequeñísimas cantidades de material químico, obtener valiosa información estructural.

En este sentido es conveniente destacar la enorme utilidad de las espectroscopías infrarroja, ultravioleta, resonancia magnética nuclear protónica y de abundancia natural de carbono 13, de dispersión óptica rotatoria, de la espectrometría de masas y finalmente, del análisis cristalográfico de rayos X, que entregan información tanto de las bases naturales como de sus derivados.

La adecuada utilización de toda esta información permite hacer aproximaciones estructurales, imposibles de lograr con los métodos degradativos clásicos, máxime cuando se trata de "alcaloides menores", es decir, que sólo se encuentran en pequeña cantidad en el vegetal.

Debido a su conexión con el presente trabajo debemos ilustrar, someramente, la importancia de algunas de estas técnicas en relación con el problema de la elucidación estructural de alcaloides de Lycopodium.

Naturalmente que la espectroscopia infrarroja (I R) ha sido determinante en la asignación de grupos funcionales presentes en la molécula de alcaloides de Lycopodium y, más aún, ha permitido hacer importantes inferencias sobre la estereoquímica de los mismos. Así, por ejemplo, las uniones de puente de hidrógeno de grupos hidróxilos con carbonilos o con el átomo de nitrógeno quedan perfectamente establecidos al estudiar los efectos de la concentración de la

solución en la frecuencia de la absorción del grupo hidroxilo en el espectro IR del alcaloide⁴⁶⁻⁴⁷. De este modo, es posible entonces decidir la naturaleza del grupo OH como enlazado intramolecularmente o no enlazado; lo que tiene gran implicancia estereoquímica.

Por otra parte la fusión cis o trans de los anillos que constituyen el sistema quinolizidínico existente en estos alcaloides puede ser inferida de la ausencia o presencia de "bandas de Bohlmann" en la región de frecuencias de 2.850-2.700 cm^{-1} respectivamente, en los espectros IR. Estas bandas están asociadas a la existencia de a lo menos dos átomos de hidrógeno orientados trans diaxialmente con el par electrónico no compartido del átomo de nitrógeno⁴⁷⁻⁴⁸.

Finalmente, cabe mencionar la utilidad de la espectroscopía IR en la ubicación de un alcaloide como perteneciente a la familia estructural de alopecurina, grupo de bases que en la región de 1.490 - 1.510 cm^{-1} muestran una banda que ha sido asociada con las vibraciones de grupos metilenos en un sistema pentacíclico altamente rígido⁴⁹⁻⁵⁰.

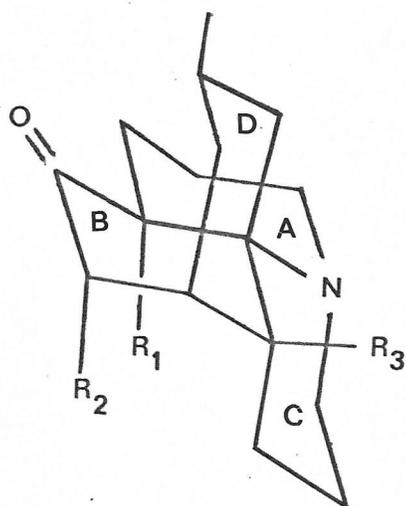
La espectroscopía ultravioleta (UV), por su parte, ha sido importante en la identificación de algunos cromóforos presentes en la molécula de alcaloides de Lycopodium o de sus derivados y junto con proporcionar esta información funcional ha tenido alguna relevancia estereoquímica. Se ha observado que todos los alcaloides del tipo de lycopodina (1) que llevan un carbonilo en carbono 5 y en los cuales el par

electrónico no compartido del átomo de nitrógeno es ecuatorial al anillo A, es decir, muestran la misma estereoquímica de licopodina, desarrollan una banda de absorción en la región de 220-260 nm. en sus espectros U V como se aprecia en la Tabla 1.

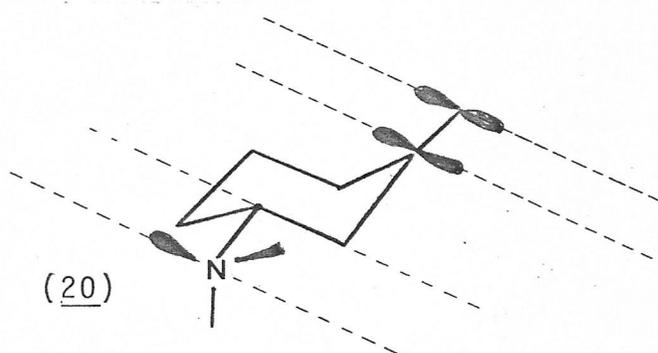
Tabla 1

Absorción de alcaloides del tipo licopodina en la región 215-230 nm⁴⁸.

Alcaloide		λ máx (ϵ)
Licopodina (<u>1</u>)	$R_1=R_2=R_3=H$	217 (2.400)
Licodolina (<u>27</u>)	$R_1=R_2=H; R_3=OH$	221 (1.500)
Flabelliformina (<u>18</u>)	$R_1=OH; R_2=R_3=H$	228 (500)
L-20	(<u>19</u>) $R_1=R_3=H; R_2=OH$	220 (2.500)



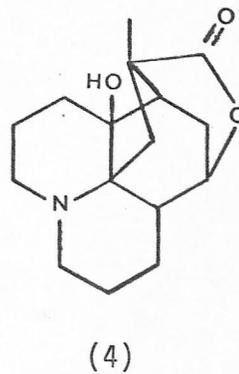
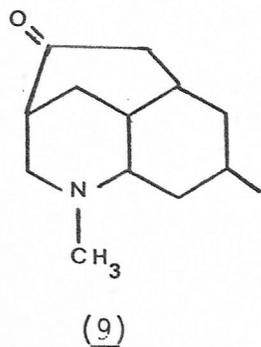
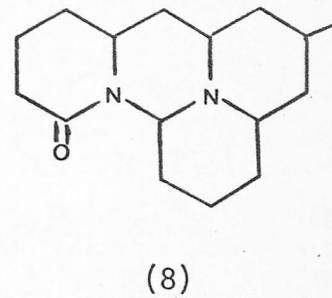
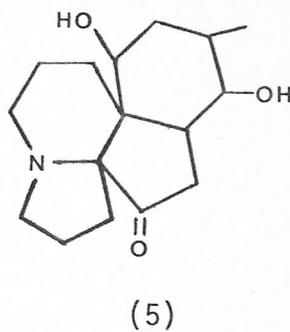
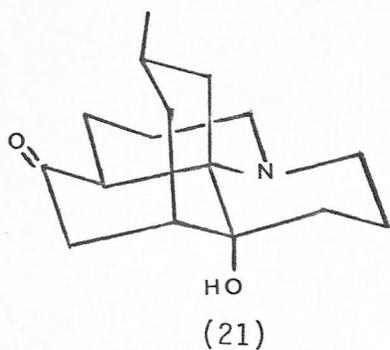
Estas bandas se producen en las β -aminocetonas en que el par electrónico del átomo de nitrógeno, el enlace σ entre los carbonos α y β y el orbital π del carbonilo son paralelos (20). Estas absorciones energéticas-que desaparecen por protonación del átomo de nitrógeno-son atribuidas a un desdoblamiento en los niveles de energía electrónica provocado por una interacción del par electrónico no compartido del átomo de nitrógeno y el orbital π del carbonilo a través del enlace σ entre los carbonos α y β .



El alcaloide 12-epilicodolina (21), base que ha sido correlacionada químicamente con licopodina⁴⁷, no muestra absorción entre 215-260 nm, de lo que se deduce que la configuración del par electrónico del átomo de nitrógeno es axial con respecto al anillo A.

La espectrometría de masas, desde que MacLean racionalizó las fragmentaciones del ion molecular de una serie representativa de alcaloides de *lycopodium*⁵¹, ha llegado a ser una herramienta indispensable en los estudios estructurales de estos productos naturales

Desde entonces, han sido informadas racionalizaciones de espectros de masas de varios representantes de otros tipos de alcaloides de Lycopodium, como por ejemplo, serratinina (5)⁽³³⁾, cernuina (8)⁽⁵²⁾, annotina (4)⁽⁵³⁾, lucidulina (9)⁽²³⁾.



Estos estudios en virtud de las señales diagnósticas que ha sido posible racionalizar, han permitido averiguar por una parte, si el esqueleto carbonado presente en un alcaloide de Lycopodium corresponde a alguna de las familias estructurales conocidas y, por otra, ha ayudado en la identificación y ubicación de los diferentes grupos funcionales en esos esqueletos carbonados^{41,54}.

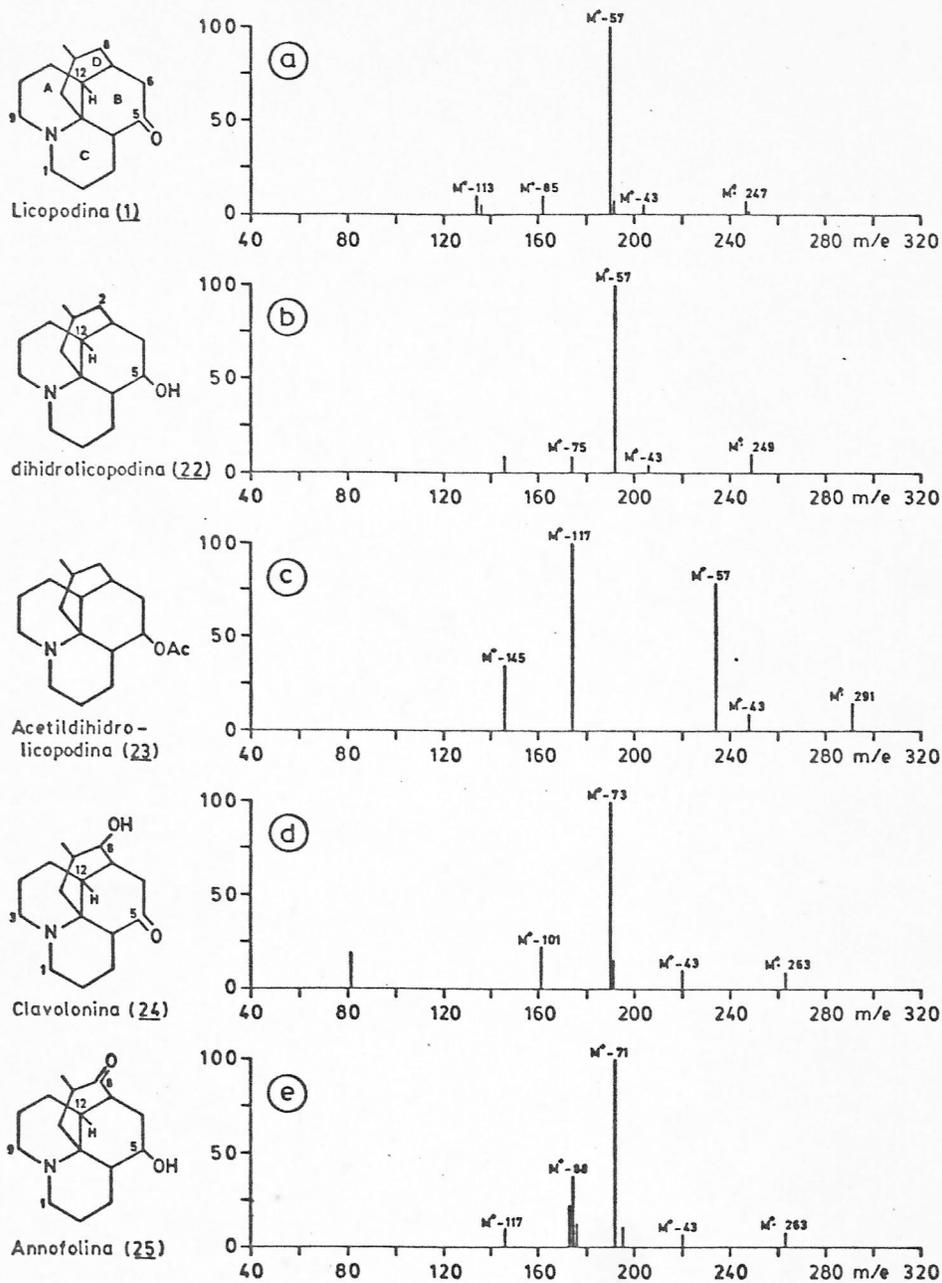


Figura 2. EM de alcaloides tipo licopodina.

Por ser de utilidad en el presente trabajo discutiremos brevemente los espectros de masas de algunos derivados de la familia de lycopodina y la información estructural que es posible deducir de ellos. Los espectros de masas de lycopodina, dihidrolicopodina, acetildihidrolicopodina, clavoglonina y annofolina se muestran en la figura 2.

Los rasgos más sobresalientes en estos espectros de masas pueden ser resumidos en los siguientes puntos:

- 1.- Los E M tienen una apariencia general, más bien, simple; sólo aparecen pocas señales de gran intensidad relativa.
- 2.- Los E M muestran señales de ión-molecular de baja intensidad relativa.
- 3.- La presencia de una señal a $M^+ - 43$ de valor diagnóstico y cuya intensidad relativa es de gran importancia, como se discute más abajo.
- 4.- En los E M de alcaloides de la familia de lycopodina que no llevan sustituyente en el anillo puente (D), (espectros a, b y c de figura 2.) aparece una señal de gran intensidad, que casi siempre es la señal base, a $M^+ - 57$.
- 5.- Cuando estos alcaloides llevan un sustituyente en dicho anillo tal señal aparece en su E M a valores correspondientes (espectros d y e, figura 2) o sea, si en el anillo hay un grupo OH o bien $OCOCH_3$ por ejemplo, la señal aparece a $M^+ - 73$ o a $M^+ - 116$, respectivamente, en lugar de $M^+ - 57$.

6. Los E.M. de alcaloides de la familia de licopodina que no llevan un átomo de hidrógeno en C12, resultan mucho más complicados. Esto se traduce en un aumento de la intensidad de las señales a $M^+ -43$ y a $M^+ -56$ (o su equivalente).

Los E.M. de estos alcaloides han sido racionalizados por MacLean de acuerdo a la fragmentación preferencial seguida por el sistema ciclohexilamina, constituido por el átomo de nitrógeno y el anillo puente D. Esto significa primero una ruptura β , seguida de una transferencia específica de un átomo de hidrógeno alílico generando un ión más estable⁵⁵.

Según MacLean, la señal a $M^+ -57$ (o su equivalente) corresponde a la pérdida de la unidad C_4H_9 (o su equivalente) desde el ión molecular; elementos que provienen del anillo puente incluyendo el átomo de hidrógeno del carbono 12, como se muestra en la figura 3.

En los E.M. de alcaloides de este tipo estructural aparecen señales metaestables que concuerdan perfectamente con los valores calculados para el tránsito $M^+ \rightarrow M^+ -57$.

Los alcaloides del tipo de licopodina que no llevan un átomo de hidrógeno en carbono 12 producen, como se dijo, espectros muy diferentes. Esto se debe fundamentalmente, según MacLean⁵¹, a que la fragmentación característica que implica la pérdida de parte del anillo D se produce más lentamente. Esto se traduce en una baja considerable de la intensidad de la señal $M^+ -57$, un incremento importante en la

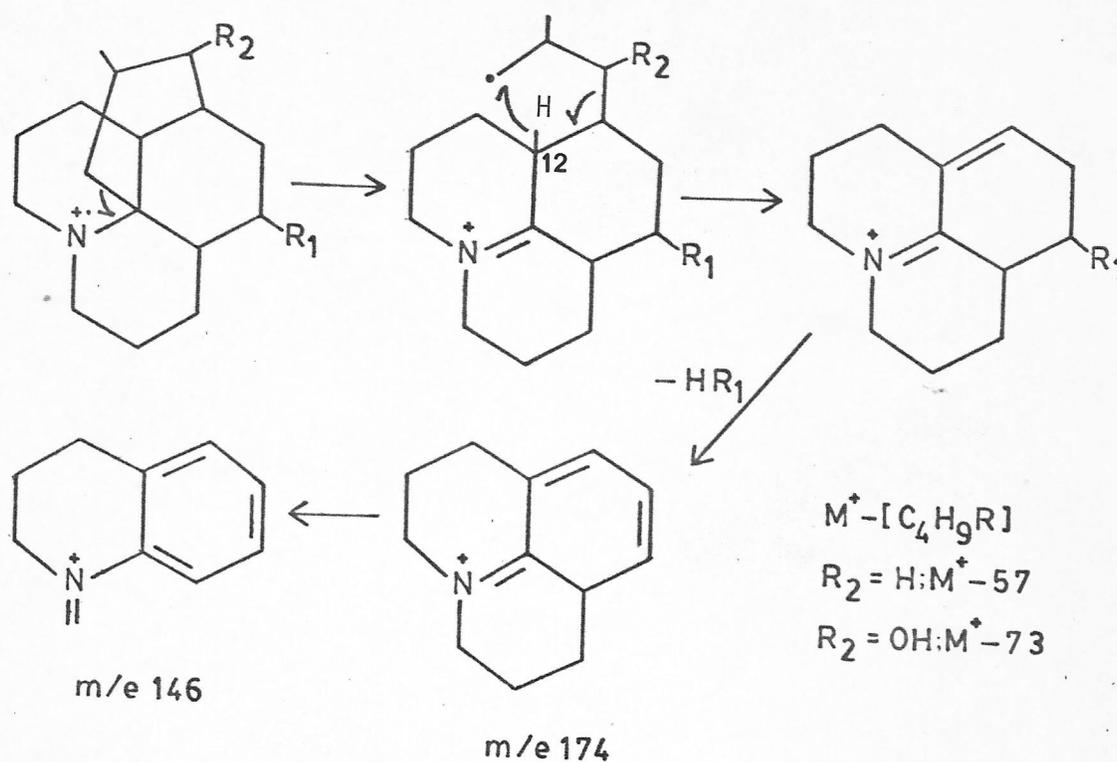


Figura 3. Racionalización de EM de alcaloides tipo lycopodina.

intensidad de la señal $M^+ - 56$ y lo que tiene carácter diagnóstico, un incremento de la señal $M^+ - 43$ que, incluso llega a ser mayor que la señal a $M^+ - 57$.

Así entonces, el E.M de un alcaloide de lycopodium, por análisis comparativo, permite decidir si la base en cuestión pertenece a la familia de lycopodina, si lleva sustituyente en el puente y si posee un átomo de hidrógeno en C 12.

Aún cuando la espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (RMNP) ha sido una herramienta valiosísima

en las investigaciones estructurales de algunos tipos de alcaloides, en lo que respecta a los de Lycopodium ha tenido una utilidad más bien limitada. Debido a la presencia de un número relativamente pequeño de grupos funcionales y a la naturaleza policíclica de carácter alifática de estos productos naturales, los espectros de RMNP resultan demasiado complejos. Esta complejidad, que se traduce en anchas señales no analizables (ni mucho menos asignables), deriva de los extensos acoplamientos spin-spin y fundamentalmente, de la superposición de señales en un rango de 1-2.5 p.p.m desde el TMS, causado por el pequeño desplazamiento químico de la mayor parte de los protones⁵⁶.

Sin embargo, lo anterior no ha sido óbice para que la información proporcionada por los espectros de RMNP relativa a la naturaleza de grupos funcionales, ubicación y algunas implicancias estereoquímicas de las bases naturales o de sus derivados, se haya empleado y se emplee en los trabajos de elucidación estructural de alcaloides de Lycopodium⁵⁷. Naturalmente que la sofisticación instrumental y el perfeccionamiento de técnicas de desacoplamiento están jugando un importante rol (e.g., RMNP 220 MHz).

La resonancia magnética nuclear de abundancia natural de carbono 13 (RMN¹³C) por su parte, está ampliando la utilidad de ésta espectroscopía en la determinación de la estructura de estos alcaloides⁵⁶.

Aunque los principios son los mismos que en la RMNP, la

baja abundancia natural del isótopo ^{13}C (1,1% contra 99,9% de ^1H) y la baja sensibilidad nuclear del átomo de carbono (sólo el 1,6% de la del átomo de hidrógeno⁵⁸) hacen que la obtención de un buen espectro de RMN ^{13}C requiera una concentración de la muestra mucho mayor que la necesaria en RMNP.

Los espectros de RMN ^{13}C de un alcaloide contiene una multitud de señales no interpretables, frecuentemente muy anchas y de variable intensidad, provocadas por los acoplamientos spin-spin heteronuclear a través de uno o más enlaces⁵⁸. Sin embargo, se han desarrollado técnicas que simplifican los espectros haciéndolos más utilizables. Una de estas técnicas consiste en obtener espectros con una irradiación simultánea de todo el rango de RMNP eliminando tales acoplamientos con los núcleos de ^{13}C (noise decoupling)⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾. Estos espectros son barridos un gran número de veces y las señales acumuladas hacen posible el registro de espectros con una muy buena relación señal/ruido. En estas condiciones cada carbono del compuesto aparece como un singlete y se puede conocer los respectivos desplazamientos químicos.

Como esta información es limitada, sobre todo cuando es difícil hacer las respectivas asignaciones, se utilizan otras técnicas que no eliminan en su totalidad los acoplamientos $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$, sino que sólo los atenúan (single frequency off resonance decoupling: sford)⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾.

Con esta técnica se consigue averiguar la respectiva multiplicidad de cada carbono. Se puede así distinguir los carbonos primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios según aparezcan como cuartetos, tripletes, dobletes o singletes respectivamente.

En analogía con la experiencia de la espectroscopía RMNP los carbonos más altamente sustituidos, los carbonos unidos a grupos electroatrayentes o carbonos enlazados por enlaces múltiples resuenan a más bajo campo⁵⁸.

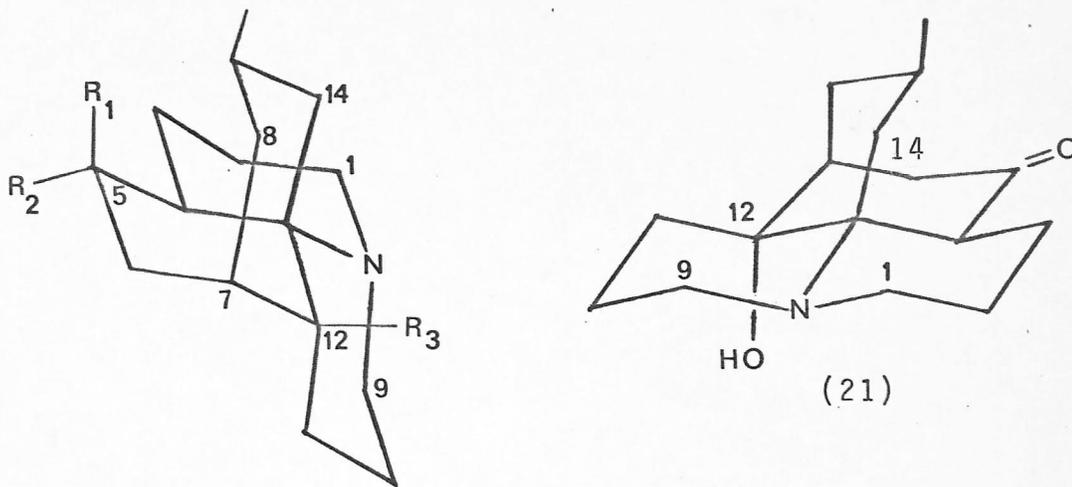
Los sistemas cíclicos de seis miembros, por efecto de sustituyentes y sus orientaciones geométricas, muestran importantes desplazamientos en las posiciones α , β y γ y ha sido establecido el carácter aditivo de tales efectos⁶⁰.

W.A. Ayer y colaboradores⁵⁶ han registrado los espectros de RMN¹³C de algunos alcaloides de Lycopodium de la familia de licopodina y usando técnicas standard han hecho asignaciones de los desplazamientos químicos de casi todos los carbonos, tal como se muestra en la Tabla 2.

Con excepción de los carbonos C 5 y C 13, cuyas resonancias fueron asignadas usando la teoría del desplazamiento químico, la protección de los carbonos de licopodina puede ser reunida en dos regiones del espectro; una que va desde 16 a 27 p.p.m y la otra desde 36 a 48 p.p.m. desde el TMS.

Ayer ubica, usando aproximaciones aditivas simples, en la primera región a los carbonos C2, C3, C10, C11, C15, y C16 y en la segunda a los carbonos C1, C9, C4, C6, C7, C8, C12 y C14.

TABLA 2

RMN ^{13}C de alcaloides tipo licopodinaLicopodina (1) $R_1+R_2=0; R_3=H$ β -dihidroliscopodina (22) $R_1=OH; R_2=R_3=H$ α -dihidroliscopodina (26) $R_2=OH; R_1=R_3=H$ Licodolina (27) $R_3=OH; R_1+R_2=0$ 12-epilicodolina (21)

	(<u>1</u>)	(<u>22</u>)	(<u>26</u>)	(<u>27</u>)	(<u>21</u>)
C1	47.2	47.1	47.2	46.2	48.0
C2	19.3	20.7	19.9	17.8	25.2
C3	20.1	23.5	19.9	19.8	18.7
C4	43.4	32.6	37.2	43.3	52.3
C5	213.4	68.5	71.5	212.1	210.5
C6	43.3	34.0	36.6	44.4	44.0
C7	37.3	35.6	36.3	40.8	40.9
C8	43.1	42.0	42.2	35.8	37.5
C9	47.8	47.4	47.2	46.2	48.7
C10	26.6	26.6	26.4	20.8	21.0
C11	25.7	25.0	24.8	30.3	30.3
C12	45.5	45.8	45.5	69.5	70.1
C13	59.9	55.2	56.8	61.6	62.5
C14	43.7	43.2	43.4	36.1	25.6
C15	25.8	23.5	28.9	24.3	24.6
C16	23.3	24.1	24.1	22.6	22.6

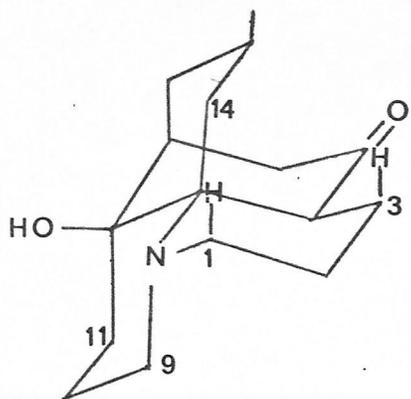
Estas asignaciones según Ayer, fueron hechas usando deuteración, analizando la multiplicidad de las señales que resultan de la aplicación de Sford y de desacoplamientos selectivos. A pesar que algunas asignaciones aparecen como tentativas, ellas parecen ser internamente consistentes.

Hay algunos hechos importantes que surgen de los resultados de RMN¹³C de esta serie particular de compuestos. La protección del carbono C15 podría reflejar, según Ayer, el efecto estérico general debido a la presencia de un sustituyente en el carbono C5. La protección encontrada para C15 en licopodina (1), β -dihidroliscopodina (22) y α -dihidroliscopodina (26) indican que la influencia estérica de un grupo carbonilo o de un grupo acetoxilo axial es intermedia a la ejercida por un grupo hidroxilo axial (protección) por una parte y un grupo hidroxilo ecuatorial (desprotección) por otra.

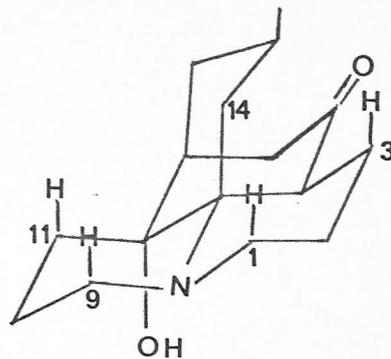
Ayer supone que este efecto podría ser una consecuencia de la ubicación de estos carbonos en el biciclo-[3,3,1] nonano. La proximidad de los carbonos C5 y C15 sería también la responsable de la distorsión de los anillos del biciclo observada en RMNP¹⁶.

Ayer observó también un dramático cambio en la protección del carbono C14 de licodolina (27) en comparación con 12-epilicodolina (21) alcaloide que muestra un cambio configuracional alrededor del carbono C12 y del átomo de nitrógeno. El carbono C14 en 12-epilicodolina, según Ayer, resulta más protegido que en licodolina porque, además de los

efectos de los protones axiales de los carbonos C1 y C3 sienten el efecto de protección de los protones axiales de los carbonos C9 y C11 que no afectan a C14 de licodolina.



(27)



(21)

Este notable cambio en la protección de C14 podría resultar, de acuerdo con Ayer, en una herramienta diagnóstica utilísima en la determinación -junto con U.V. e I.R.- de la configuración del átomo de nitrógeno para compuestos de estructura relacionada. Ayer, utilizando este nuevo antecedente, confirmó la estereoquímica de sauroxina (17) comparando el desplazamiento del carbono C14 con el de su epímero α -obscurina⁵⁶.

Hemos calculado el corrimiento químico de los carbonos afectados por la introducción de un grupo OH ecuatorial en el carbono 8 de licopodina, usando los valores para los desplazamientos químicos asignados por Ayer para licopodina y los cambios en los mismos debido a la sustitución en las posiciones α , β y γ propuestos por J.D. Roberts⁶¹.

Este autor ha señalado que en posiciones α y β el

grupo hidroxilo ecuatorial produce una desprotección adicional de 43.2 y 8 p.p.m. respectivamente, mientras que esta sustitución protege la posición γ en 1.1 p.p.m.

Los valores calculados para clavolonina (8- α -hidroxilicopodina) se muestra en la Tabla 3 y figura 4 junto a los de licopodina y de clavolonina encontrados por Ayer.

Tabla 3

Cálculo de desplazamiento químico de algunos carbonos de clavolonina. (en p.p.m.).

	licopodina	clavolonina (calc.)	clavolonina (exp.)	(δ cal.- δ exp.)
Carbono 8	43,1	86,3	79,9	7,4
15	25,8	33,8	33,0	0,8
7	37,3	45,3	43,1	2,2
16	23,3	22,2	19,4	2,8
14	43,7	42,6	42,0	0,6
12	45,5	44,4	43,9	0,5
6	43,3	42,2	36,5	5,7

Con excepción del carbono C8 que lleva el hidroxilo y por tanto fácilmente ubicable y el carbono C6, el resto de los carbonos muestran desplazamientos químicos que concuerdan estrechamente con los valores calculados.

Las diferencias observadas, excepto C8 y C6, caen en un rango de 0.5 - 2.8 p.p.m.

Estos resultados podrían sugerir la posibilidad de hacer asignaciones tentativas de los desplazamientos químicos

de los carbonos constituyentes de alcaloides que tienen el esqueleto de lycopodina, al disponer de un espectro totalmente desacoplado (noise decoupling) usando como base las asignaciones realizadas por W.A. Ayer y los efectos de sustitución pertinentes.

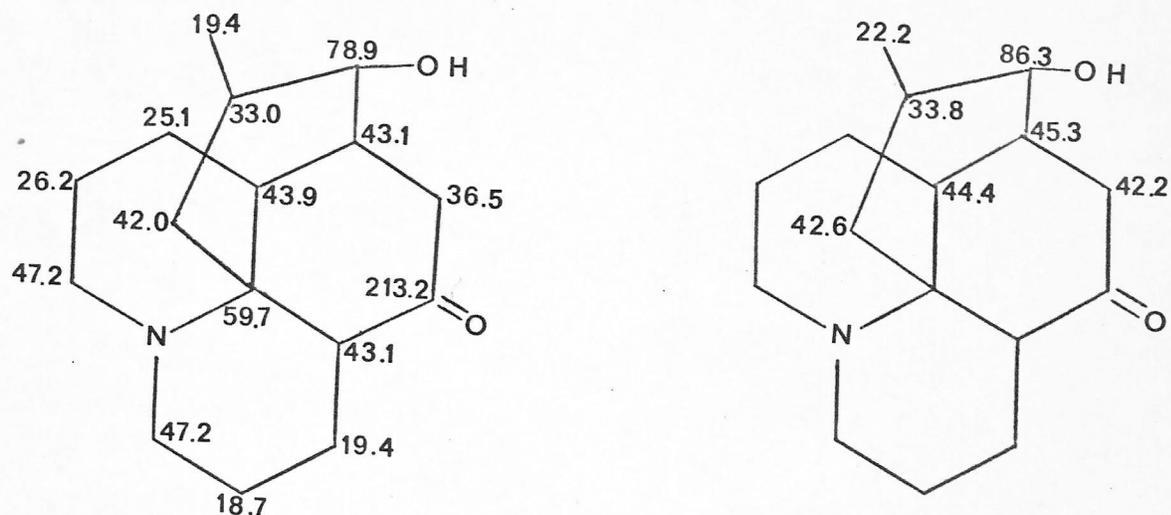
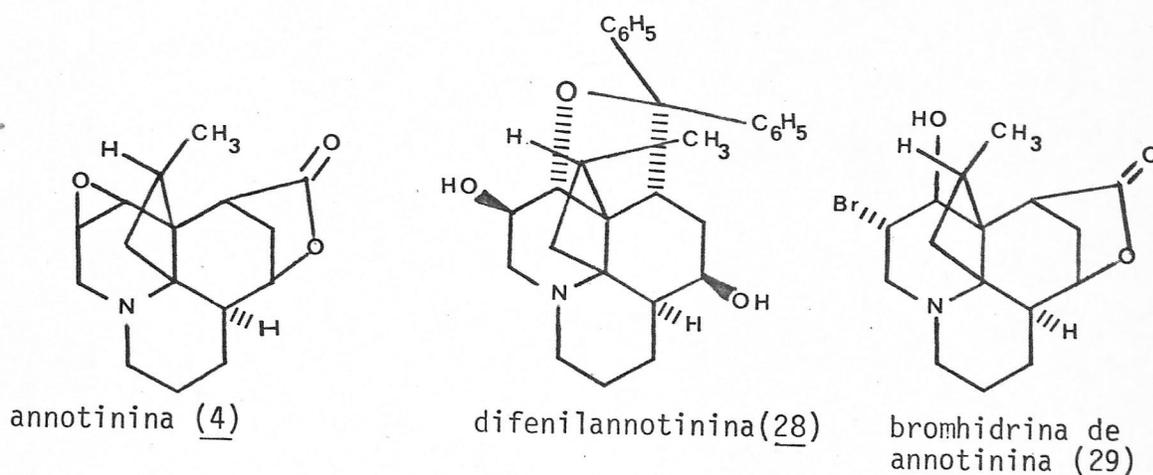


Figura 4. RMN ^{13}C de clavolonina. a) asignación de Ayer⁵⁶ y b) cálculo desde lycopodina

Las determinaciones de las estereoquímicas relativas y absolutas de alcaloides de Lycopodium han significado una fructífera combinación de resultados químicos y análisis espectroscópicos.

Las determinaciones de las configuraciones relativas de algunos centros asimétricos en alcaloides aislados en cantidades relativamente importantes han sido llevadas a cabo junto con los trabajos estructurales. Algunos de éstos son ejemplos

de brillantes deducciones químicas que posteriormente han sido plenamente confirmadas por técnicas más sofisticadas. Así, por ejemplo, la estereoquímica de todos los centros asimétricos de annotinina, con excepción de C15, se obtuvo por consideraciones químicas⁶²⁻⁶⁵.

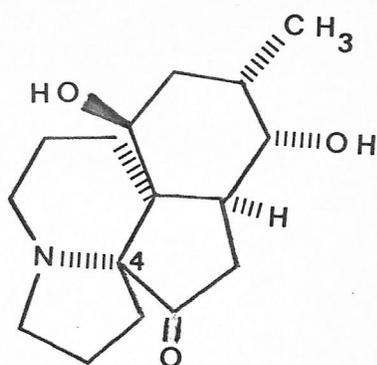


La configuración relativa de C15 se determinó analizando el importante efecto protector de a lo menos un anillo bencénico sobre el grupo CH₃ observado en el espectro de RMNP del derivado difenil annotinina (28)⁽⁶⁶⁾.

El análisis de Rayos-X de bromhidrina de annotinina (29)⁽⁶⁷⁾ no solamente confirmó todos los aspectos estructurales y las asignaciones estereoquímicas derivadas de esos trabajos, sino que también estableció la estereoquímica relativa de C15.

Otro interesante ejemplo se encuentra en los trabajos realizados por Inubushi y colaboradores en las determinaciones

estereoquímica de serratinina (5) y alcaloides relacionados. El análisis de los resultados de una serie de reacciones químicas permitió a los autores resolver la totalidad de los problemas estereoquímicos planteados por serratinina y derivados^{32,33}.

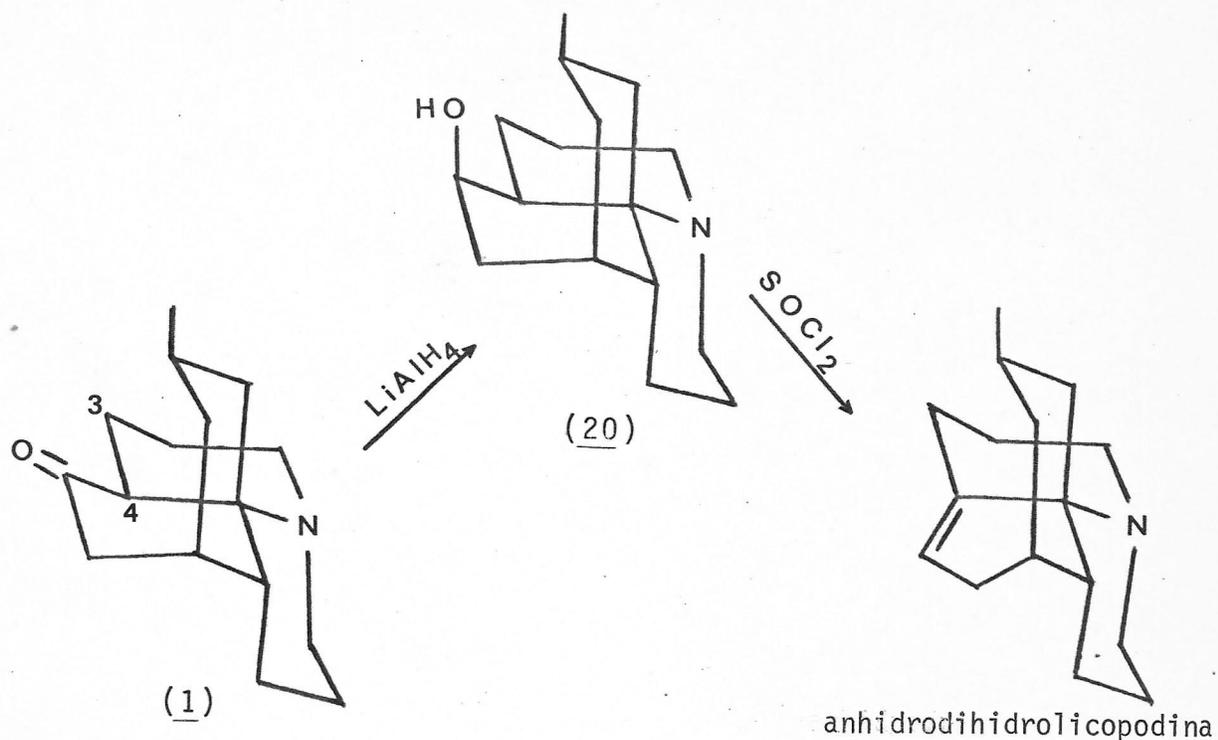


(5)

Con la sola excepción de la orientación del enlace N-C4, todas las deducciones logradas fueron confirmadas completamente por análisis de Rayos-X⁽⁶⁸⁾. La estereoquímica correcta de serratinina se muestra en (5).

De igual manera, los intensos trabajos degradativos realizados en licopodina llevaron a proponer su estereoes-
 tructura. La ausencia de bandas de Bohlmann en el espectro IR de licopodina indujo a pensar que la orientación del átomo de hidrógeno en el carbono 12 debía ser ecuatorial y cis al anillo puente. La 12-epilicopodina, contrariamente, muestra importantes bandas de Bohlmann en su IR. La

configuración del carbono 15 fue establecida por Anet al correlacionar los alcaloides annofolina, acrifolina y licopodina⁶⁹.



En torno a la configuración del carbono C4, aunque no fue rigurosamente establecida, se supuso que el enlace C3-C4 debía ser ecuatorial debido a la gran estabilidad a la isomerización de licopodina en medio ácido o básico. Por otro lado, el producto de reducción de licopodina con hidruro de aluminio y litio, dado el impedimento estérico del anillo puente, debe ser el alcohol con el grupo hidroxilo orientado axialmente: β -dihidrolicopodina (20)^(47,70). Este derivado se deshidrata aún en condiciones muy suaves (por ejemplo, con cloruro de tionilo) generando una olefina, cuyo espectro de RMNP muestra la presencia de un hidrógeno

olefínico indicando, en consecuencia, que esta deshidratación ocurre entre el carbono 5 (OH) y el carbono 4 (H)⁽⁶⁹⁾. La facilidad de la deshidratación debe involucrar que los grupos salientes están transdiaxialmente orientados^{69,70}. Avala esta suposición que fija la configuración del carbono 4, el hecho que el producto de reducción de licopodina con metal y amoníaco no se deshidrata ni siquiera en condiciones mucho más drásticas (por ejemplo, con P_2O_5 en reflujo). Este alcohol (α -dihidroliscopodina) debe tener el grupo hidroxilo en la orientación más estable: la ecuatorial^{16,69,70}.

Obviamente, las configuraciones relativas de un gran número de alcaloides han sido definidas luego de una correlación química con licopodina. Este es el caso de: licodolina⁴⁷, flabelliformina⁴⁶, licodina^{28,43}, etc.

La utilización de técnicas de difracción de rayos X ha permitido confirmar algunas estructuras propuestas^{67,68,71} y elucidar las de algunos alcaloides obtenidos en pequeñas cantidades^{23,37,41,72,73}.

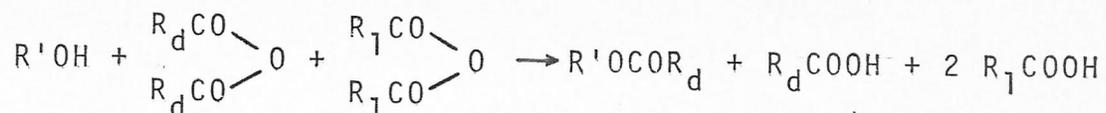
Así como la determinación de la configuración relativa de los centros quirales incluye trabajos degradativos, correlaciones y análisis espectroscópicos, la determinación de la configuración absoluta de alcaloides de Lycopodium ha implicado también la utilización de técnicas físico-químicas y métodos químicos. Entre los primeros es conveniente mencionar el análisis de las curvas de dispersión óptica rotatoria (DOR) y de dicroísmo circular.

Entre las técnicas químicas figuran el "método o regla del benzoato" y el "método de Horeau" que por ser aplicados en este trabajo deben ser comentados brevemente.

El método de Horeau o del desdoblamiento parcial relaciona, empíricamente, la configuración absoluta de un alcohol secundario ópticamente activo con la esterificación preferencial por una de las antípodas ópticas del ácido α -fenil butírico racémico⁷⁴⁻⁷⁶. Este método está basado en las diferencias de reactividades debido a los impedimentos estéricos de los sustituyentes del carbinol.

Un enantiomorfo A puede reaccionar con distinta velocidad con cada uno de los antípodas ópticos d y l de otro compuesto B. Esto es, si se mezclan en reacción "una molécula de A con una de d y una de l, o sea con dos moléculas racémicas de B" se debe esperar encontrar al final de la reacción en la parte no combinada, un exceso de uno de los antípodas en relación al otro.

En una esterificación por ejemplo, si se hace reaccionar un alcohol con cloruro de ácido α -fenil butírico racémico (o mejor aún, con el anhídrido correspondiente) se debe esperar que, en la porción no esterificada, se encuentre un exceso de un ácido ópticamente activo, tal como se ilustra en la siguiente ecuación, en que suponemos que el alcohol R'OH reacciona preferencialmente con el anhídrido $(R_d CO)_2O$.



La actividad óptica del producto debe corresponder al mostrado por el ácido R_1COOH .

De este modo, conociendo la configuración absoluta del antípoda que aparece-debido a la actividad óptica observada en la porción no combinada- y por lo tanto la configuración del que reacciona preferentemente, se puede deducir la configuración absoluta del alcohol.

La esterificación se lleva a cabo en piridina con un exceso de anhídrido α -fenil butírico racémico. El rendimiento de esterificación es calculado después de una hidrólisis selectiva del anhídrido de exceso con exclusión del éster formado y titulación del ácido con hidróxido de sodio (ver parte experimental, página 88). Esta solución acuosa se agita con benceno para separar la sal sódica del ester. El ácido de la sal es liberado por acidificación. El poder rotatorio de este último permite encontrar por aplicación de una regla simple, la configuración absoluta. "Si el ácido obtenido es levógiro, el alcohol secundario tiene tal configuración absoluta que escrito en proyección de Fischer el grupo OH está abajo, el H arriba y el grupo estéricamente más voluminoso (grupo L) se encuentra a la derecha".

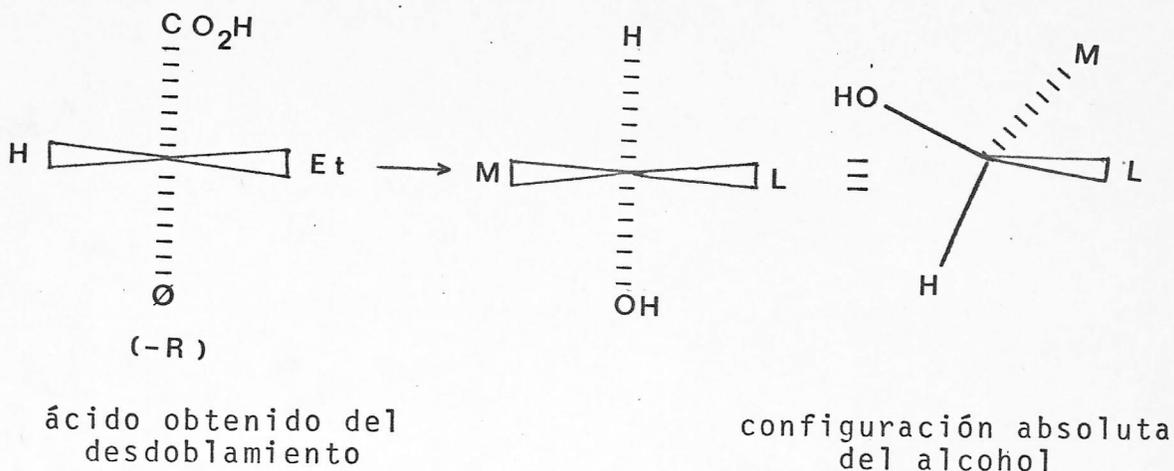
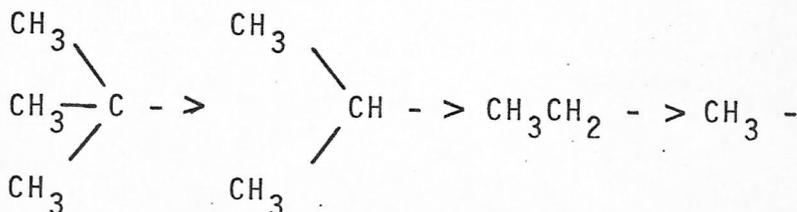


Figura 5. "Regla de Horeau"

La aplicación de esta "regla de Horeau" ha sido intensa y ha mostrado una muy buena concordancia con los resultados obtenidos con otros métodos.

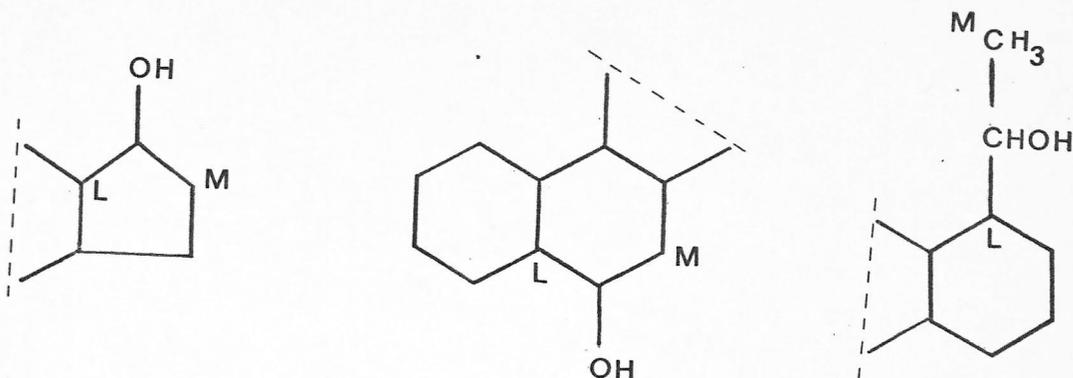
Los rendimientos ópticos (20-70%) son tanto más altos cuanto más importantes son las diferencias en las restricciones estéricas que imponen los grupos vecinos al carbono carbonilo.

La experiencia de Horeau en la aplicación de su método, ha permitido hacer una clasificación de la voluminosidad de los grupos alquílicos en orden decreciente⁷⁶.



En la serie alicíclica se debe considerar la correspondiente analogía. Esto permite, con la ayuda de modelos

moleculares, asignar los grupos L ("más grande") y M ("más pequeño"). Así por ejemplo:



El método pierde precisión cuando los sustituyentes del alcohol no presentan grandes diferencias estéricas; esto se manifiesta en un bajo valor del rendimiento óptico. En tales casos los resultados obtenidos con la aplicación del método deben ser considerados cuidadosamente⁷⁵.

Experimentalmente, el método implica el uso de pequeñas cantidades del alcohol por cuánto el ácido α -fenil butírico posee una actividad óptica importante, $[\alpha]_D = \pm 96.5^\circ$.

La idea básica del método de Horeau se ha extendido, en su aplicación, a otros grupos funcionales: aminas primarias y secundarias, alcoholes primarios deuterados⁷⁷ o simplemente en el mejoramiento de técnicas de análisis de productos usando cromatografía de gases⁷⁸, por ejemplo.

Finalmente, debemos decir que el método de Horeau ha sido aplicado en la determinación de configuraciones absolutas de alcaloides de Lycopodium: cernuina³⁵, β y α -dihidroliscopodina⁴⁸, con resultados coincidentes con otros métodos.

Otro método usado para determinar la configuración absoluta de un alcohol secundario es la denominada "regla del benzoato"⁽⁷⁹⁾. Esta "regla del benzoato" es una extensión de la regla de Mills, una extensión de la regla de Freudenberg o regla de ftalato ácido y una aplicación de la "reglas de disimetrías conformacionales" de Brewster⁸⁰.

Si la actividad óptica de una molécula se debe a las contribuciones de cada uno de sus centros quirales y si uno de ellos es modificado por cambios conformacionales, la actividad óptica de la molécula debe sufrir alteraciones.

El análisis de Brewster ("regla de benzoato") considera los cambios conformacionales que sufre un grupo carbinol secundario por efecto de una benzoilación y su consecuencia en la actividad óptica teniendo en cuenta, fundamentalmente, los requerimientos estéricos de los sustituyentes del carbinol y las polarizabilidades de los mismos.

Un éster benzoato derivado de un alcohol secundario ópticamente activo tenderá a adoptar aquella conformación plana en la cual los efectos de resonancia entre el grupo fenilo y carbonilo sean máximos y los impedimentos estéricos entre el grupo fenilo y los sustituyentes del carbono alcóhólico sean mínimos. El átomo de oxígeno del grupo carbonilo tiene requerimientos estéricos apreciables y tenderá a alinearse de forma tal que quede flanqueado por los dos grupos sustituyentes más pequeños del alcohol. Así entonces,

el benzoato derivado de un alcohol de configuración absoluta indicada en (31) de la figura 6, deberá adoptar las conformaciones posibles (32) o (33)

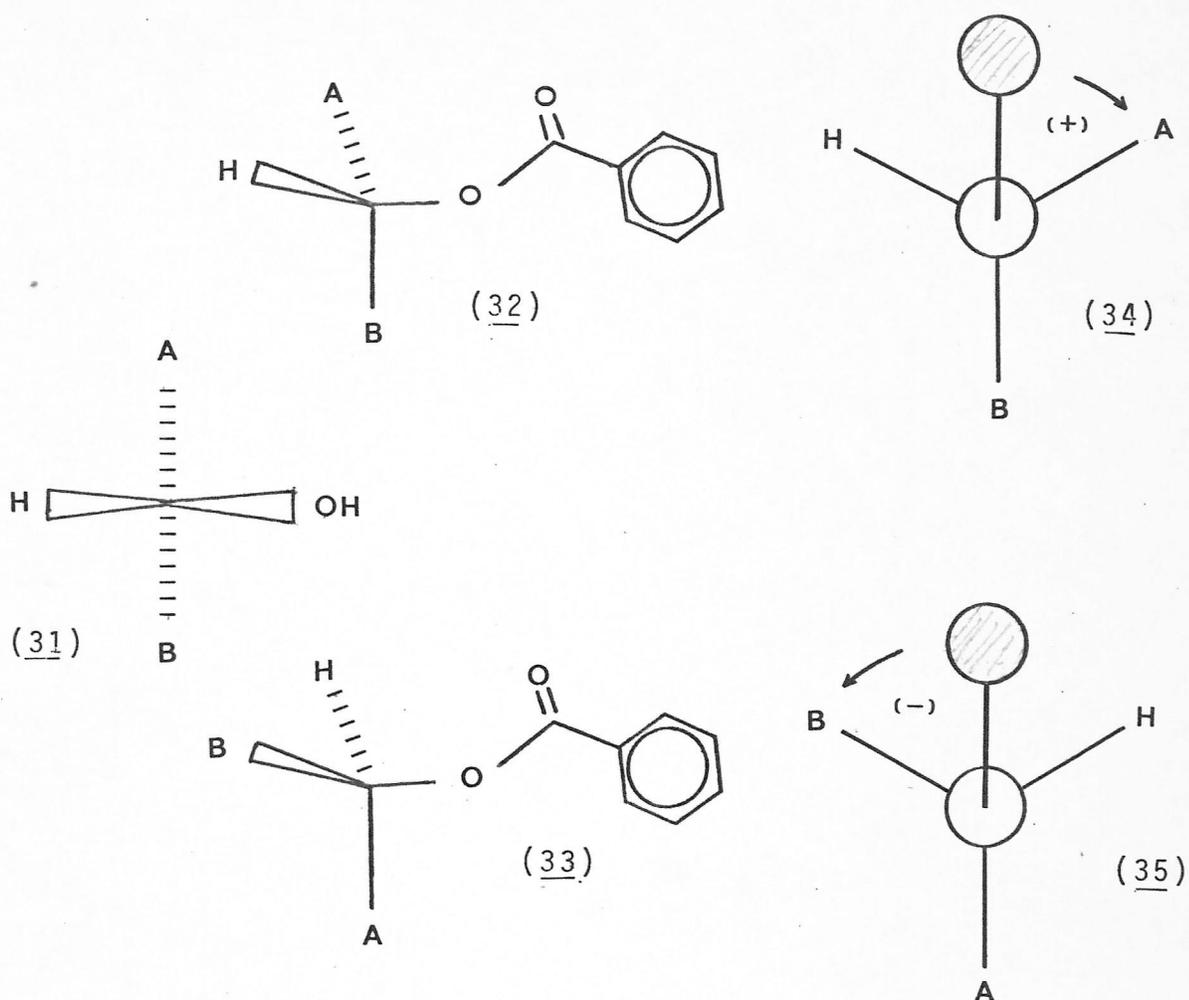


Figura 6. "Regla del benzoato".

La conformación preferida (32) o (33), que no existe en el alcohol original, dependerá de las diferencias estéricas entre los grupos A y B. Debido a que A y B son siempre más polarizables que el átomo de hidrógeno, la conformación (32) mostrará un desplazamiento dextrorrotatorio

mientras que la (33) mostrará un efecto levorotatorio relativo al alcohol. La idea es esquematizada en (34) y (35) que representan las conformaciones del éster a lo largo del eje C-O y el círculo oscuro representa el eje 1-4 del anillo bencénico.

Si A y B son grupos estéricamente semejantes las conformaciones (32) y (33) deben coexistir y, en consecuencia, el poder rotatorio del benzoato será similar al del alcohol original.

Si los grupos A y B presentan gran diferencia en sus requerimientos estéricos, una conformación se verá favorecida. Si A es el grupo menos voluminoso, un grupo pequeño (S), entonces la conformación (32) será predominante y el benzoato será más dextrorotatorio que el alcohol. La diferencia de la actividad óptica molecular será positiva:

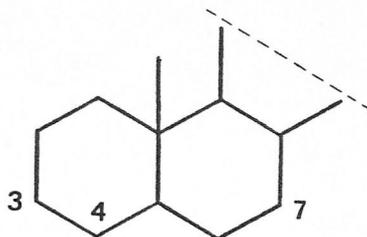
$$\Delta = \phi_{\text{benz.}} - \phi_{\text{alc.}} > 0$$

La magnitud de esta diferencia reflejará la diferencia estérica entre los sustituyentes A y B.

En consecuencia, si experimentalmente se encuentra que el benzoato derivado de un alcohol secundario muestra un poder rotatorio molecular significativamente más dextrógiro que el alcohol mismo, se debe aceptar que la configuración absoluta de éste debe ser la que en proyección de Fischer se muestra en (36), donde S y L representan los grupos menos y más voluminosos respectivamente.

Tabla 4

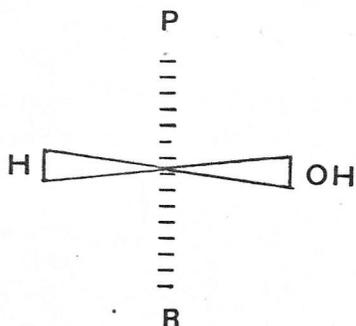
Ejemplos de aplicación de la regla del benzoato



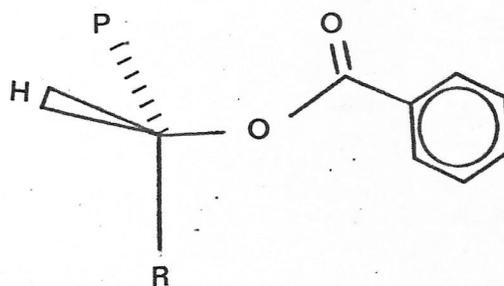
		α			β		
		$\phi_{alc.}$	$\phi_{benz.}$	Δ	$\phi_{alc.}$	$\phi_{benz.}$	Δ
A	C3	97	114	17	90	98	8
B	C4	12	-98	-110	113	280	167
C	C7	43	-108	-151	202	428	226

Como se indicó antes, también es necesario considerar las polarizabilidades de los sustituyentes.

Análogamente, un centro asimétrico como el (39) que lleve un sustituyente P (grupo más polarizable) y un grupo R (grupo menos polarizable), por benzoilación mostrará un



(39)



(40)

desplazamiento dextrorrotatorio por efecto del predominio de la conformación (40).

Es posible que se presente el problema que las consideraciones de polarizabilidad induzcan a una configuración absoluta contraria a la derivada usando razones estéricas. Esta situación se presenta cuando los sustituyentes del carbono alcóhólico muestran gran diferencia en sus polarizabilidades y en estos casos las consideraciones de polarizabilidades son predominantes⁷⁹.

Inubushi ha aplicado esta "regla del benzoato" a un alcaloide de Lycopodium, 8-episerratinina (41)* y dado que las polarizabilidades de los sustituyentes son similares las conclusiones son regidas por consideraciones estéricas exclusivamente³²⁻³³.

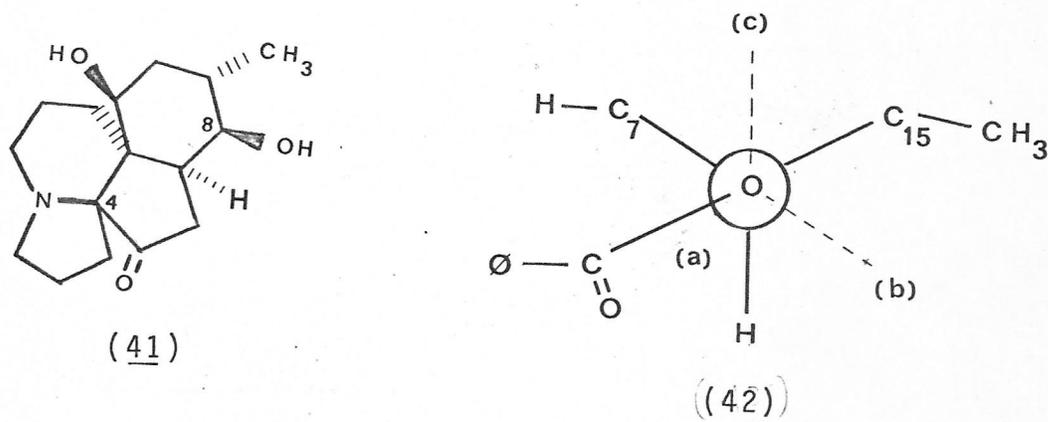


Figura 7. Aplicación de la Regla del benzoato a 8-episerratinina

* La configuración del enlace N-C4 fue corregida posteriormente⁶⁸.

El análisis de las conformaciones (a, b y c) para el benzoato (42) indujo a Inubushi a descartar las posibilidades b y c por parecer menos favorecidas al mostrar interacciones 1,3-diaxiales.

El confórmero a predice un benzoato más dextrorrotatorio. Experimentalmente, Inubushi encontró una diferencia de actividad óptica de:

$$\Delta = \phi_{\text{benz.}} 212.06 - \phi_{\text{alc.}} + 77.66 = + 134.40^\circ$$

que está de acuerdo con la predicción, implicando que la configuración absoluta del carbono 8 en 8-episerratinina corresponde al mostrado en (41) y de forma R.

En el presente trabajo, aplicamos la regla del benzoato para averiguar la configuración absoluta de paniculatina.

Los métodos químicos usados para la determinación de la estereoquímica absoluta implicando directa o indirectamente la necesidad de disponer de moléculas patrones de configuración conocida.

Sin embargo, desde que instrumentalmente fue posible registrar las curvas de dispersión óptica rotatoria (DOR) y dicroísmo circular (DC), 1953 y 1961 respectivamente, éstas técnicas han mostrado ser herramientas únicas en el estudio de la quiralidad de moléculas ⁸¹.

Si una sustancia ópticamente activa absorbe en la región ultravioleta no solamente exhibirá dicroísmo circular

sino que también mostrará una curva anómala de DOR. Una curva anómala de DOR es aquella que presenta máximo (peak) y mínimo (trough). Una curva con efecto Cotton positivo muestra el máximo a mayor longitud de onda que el mínimo.

Djerassi, Klyne y sus colaboradores han estudiado extensamente las curvas de DOR de un gran número de compuestos. El estudio de ciclohexanona y los efectos de distintos sustituyentes en las curvas de DOR llevó a Djerassi a proponer su conocida "regla de octantes" que permite predecir el signo del efecto Cotton⁸²⁻⁸⁷.

El carbonilo de ciclohexanona - cromóforo inherentemente simétrico - que absorbe débilmente a alrededor de 300 nm como consecuencia de la transición $n \rightarrow \pi^*$ es afectado por la orientación espacial de los sustituyentes.

Una aplicación de la regla de octantes implica dividir el espacio en torno al grupo CO de la ciclohexanona, en su conformación más estable, en ocho octantes por efecto de la aplicación de tres planos mutuamente perpendiculares. (figura 8).

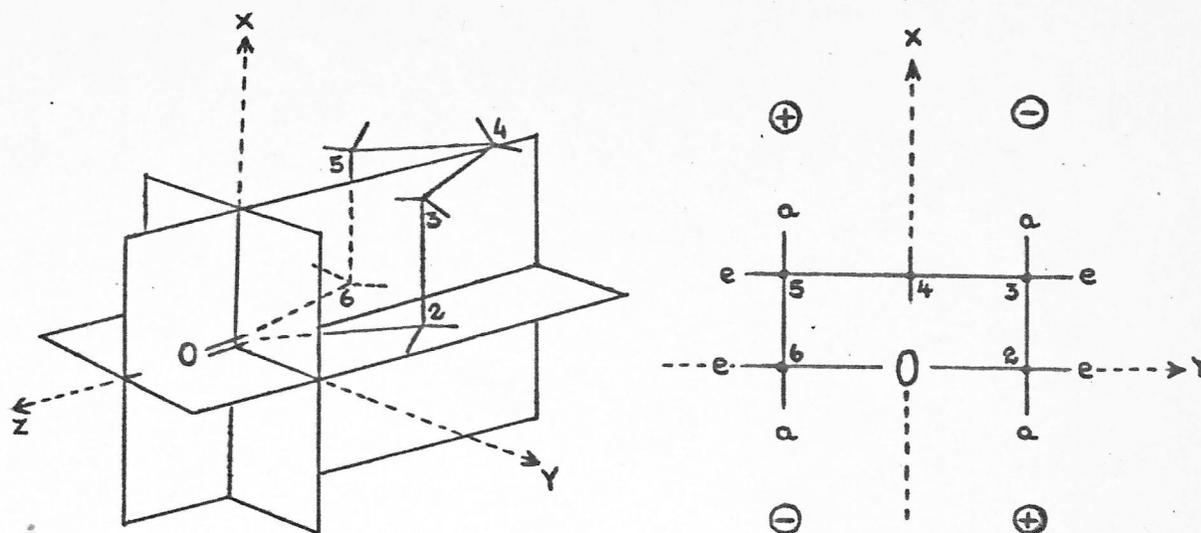


Figura 8. Regla de octantes.

La molécula es mirada desde el átomo de oxígeno hacia el carbono del carbonilo. El anillo aparece en octantes posteriores y una proyección de octantes aparece en la figura 8.

La regla de octantes establece que:

- 1) Los sustituyentes en los octantes posteriores superior izquierdo e inferior derecho hacen contribuciones positivas al efecto Cotton.
- 2) Los sustituyentes de los octantes posteriores superior derecho e inferior izquierdo hacen una contribución negativa al efecto Cotton.
- 3) Los sustituyentes que residen en algunos de los planos que dan los octantes no tiene contribución al efecto Cotton.

4.- Los sustituyentes de los octantes anteriores hacen contribuciones opuestas a las indicadas en 1 y 2.

En consecuencia, si se conoce la conformación de una ciclohexanona entonces, por aplicación de la regla del octante y la curva de DOR se puede determinar su configuración absoluta.

Por otra parte, Djerassi observó que un átomo de cloro o bromo unido en posición α ecuatorial en la ciclohexanona prácticamente no afecta al efecto Cotton, pero cuando el sustituyente halógeno (cloro o bromo) está en posición α axial genera un cromóforo $\begin{array}{c} -C - C - \\ || \quad | \\ O \quad X \end{array}$ que llega a ser domin

nante y controla por sí solo el signo del efecto Cotton. Este efecto constituye la "regla de la α -haloaxialcetona" que puede ser definida como sigue: "Si el anillo de la ciclohexanona se coloca de modo que el átomo de carbono del carbonilo esté a la cabeza de la silla y miramos a lo largo del enlace O - C (figura 9) y el átomo de halógeno ocupa la posición (X) a la derecha del observador el efecto Cotton será positivo, si el halógeno está a la izquierda (X') el efecto será negativo."

La aplicación de esta regla de halocetona en la determinación de la configuración absoluta es independiente de la regla del octante y complementaria con ella.

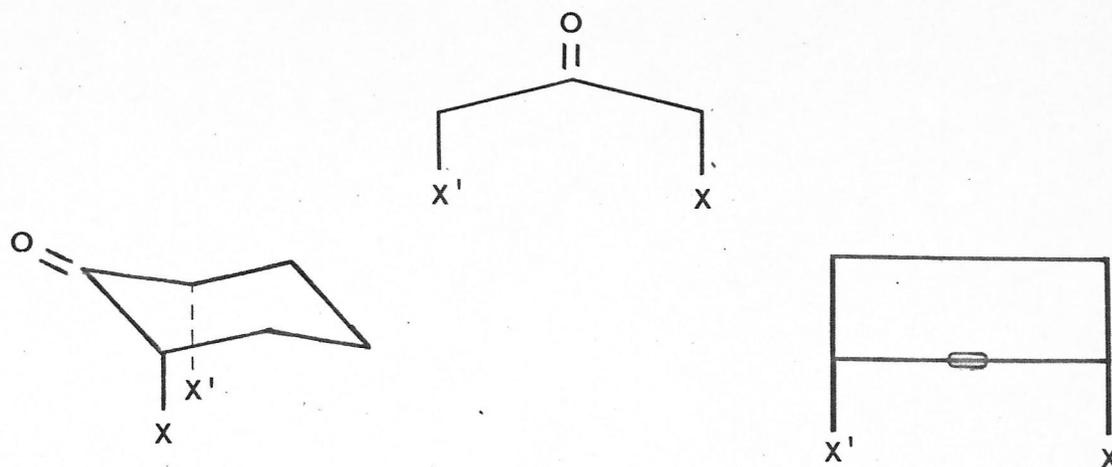


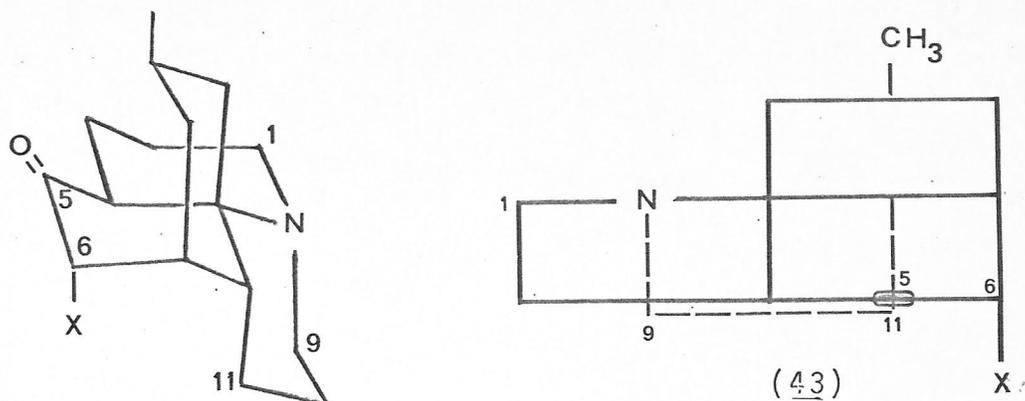
Figura 9. Regla de la α -haloaxialcetona.

Sin embargo, se requiere un conocimiento exacto de la orientación axial o ecuatorial del átomo de halógeno y de la posición α ó α' .

Estos antecedentes se pueden obtener por espectroscopía ultravioleta o espectroscopía infrarroja⁹⁰⁻⁹¹.

La configuración absoluta de varios alcaloides de Ly copodium ha sido determinada aplicando la regla de octantes: lucidulina²³, cernuina³⁵, licopodina⁴⁸, serratinina^{32,33} etc. La comparación de las curvas de DOR ha llevado a determinar la estereoquímica de otras bases relacionadas con las anteriores. El caso planteado por licopodina merece especial mención.

Se ha concluido que la configuración absoluta de licopodina corresponde a la indicada en (1 X = H) de la figura 10, usando los resultados coincidentes de varios métodos independientes^{48, 65, 70}.



- (1) Licopodina X = H
 (44) 6 α -bromo -
 licopodina X = Br

Fig. 10. Aplicación de la regla de octantes a licopodina y 6- α -bromo derivado.

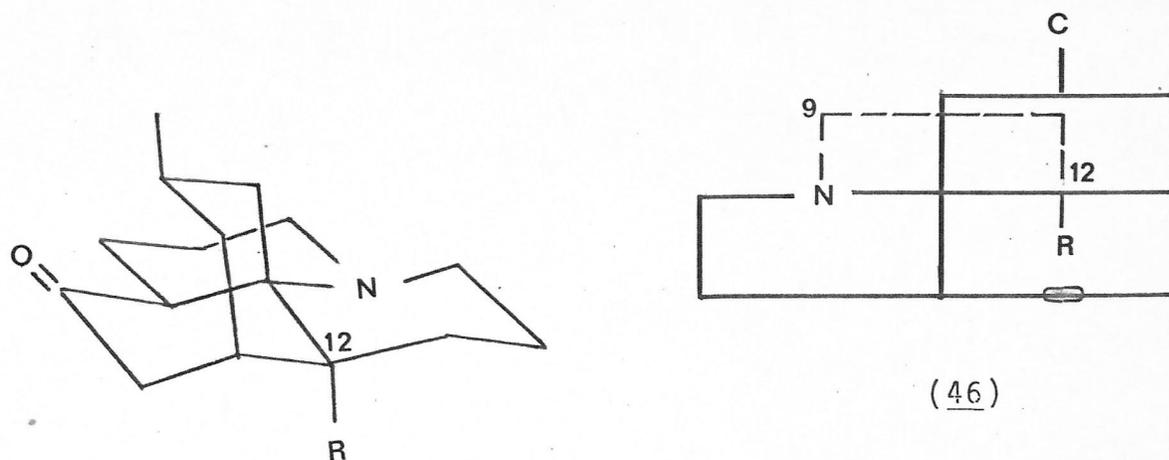
- 1.- En DOR, licopodina muestra un efecto Cotton positivo con extremos a 306 y 271 nm. y una amplitud $a = +170$. La aplicación de la regla de octantes a la estereoestructura (1 X = H) está de acuerdo con el signo del efecto Cotton observado como se muestra en el diagrama (43 X=H figura 10).
- 2.- En DOR, el derivado 6 α -bromolicopodina⁹² muestra un efecto Cotton positivo con extremos a 335 y 294 nm. y una amplitud $a = +295$. La aplicación de la regla de la α -haloaxialcetona a la estereoestructura (44 X = Br) con - cuerda con el signo del efecto Cotton observado, tal como se muestra en (43 X = Br).
- 3.- La aplicación del método de Horeau (página 88) a α y β -

dihidroliscopodina⁴⁸, proporciona resultados que ratifican que la configuración absoluta de licopodina corresponde a (1 X = H).

- 4.- Finalmente ha sido confirmada la estereoestructura (1 X = H) como la antípoda natural de licopodina por estudios de rayos X llevados a cabo con el hidrocloruro derivado⁷¹.

Así entonces, al quedar perfectamente establecida su estereoquímica absoluta, todas las correlaciones realizadas con licopodina son válidas.

Sin embargo, las curvas de DOR deben ser interpretadas cuidadosamente⁴⁸, por cuanto una discrepancia no explicable aún se presenta al analizar las curvas de 12-epilicopodina (45, R = H), de 12-epilicodolina (21, R = OH) y de las sales de licopodina⁴⁸. 12-epilicodolina se correlacionó con licopodina, mostrando que ambas bases pertenecen a la misma serie enantiomérica⁴⁸.



12-epilicopodina (45 R = H)

12-epilicodolina (21, R = OH)

Figura 11. Aplicación de la regla de octantes a 12-epilicopodina y 12-epilicodolina

La aplicación de la regla de octantes a las estructuras (45) y (21) predice un efecto Cotton positivo tal como se muestra en el diagrama (46). Sin embargo, las curvas de DOR de estos compuestos y las de sus sales muestran un efecto Cotton negativo.

Tal como nos muestra la tabla 5, los estudios de di-croísmo circular en licopodina y alcaloides relacionados muestran que estas bases desarrollan dos efectos Cotton.

TABLA 5

DOR y CD de algunos alcaloides tipo licopodina.

DOR	CD		
	(a)	$\Delta\epsilon$	(λ nm.)
Licopodina	+170	+11.700	(288)
		-16.200	(223)
Licopodina +HCl	- 28	- 2.050	(290)
Licodolina	+198	+10.900	(292)
		-16.350	(230)
Licodolina +HCl	- 39	- 2.850	(288)
12-epilicopodina	- 51		
12-epilicopodina + HCl	- 36		
12-epilicodolina	- 68	- 4.230	(287)
12-epilicodolina +HCl	- 32	- 2.470	(292)

En licopodina se observa un efecto Cotton positivo a 288 nm. y uno negativo a 223 nm. El primero asociado a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del carbonilo y el segundo al cromóforo constituido por los orbitales paralelos que forman el sistema β -aminocetona ya discutido en página 8.

La protonación del átomo de nitrógeno elimina el efecto Cotton a menor longitud de onda e invierte el signo del que ocurre a longitud de onda mayor.

12-epilicodolina por su parte, muestra solo un efecto Cotton negativo centrado a 287 nm.

Parece ser que el signo del efecto Cotton depende de la configuración del carbono 12 y del átomo de nitrógeno y solamente en el caso de las bases libres con la configuración de licopodina, la regla de octante lo predice correctamente⁴⁸.

No obstante la dificultad planteada, las curvas de DOR han sido empleadas en alcaloides de Lycopodium en estudios conformacionales⁴⁸ y en la ubicación de grupos carbonilos en otros carbonos del esqueleto de licopodina C6 y C8, por ejemplo^{16, 54, 70}.

En la actualidad estos alcaloides de Lycopodium son objetos de intensos estudios estructurales, biosintéticos y sintéticos⁷.

En el laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, además de Lycopodium paniculatum Desvaux, objeto de nuestro estudio, han sido analizadas las especies L. magellanicum^{93,94} y L. gayanum⁹⁵. En la actualidad se está estudiando L. confertum.

Nuestro interés, que comenzó con estudios preliminares en 1971⁹⁶, se ha dirigido a la aislación y resolución de los problemas estructurales planteados por los alcaloides obtenidos en pequeña cantidad desde los extractos básicos

de L. paniculatum.

Lycopodium paniculatum Desvaux (fam. Lycopodiáceas, div. pteridofita) es conocido en el sur del país (provincias de Valdivia y Osorno) como: palmo, palmito, verde, etc. y es utilizado frecuentemente en adornos y arreglos florales.

El estudio químico que aquí se informa, forma parte del análisis de las especies de Lycopodium chilenos. De las especies nativas sólo restan por analizar L. chonoticum y L. fueganum, cuya abundancia y distribución geográfica es muy restringida 13b.

En el presente trabajo deseamos exponer la investigación realizada con el material botánico recolectado en la provincia de Osorno en Octubre de 1973 (29 Kg.) y Octubre de 1975 (50 Kg.)

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. APARATOS, METODOS Y MATERIALES

Los espectros de masa (EM) se tomaron en un espectrómetro de masa CE21-110 B o en un VARIAN CH7 a un potencial de ionización de 70 - 80 eV y a una corriente de ionización de 100 mA. La muestra se introdujo a la fuente iónica a temperatura ambiente y se calentó gradualmente o bien se introdujo a la fuente ya precalentada a la temperatura que se indica en cada caso. Los espectros han sido graficados en términos de la intensidad de cada señal con relación a la más intensa que ha sido asignada como 100%.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMNP) se han registrado a 60 MHz en un instrumento VARIAN T-60, a 100 MHz en un instrumento VARIAN HA 100 o a 220 MHz en un VARIAN HR 220*.

Se usó soluciones clorofórmicas y Tetrametilsilano (TMS) como standard interno. En el análisis de protones lábiles o de efectos de protonación se añadió a la solución clorofórmica 2 o 3 gotas de D_2O o de CD_3COOD , respectivamente.

El corrimiento químico de los protones se ha referido en δ (p.p.m.) desde el TMS y la multiplicidad de las señales se ha denotado como s (singlete), d (doblete), t (tripleto)

*Tomado en Canadian NMR Centre, Sheridan Park, Ontario

sext (sexteto) o m (multiplete); $a_{1/2}$ denota el ancho (Hz) de una señal a la mitad de su altura.

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en pastilla (KBr), suspensión (Nujol) o en soluciones (CHCl_3 o CCl_4) en un instrumento Perkin Elmer 621, o 700 o en un Beckmann IR5.

Los espectros ultravioleta (UV) se registraron en un espectrofotómetro CARY 17 usando etanol como solvente.

Los espectros de dispersión óptica rotatoria (DOR) se obtuvieron en un espectropolarímetro Perkin Elmer 241 o 141 en soluciones etanólicas en cubetas de 1 cc. de capacidad y de 1 dm. de longitud, usando lámparas de mercurio y/o deuterio.

Los espectros se han graficado usando la rotación molecular ϕ v/s longitud de onda (nm) y la amplitud (a) del efecto Cotton ha sido calculada según la ecuación $a = \phi_2 - \phi_1 / 100$ donde ϕ_2 y ϕ_1 , son las rotaciones moleculares observadas a mayor y menor longitud de onda respectivamente⁸¹.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C fueron determinados en un instrumento Bruker WH90 a 22.62 MHz o en instrumento VARIAN CFT-20 a 20 MHz en soluciones clorofórmicas y usando TMS como standard interno. Con excepción de paniculatina los espectros fueron registrados con total desacoplamiento ("noise decoupled") y el número de registros se indica para cada caso.

En los experimentos de difracción de Rayos-X se usó un cristal de hidrobromuro de paniculatina 0.02 x 0.02 x 0.04 cm y un difractómetro automático Syntex PĪ con radiaciones MoK_α de longitud de onda $\lambda = 0.71069 \text{ \AA}$ monocromatizadas por grafito.

Los puntos de fusión (pf) se midieron en un microscopio con placa calefactora E. Leitz y no fueron corregidos.

En cromatografía de gases (c.g.) se usó un instrumento Perkin Elmer 900 con detector de ionización de llama y nitrógeno como gas transporte a un flujo de 30 ml/min. medido a la salida de las columnas. De preferencia se usó columnas de vidrio de 6 pies de largo y 1/8 de pulgada de diámetro interior empacadas con OV 17 (3%) u OV 1 (3%) sobre Gas Chrom. W. o Anakrom Q., respectivamente.

En los análisis de cromatografía de capa fina (c.c.f.) se usó cromatoplasmas de vidrio de silicagel GF_{254} o de alúmina GF_{254} , preparadas utilizando un aparato Desaga ajustado a 0.2 mm. de espesor. Las placas fueron activadas a 110°C por media hora. Las muestras, aplicadas con tubo capilar, fueron cromatografiadas usando éter etílico, cloroforno, metanol o mezclas de los últimos en proporción adecuada. Los cromatogramas se revelaron con vapor de yodo, reactivos de Draggendorff (vide infra) o analizados bajo la luz ultravioleta de onda corta (254 nm).

En cromatografía de capa preparativa (c.c.p.) se

usó capas de espesores desde 0.2 a 2.0 milímetros sobre placas de vidrio de 20 x 20 o 20 x 40 centímetros. En algunos casos la muestra, aplicada con tubo capilar, fue cromatografiada repetidas veces; esto es, cuando el solvente alcanzó una altura conveniente la placa se retiró del cromatotank, se secó al aire y se cromatografió nuevamente. La operación se repitió las veces que se indica en cada caso.

La separación de las diferentes fracciones se hizo, según el análisis con luz ultravioleta o con reactivo de Dragendorff aplicado sobre una muestra "testigo" en la misma cromatoplaca.

La recuperación del material alcaloidal se logró por extracción en soxhlet de las diferentes fracciones de la cromatoplaca con etanol o cloroformo.

En cromatografía de columna (c.c.) se usó óxido de aluminio; "alúmina", Actividad I. Cuando fue necesario, el soporte se desactivó añadiendo las cantidades apropiadas de agua^{97,98}.

En las distribuciones en contra corriente⁹⁹, la mezcla alcaloidal se disolvió en el volumen de cloroformo que se indica en cada caso y se agitó por cinco minutos en un embudo de decantación (o en los primeros tubos de un aparato semiautomático Quickfit de 80 tubos de 50 mililitros de capacidad) con igual volumen de una solución de Buffer de

Mc Ilvaine¹⁰⁰ de ácido cítrico/fosfato sódico o de Borax/ácido clorhídrico¹⁰¹ de pH indicado en cada caso. Después de una separación completa de las dos fases, la acuosa (fase móvil) se transfirió a un segundo embudo o tubo que contenía cloroformo limpio. Al recipiente inicial (fase estacionaria) se agregó idéntico volumen de solución buffer limpia. Se agitó las dos fases por otros cinco minutos.

El procedimiento se continuó hasta completar el número de transferencias que se indica en cada caso.

La recuperación del contenido alcaloidal de la distribución se realizó basificando con amoníaco hasta pH 10 y extrayendo con cloroformo.

La naturaleza de la mezcla básica de cada tubo y la decisión de reunir el contenido de varios de ellos se determinó por análisis cromatográfico (c.c.f. y c.g.).

El pH de los buffer fue determinado en un peachímetro.

Las sales de los alcaloides, hidrobromuros o percloratos, se prepararon disolviendo el material básico en un pequeño volumen de etanol o acetona y añadiendo ácido bromhídrico (HBr ac. 47%, o solución de éter etílico saturada en ácido bromhídrico) o ácido perclórico, (HClO₄ ac. 70%) gota a gota hasta que la solución mostró reacción ácida al papel tornasol. Se indujo a cristalizar añadiendo éter etílico.

En los procesos de extracción se utilizó solvente de

grado técnico previamente redestilados.

En todas las reacciones (y cristalizaciones) se usó reactivos y solventes de calidad "pro análisis".

En las reacciones de acetilación se usó anhídrido acético y piridina recién destiladas.

En las reacciones de hidrólisis se usó una solución de 50% de metanol y solución acuosa de hidróxido de sodio 5N²⁴.

El reactivo de Jones se preparó disolviendo 7 gr. de trióxido de cromo en 100 ml de una solución acuosa que contenía 6.1 ml de ácido sulfúrico concentrado¹⁰².

El reactivo de Sarett (complejo de CrO_3 -piridina) se preparó disolviendo, con agitación y enfriando, una parte de trióxido de cromo sobre 10 partes de piridina¹⁰³.

El reactivo de Draggendorff se preparó mezclando 5 ml. de solución A con 5 ml. de solución B y añadiendo 100 ml. de agua y luego 20 ml. de ácido ácido glacial.

La solución A se preparó disolviendo 850 mg. de sub-nitrato de bismuto en 40 ml. de agua y agregando 10 ml. de ácido acético glacial. La solución B se preparó disolviendo 8 gr. de yoduro de potasio en 20 ml. de agua¹⁰⁴.

El material botánico recolectado cerca de Osorno, Chile, en Octubre de 1973 y Noviembre de 1974 fue identificado como Lycopodium paniculatum Desvaux por G. Looser, de la Academia Chilena de Ciencias Naturales.

Una muestra del mismo se conserva en el Herbario de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

2.2. EXTRACCION Y OBTENCION DE ALCALOIDES.

2.2.1. RECOLECCION 1973.

28 Kg. de L. paniculatum, recolectados en Osorno en Octubre de 1973, seco y finalmente molido, se extrajeron con metanol (grado técnico) en un aparato soxhlet durante 72 horas, tiempo suficiente para una extracción exhaustiva.

El extracto alcohólico se concentró a presión reducida y el residuo se trató con una solución acuosa de ácido clorhídrico (5% v/v) y se filtró. El residuo insoluble se trató nuevamente con porciones frescas de ácido (10% v/v) y se filtró. Este procedimiento se repitió cuatro veces, gastando un total de 4.5 lts. de solución ácida.

La solución acídica se lavó con éter etílico (5 x 500 ml.) y las soluciones etéreas no se trabajaron.

La solución ácida se basificó con solución concentrada de hidróxido de sodio hasta pH 11 y se extrajo en un extractor líquido-líquido con cloroformo hasta que la fase orgánica dió reacción negativa al reactivo de Draggendorff.

La evaporación del cloroformo bajo presión reducida produjo una mezcla cruda de alcaloides de 202 gr., constituyendo un 0,73% de rendimiento desde planta seca.

Este crudo de alcaloides (202 gr.) se trató nuevamente, con 2 lts. de solución acuosa de ácido clorhídrico (10% v/v). La mezcla se filtró, y el sólido se lavó con 2 lts. adicionales de solución ácida y se obtuvo 31 gr. de un material

rotulado como "Insoluble en ácido" que no se ha trabajado aún.

El pH de la solución filtrada se llevó a 10 con una solución diluída de hidróxido de sodio. Esta solución básica se extrajo primero usando éter etílico y luego con cloroformo hasta que los extractos orgánicos dieron reacción negativa al Draggendorff.

Las respectivas soluciones orgánicas se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir 92 gr. de "Fracción soluble en éter" y 30 gr. de "Fracción soluble en cloroformo". El material básico constituyó un 0.43% de la planta seca.

El esquema de extracción y fraccionamiento seguido se muestra en la figura 12, página 56.

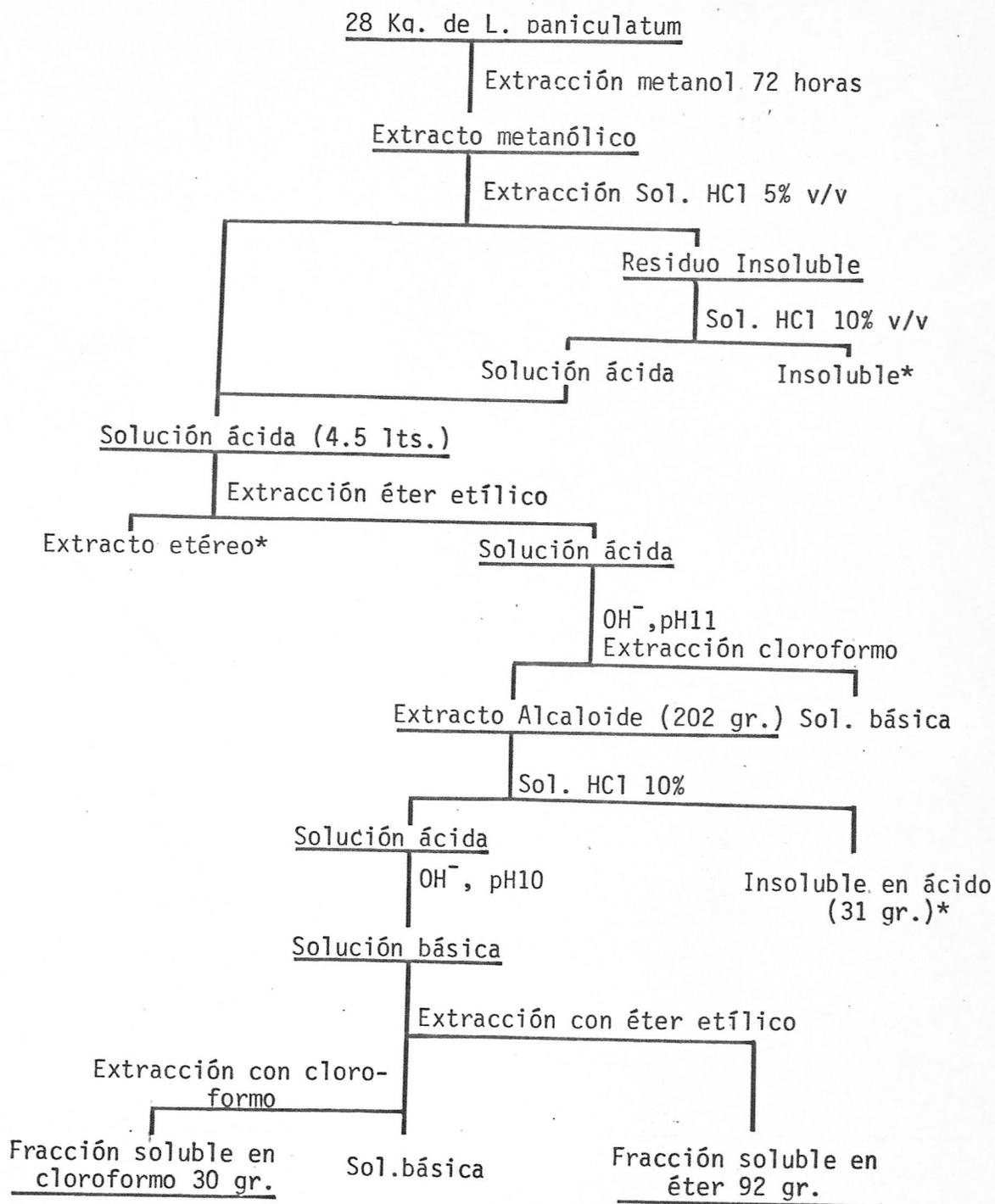


Figura 12. Extracción y fraccionamiento de L.paniculatum (1973)

* Fracciones no trabajadas

2.2.1.1. Examen de la "Fracción soluble en éter".

El extracto soluble en éter etílico (92 gr.) se disolvió en acetona caliente (750 ml) y se mantuvo en el refrigerador. Después de varios días precipitó un sólido blanco (6.2 gr.) que se recristalizó de metanol-acetona o de acetato de etilo - éter etílico. El producto cristalino, cuya solución etanólica dió una fuerte reacción al Dragendorff, tiene un punto de fusión mayor que 310°C y mostró un cambio en la forma cristalina entre 250° - 270°C . El espectro infrarrojo muestra bandas típicas de una sal derivada de un alcaloide entre $2.750 - 2.500 \text{ cm}^{-1}$.

Se disolvió 500 mg. de este producto cristalino en 15 ml. de agua destilada. Dos gotas de esta solución se agregaron a 2 ml. de una solución acuosa de nitrato de plata y se obtuvo un precipitado blanco que se redisolvió con gotas de solución diluída de amoníaco. El resto de la solución alcaloidea se basificó con solución diluída de hidróxido de sodio y se extrajo con cloroformo.

Después de concentrar los extractos clorofórmicos se obtuvo 350 mg. de una laca que por sublimación (10^{-3} mm. de Hg y 120°C) dió un producto sólido, incoloro que cristalizado de acetona funde a 163° - 165°C . Este alcaloide se identificó como dihidrolicopodina por comparación de sus propiedades espectroscópicas y cromatográficas con una muestra auténtica.

El líquido madre se concentró hasta sequedad, se disolvió en cloroformo (1 lt.) y se hizo una distribución en contracorriente usando un buffer de Mc Ilvaine de pH7, como fase móvil, en 13 embudos de decantación de 3 lts.

El material distribuido se dividió en cuatro fracciones sobre la base de su conducta de cromatografía de capa fina, según el siguiente cuadro.

Fracción	Nº de los embudos	masa (gr.)
A	1-3	59
B	4-5	4.7
C	6-10	6.2
D	11-13	19.0

Análisis de fracción A. Constituida en un 80% aproximadamente por acetildihidrolipodina. Los esfuerzos por separar e identificar componentes menores fueron infructuosos; 13gr. de los componentes más polares (A_1) fueron mezclados con fracción F¹ (vide-infra)

Análisis de la fracción B. Esta fracción (4.7 gr.) se colocó en una columna de alúmina básica (210 gr., Actividad II) en cloroformo y se eluyó con solventes de polaridad creciente: cloroformo, (1 - 17), cloroformo-metanol 1% (18-20), cloroformo-metanol 5% (21-29) cloroformo-metanol 10% (30-50) y cloroformo-metanol (51-75)

Según c.c.f. se dividió en las siguientes fracciones en frascos tarados.

Fracción	N° eluatos	Masa (gr.)
B ₁	1 - 20	0.8
B ₂	21 - 32	3.0
B ₃	33 - 50	0.2
B ₄	51 - 75	0.3

Solamente se trabajó la fracción B₂ (3.0 gr.) Esta se disolvió en un pequeño volumen de etanol en caliente y se preparó un hidrobromuro cristalino, tal como se indica en página 51 .

Después de varias recristalizaciones desde etanol-éter etílico se obtuvo 1.1 gr. de "HIDROBROMURO de PANICULINA", que funde a 247°C.

Este hidrobromuro se reunió con la sal obtenida en el análisis de fracción C₃ (vide infra) y se disolvió en 250ml. de agua, se basificó con amoníaco hasta pH 8 y se extrajo con cloroformo.

Se concentró el extracto clorofórmico seco y se obtuvo 750 mg. de la base libre, PANICULINA, que cristaliza en acetona y funde a 65 - 66°C⁹⁶. Las propiedades espectrales de paniculina y derivados se describen en página 104.

El líquido madre del hidrobromuro (fracción B₂) se evaporó a presión reducida y se añadió agua destilada, se basificó con amoníaco y se extrajo con cloroformo. Del extracto clorofórmico resultó una laca café oscura (0.8 gr.) que dió fuerte reacción del Draggendorff y mostró un sólo componente básico importante en c.c.f.

Esta laca (0.8 gr.) se colocó en una columna de alúmina (30 gr. Actividad II-III) y se eluyó con éter etílico. Los eluatos Draggendorff positivos (fracción 6-10) se combinaron y evaporaron, resultando un producto amorfo que se purificó por sublimación (10^{-3} mm de Hg. 100°C) y posteriores recristalizaciones desde acetona. Se obtuvo 20 mg. de "ANHIDRODESACETILPANICULINA" que funde con descomposición a $175-185^{\circ}\text{C}$. Las propiedades espectrales de anhidrodesacetilpaniculina se describen en página 111.

Análisis de Fracción C. 6.0 gr. de Fracción C se colocaron sobre una columna de alúmina básica (300 g Actividad II) con cloroformo y se eluyó con solvente de polaridad creciente: cloroformo (1-13); cloroformo-metanol 1% (14-32), cloroformo-metanol 5% (33-51), cloroformo-metanol 10% (52-58), cloroformo-metanol 50% (59-70).

Los eluatos fueron reunidos tal como se muestra en el siguiente cuadro

Fracción	N° eluato	Masa (gr)
C ₁	1 - 17	0.05
C ₂	18 - 30	4.0
C ₃	31 - 45	1.3
C ₄	46 - 70	0.2

La fracción C₁ (0.05) no se trabajó por ser una mezcla compleja y tener poco peso.

La fracción C₂ (4.0 gr) se disolvió en un pequeño

volumen de acetona en caliente y se indujo a cristalizar. Sucesivas recristalizaciones produjeron 0.8 gr. de "PANICULATINA"⁹⁶, que funde a 180-181°C. Las propiedades espectrales de paniculatina y derivados se muestra en página 82 ..

Los líquidos madres produjeron, una vez evaporados, 2.6 gr. de una laca que se disolvió en un pequeño volumen de etanol y se preparó un hidrobromuro tal como se indicó en página 51 . De sucesivas recristalizaciones de etanol-eter etílico se obtuvo HIDROBROMURO DE PANICULATINA (1.2 gr.) que funde a 310-312°C.

La fracción C₃ (1.2 gr.) se disolvió en etanol y se preparó un hidrobromuro. Después de varias recristalizaciones se obtuvo HIDROBROMURO DE PANICULINA (0.4 gr.) que funde a 247-249 °C*, idéntico con el obtenido en el análisis de fracción B₂(vide supra).

La fracción C₄ (0.2 gr.) no se trabajó porque dió reacción muy débil al Draggendorff.

Análisis de Fracción D. La fracción D (19.0 gr.) se disolvió en acetona y después de varias semanas en el refrigerador cristalizó un alcaloide (2.5 gr.) cuyas propiedades concuerdan con dihidrolicopodina⁹⁶.

El líquido madre se evaporó al máximo y luego se redisolvió en 75 ml. de cloruro de metileno y se repartió en los

* Ocasionalmente se encontró cristales de punto de fusión de 310°C.

tres primeros tubos de un aparato semiautomático de distribución en contracorriente. Se hizo 38 transferencias usando un buffer pH 8.8 (Bórax/HCl)¹⁰¹ como fase móvil y dicloro metano como fase estacionaria.

Después que las 38 transferencias se completaron, se inició otra distribución sin retirar el contenido de los tubos de la primera. Desde el tubo número 1 se utilizó un buffer pH 8.0 (Bórax/HCl) y se continuó con este pH hasta completar 58 transferencias en total.

El análisis cromatográfico reveló la necesidad de realizar las siguientes mezclas:

Fracción	NºTubos	Masa (gr)
D ₁	1 - 6	2.2
D ₂	7 - 36	9.9
D ₃	37 - 56	1.8
D ₄	57 - 58	0.5

La fracción D₁ (2.2 gr) no se trabajó debido a su excesiva complejidad.

La fracción D₂ (9.9 gr) se disolvió en acetona caliente y se mantuvo por varios días en refrigerador. El producto cristalino obtenido resultó ser dihidrolicopodina prácticamente pura.

La fracción D₃ (1.8 gr) se indujo a cristalizar en acetona. Sucesivas recrystalizaciones produjeron un producto cristalino de color rosado (0.8 gr.). Una vez

sublimado y recristalizado de acetona se obtuvo 0.6 gr. de un material cristalino incoloro que se identificó como DESACETILLICOCLAVINA, de punto de fusión de 215-216°C. Las propiedades espectrales de desacetillicoclavina y derivados se muestran en página 125 .

La fracción D₄ (0.5 gr.) no dió reacción positiva al reactivo de Draggendorff y no se trabajó. El esquema del Examen de la "Fracción Soluble en Eter" se muestra en la figura 13, página 64.

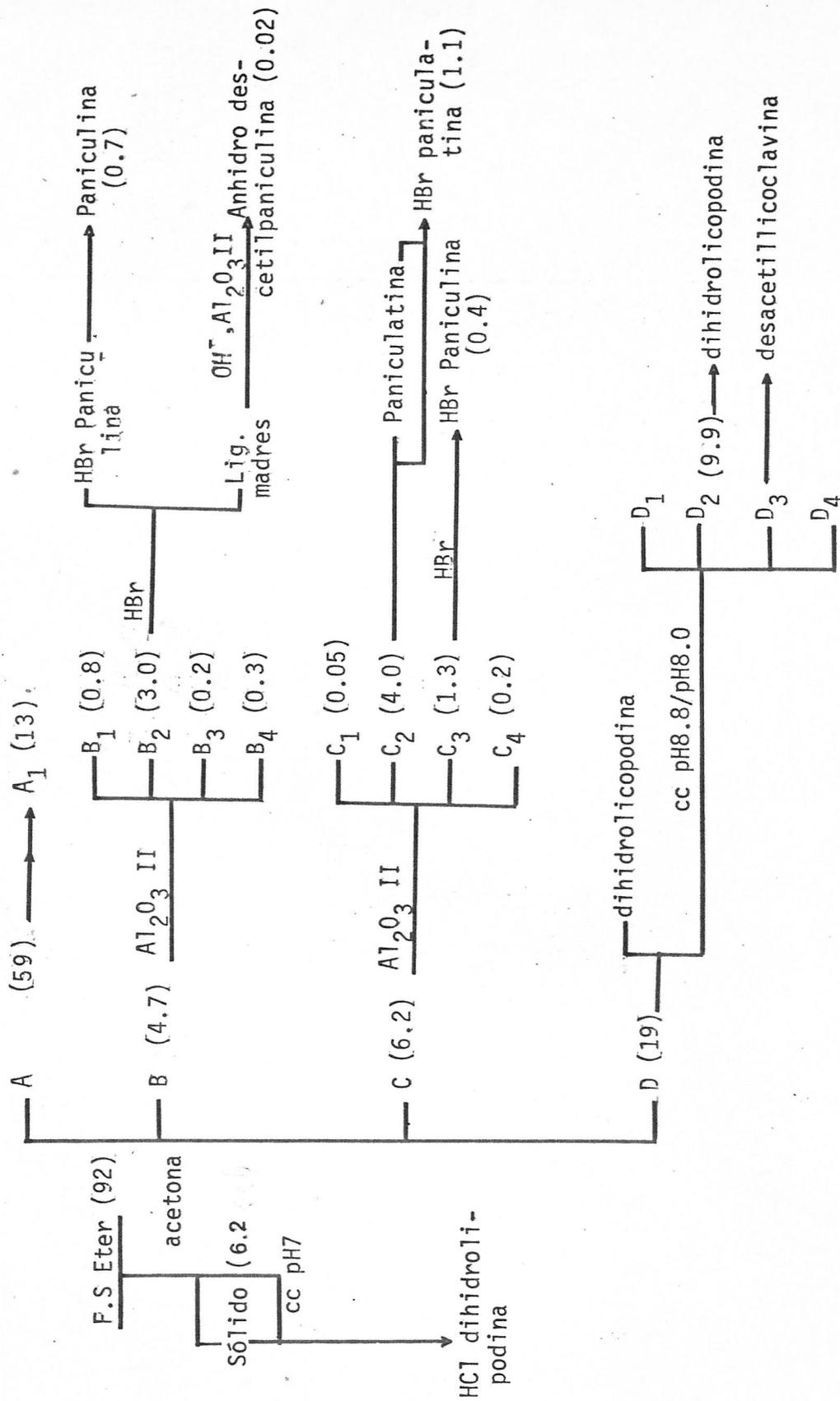


Figura 13. Examen "Fracción soluble en éter". 1973

2.2.1.2. Examen de la "Fracción soluble en el cloroformo".

La fracción soluble en cloroformo (30 gr.) se disolvió en 500 ml. de cloroformo y se hizo una distribución en contracorriente en 8 embudos de decantación usando un buffer de Mc Ilvaine de pH7 como fase móvil.

El material distribuido se reunió, según cromatografías, como se indica a continuación:

Fracción	Nº embudos	Masa (gr)
E	1 - 3	11.0
F'	4 - 6	1.8
G	7 - 8	11.6

La fracción E (11.0 g.) no ha sido estudiada aún.

Análisis de la Fracción G. La fracción G (11.6 gr) se cromatografió en una columna de alúmina básica (300 gr. actividad I) y se eluyó con éter etílico (fracción 1-78), éter etílico-cloroformo 50% (81), cloroformo (82-83), cloroformo-metanol 10% (84-92) y metanol (92-94).

Según la conducta cromatográfica de c.f. se mezcló en las siguientes fracciones:

Fracciones	Nº eluatos	Masa (gr)
G ₁	1 - 5	2.1
G ₂	6 - 22	0.8
G ₃	23 - 28	0.3
G ₄	29 - 50	2.23
G ₅	51 - 72	0.8
G ₆	73 - 84	1.1
G ₇	85	1.7

La fracción G₄ (2.23 gr) cristalizó en acetona produciendo un producto cristalino de color rosado que se mantuvo después de varias recrystalizaciones.

Sólo se logró un producto incoloro por sublimación (10^{-2} mm Hg, 120°C) y recrystalización de acetona o acetato de etilo. Las propiedades físicas y espectroscópicas de este material (0.3 gr.) fueron idénticas a las de desacetillicoclavina obtenida del análisis de la fracción D₃.

Las demás fracciones G no se trabajaron.

Análisis de la Fracción F: La fracción F' (1.8 gr.) se combinó con 13 gr. de la fracción A₁ como resultado del estudio de los cromatogramas de c.c.f. y c.g. obteniendo una mezcla F de un peso de 14.8 gr. Esta fracción F se disolvió en 100 ml. de cloroformo y se repartió en los cuatro primeros tubos del aparato de contracorriente. Usando un buffer pH 8.8 (Borax/HCl) como fase móvil y cloroformo como fase estacionaria se realizó 28 transferencias. Luego, se usó

desde el tubo 1 un buffer pH 8.0 y se continuó la distribución hasta completar 72 transferencias en total.

El análisis cromatográfico del contenido de cada tubo indicó la necesidad de mezclar en la siguiente forma:

Fracción	NºTubos	Masa (gr)
F ₁	1 - 16	
F ₂	17 - 47	5.0
F ₃	48 - 72	1.2.

La fracción F₃ no se analizó por ser una mezcla muy compleja.

La fracción F₂ disuelta en acetona produjo cristales de dihidrolicopodina (3.5 gr.), purificados por sublimación y recristalización de acetona.

La fracción F₁ (tubos 1 - 16) sin ser retirada del aparato distribuidor fue objeto de otra distribución en contracorriente. usando ésta vez un buffer de Mc Ilvaine pH7 (fase móvil) hasta completar 42 transferencias y posteriormente se reunió en la siguiente forma.

Fracción	NºTubos	Masa (gr.)
F ₁₁	1 - 9	5.0
F ₁₂	10 - 23	1.0
F ₁₃	24 - 30	0.7
F ₁₄	31 - 42	0.5

La fracción F₁₄ (0.5 gr.) produjo por cristalización de acetona 0.2 gr. de dihidrolicopodina.

La fracción F_{13} (0.7 gr.) produjo por cristalización y recristalización desde acetona - éter etílico un material cristalino incoloro que corresponde a LICOCLAVINA (120 mg.) y que funde a 198-201 °C, con un cambio en la forma cristalina a 172°C.

Las propiedades espectrales de la licoclavina se muestran en página 146 ..

Las fracciones F_{11} y F_{12} se distribuyeron en contracorriente con buffer pH 6 y buffer pH 7, respectivamente, pero los resultados no fueron satisfactorios.

Se mezcló entonces las fracciones F_{11} y F_{12} (5.0 gr) y se cromatografió sobre alúmina básica (150 g. Actividad II) obteniendo las siguientes fracciones:

Fracción	Solvente	Masa (gr)
F_{111}	benceno - éter 50%	1.0
F_{112}	éter etílico	0.8
F_{113}	éter - cloroformo 50%	1.2
F_{114}	cloroformo y cloroformo metanol 10%	0.8
F_{115}	cloroformo-metanol 50%	0.4
F_{116}	cloroformo - metanol 80%	0.4

Las fracciones F_{111} y F_{112} contenían los mismos tres alcaloides aunque en cantidades relativas diferentes. Se mezcló F_{111} y F_{112} (1.8 gr) y se cromatografió en alúmina básica (40 g. Actividad II) y se eluyó con benceno. Las

fracciones 1-7 (0.7 g.) contenían fundamentalmente licopodina y acetildihidroliscopodina (por c.c.f.).

Las fracciones 8-14 (0.9 g.) fueron concentradas y destiladas a presión reducida obteniendo un aceite (0.5 g.) que en c.c.f. (alúmina, eter etílico) mostró tres componentes con R_f que se indican en paréntesis: licopodina (R_f 0.6), acetildihidroliscopodina (R_f 0.5) y un tercer alcaloide (R_f 0.3) que fluoresce fuertemente bajo la luz ultravioleta (254 nm.).

Este aceite (0.5 gr.) se aplicó en 5 placas de 20 x 20 cm. con capa de alúmina de 0.4 mm. de espesor se desarrolló con éter etílico y dirigido por la fluorescencia se separó en dos zonas. Solamente se trabajó la de menor R_f que contenía el alcaloide activo a la luz ultravioleta. Después de una extracción en soxhlet (2 horas) con etanol, filtración y evaporación se obtuvo 0,15 gr. de un material aceitoso de color café. Por destilación a presión reducida (10^{-3} mm. de Hg, 80-100°C) se obtuvo 30 mg. de un alcaloide que corresponde a FLABELIDINA, un aceite que no fue inducido a cristalizar: todos los intentos por preparar sales cristalinas fallaron.

Las principales propiedades espectroscópicas de flabelidina aparecen en página 147. El esquema del examen de la "Fracción soluble en cloroformo se muestra en figura 14 página 50

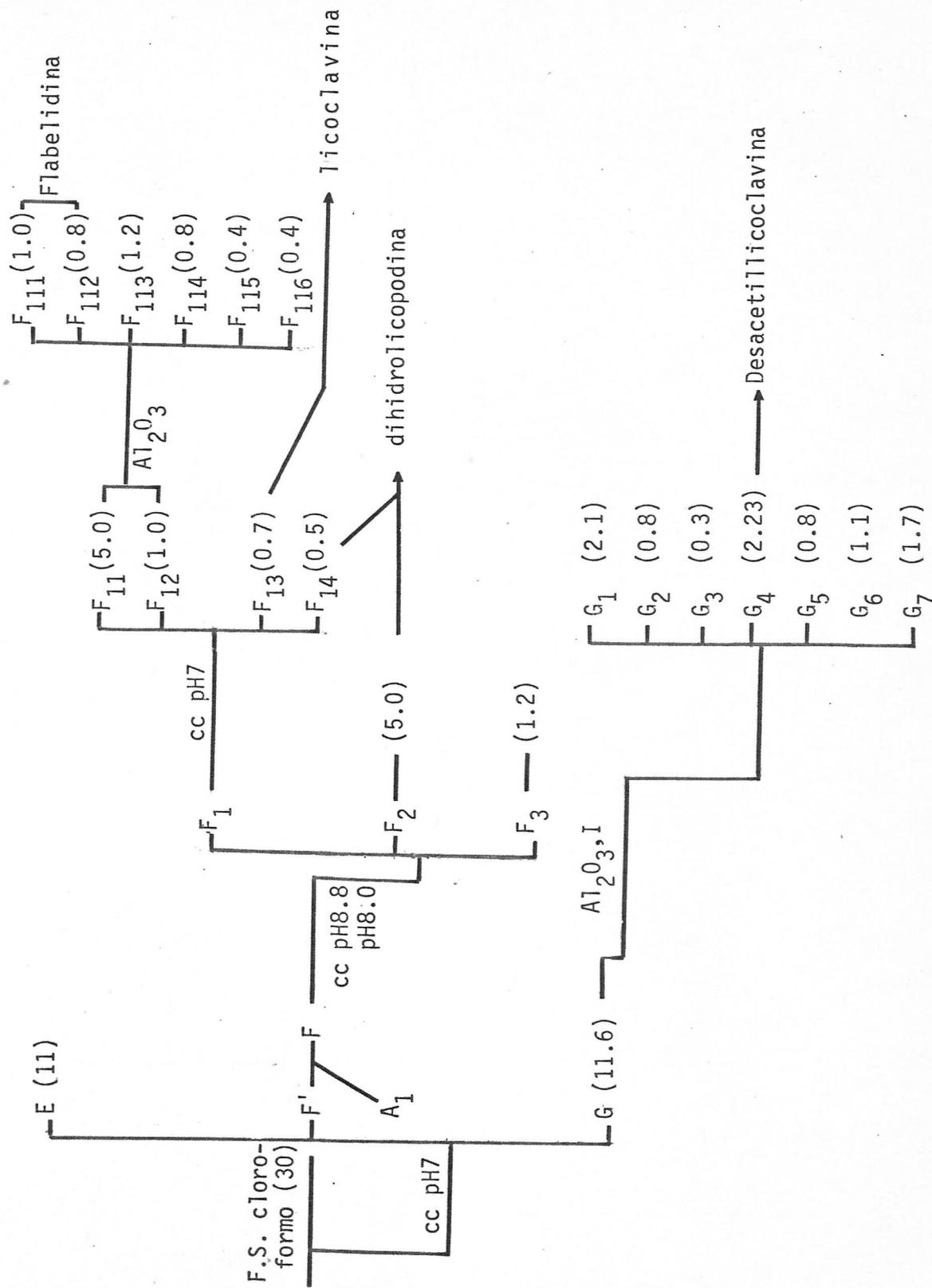


Figura 14. Examen "Fracción soluble en cloroformo".

2.2.2. RECOLECCION 1974.

49 Kg. de L. paniculatum Desvaux, seco y molido, se extrajeron con etanol frío en la forma como se indica para 3-4 Kg. de material.

Se colocó en un percolador 3-4 Kg. de Lycopodium y se agregó 18-20 litros de etanol (hasta que el solvente ocupó un volumen similar al doble que el ocupado por la planta). Después de agitar vigorosamente la mezcla se dejó en reposo durante 2 o 3 días. Luego, mediante la llave del percolador, se retiró el máximo de solución alcohólica y se añadió nuevamente solvente fresco. Esta operación se repitió tantas veces como fue necesario para obtener un extracto alcohólico prácticamente incoloro (o débilmente amarillento). Normalmente se necesitó 5 - 7 repeticiones*

Las soluciones alcohólicas se concentraron usando primero un evaporador de ciclón y luego un evaporador rotatorio añadiendo porciones de agua para eliminar al máximo el alcohol.

Los extractos reunidos del procesamiento anterior de los 4 Kg. de planta, se trataron con solución de ácido clorhídrico 10% v/v) y se filtraron. La operación se repitió

* Porciones de este material botánico percolado se extrajeron en Soxhlet con etanol. Los extractos alcohólicos concentrados no dieron reacción positiva al reactivo de Dragendorff.

hasta que la solución acuosa ácida dió reacción negativa al reactivo de Draggendorff.

La solución ácida filtrada se agitó con sucesivas porciones con éter etílico hasta que la fase orgánica fue incolora.

La solución etérea se concentró y se reunió en un Crudo Neutro, que dá reacción muy débil al Draggendorff y que no ha sido analizado aún.

La solución ácida se basificó cuidadosamente con solución concentrada de hidróxido de sodio y se extrajo con cloroformo en un aparato distribuidor líquido-líquido.

El término de la extracción con cloroformo fue confirmada por el reactivo de Draggendorff.

Se disminuyó el volumen de la solución clorofórmica alrededor de diez veces y se trató con sulfato de sodio anhidro y carbón activado. Se calentó a ebullición por 10 minutos, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener un crudo de alcaloides como una laca de color caramelo. De esta manera se obtuvo un total de 275 gr.

Estos 275 gr. -que constituyen un 0.54% de la planta seca-se trataron con sucesivas porciones de solución de ácido clorhídrico 3% v/v (8 lts.) hasta que la solución ácida no mostró reacción positiva al Draggendorff.

Después de filtrar se obtuvo una solución acuosa ácida y un residuo de 25 gr. denominado "Insoluble en HCl 3%",

que significó un 0,05 % de rendimiento y que no ha sido analizado aún.

La solución acuosa ácida se basificó con solución diluída de hidróxido de sodio hasta un pH 10 y se extrajo en embudos de decantación con éter etílico (75 lts.). La extracción se repitió hasta que la solución etérea una vez concentrada, sólo dió una débil reacción al test de alcaloides.

La solución etérea se concentró a presión reducida para producir un crudo de 143 gr. denominado "Crudo éter", que constituye un 0.3 % de la planta seca:

La solución básica resultante se extrajo exhaustivamente con cloroformo (22 lts.) en un aparato de extracción líquido-líquido. La solución clorofórmica seca y concentrada produjo un crudo de 30 gr. denominado "Crudo cloroformo" constituyendo un 0.06% de la planta seca.

Este Crudo cloroformo disuelto en acetona produjo, después de varias semanas, 0.8 gr. de un producto cristalino idéntico en sus propiedades con hidrocloruro de dihidrolicopodina (vide supra).

El resto del crudo cloroformo no ha sido analizado aún.

2.2.2.1. Examen del "Crudo éter".

El "crudo éter" (143 gr.) se disolvió en 1.5 lts. de

cloroformo y en un embudo de decantación se agitó repetidas veces con sucesivas porciones de solución de buffer Mc Ilvaine de pH 6, usando un total de 10 lts. La fase orgánica concentrada produjo 13 gr. de una mezcla que se denominó "Bases débiles a pH6" y una solución acuosa que contenía las bases fuertes a ese pH. A esta solución acuosa se le adicionó fosfato disódico sólido hasta que el pH llegó a ser 7.1 y se extrajo con cloroformo en extractor líquido (6 lts.) durante 24 horas. La solución clorofórmica concentrada produjo 81 gr. de una mezcla denominada "Bases débiles a pH7.1" La solución acuosa remanente se basificó con hidróxido de sodio hasta pH 8.5. Esta solución se extrajo con cloroformo por 25 horas. La fase orgánica produjo 32 gr. de un crudo denominado "Bases débiles a pH 8.5". Finalmente, el pH de la solución acuosa se llevó a 10 y se extrajo con cloroformo. El extracto clorofórmico produjo 21 gr. de "Bases débiles a pH 10".

El esquema de fraccionamiento de "crudo éter" se muestra en figura 15 página 75.

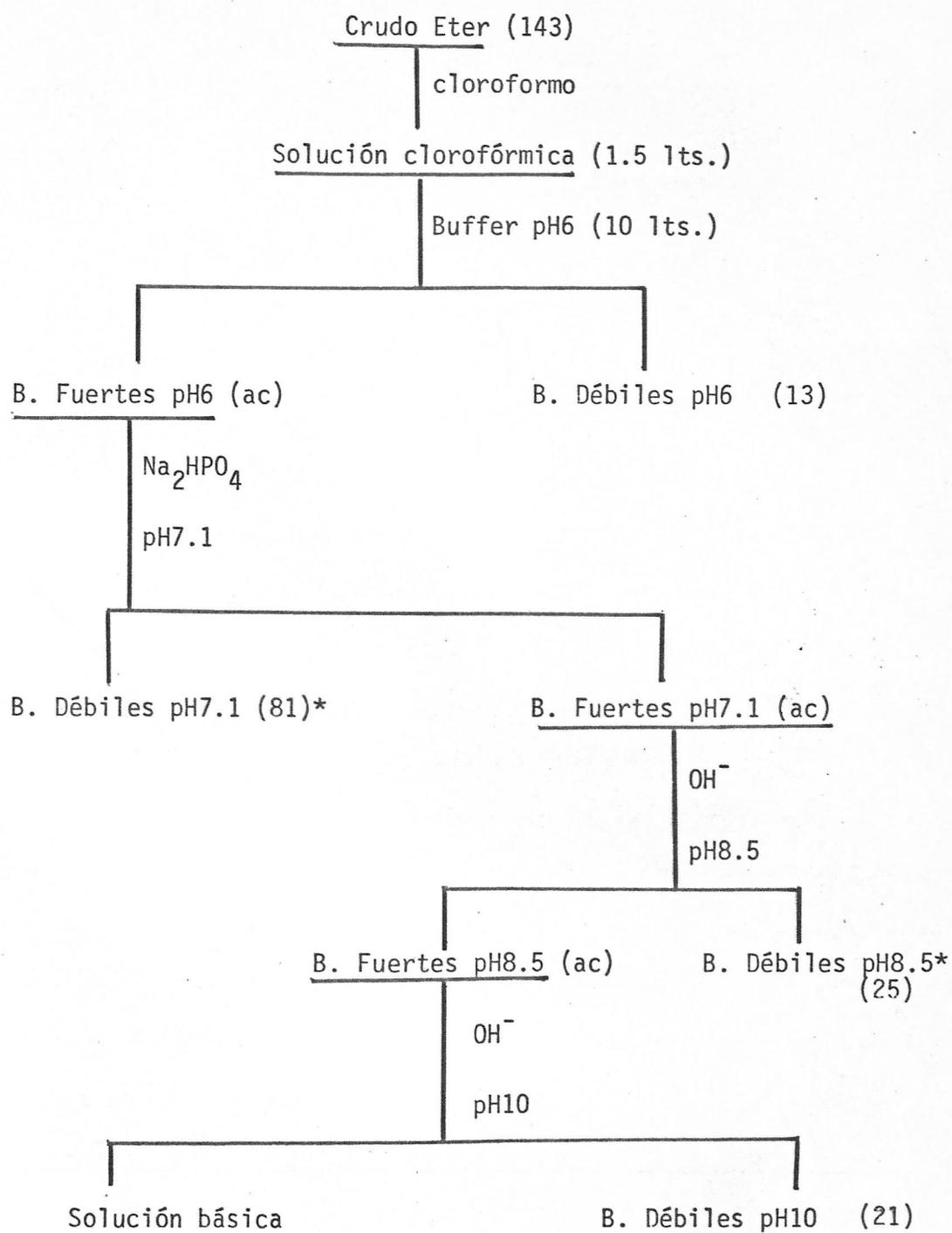


Figura 15. Fraccionamiento "crudo éter". 1974.

* Fracciones no trabajadas

2.2.2.1.1. Examen de la fracción "Bases débiles pH6".

La fracción "Bases débiles pH6 (13 gr.) se disolvió en 75 ml. de cloroformo, se colocó en los tres primeros tubos del distribuidor de contracorriente y se distribuyó con buffer de Mc Ilvaine pH5.9 hasta completar 48 transferencias, usando el buffer como fase móvil.

El análisis cromatográfico del contenido de cada tubo indicó la necesidad de reunir las siguientes fracciones:

Fracción	NºTubos	Masa (gr.)
H	1 - 15	12.0
I	16 - 25	0.2
J	26 - 43	0.5
K	44 - 48	0.06

Las fracciones J y K se combinaron puesto que contenían fundamentalmente licopodina y acetildihidrolicopodina. No se aislaron.

Análisis de la fracción I.

La fracción I (0.2 gr.) se aplicó en 3 placas de silicagel de 0.4 mm. de espesor y se desarrolló con cloroformo-metanol 3:1. Solamente se analizó la zona de la capa (R_f 0.8) que mostró una fuerte fluorescencia a la luz ultravioleta (254 nm.). El material químico recuperado del soporte cromatográfico produjo un aceite de color café.

Una destilación de este aceite generó un líquido incoloro que solidifica lentamente; este sólido resultante se

hidrata con suma facilidad transformándose en un líquido amarillento. La misma conducta se observó con el material cristalino que se obtuvo en la cristalización lenta desde acetona a partir del líquido destilado. El punto de fusión de esta base - denominada ALCALOIDE P8 es de 229 - 233°C con descomposición. Se observó además un cambio en la forma cristalina entre 200 - 210°C. Algunas propiedades espectrales se muestran en página 153.

Análisis de la fracción H.

La fracción H (12.0 gr.) se disolvió en cloroformo (100 ml.) y se colocó en los cuatro primeros tubos del distribuidor de contracorriente. Se hizo 72 transferencias con un buffer de pH 5.1. El contenido alcaloidal se reunió de la siguiente forma:

Fracción	Nº Tubos	Masa (gr.)
H ₁	1 - 6	
H ₂	7 - 12	0.6
H ₃	13 - 34	0.9
H ₄	35 - 50	0.2
H ₅	51 - 71	0.1

Las fracciones H₅, H₄ y H₂ no han sido estudiadas.

La fracción H₃ (0.9 gr.) disuelta en un pequeño volumen de etanol, se aplicó en 5 capas de silicagel de 40 cm x 20 cm x 0.2 mm y se desarrolló con cloroformo-metanol 10%. Se separó seis zonas dirigido por la luz ultravioleta y

coloración en la placa cromatográfica.

Las 6 zonas se numeraron en orden decreciente de sus R_f . Las fracciones 1 al 3 (175 mg.) mostró un componente mayoritario. El tratamiento de esta fracción con ácido perclórico (página 51) produjo una sal cristalina: PERCLORATO DE ALCALOIDE P9. No ha sido caracterizado.

La fracción H_1 , sin ser retirada del aparato, se distribuyó con un buffer pH 3.0 hasta completar 72 transferencias.

El análisis del contenido de cada tubo indicó la necesidad de reunir en la siguiente forma:

Fracción	N°Tubo	Masa (gr.)
H_{11}	1 - 12	8.5
H_{12}	12 - 27	0.5
H_{13}	28 - 49	1.0
H_{14}	50 - 72	0.2

Ninguna de estas fracciones ha sido mayormente analizada. El esquema del análisis de la fracción "Bases débiles a pH6" se muestra en figura 16, página 81.

El crudo "Bases débiles pH7.1" (81 gr.) y el crudo "Bases débiles a pH8.5" (30 gr.) no han sido estudiados aún.

2.2.2.1.2. Examen de la Fracción "Bases débiles pH10".

Este crudo (21 gr.) de Bases débiles a pH10 se disolvió en 50 ml. de acetona y después de varias semanas a temperatura ambiente cristalizó 4.0 gr. de un sólido que una vez purificado mostró ser idéntico a dihidrolicopodina.

El líquido madre (16,5 gr.) disuelto en 75 ml. de cloroformo se distribuyó a pH 8.3 (buffer Borax/HCl) hasta completar 57 transferencias.

Del análisis del contenido de cada tubo se obtuvo las siguientes mezclas:

Fracción	NºTubos	Masa (gr.)
L	1 - 6	2.5
M	7 - 27	7.5
N	28 - 37	1.3
O	38 - 57	5.1

Análisis de la Fracción O.

Esta fracción se disolvió en acetona (50 ml.) y después de varios días en refrigerador cristalizó un producto que una vez purificado por sublimación y cristalización mostró propiedades físicas y espectroscópicas idénticas con DESACETILLICOCLAVINA (2.2 gr.)

Análisis de la fracción N.

Del mismo modo se indujo a cristalizar la fracción N (1.3 gr.) y se obtuvo un producto cristalizado de acetona que funde a 170-172°C denominado "DESACETILPANICULINA".

Las principales propiedades espectrales de desacetilpaniculina y derivados se muestran en página 110.

Análisis de la fracción M

La fracción M (7.5 gr.) produjo dihidrolicopodina (5.0 gr.) como único producto aislable.

Análisis de la fracción L.

La fracción L (2.5 gr.) fue objeto de una nueva contracorriente (30 tubos a pH 7.6 buffer Mc Ilvaine). El peso del contenido alcaloidal se concentró principalmente en los primeros cuatro tubos (2.2 gr.).

Esta fracción se resistió a cristalizar y a dar sales cristalinas (HClO_4 , HBr). Una filtración sobre alúmina (70 gr. Actividad I) con éter etílico produjo una mezcla de dos componentes en una proporción de 9 : 1 aproximadamente. Aún no ha sido aislado el alcaloide mayoritario.

El esquema del análisis de fracción "Bases débiles a pH 10" se muestra en figura 17 página 81.

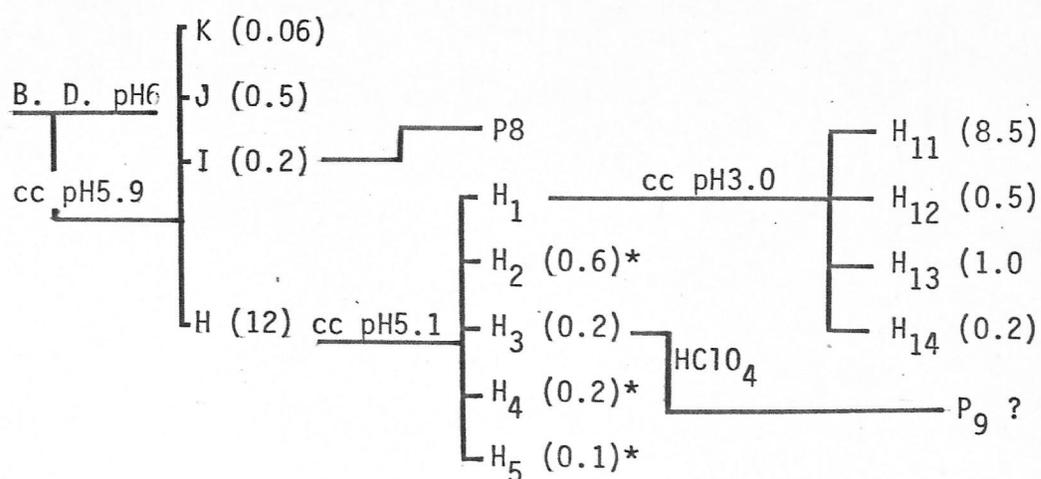


Figura 16.- Análisis fracción "Bases Débiles pH6"

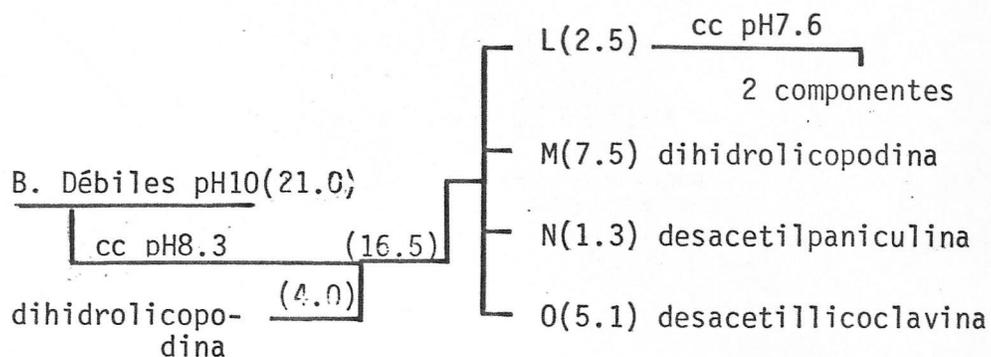


Figura 17. Análisis fracción "Bases Débiles pH10"

2.3. CARACTERIZACION DE ALCALOIDES Y DE DERIVADOS*

2.3.1. PANICULATINA: Este alcaloide funde a 180°- 181°C cristalizado desde acetona, $\alpha_D^{25} = 57.72$ (c 1.66, etanol). El hidrobromuro, cristalizado de metanol-éter etílico, funde a 310°C.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.190(OH), 2.800(CH₃-N)⁽¹¹⁰⁾, 1.730(carbonilo de ciclopentanona), 1.470, 1.450, 1.370 y 1.040 cm⁻¹ (figura 18, página 90).

$\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃): 3.620(OH libre), 1.720 y 1.040 cm⁻¹.

$\nu_{\text{máx}}$ de Hidrobromuro de paniculatina (KBr) : 3.450-3.300, 2.950-2.850, 2.750-2.550(H⁺N-), 1.720 y 1.040 cm⁻¹ (figura 19, página 90).

RMNP (CDCl₃, 220MHz) (δ): 0.90(d, J=6.5Hz, 3H, CH₃-CH), 2.18 (s, 3H, CH₃-N), 2.75(m, a_{1/2}⁵Hz, 2H, protones α a nitrógeno), 3.78(s, a_{1/2}⁸Hz, 1H, CH-OH) (figura 20, página 91).

(60MHz) (δ): 0.9(d, J=7Hz, 3H), 2.2(s, 3H, CH₃-N), 2.8(m, ~2-3H), 3.8(m, a_{1/2}⁸Hz, 1H, CHOH) (figura 21 a, página 92).

(CDCl₃+CD₃COOD, 60MHz) (δ): 0.90(d, J=6Hz, 3H), 2.8 (s, a_{1/2}¹⁰Hz, 3H, CH₃-N)⁽¹¹¹⁾, 3.2(m, ~2H), 3.3 (m, ~2H) y 3.8(s, a_{1/2}⁸Hz, 1H) (figura 21 b, página 92).

* A menos que se indique otra referencia, las asignaciones funcionales en los IR se hicieron de acuerdo a Nakanishi¹⁰⁵ y Bellamy¹⁰⁶ y en RMNP de acuerdo a Bovey¹⁰⁷, Dyer¹⁰⁸ y Jackman¹⁰⁹.

RMNP (Doble irradiación)(δ) (figura 20, página 91)

irradiación	efecto
1.70	3.78 s, $a_{1/2}^{8\text{Hz}}$ \rightarrow s, $a_{1/2}^{5\text{Hz}}$
	0.90 d, $J=6.5\text{Hz}$ \rightarrow s, $a_{1/2}^{6\text{Hz}}$
1.22	3.78 s, $a_{1/2}^{8\text{Hz}}$ \rightarrow s, $a_{1/2}^{5\text{Hz}}$

EM m/e (% , composición por alta resolución): 277(90%,
 277.2041, $C_{17}H_{27}O_2N$), 262(10, $C_{16}H_{24}NO_2$), 248
 (5, $C_{16}H_{26}NO$), 206(5, $C_{13}H_{20}NO$ y $C_{12}H_{18}O_2$), 204
 (29, $C_{13}H_{18}NO$), 192(17, $C_{12}H_{18}NO$ y $C_{12}H_{16}O_2$),
 110(11, $C_7H_{12}N$), 96(21, $C_6H_{10}N$), 94(12), 91(15),
 71(25, C_4H_9N), 70(24), 58(100, C_3H_8N), 57(42).
 (figura 22, página 93)

Análisis elemental: calculado para $C_{17}H_{27}O_2N$: C 73.61%,
 H 9.81% y N 5.05%. Valores encontrados: C 73.64%,
 H 9.70% y N 5.04%.

RMN¹³C (CDCl₃, TMS) (δ): 19.1($\underline{C}H_3$ -C), 22.4, 26.0, 32.3,
 38.1, 39.5, 39.7, 40.4, 41.2, 44.0, 46.7 ($\underline{C}H_3$ -N),
 52.1, 53.4, 58.1, 58.6, 75.4 (\underline{C} -OH), 220.8 (CO).

DOR λ nm (Φ): 589(+203), 545(+251), 435(+484), 400(+660);
 380(+888), 370(+1.091), 360(+1.242), 350(+1.420),
 340(+1.826); 330(+2.739), 320(+3.881)máx., 310
 (+2.689), 300(0), 290(-2.232), 280(-2,689)min.

2.3.1.1. Acetilación de paniculatina.

Se disolvió 50 mg. de paniculatina en 2.0 ml. de pi-
 ridina, se añadió 2.0 ml. de anhídrido acético y se dejó a
 temperatura ambiente por 19 horas. Se diluyó con cloroformo

y se agitó con una solución diluída de bicarbonato de sodio. Se lavó el extracto clorofórmico con agua destilada y se seco con sulfato de sodio anhidro. El líquido filtrado produjo una laca café de 52 mg. Por c.c.f. preparativa (alúmina-éter etílico) y por destilación (10^{-3} mm. de Hg., 80-100°C) se obtuvo 25 mg. de un aceite que no pudo ser cristalizado; no forma sales cristalinas. Este derivado mostró ser Acetilpaniculatina.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (film): 2.950-2.850, 2.780(NCH₃), 1.740-1730 (OAc,CO) y 1.250 cm^{-1} (figura 23, página 94)

RMNP (δ): 0.9(d, J=6Hz, 3H, CH₃-CH), 2.0(s, 3H, CH₃COO), 2.3(s, 3H, CH₃-N) y 5.08(s, $a_{1/2}$ 8Hz, 1H, CH-OAc) (figura 24, página 94).

2.3.1.2. Oxidación de paniculatina.

Se disolvió 40 mg. de paniculatina en 2.5 ml. de piridina y se añadió sobre una solución de 2.5 ml de piridina que contenía 0.2 gr. de trióxido de cromo. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente. Después de cuatro horas se diluyó con agua destilada, se basificó con amoníaco y se extrajo repetidas veces con cloroformo. El extracto cloroformico se lavó con agua, se secó y se concentró produciendo una laca café de 46 mg. Este crudo de reacción se cromatografió sobre alúmina (5 gr. Actividad I) con éter etílico. Las fracciones Draggendorff positivas (32 mg.) contienen dos productos uno de los cuales corresponde a 10 mg de

paniculatina sin reaccionar.

Por c.c.f. preparativa (alúmina, éter etílico) se obtuvo 16 mg. de un aceite que no cristalizó ni formó sales cristalinas. Este producto, que se obtuvo también por oxidación de paniculatina con reactivo de Jones, probó ser paniculatinona o dehidropaniculatina.

UV $\lambda_{\text{máx}}$ 242 (log ϵ 2.43)

IR $\nu_{\text{máx}}$ (Nujol): 2.970-2.850, 2.780(NCH₃), 1.730(ciclopentanona), 1.700(ciclohexanona) y 1.420 cm⁻¹ (metileno activado CH₂-CO-)⁽¹¹²⁾ (figura 25 página 95).

RMNP (δ): 1.1(s, a_{1/2}⁶Hz, 3H aprox., CH₃CH), 2.3(s, CH₃-N), 3.3(d, J=6Hz) (figura 26, página 97).

EM m/e (%): 275(M⁺, 100%), 260(M⁺-15, 11), 247(M⁺-28, 31) 219 (M⁺-56, 38), 204(32), 110(75), 109(33), 96 (43), 84(33), 70(63), 58(70) (figura 27, página 96)

2.3.1.3. Reducción de paniculatina^{16, 32, 113}.

Se disolvió 0.2 gr. de sodio en 10 ml. de etilenglicol, se añadió hidrazina anhidra (preparada destilando 20 ml. de hidrazina clorhidrato en presencia de 20 gr. de hidróxido de sodio en lentejas) calentando hasta que la mezcla refluja libremente a 180°C.

La solución se enfrió, se añadió 55 mg. de paniculatina y se refluja durante 16 horas a 180°C. Se aumentó la

temperatura hasta 210°-220°C destilando el exceso de hidrazina y luego se reflujo por otras 23 horas a 210°-220°C.

La mezcla fría se diluyó con agua y se extrajo con cloroformo. La solución clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro por toda la noche, se filtró y concentró obteniéndose un producto cristalino amarillento. Una sublimación produjo 36 mg. de deoxopaniculatina que funde a 117-121°C.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.440-3.000(OH), 2.950-2.850, 2.800 cm^{-1} (NCH₃).

(figura 28, página 97).

RMNP(δ): 0.92(d, J=7Hz, 3H, CH₃CH), 2.2(s, 3H, CH₃N), 3.62(s, a_{1/2} 7.5Hz, 1H CHOH), 3.65(s, 1H, intercambia con D₂O, OH) (figura 29, página 97)

EM m/e (%) : 263(M⁺, 63%), 248(M⁺-15, 50), 235(M⁺-28, 13), 192 (28), 110(25), 96(39), 71(53), 70(44), 58(100), 57(63) (figura 30, página 98).

2.3.1.4. Oxidación de Deoxopaniculatina:

Se disolvió 34 mg. de deoxopaniculatina en 4 ml. de acetona fría y se agregó gota a gota y con agitación una solución de reactivo de Jones hasta que la solución reaccionante mostró un débil color amarillo. Después de tres horas a temperatura ambiente, se eliminó el exceso del oxidante agregando 15 ml. de etanol. La solución se evaporó casi a sequedad, se diluyó con cloroformo y se agitó con solución diluída de bicarbonato de sodio. La evaporación de los extractos orgánicos produjo 30 mg. de una laca que

destilada a presión reducida dió 20 mg. de un aceite que no fue posible caracterizar como producto cristalino y a juzgar por sus propiedades espectroscópicas es dehidrodeoxopaniculatina.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (film): 2.950-2.850, 2.780(NCH₃), 1.690(ciclohexanona), 1.420 cm⁻¹(CH₂-CO-), (figura 31, página 99).

RMNP (δ): 1.02(d, J=4Hz, 3H, CH₃CH), 2.2(s, 3H, CH₃-N) (figura 32, página 99).

EM m/e(%): 261(M⁺, 71%), 246(M⁺-15, 26), 233(M⁺-28, 43), 232(M⁺-29, 48), 204(5), 190(29), 176(14), 149(100), 123(14), 110(58), 96(55), 83(35), 71(60), 70(100) 58(77), 57(84) (figura 33, página 100).

UV $\lambda_{\text{máx}}$ 285 (inflexión)

DOR λ_{nm} (ϕ): 579(0), 435(+52), 366(+417), 350(+1.827), 340(+4.959), 330(+5.742), 310(+7.047) máx., 300(+3.654), 290(+1.305), 280(-2.871) min., 270(-2.610), 260(-783). $a=+99.18$ (figura 34 página 101)

2.3.1.5. Benzoilación de paniculatina.

A 70 mg. de paniculatina disuelta en 3 ml. de piridina destilada se agregó 1.5 ml. de cloruro de benzoilo y se reflujó por dos horas. La mezcla reaccionante se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó agua destilada y se agitó con sucesivas porciones de éter etílico

(5x40 ml). La fase etérea se extrajo con solución de ácido clorhídrico 5% v/v (400 ml.). La solución acuosa se basificó con amoníaco y se extrajo con cloroformo. Los extractos clorofórmicos secos se concentraron dando un residuo cristalino que por sublimación produjo 22 mg. de benzoilpaniculatina que funde a 78-80°C.

$$\alpha_{25}^D = 88.5 (c 1.33, \text{etanol})$$

IR ν_{max} (KBr): 2.950-2.850, 1.720(ciclohexanona), 1.710(benzoato), 1.600, 1.280(benzoato), 710 cm^{-1} (figura 35, página 102)

RMNP(δ): 1.0(d, J=6Hz, 3H, CH₃CH), 2.3(s, 3H, CH₃-N), 5.25(m, a_{1/2} 8Hz, CH-O-CO), 7.5(m, 3 Aromáticos) y 7.9(m, 2H aromáticos) (figura 36, página 102)

EM m/e(%): 381(M⁺, 17%), 277(22), 276(M⁺-105, 100), 204(9), 149(13), 105(56), 96(13), 77(36), 71(20), 70(23), 58(44), 57(42) (figura 37, página 103)

2.3.1.6. Aplicación del método de Horeau a paniculatina.

A 35 mg. de paniculatina se agregó 59 mg. de anhídrido α -fenil butírico racémico (0.5 ml. de solución del anhídrido en piridina a una concentración de 118 mg/ml.) y se dejó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió unas gotas de agua y se calentó la mezcla a baño maría por media hora. La mezcla se vació en un embudo de decantación pequeño que contenía 2 ml. de agua y 3 ml. de benceno. Se agitó y se tituló con 3.2 ml. de hidróxido de sodio 0.1 M

en presencia de fenolftaleína. Rendimiento de Esterificación 47%.

Se separó la capa bencénica y la solución acuosa se extrajo primero con cloroformo y luego con benceno. La solución acuosa se acidificó con ácido clorhídrico y se extrajo con benceno.

Después de evaporar el solvente se añadió 2.0 ml. de benceno y ésta solución mostró, en el espectropolarímetro, una lectura de -0.121° , en una celda de 1 dm. Rendimiento óptico: 25%.

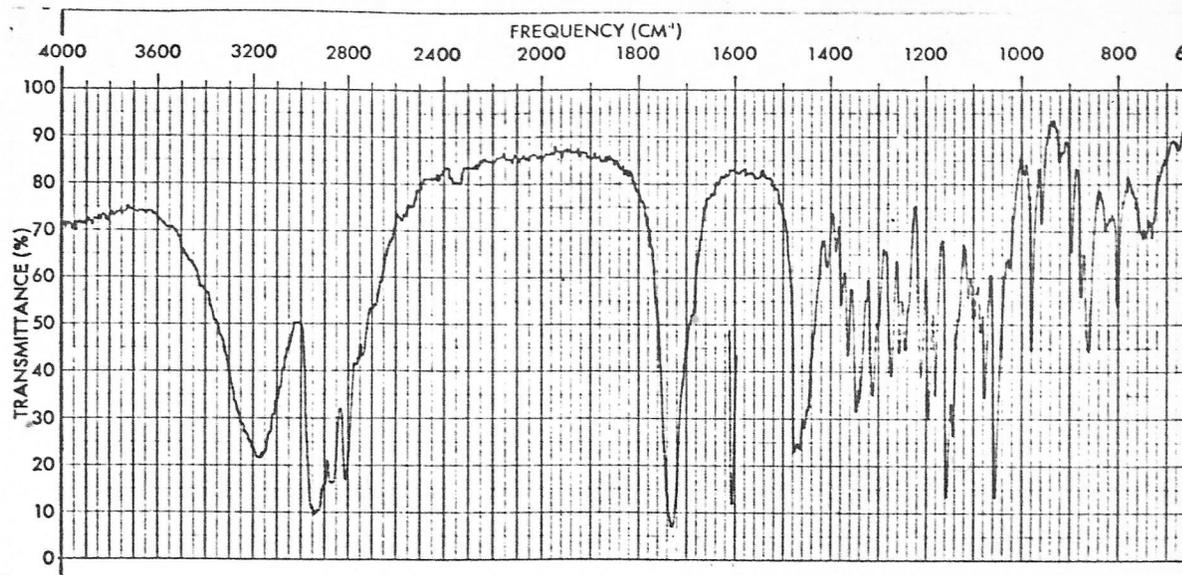


Figura 18. IR (KBr) de paniculatina.

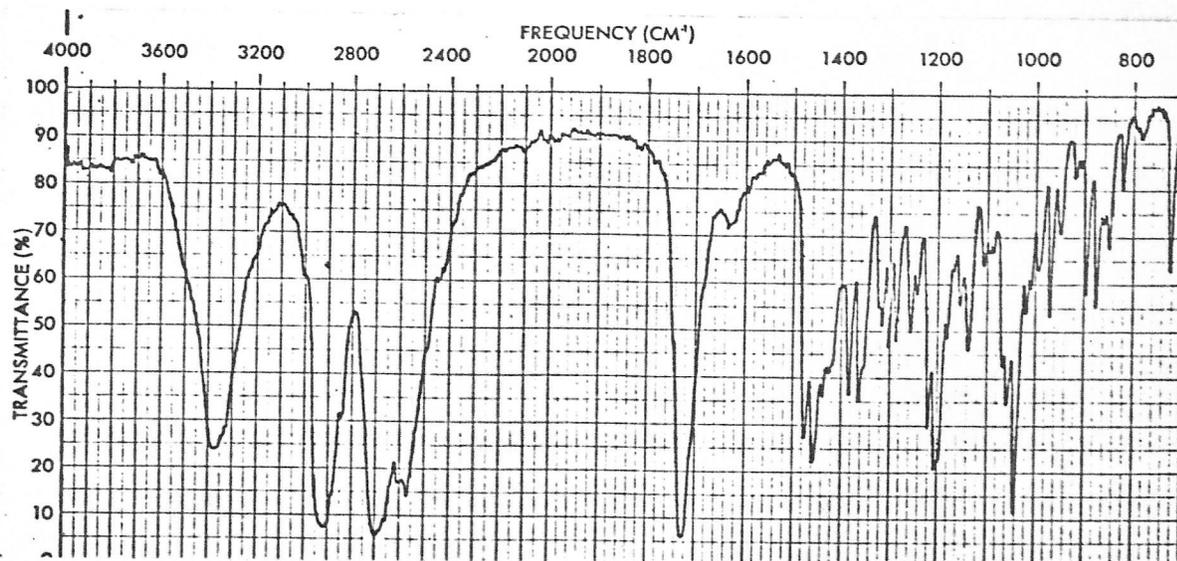


Figura 19. IR (KBr) de hidrobromuro de paniculatina.

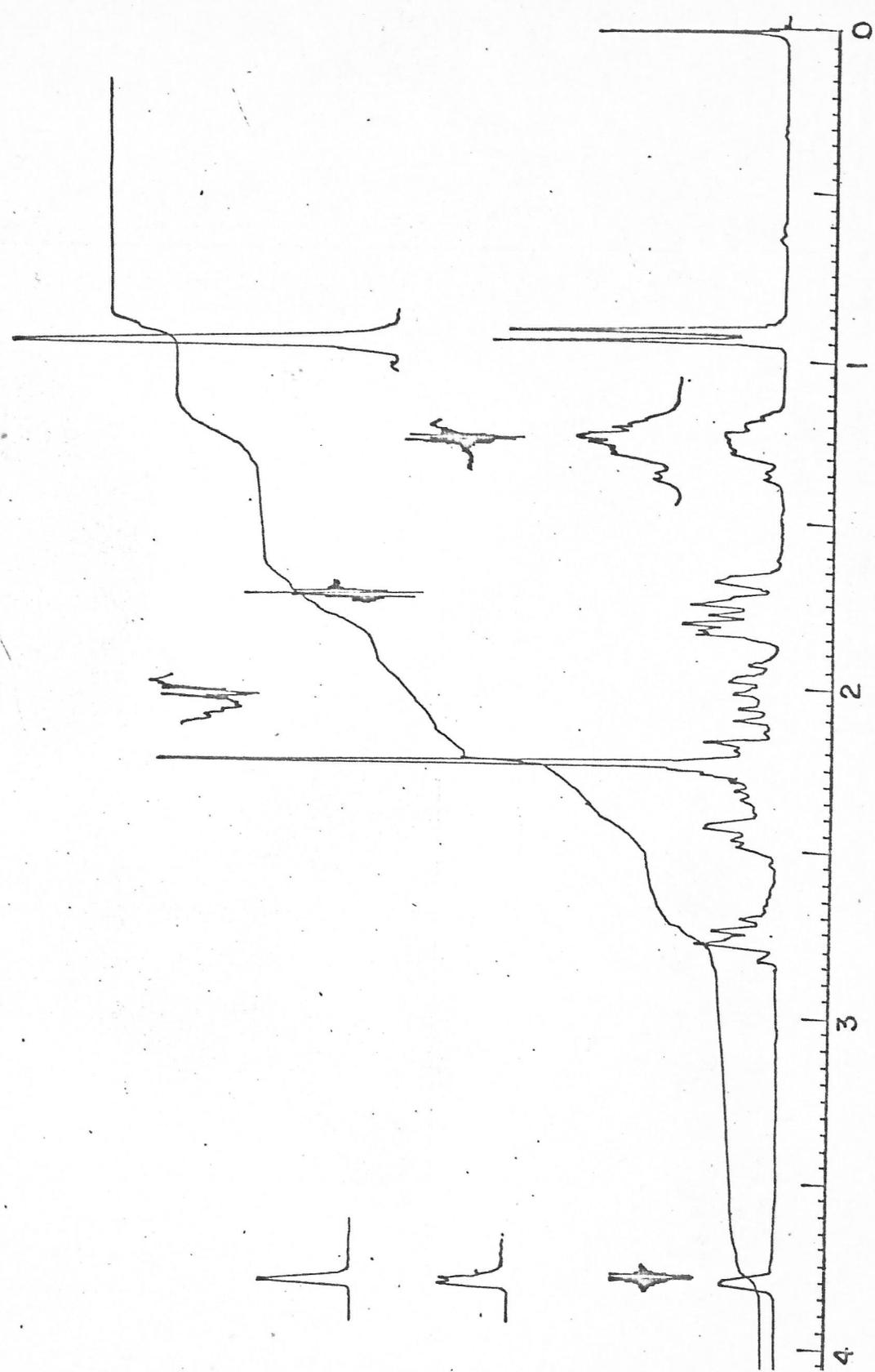


Figura 20. RMNP (220 MHz) de paniculatina.

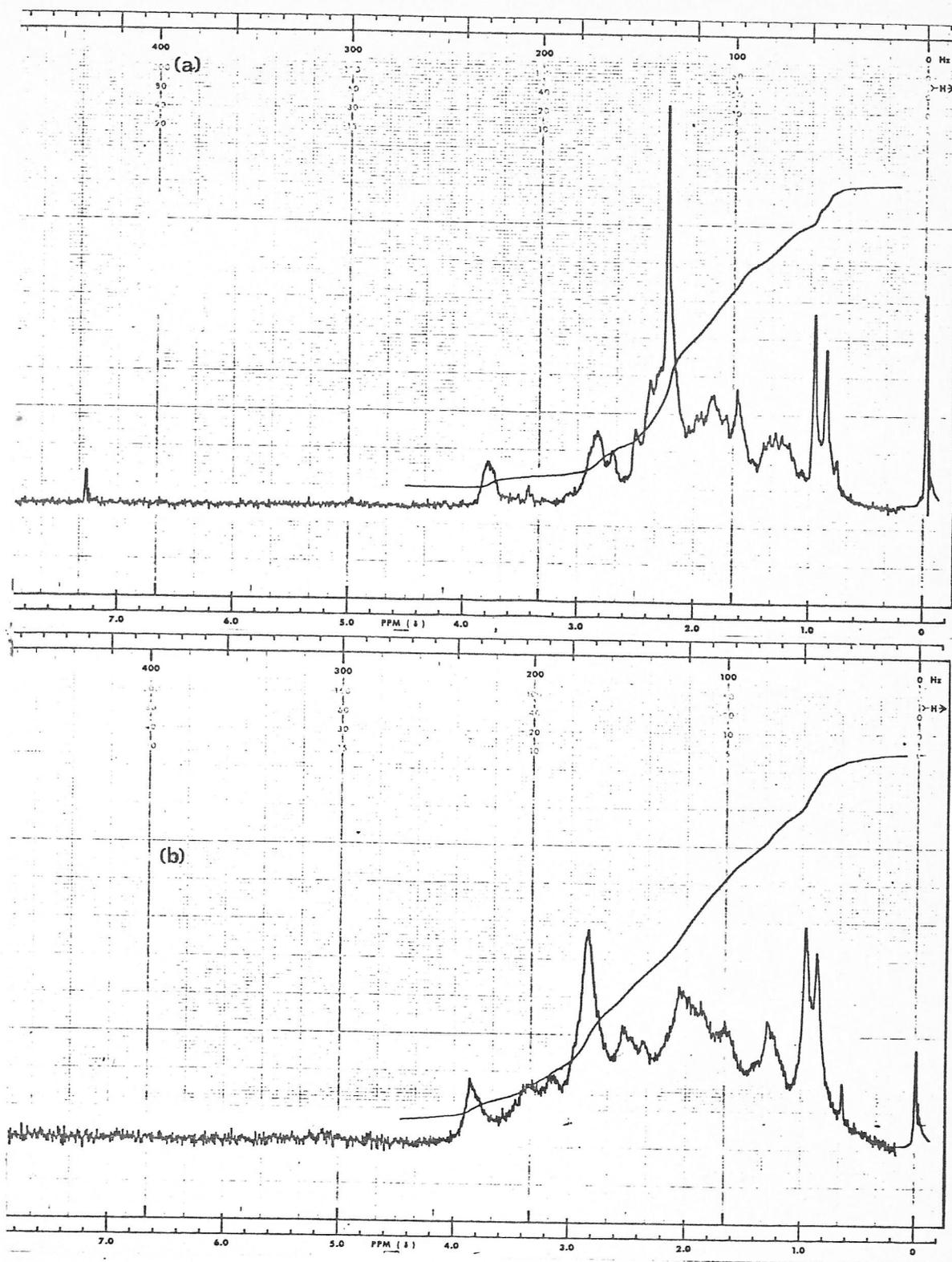


Figura 21. RMNP (60 MHz) de paniculatina a. en CDCl_3 y b. en $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{COOD}$.

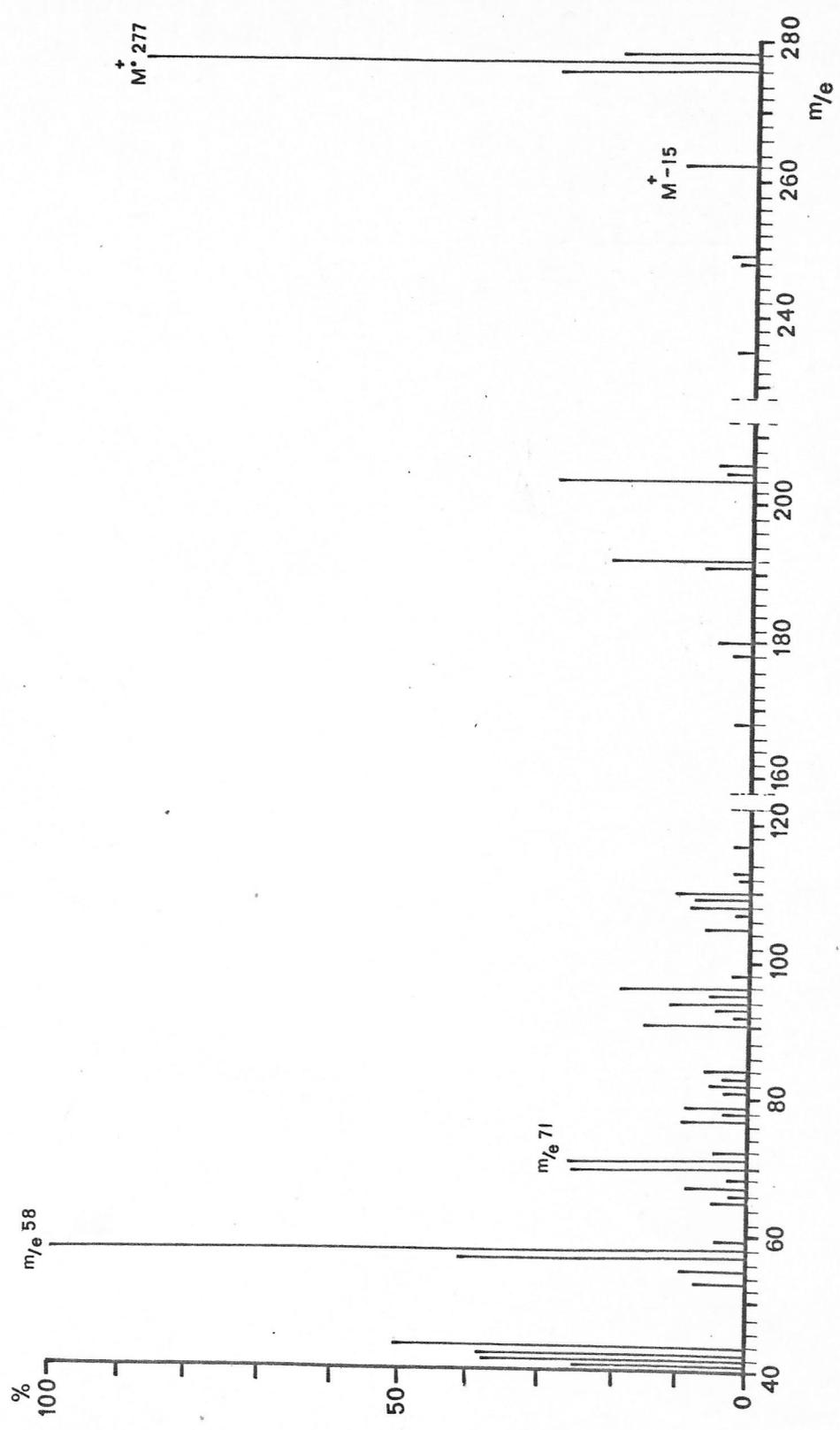


Figura 22. EM de paniculatina

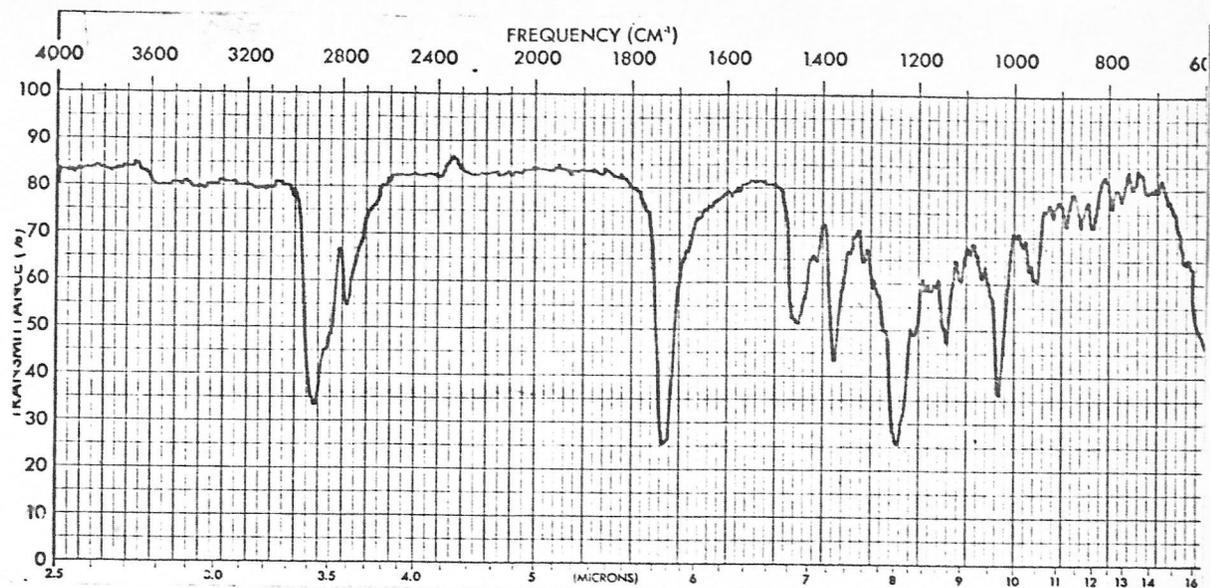


Figura 23. IR (film) de acetilpaniculatina

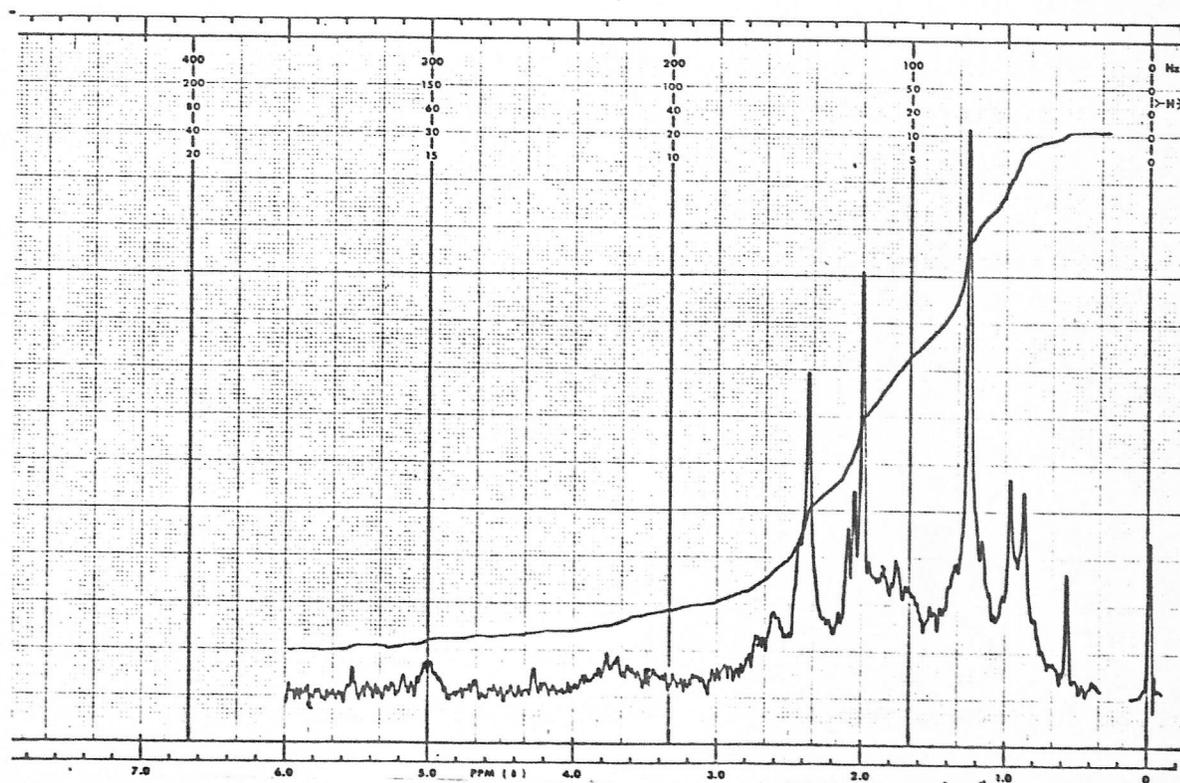


Figura 24. RMNP de acetilpaniculatina

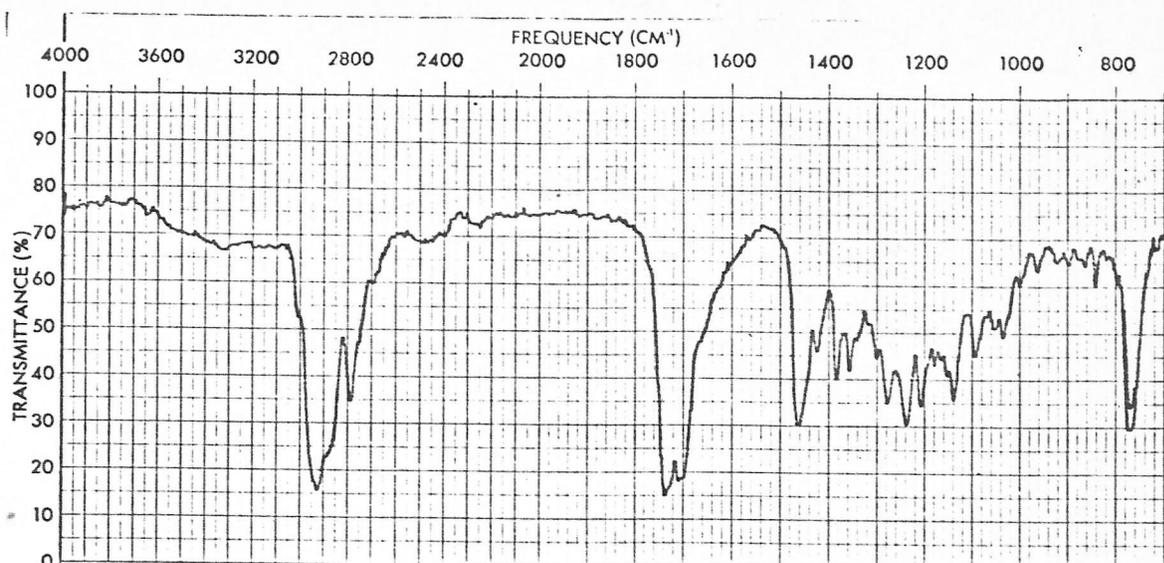


Figura 25. IR (Nujol) paniculatinona.

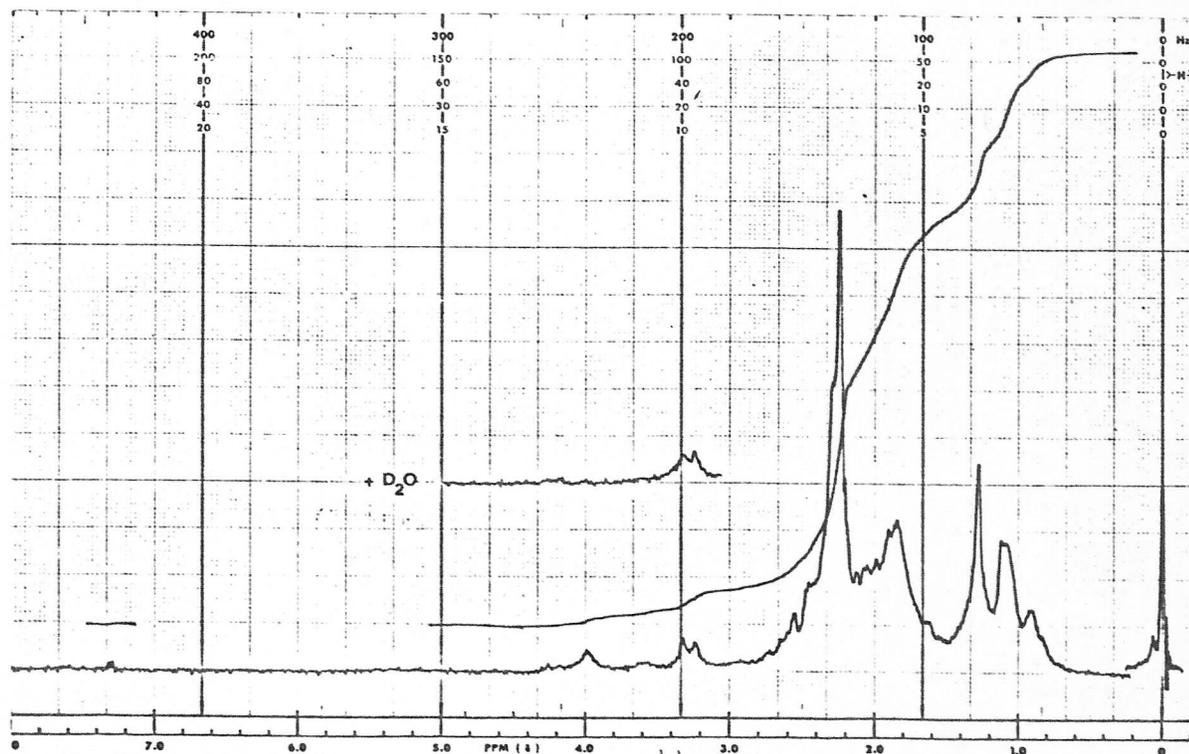


Figura 26. RMNP de paniculatinona.

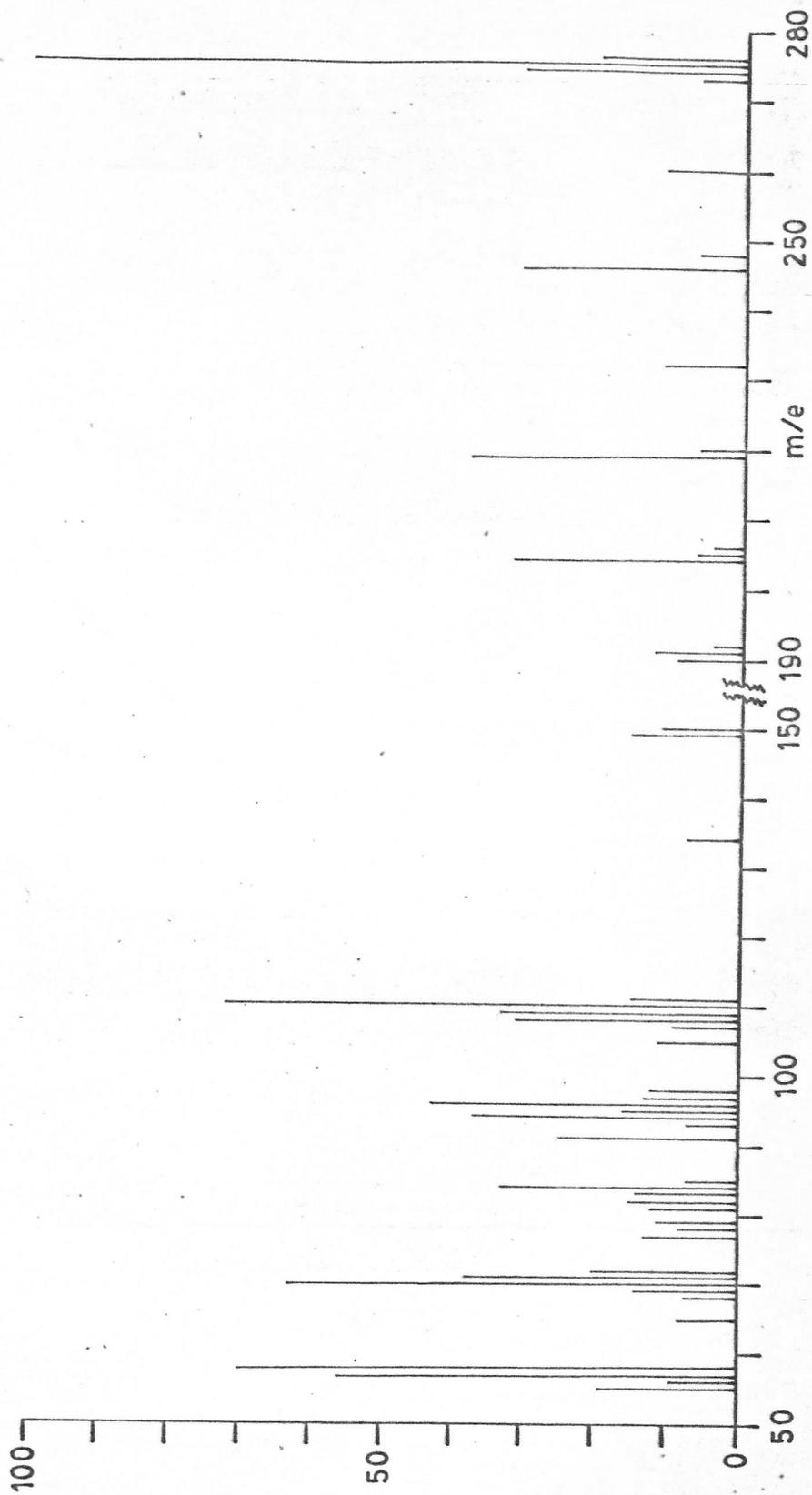


Figura 27. EM de paniculatinona

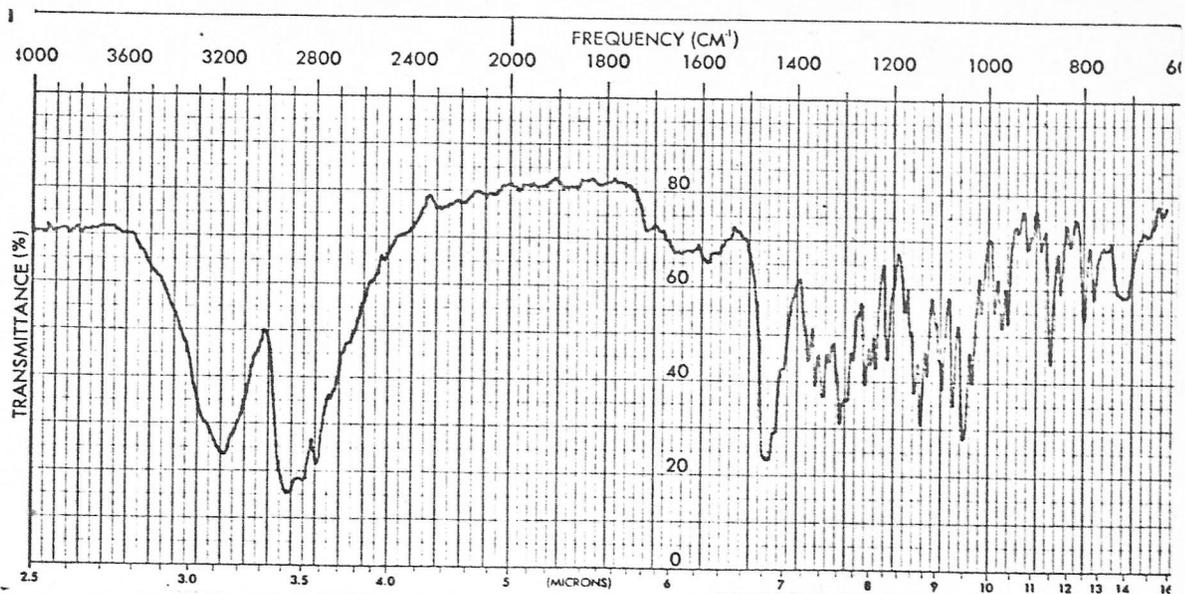


Figura 28. IR (KBr) de deoxopaniculatina

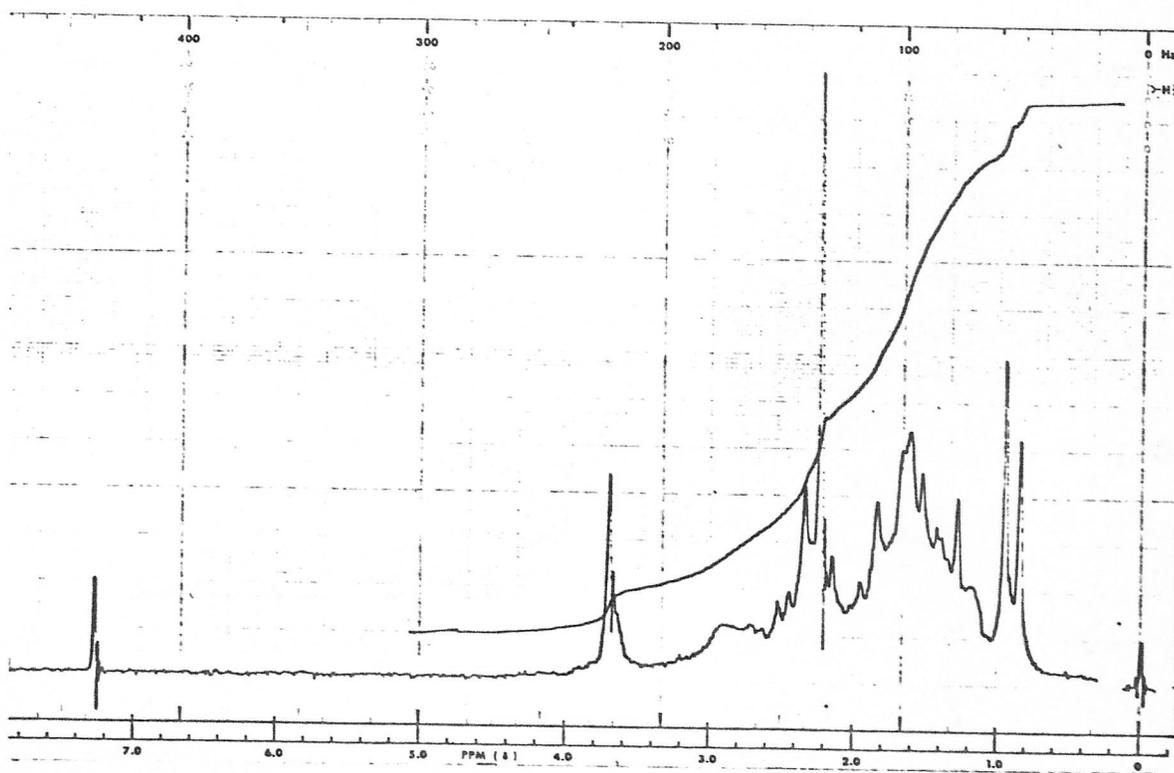


Figura 29. RMNP de deoxopaniculatina.

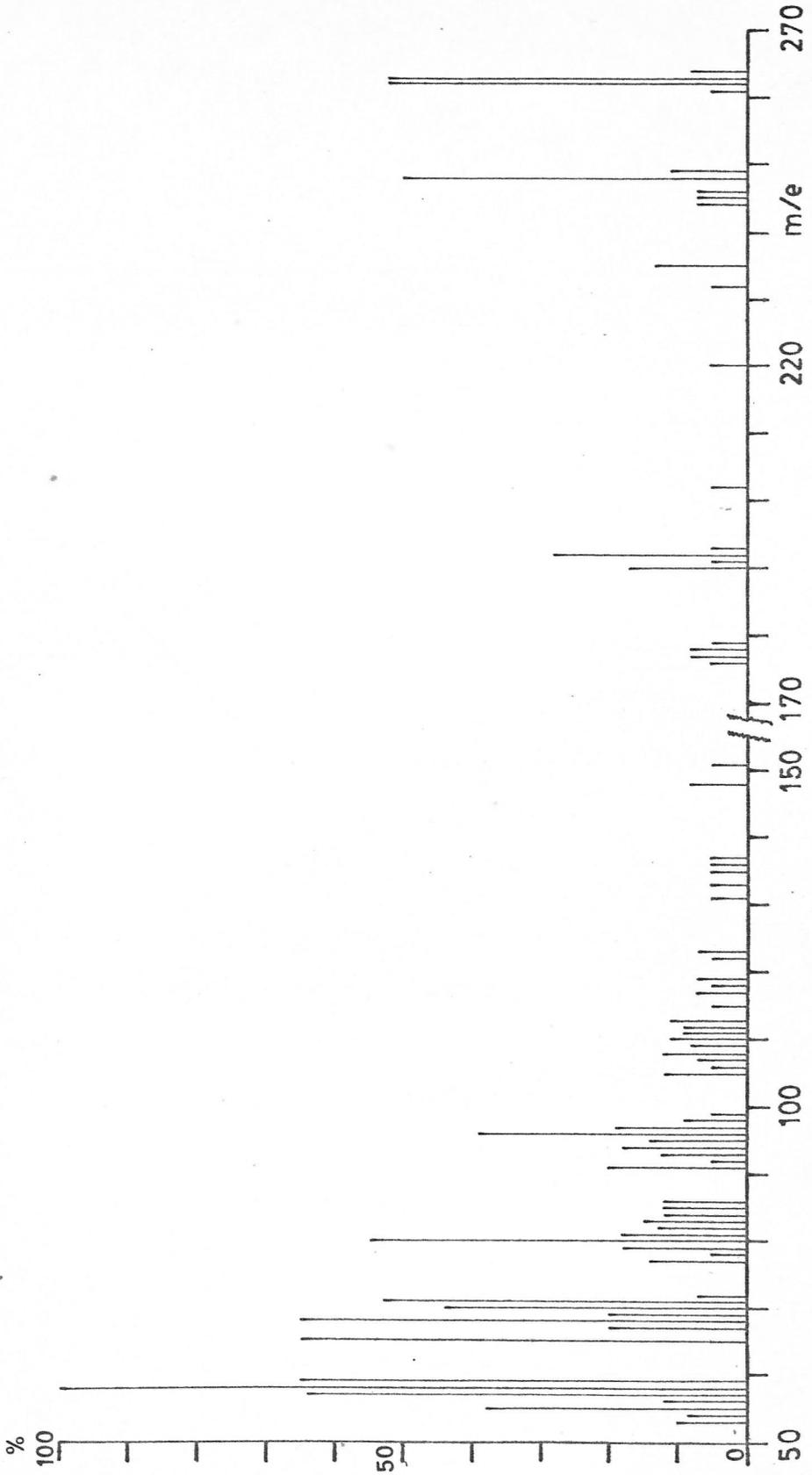


Figura 30. EM de deoxopaniculatina.

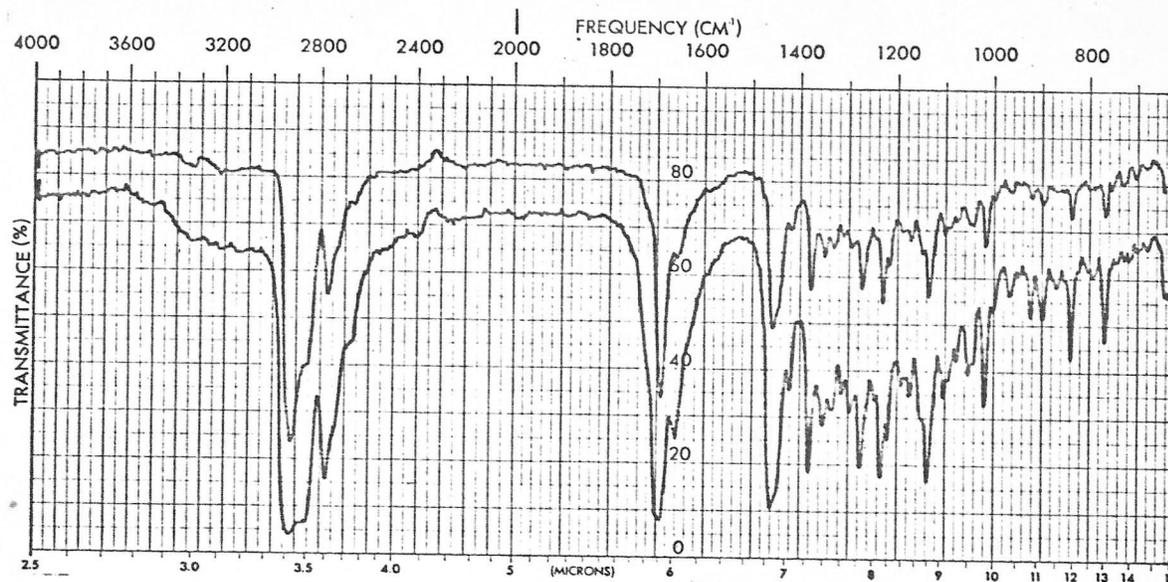


Figura 31. IR (film) de dehidrodeoxopaniculatina.

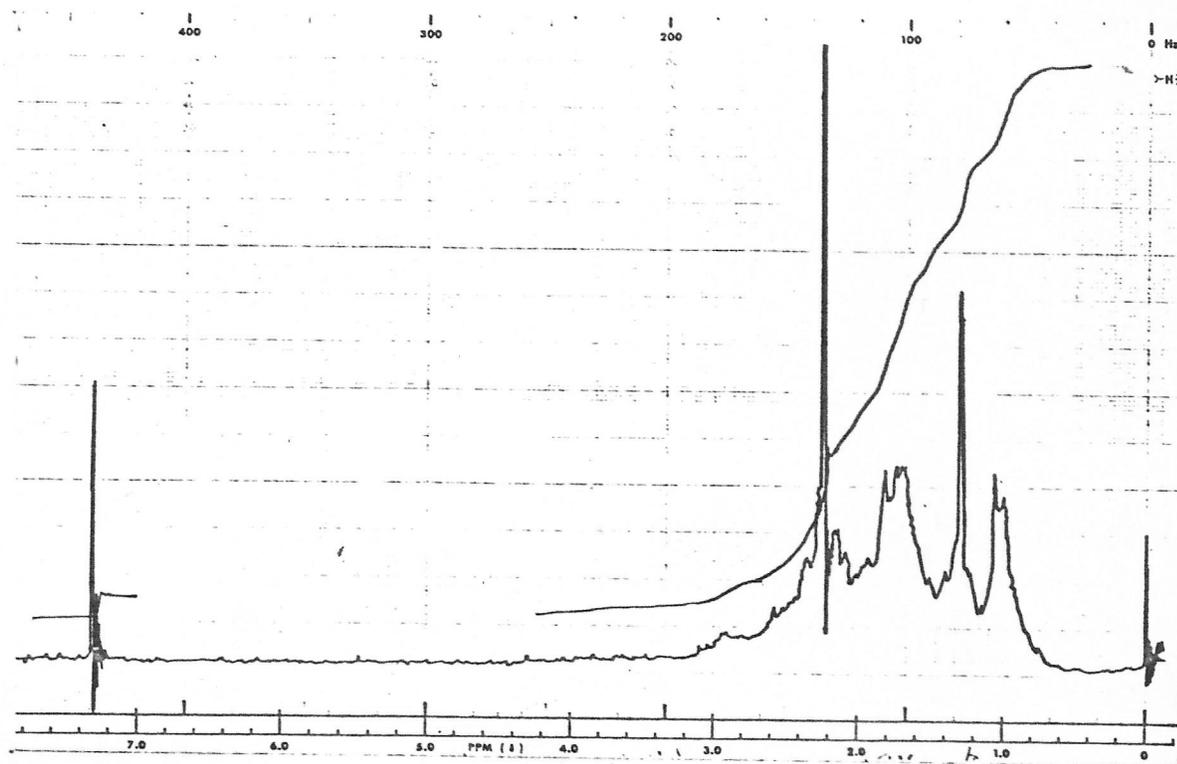


Figura 32. RMNP de dehidrodeoxopaniculatina.

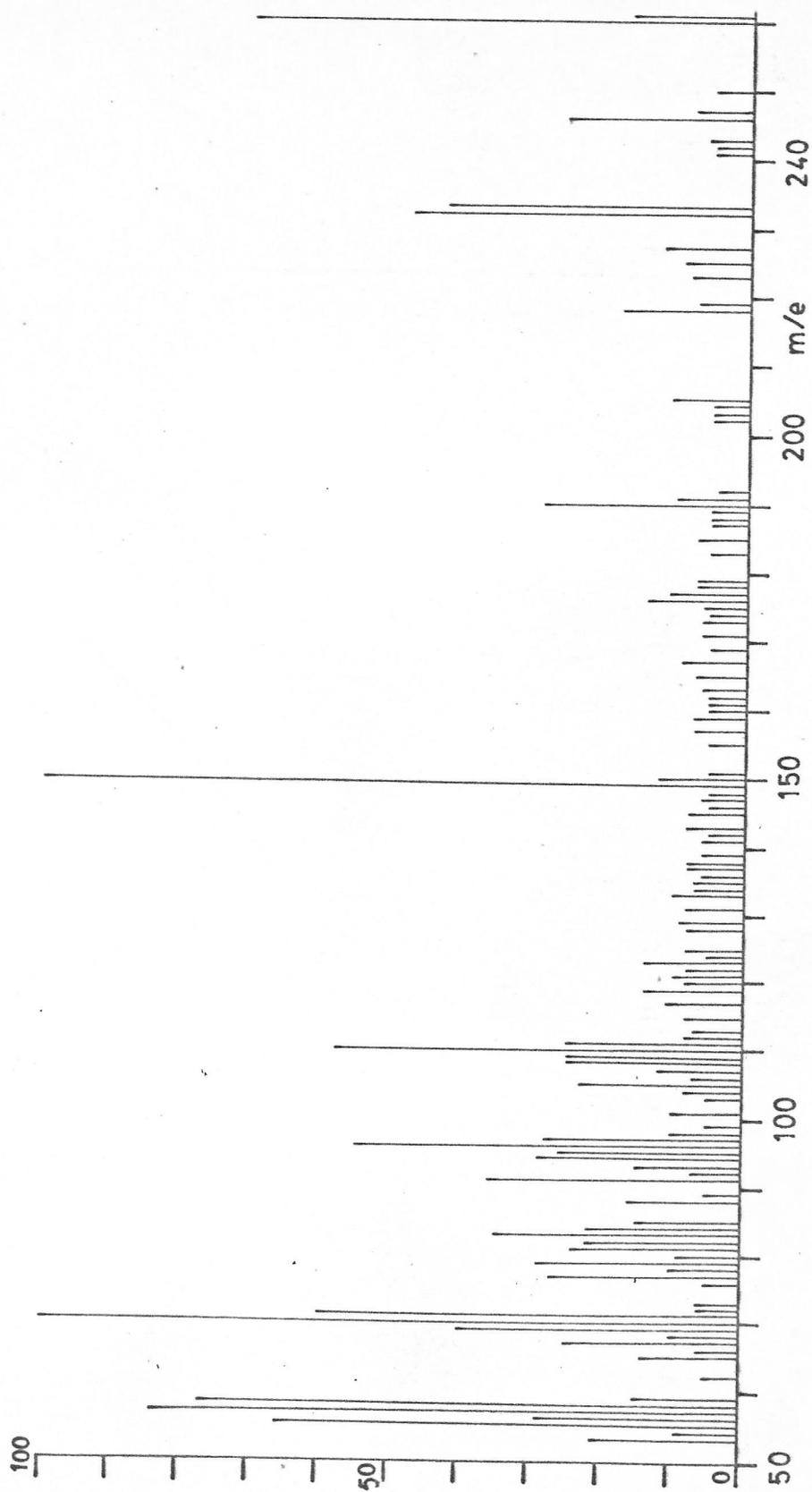


Figura 33. FM de dehidrodeoxonaniculatina

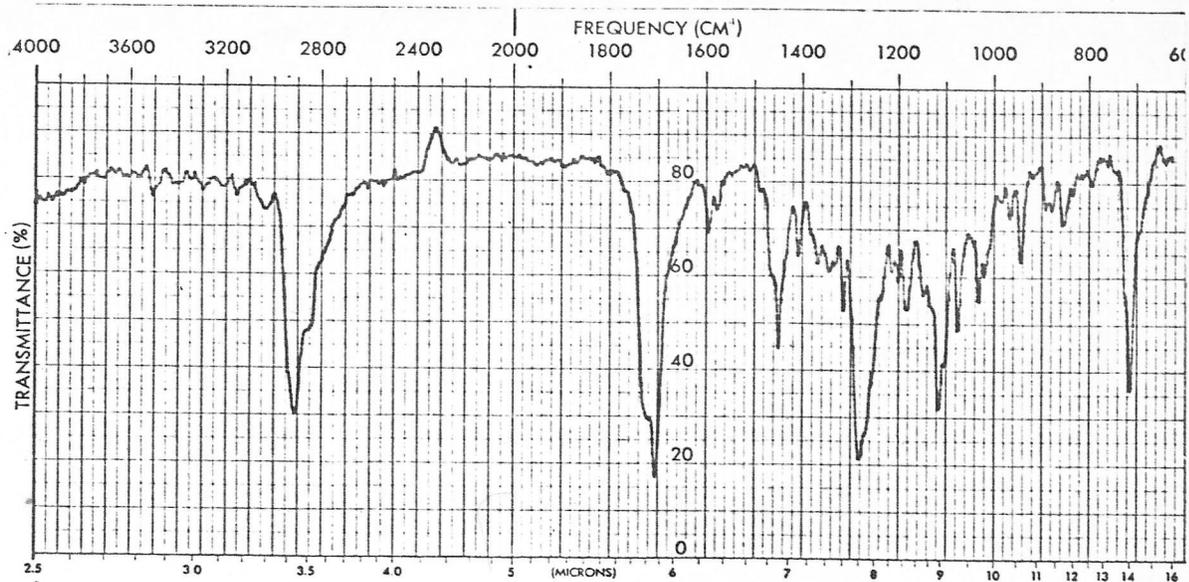


Figura 35. IR (KBr) de benzóilpaniculatina.

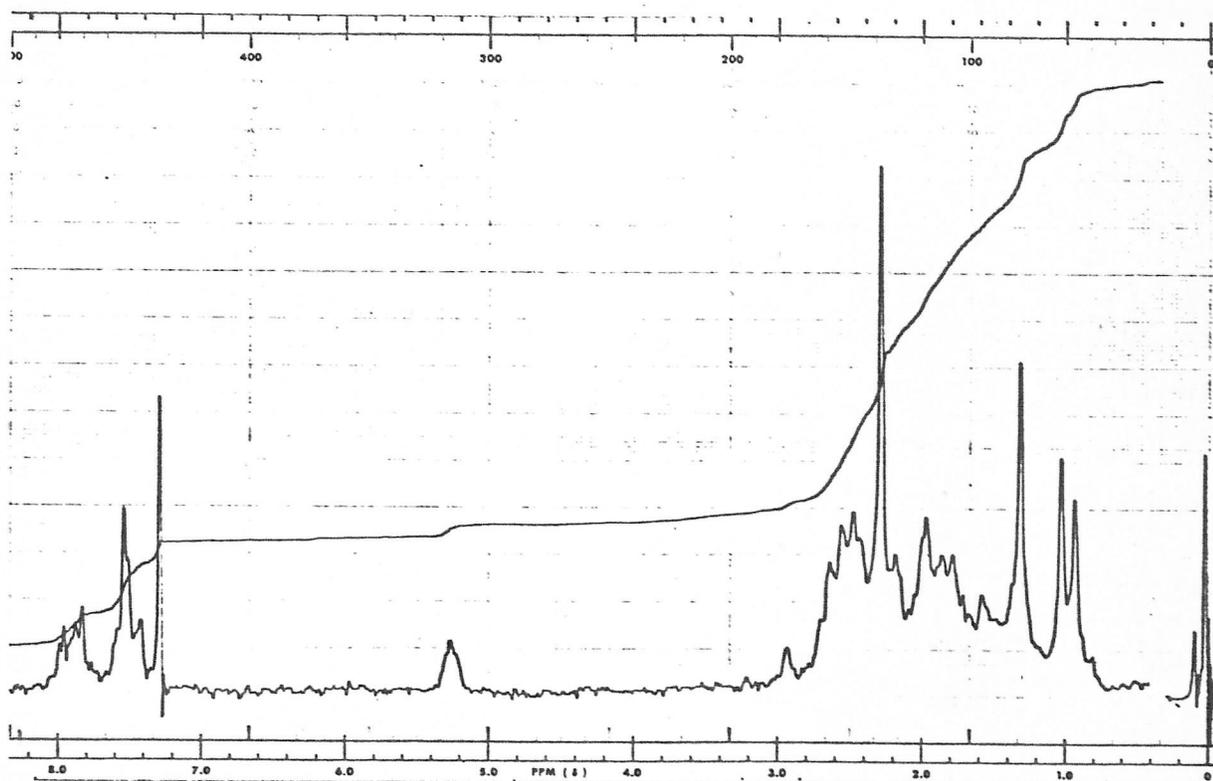


Figura 36. RMNP de benzóilpaniculatina.

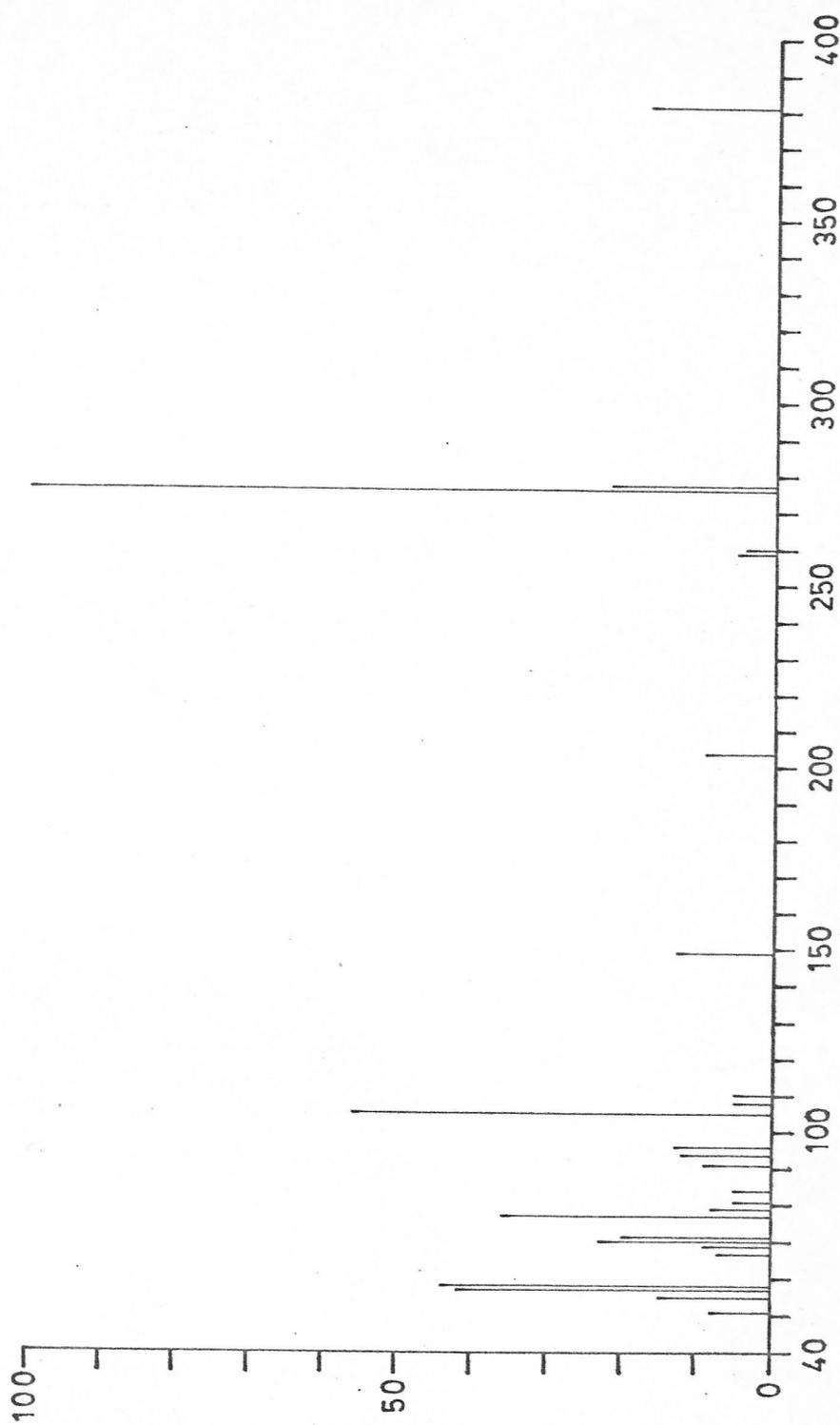


Figura 37. EM de benzoilpaniculatina.

2.3.2 PANICULINA: Este alcaloide cristaliza en acetona y tiene un p.f. de 65-66°C⁽⁹⁶⁾. Sus principales propiedades espectroscópicas son:

IR $\nu_{\text{m\grave{a}x}}$ (KBr): 3.500-3.100(OH), 2.930-2.840, 1.730-1.710, 1.240 cm^{-1} (figura 38, página 112).

$\nu_{\text{m\grave{a}x}}$ (CCl_4): 3.640(OH libre), 1.736, 1.250-1.300 cm^{-1}

IR del hidrobromuro. $\nu_{\text{m\grave{a}x}}$ (KBr): 3.250, 2.750-2.500, 1.740 y 1.250 cm^{-1} (figura 39, página 112).

RMNP (CDCl_3 , 220 MHz) (δ): 0.94(d, J=6Hz, 3H, CH_3CH), 2.04(s, 3H, CH_3CO), 2.90(cuart. J=12 y 4Hz, 1H), 3.04(t, J=11Hz, 1H), 3.49(sext. J=15, 15 y 3Hz, 1H), 3.96(sext. J=11, 11 y 4Hz, 1H) y 5.11(t, J=6Hz, 1H, CHOAc) (figura 40, página 113).

RMNP (CDCl_3 , 100 MHz) (δ): 0.95(d, J=6Hz), 2.05(s, 3H), 3.5-3.9 (m, 2H), 5.10(t, J=6Hz, 1H) (figura 41, página 114).

RMNP (δ): 0.9(d, J=6Hz, 3H), 2.0(s, 3H), 3.5-4.0(m, 2H), 5.1 (t, J=6Hz, 1H) (figura 42, página 115).

RMNP (doble irradiación) (δ)

irradiación	efecto
1.41	5.11(t, J=6Hz) → d, J=6Hz
1.78	5.11(t, J=6Hz) → d, J=6Hz

EM m/e (% , composición por alta resolución): 307(M^+ , 25%, $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_3$), 264($\text{M}^+ - 43, 6, \text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_3$), 250 ($\text{M}^+ - 57, 100, \text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_3$), 208(10, $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2$), 206(8, $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_2$), 190(22, $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}$), 172(11, $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}$), 144(4) (figura 43, página 115).

Análisis elemental: calculado para $C_{18}H_{29}NO_3$: C 70.31%, H 9.51% y N 4.54%. Valores encontrados: C 70,20%, H 9.45% y N 4.51%.

Paniculina no es oxidado por reactivo de Jones (3 horas), ni de Sarret (5 horas), ni trióxido de cromo-ácido acético¹⁶.

2.3.2.1. Hidrólisis alcalina de Paniculina

Se disolvió 30 mg. de paniculina en 2.0 ml. de metanol y se añadió 2.5 ml. de una solución 50% metanol-hidróxido de sodio 5N y se reflujo por 5 horas. La solución fría se diluyó con agua y se extrajo con cloroformo repetidas veces. La solución clorofórmica seca se evaporó dando un residuo blanco, espumoso. Por sublimación se obtuvo un producto (23 mg.) que mostró un p.f. de 159°-160°C, mientras que cristalizado de acetona-éter etílico funde a 172-174°C

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.300-3.000(OH), 2.950-2.850 cm^{-1} . (figura 44, página 116).

$\nu_{\text{máx}}$ (Nujol): 3.320-3.300 y 3.100-3.000 cm^{-1} .

$\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3): 3.620(OH) y 3.580(OH) cm^{-1}

RMNP (δ): 0.9(d, J=6Hz, 3H), 3.9(m, $a_{1/2}$ 16Hz, 2H), 3.0-4.0(m, 3H) (figura 45, página 116)

EM m/e (%): 265(M^+ , 10%), 248(M^+ -17, 4), 247(M^+ -18, 3), 222(M^+ -43, 4), 210(4), 209(24), 208(M^+ -57, 100), 207(6), 204(s), 190(7), 188(4), 178(5), 172(7), 144(5) (figura 46, página 117).

Las propiedades cromatográficas y espectroscópicas del producto de hidrólisis de paniculina son idénticas con las del alcaloide aislado en este trabajo denominado Desacetilpaniculina (página 110).

2.3.2.2. Oxidación de Desacetilpaniculina.

Se disolvió 15 mg. de Desacetilpaniculina en 10 ml. de piridina y se añadió sobre una solución de 1,5 ml. de piridina que contenía 150 mg. de trióxido de cromo y se dejó a temperatura ambiente. Después de 24 horas se diluyó la mezcla reaccionante con agua fría, se basificó con amoníaco y se extrajo con cloroformo. La solución clorofórmica seca, se evaporó resultando 15 mg. de un producto cristalino que una vez sublimado funde a 57-59°C y que a juzgar por sus propiedades espectroscópicas, corresponde a una hidroxiketona.

Un producto idéntico se obtuvo por oxidación de desacetilpaniculina (producto natural) con reactivo de Jones.

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (Etanol) 270 (ϵ 1.500), 220 (ϵ 900).

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.400-3.100(OH), 2.970-2.850, 1.690(ciclohexanona), 1.420 cm^{-1} ($\text{CH}_2\text{-CO}$) (figura 47, página 118)

RMNP (δ): 0.9(d, J=4Hz, 3H, CH_3CH) y 3.0-4.0(2H) (figura 48, página 118).

EM m/e (%): 263(M^+ , 9), 220($\text{M}^+ - 43$, 2), 208(6), 207(16), 206($\text{M}^+ - 57$, 100), 204(7), 190(3), 178(11), 176(3), 160(5), 150(3), 134(4) (figura 49, página 119).

DOR λ nm (Φ): 579(-92), 546(-92), 436(-220), 407(-66), 366
 (+184), 334(+657), 320(+2.235), 312(+2.498),
 310(+2.727 máx), 300(+876), 290(-657), 280
 (-3.287), 270(-3.944 mín) 260(-657).
 $a = +66.61$ (figura 50, página 120).

El IR del hidrobromuro derivado (p.f. > 340°C) muestra las siguientes bandas asignables:

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.300(OH), 1.690(ciclohexanona), 1.420 cm^{-1}
 (-CH₂-CO)

2.3.2.3. Acetilación de Paniculina.

Se disolvió 30 mg. de paniculina en una solución de 1.5 ml. de piridina frescamente destilada y 1.5 ml. de anhídrido de acético. La mezcla reaccionante se dejó a temperatura ambiente por 72 horas. Se diluyó con agua, se basificó con solución de bicarbonato de sodio y se extrajo repetidas veces con cloroformo. El residuo cristalino (32 mg.) que resultó de evaporar los extractos clorofórmicos se purificó por c.c.p. (alúmina, éter etílico usando 2 placas de 20 x 20 cm x 0.2 mm.). Se separó dos fracciones. La recuperación desde el soporte cromatográfico de la fracción de mayor R_f produce finalmente 16 mg. de un producto que cristaliza en acetona y funde a 190° con descomposición. Por sus propiedades espectroscópicas este derivado corresponde a Acetilpaniculina.

De la fracción de menor R_f se recuperó 11 mg. de

paniculina sin reaccionar.

Las propiedades espectroscópicas de acetilpaniculina son:

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) 2.950-2.850, 1.730 y 1.250 cm^{-1} (muy intensa) (figura 51, página 121).

RMNP (δ): 0.9 (d, J=7Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 2.0 (s, 6H, CH_3CO), 5.1 (t, J=6Hz, 1H, CHOAc), (figura 52, página 121).

EM m/e(%): 349 (M^+ , 2%), 292 ($\text{M}^+ - 57$, 3), 289 ($\text{M}^+ - 60$, 5), 232 ($\text{M}^+ - 117$, 38), 202 (24), 186 (11), 174 (12), 172 ($\text{M}^+ - 177$, 100), 144 (45), 136 (6) (figura 53, página 122).

2.3.2.4. Deshidratación de Desacetilpaniculina.

Se disolvió 15 mg. de desacetilpaniculina en 2.0 ml. de cloruro de metileno y se agregó 2 ml. de cloruro de tionilo recién destilado. Después de 21 horas a temperatura ambiente se añadió 5 ml. de solución de ácido clorhídrico 5% v/v y se agitó repetidas veces con éter etílico. Se descartó la fase orgánica. La solución acuosa se alcalinizó con amoníaco y se extrajo con cloroformo. El producto cristalino (14 mg.) que resultó de la sublimación del residuo clorofórmico mostró ser idéntico a anhidrodesacetilpaniculina, alcaloide aislado en este trabajo y cuyas principales propiedades espectrales y químicas se muestran en página .

2.3.2.5. Conversión de Paniculina en acetildihidrolipodina.

Se disolvió 51 mg. paniculina en 20 ml. de cloruro de metileno y con agitación magnética y bajo corriente de nitrógeno se añadió en sucesivas porciones pentacloruro de

fósforo (200 mg. en una hora)⁽¹¹⁴⁾. Después de cuatro horas a temperatura ambiente se diluyó la mezcla reaccionante con cloroformo saturado de agua. Se agitó en un embudo de decantación con solución de bicarbonato de sodio y se separó la solución clorofórmica. La fase orgánica seca produjo por evaporación 55 mg. de un producto aceitoso de color café oscuro. Este crudo, que dió reacción positiva al test de Beilstein¹¹⁵, se disolvió en 15 ml. de etanol absoluto, se añadió óxido de platino y unos cristallitos de acetato de sodio¹¹⁶ y se mantuvo durante toda la noche bajo una atmósfera de hidrógeno con agitación magnética. La solución alcohólica filtrada se evaporó casi a sequedad, se diluyó con 5 ml. de agua y se extrajo con cloroformo (15 ml.).

El crudo obtenido de los extractos clorofórmicos (40 mg.) se sublimó y produjo un material cristalino (19 mg.) idéntico en todas sus propiedades espectroscópicas y cromatográficas a acetildihidrolicopodina auténtica.

Cuando paniculina se reflujo con cloruro de tionilo en benceno por 24 horas, se obtuvo un crudo (positivo al test de Beilstein) de 5 componentes. Después de hidrogenación catalítica no fue posible aislar ningún producto caracterizable, aunque un componente de la mezcla mostró similar conducta cromatográfica con acetildihidrolicopodina.

2.3.3. DESACETILPANICULINA.

Este alcaloide funde una vez cristalizado de acetona a 170-172°C. El hidrobromuro derivado funde a 275°desc. Las propiedades espectroscópicas, que concuerdan con el derivado de hidrólisis de paniculina, se han mostrado en página 105.

2.3.3.1. Acetilación de Desacetilpaniculina.

Se disolvió 60 mg. de desacetilpaniculina en 3.5 ml de piridina y 3.5 ml. de anhídrido acético. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 19 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se agitó exhaustivamente con cloroformo. El extracto clorofórmico se concentró a presión reducida produciendo una laca café (50 mg.) que contiene, según c.c.f. (alúmina, éter etílico) tres productos, un componente mayoritario de Rf 0.8, un componente menor de Rf 0.4 y algo de desacetilpaniculina sin reaccionar

Una columna de alúmina (12 gr., Actividad II, éter etílico) permitió separar un sólido que una vez sublimado mostró ser idéntico en todas sus propiedades con acetilpaniculina (página 107)

El componente de Rf 0.4 no pudo ser aislado pero cromatográficamente mostró ser distinto a paniculina

2.3.4. ANHIDRODESACETILPANICULINA

Este alcaloide cristaliza de acetona y funde con descomposición a 175°-185°C.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.250-3.190(OH), 2.950-2.850, 1.070 cm^{-1}

(figura 54, página 123).

IR $\nu_{\text{máx}}$: 3.620 cm^{-1} (OH libre)

RMNP (δ): 0.9(d, J=6Hz, 3H, CH₃CH), 3.3(m, a_{1/2} 18Hz, 1H), 3.8

(m, a_{1/2} 16Hz, 1H), 5.5(m, a_{1/2} 10Hz, 1H olefínico) (figura 55, página 123)

EM m/e (% , composición por alta resolución): 247(20, C₁₆H₂₅NO),

218(3, C₁₄H₂₀NO), 204(8, C₁₃H₁₈NO), 190(100,

C₁₂H₁₆NO), 172(43, C₁₂H₁₄N) (figura 56, página 124).

Anhidrodesacetilpaniculina fue resistente a la oxidación con trióxido de cromo-ac. acético¹⁶, con reactivo de Jones y con reactivo de Sarret. Anhidrodesacetilpaniculina fue recuperado intacto después de una hidrogenación con óxido de platino en metanol.

Finalmente, el alcaloide no fue acetilado con anhídrido acético-piridina a temperatura ambiente por 5 horas.

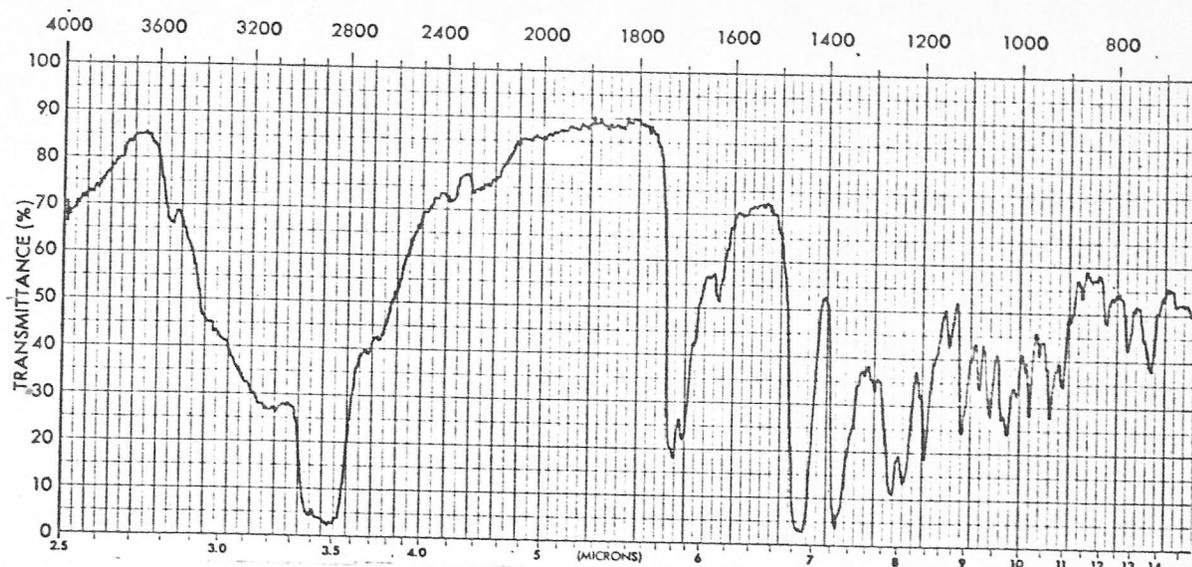


Figura 38. IR (KBr) de paniculina.

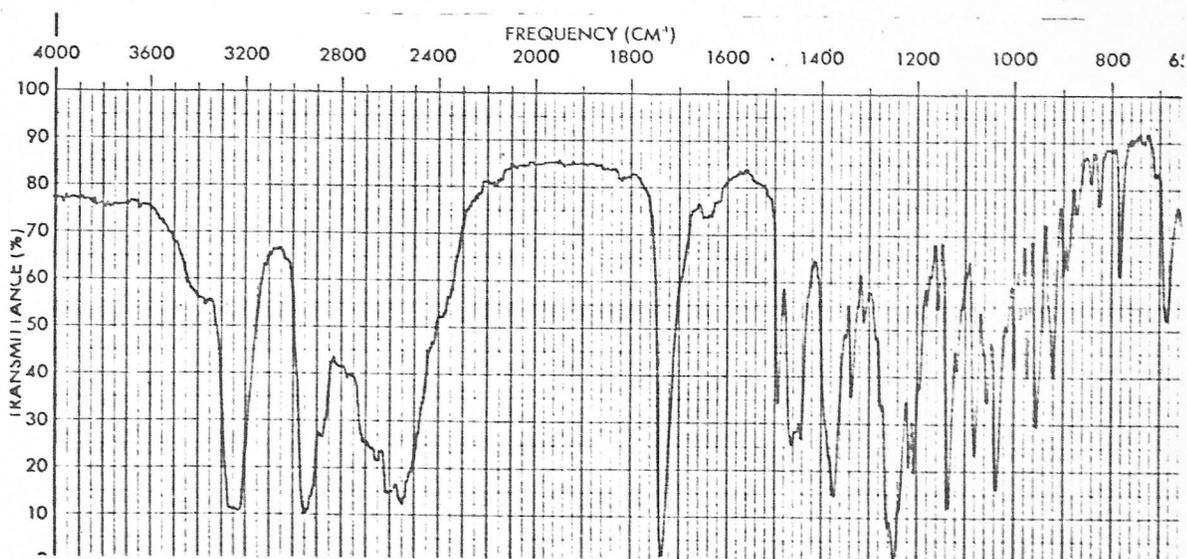


Figura 39. IR (KBr) del hidrobromuro de paniculina.

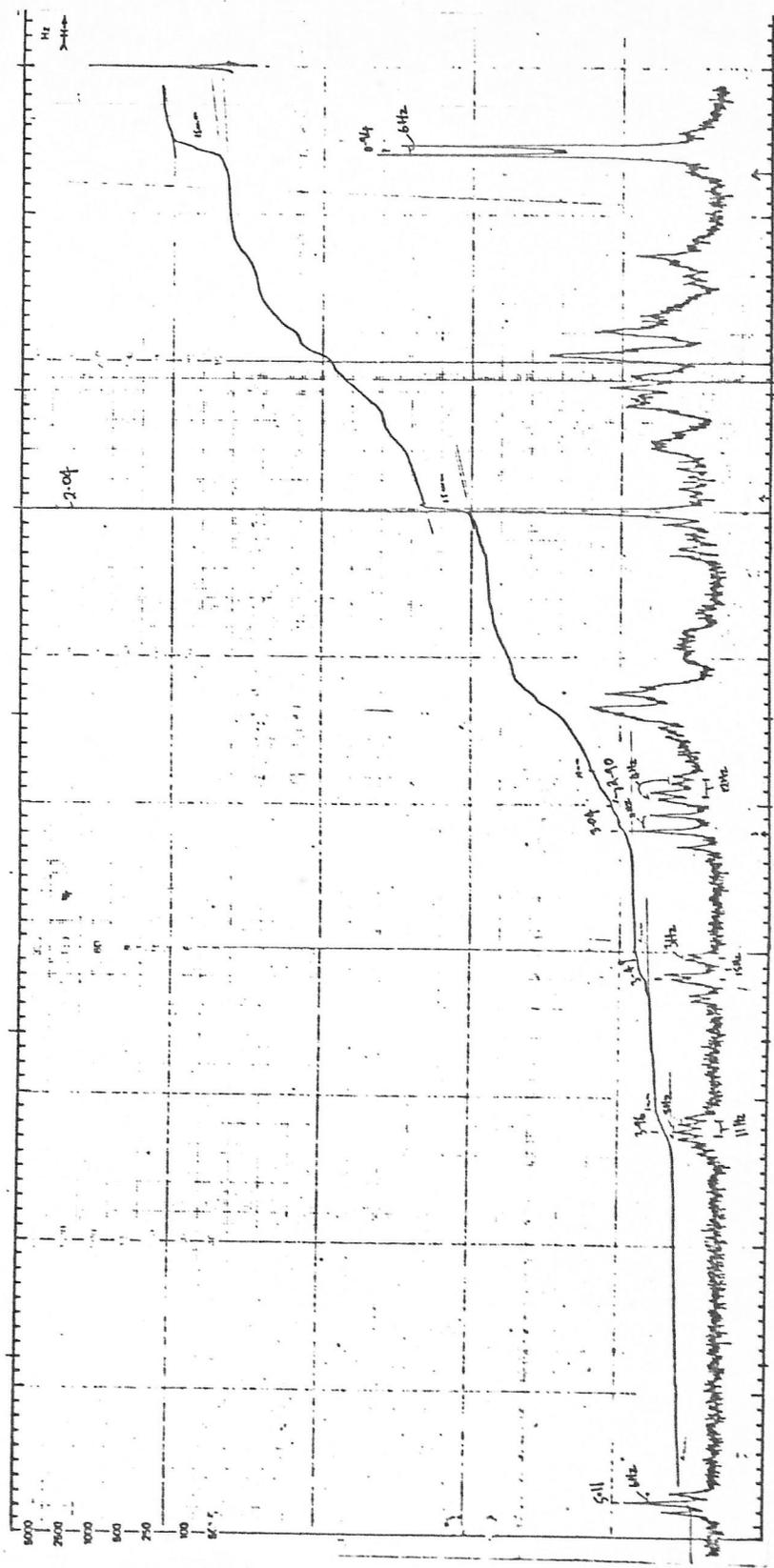


Figura 40. RMNP (220 MHz) de paniculina.

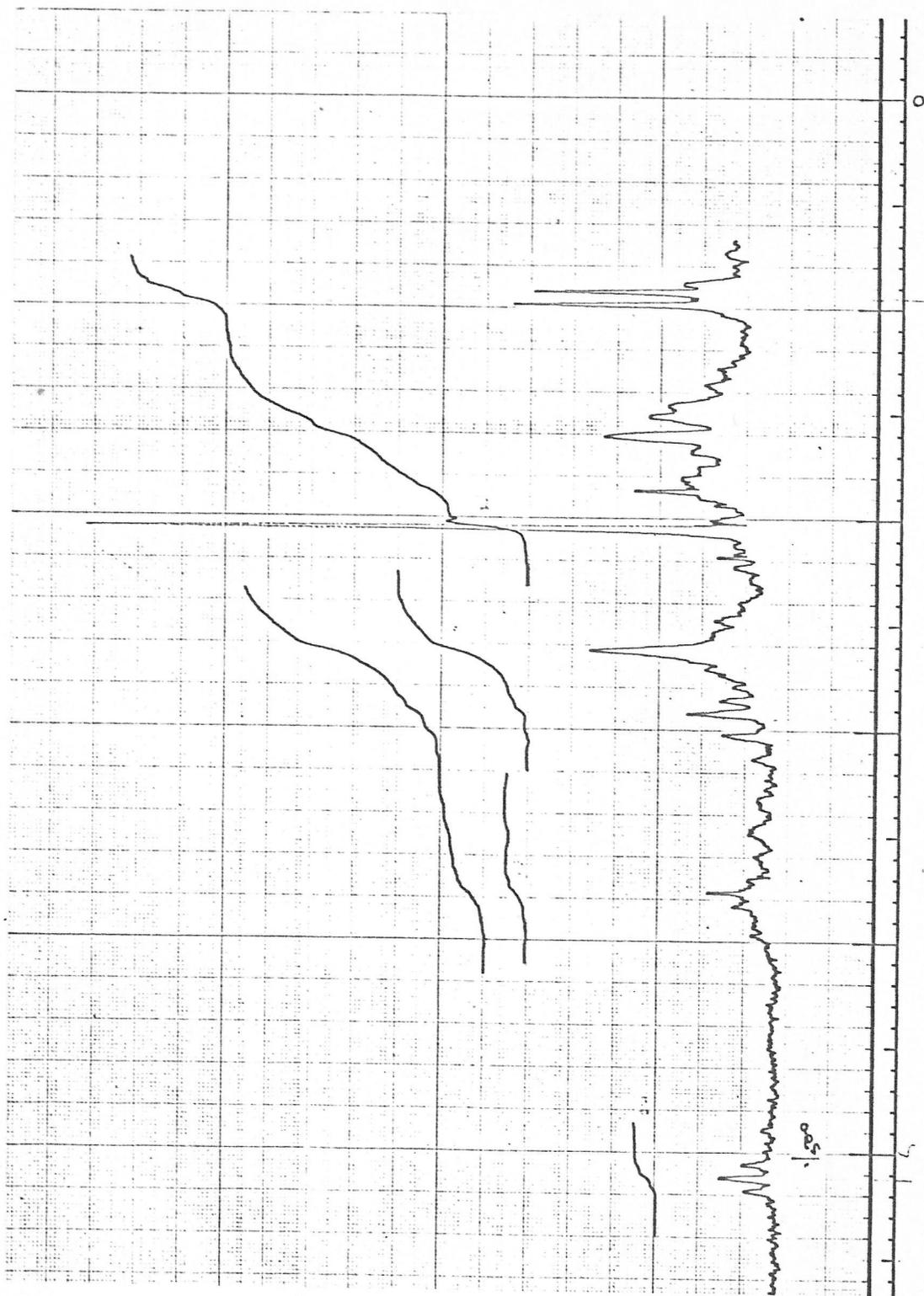


Figura 41. RMNP (100 MHz) de paniculina.

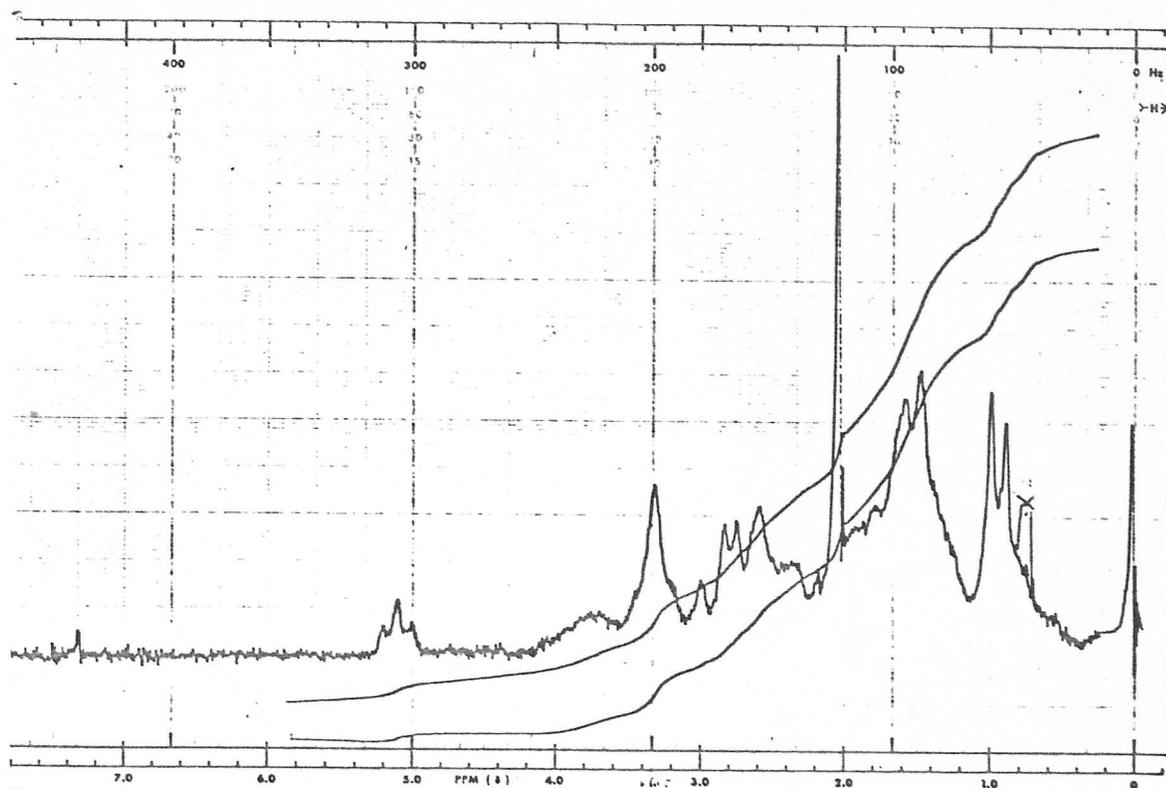


Figura 42. RMNP (60 MHz) de paniculina.

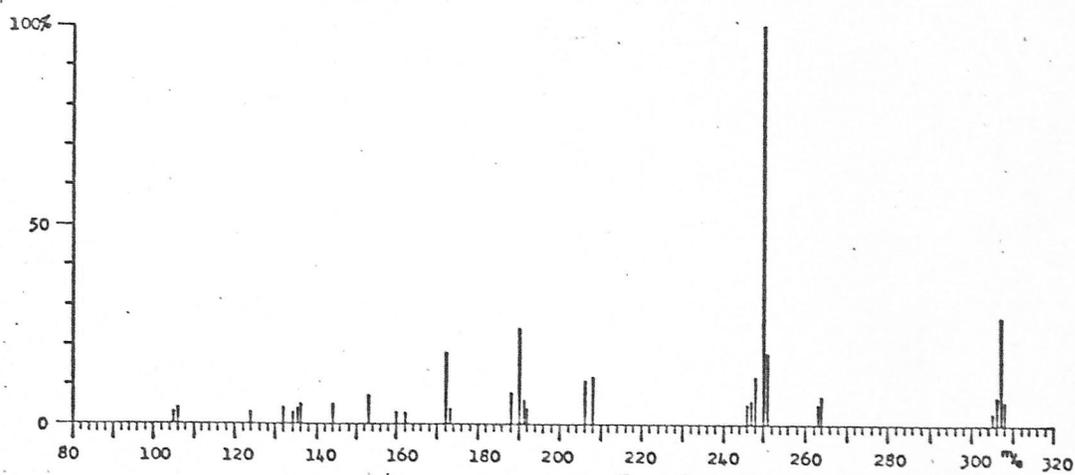


Figura 43. EM de paniculina)

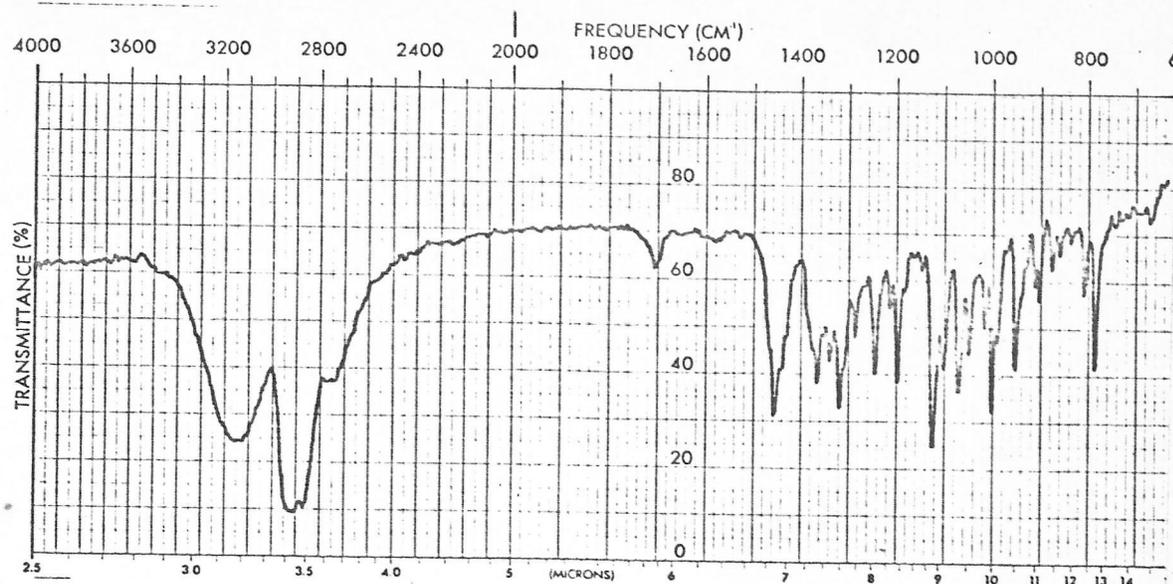


Figura 44. IR (KBr) de desacetilpaniculina.

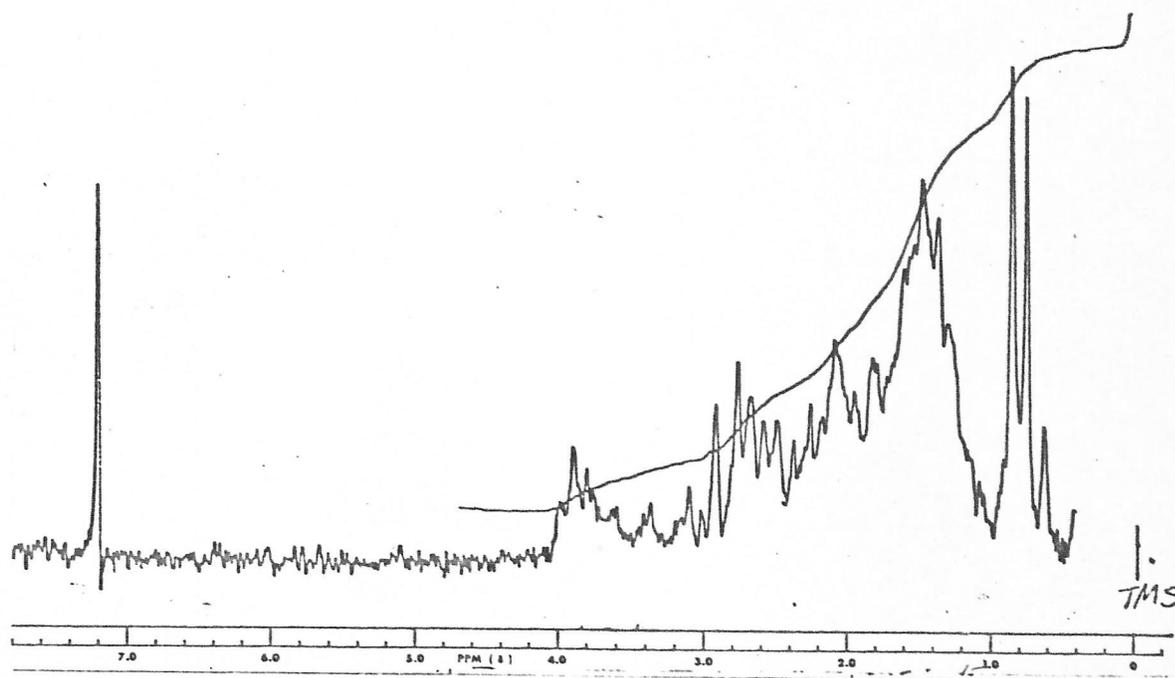


Figura 45. RMNP de desacetilpaniculina.

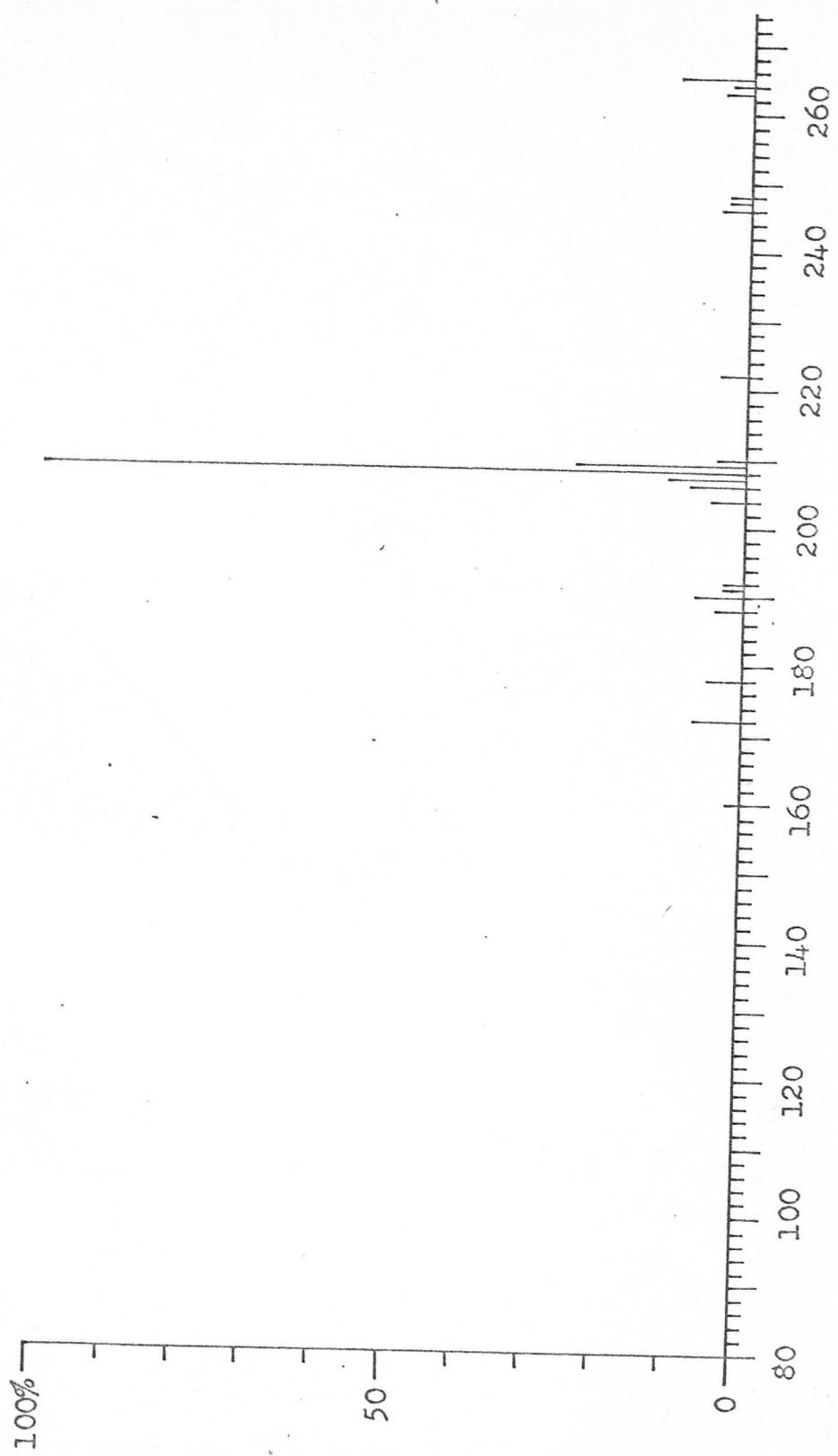


Figura 46. EM de desacetilpaniculina.

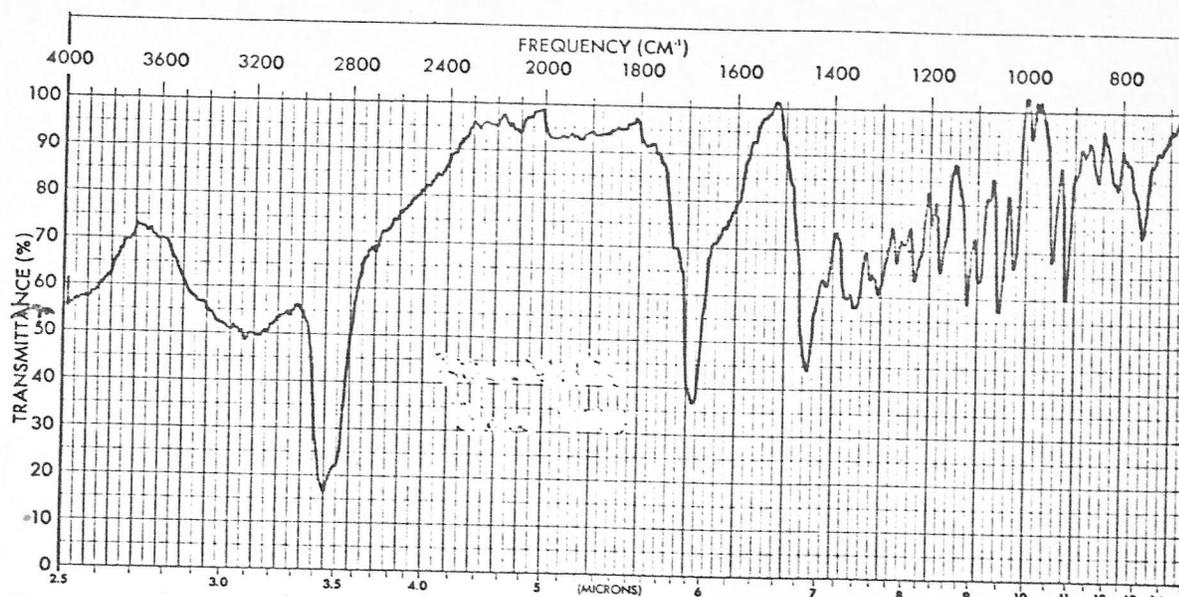


Figura 47. IR (KBr) de dehidrodesacetilpaniculina.

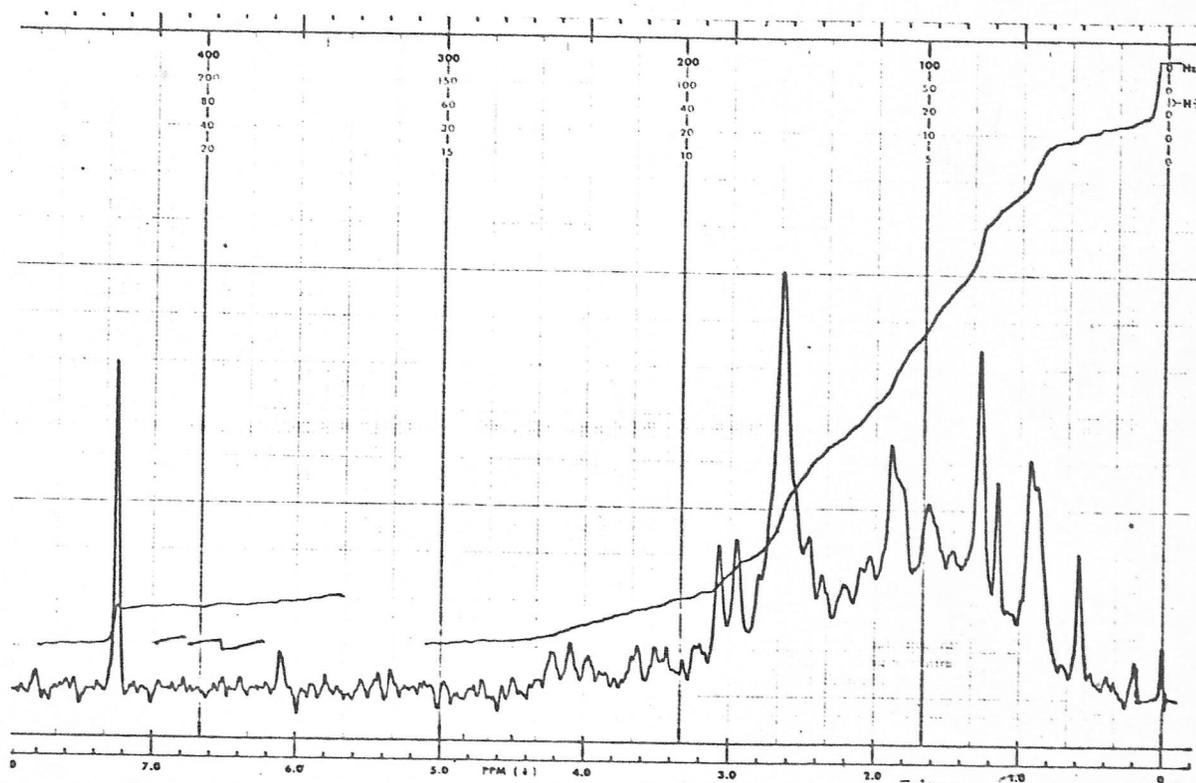


Figura 48. RMNP de dehidrodesacetilpaniculina

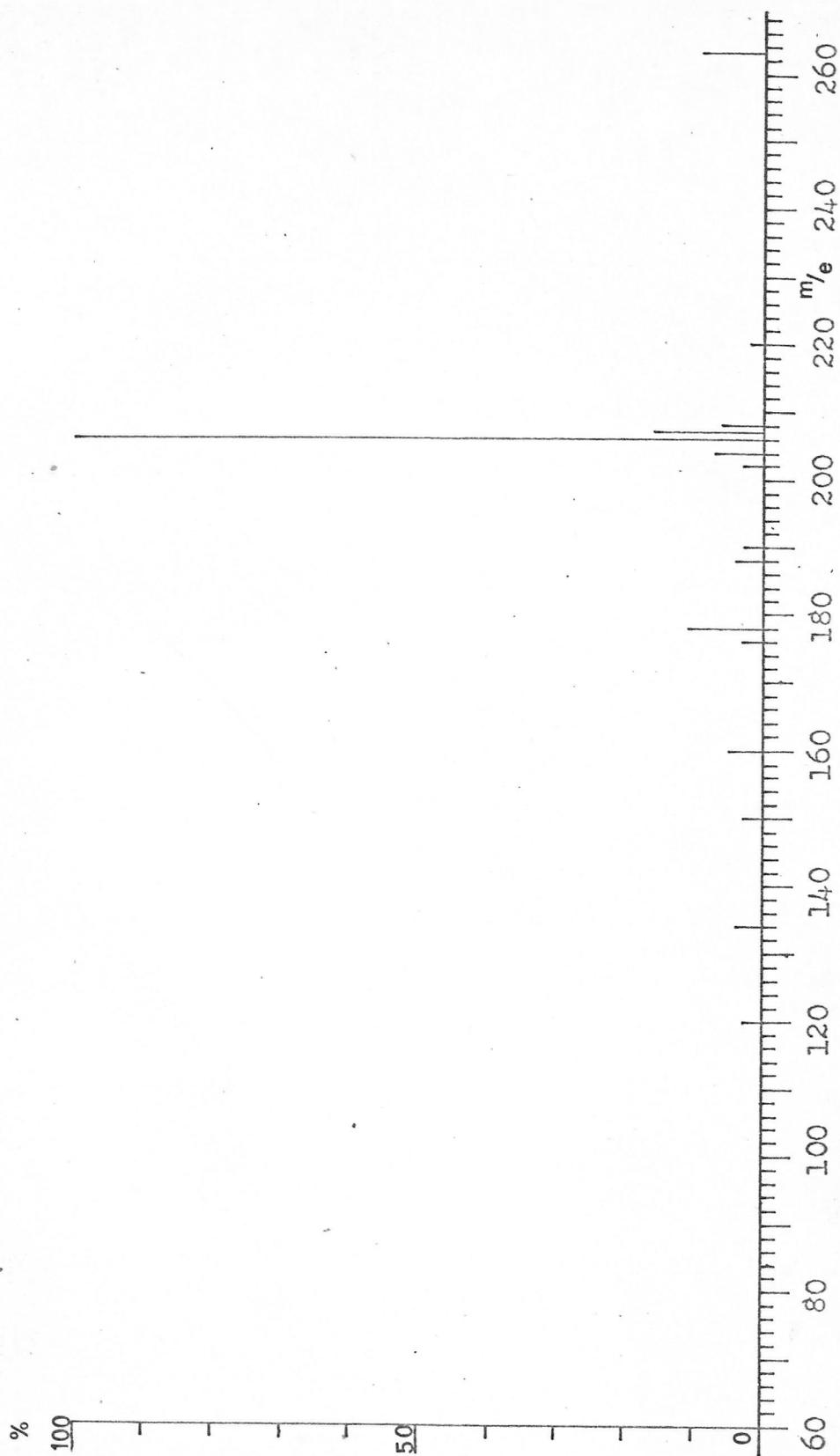


Figura 49. EM de dehidrodesacetilpaniculina.

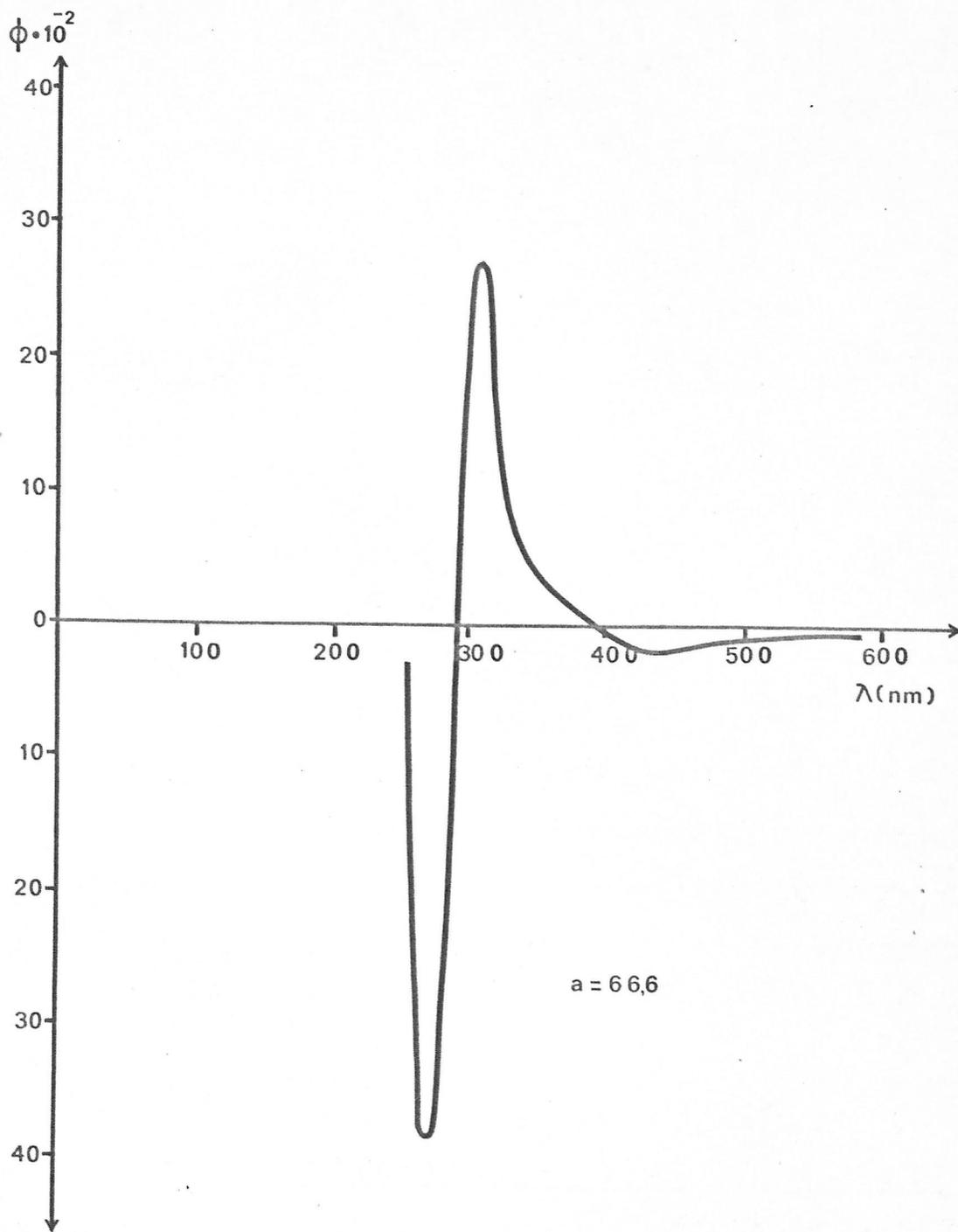


Figura 50. DOR de dehidrodesacetilpaniculina.

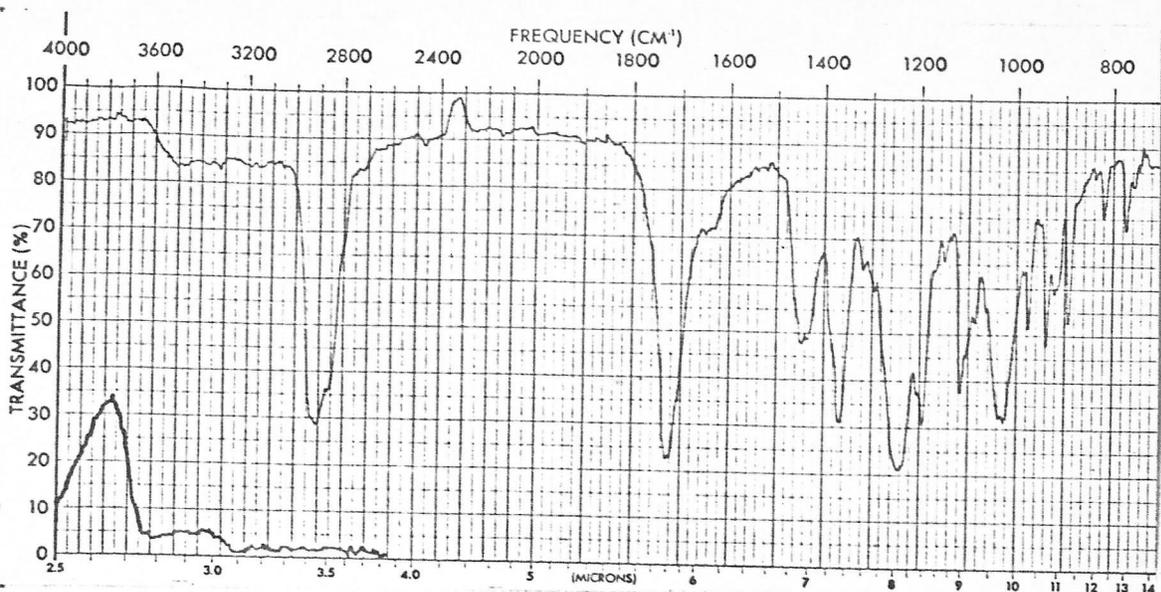


Figura 51. IR (KBr) de acetilpaniculina.

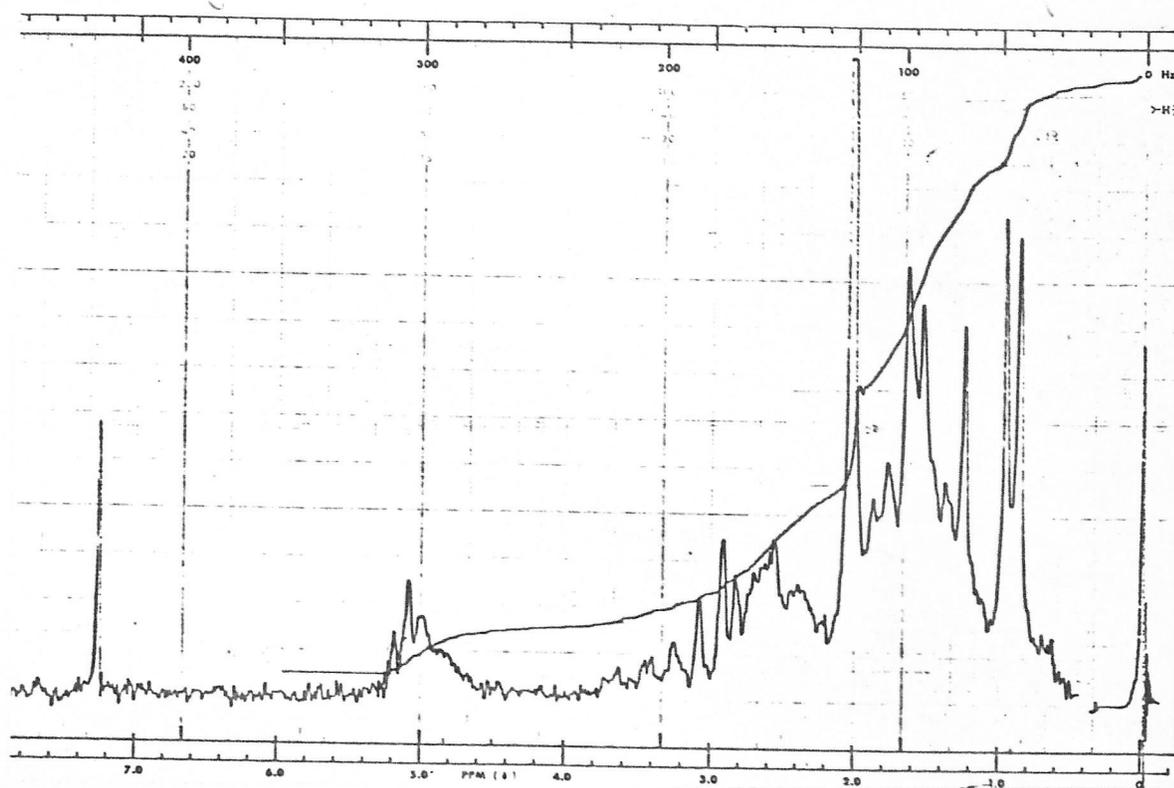


Figura 52. RMNP de acetilpaniculina

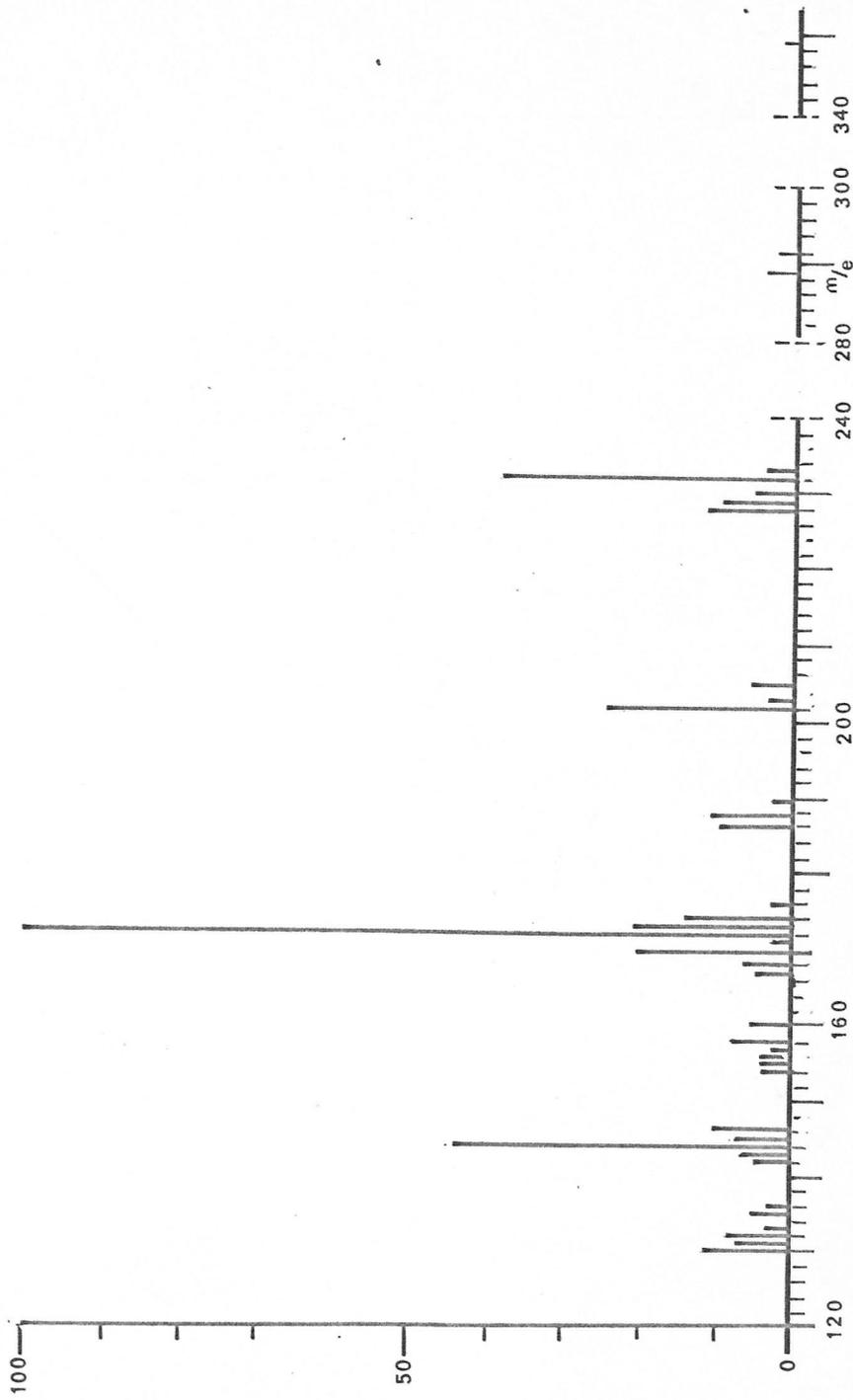


Figura 53. EM de acetylpaniculina.

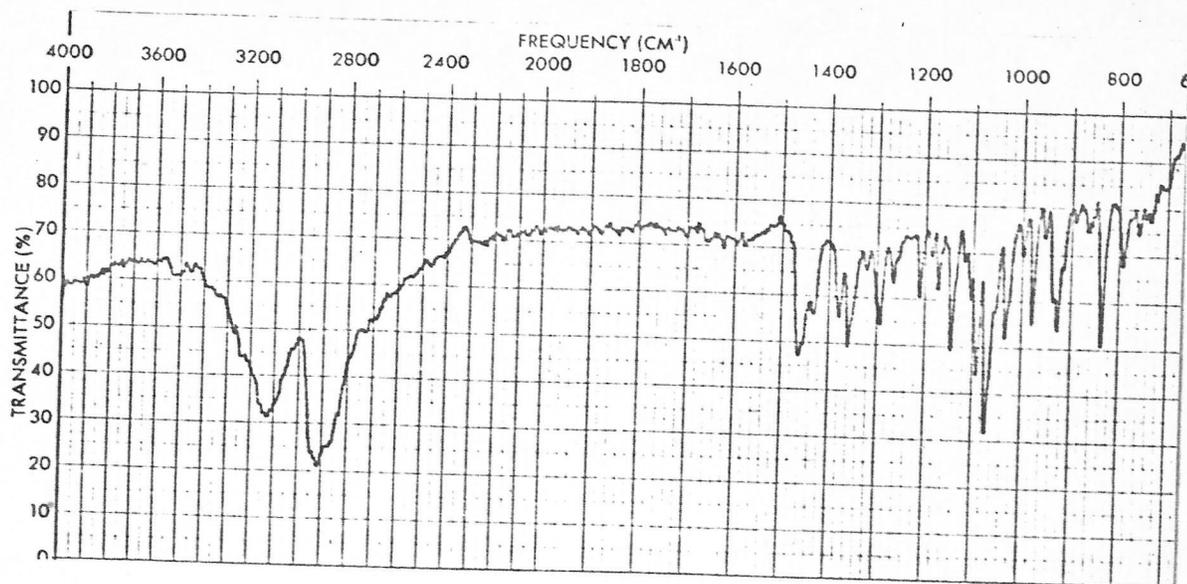


Figura 54. IR (KBr) de anhidrosacetylpaniculina.

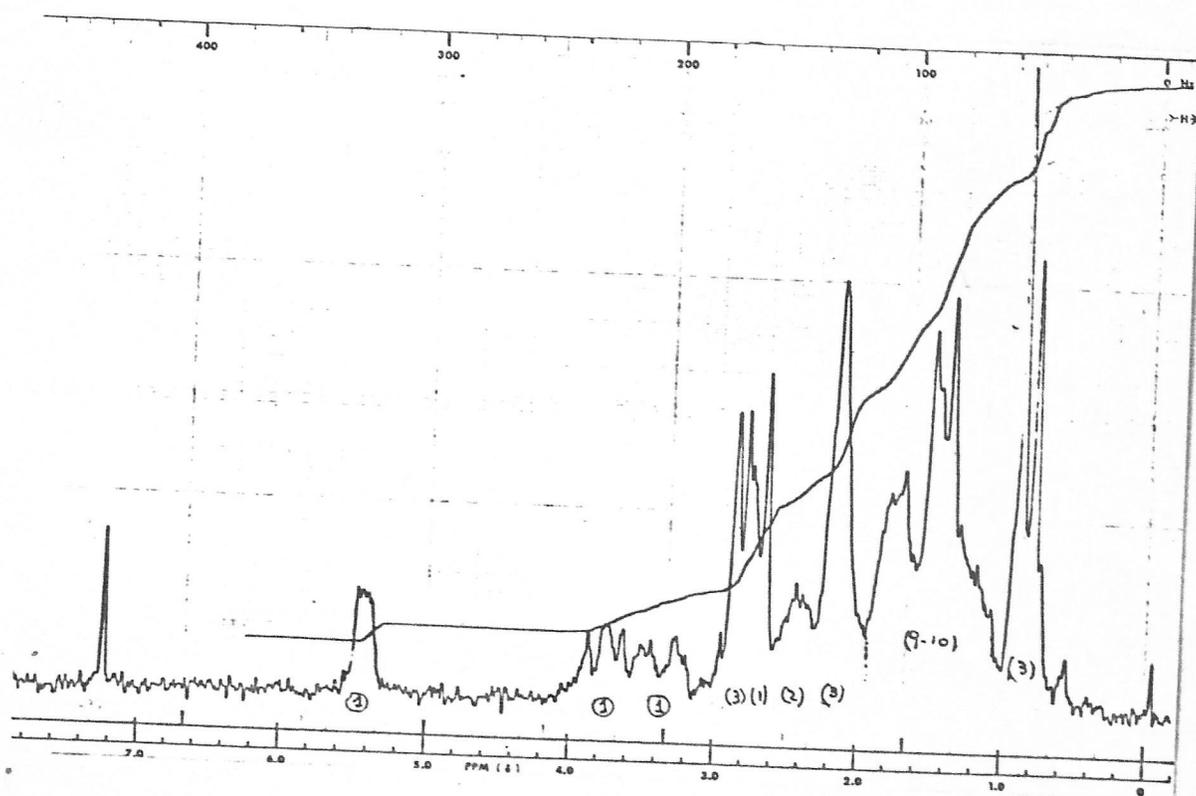


Figura 55. RMNP de anhidrosacetylpaniculina.

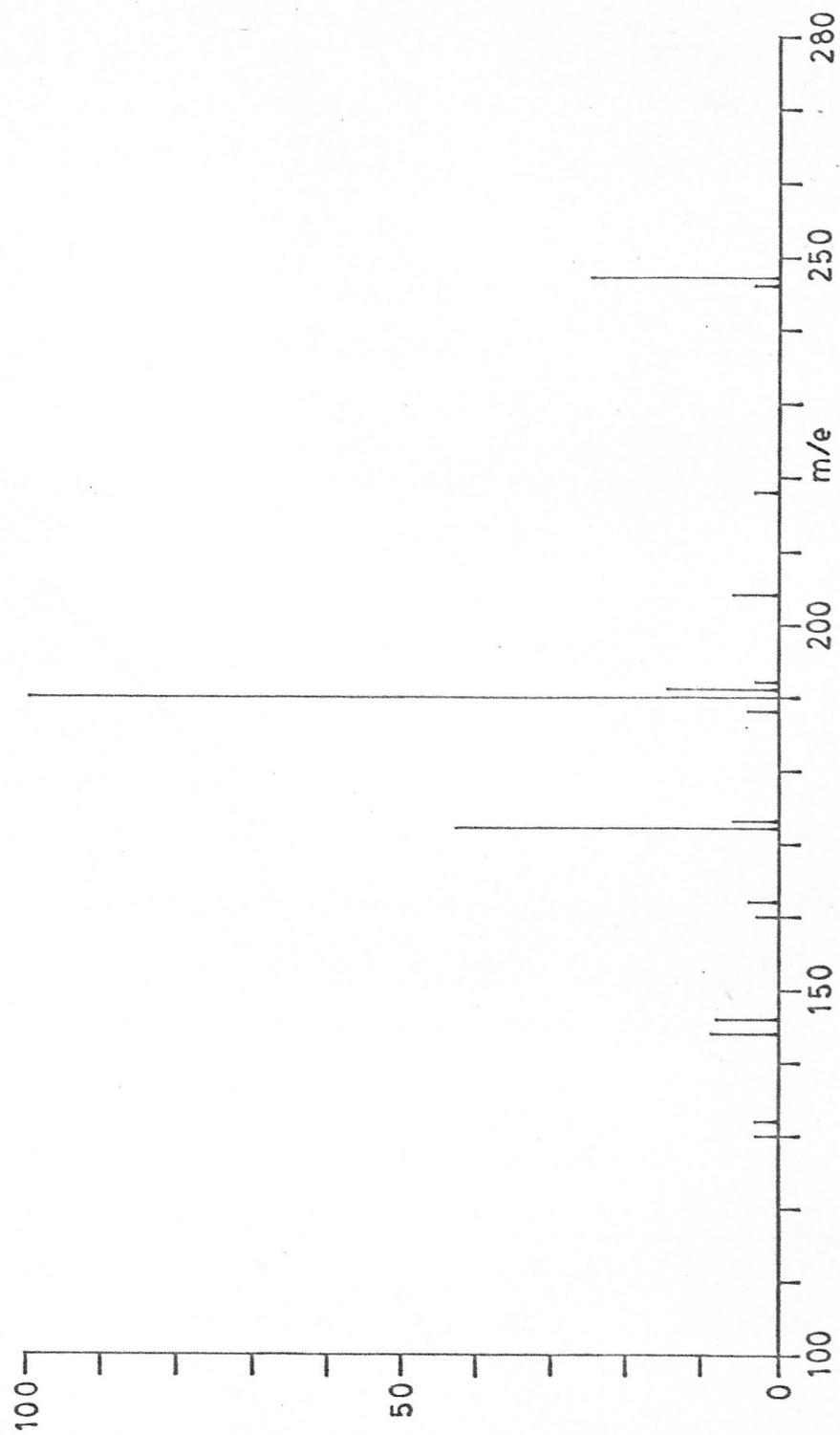


Figura 56. EM de anhidrosacetilpaniculina

2.3.5. DESACETILLICOCLAVINA.

Este alcaloide cristaliza de acetona (o de acetona-éter etílico) y funde a 216-217°C.

El hidrobromuro derivado funde a 308-311°C con descomposición. El perclorato funde a 260-261°C.

Las principales propiedades espectroscópicas de desacetillicoclavina se muestran a continuación:

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.450, 3.300(OH), 1.460 y 1.060 cm^{-1} (figura 57, página 135).

IR $\nu_{\text{máx}}$ (Nujol): 3.500 y 3.200 cm^{-1} .

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3 o CCl_4): 3.625 cm^{-1} (OH libre).

RMNP (220 MHz, CDCl_3) (δ): 0.85(d, J=6Hz, 3H, CH_3CH), 1.89(s, ancho que intercambia con D_2O), 3.19(sext., J=12,12 y 3Hz, 1H), 3.42(sext., J=14,14 y 3Hz, 1H), 3.74(s, $a_{1/2}$ 3.5Hz, 1H), 3.86(d, J=6Hz, 1H), (figura 58, página 136).

Experimentos de doble irradiación mostró que el átomo de hidrógeno asociado a la señal a 3.86 p.p.m. está acoplado con un átomo de hidrógeno que resuena a 2.57 p.p.m.

EM (m/e, %, composición por alta resolución): 265(M^+ , 16%, $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_2$), 248(M^+-17 , 3, $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}$), 222(M^+-43 , 4, $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_2$), 208(M^+-57 , 100, $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2$), 205(9), 190(7, $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}$), 164(6), 162(15, $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}$ y $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}$), 148(17), 137(9) (figura 59, página 137).

RMN ^{13}C (CHCl_3 , 75.39) (δ): 78.51, 74.7, 55.3, 47.34, 47.17
 44.82, 44.02, 42.67, 40.33, 29.1
 26.85, 26.66, 24.11, 23.93, 23.04
 20.31 (figura 60, página 138).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_2$, C72.41%,
 H10.25% y N5,27%, valores encontrados
 C72.60%, H10.73% y N5.68%

2.3.5.1. Diacetilación de Desacetillicoclavina.

Una mezcla de 41 mg. de desacetillicoclavina en 2.0 ml. de anhídrido acético y 2 ml. de piridina se mantuvo por 20 horas a 92°- 94°C. La solución resultante se diluyó con cloroformo y se agitó con una solución de amoníaco frío. La solución clorofórmica decantada se lavó con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró. La laca amarilla resultante se filtró en una columna de alúmina usando éter etílico. La evaporación de los filtrados produjo 33 mg. de un sólido incoloro que cristaliza por evaporación del solvente.

Por sublimación se obtuvo un sólido que funde a 115°-118°C denominado Acetillicoclavina y cuyas propiedades espectroscópicas se muestran a continuación:

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2.950-2.850, 1.740, 1.725 y 1.240 cm^{-1} (figura 61, página 139),

RMNP (δ): 0.96(d, J=6Hz, 3H, CH_3CH), 2.0 (dos singletes, 6H, CH_3CO), 4.6(s, $a_{1/2}$ 3.5Hz, 1H, CHOAc), 5.0(d, J=6Hz,

$^1\text{H,CHOAc}$) (figura 62, página 139).

EM m/e(%): 349(M^+ ,11%), 306(M^+-43 ,4), 292(M^+-57 ,40), 290
 (M^+-59 ,13), 289(M^+-60 ,15), 232(M^+-117 ,100),
 190(M^+-159 ,82), 174(15), 173(19), 172(15)
 162(18), 148(12) (figura 63, página 140).

2.3.5.2. Monoacetilación de Desacetillicloclavina.

Se mezcló 100 mg. de desacetillicloclavina con 2.5ml. de anhídrido acético y 4 ml. de piridina y se mantuvo durante 19 horas a una temperatura de 0°C. La solución resultante se trabajó en la misma forma que se indicó arriba y produjo finalmente una taca que en c.c.f. (alúmina, éter etílico) mostró ser una mezcla de tres componentes de Rfs 0.8, 0.7 y 0.1 respectivamente.

El compuesto de Rf 0.1 corresponde a desacetillicloclavina sin reaccionar y el Rf 0.8 a acetillicloclavina.

El crudo de la reacción (120 mg.) se cromatografió en alúmina básica (15 gr, Actividad I) y se eluyó en nueve fracciones con éter etílico (350 ml.). Una vez concentrada cada fracción y en virtud de c.c.f. se les reunió en tres fracciones: 1-2(38 mg.), 3-8(30mg.)y 9(20mg.)

La fracción 3-8(30 mg.) se aplicó, disuelta en acetona, en tres placas de alúmina de 20x20 cm x0.2 mm. y se eluyó con éter etílico. La cromatografía se desarrolló 3 veces tal como se indica en la página 50.

El análisis al reactivo de Draggendorff y la luz ultravioleta dirigió la separación de la zona de la capa que

mostró Rf 0.7. El material orgánico se extrajo desde la alúmina con metanol en soxhlet durante tres días. Se filtró la solución y se evaporó resultando un producto aceitoso (25 mg.).

Este derivado de desacetillicoclavina, homogéneo en c.c.f., fue resistente a los intentos de cristalización. Sin embargo, formó un hidrobromuro cristalino de punto de fusión de 248-251°C. Las propiedades espectroscópicas, que se indican abajo, sugieren que este producto es ácetil desacetillicoclavina

IR $\nu_{\text{máx}}$ (film): 3.500-3.200, 2.950-2.850, 1.730 y 1.250 cm^{-1}
(figura 64, página 141)

RMNP (δ): 0.96(d, J=6Hz, 3H, CH_3CH), 2.01(s, 3H, CH_3CO), 3.9
(d, J=4Hz, 1H, CHOH) y 4.7(s, $a_{1/2}$ 3.5Hz, 1H, CHOAc).
(figura 65, página 141).

2.3.5.3. Oxidación de Desacetillicoclavina con reactivo de Jones.

Se disolvió 30 mg. de desacetillicoclavina en 15 ml. de acetona y se añadió, gota a gota, reactivo de Jones (1,5 ml. en 15 minutos).

Se mantuvo la mezcla con agitación esporádica durante dos horas a temperatura ambiente. Se añadió 5 ml. de etanol y se evaporó casi a sequedad. Se colectó con 40 ml. de cloroformo y se agitó con solución de amoníaco (50 ml.). Se secó y evaporó la solución orgánica resultando un producto de reacción de 25 mg. que muestra prácticamente un

componente mayoritario (c.g. y c.c.f.) y fue purificado por sublimación. El producto sublimado (15 mg.) funde a 157-158°C, pero este valor sube a 170-171°C después de varias recristalizaciones de acetona. Este derivado de la oxidación, que fluoresce fuertemente a la luz ultravioleta, es incoloro pero ennegrece lentamente.

Las principales propiedades espectroscópicas de este derivado son:

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.200(OH), 2.950-2.850, 1.660(cetona α,β no saturada), 1.640 cm^{-1} (olefina conjugada) (figura 66, página 142).

$\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3): 3.450 cm^{-1} (OH enlazado intramolecularmente)

$\nu_{\text{máx}}$ (Nujol): 3.200 cm^{-1} .

RMNP (δ): 1.0(d, mal resuelto, 3H, CH_3CH), 6.2(s, ancho, 1H que intercambia con D_2O y que se desplaza hasta 1.6 p.p.m. por dilución. Es importante señalar la ausencia de protones olefínicos (figura 67, página 142).

EM m/e (%): 261(M^+ , 35%), 260(10), 218(M^+-43 , 48), 216(31), 205(58), 204(M^+-57 , 100), 203(45), 202(94), 190(32), 188(22), 176(74), 174(48), 162(10), 160(10), 148(12), 146(15) (figura 68, página 143).

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (Etanol): 285 nm. $\log \epsilon=4.07$

$\lambda_{\text{máx}}$ (Etanol, OH^-): 333 nm. $\log \epsilon=4.06$

Este producto de oxidación de desacetillicoclavina resultó ser idéntico al producto de oxidación de licopodina con dióxido de selenio y al producto de hidrólisis de 6 α -bromolicopodina con solución de NaOH (vide infra).

2.3.5.4. Oxidación de Desacetillicoclavina con reactivo de Sarett a 0°C.

Se disolvió 123 mg. de desacetillicoclavina en 7.5 de piridina y se le añadió 7.5 ml. del reactivo de Sarett (preparado tal como se indicó en página 52).

La mezcla se mantuvo a 0°C durante dos horas. Luego se diluyó con agua fría (150 ml), se alcalinizó con amoníaco y se extrajo con sucesivas porciones de cloroformo (3x100 ml.)

Esta solución clorofórmica se lavó, se secó y se concentró produciendo 102 mg. de una mezcla amorfa de tres componentes, uno de los cuales correspondía al anteriormente mencionado producto de oxidación con reactivo de Jones.

Una cristalización desde etanol-éter etílico y luego sublimación permitió obtener el producto principal de la reacción. Este producto (15 mg.) cristalizado de acetona funde a 245-246°C con un cambio en la forma cristalina entre 120°-128°C. Las propiedades espectroscópicas más importantes se muestran a continuación:

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.100-2.550(OH), 1.705 y 1.040 cm^{-1} (figura 69, página 144).

$\nu_{\text{máx}}$ (Nujol): 3.350-3.100, 1.705 y 1.040 cm^{-1}

IR $\nu_{\text{m\grave{a}x}}$ (CHCl_3): 3.610 cm^{-1} (OH libre)

RMNP (δ): 0.9 (d, mal resuelto, 3H, CH_3CH), 3.8 (s, $a_{1/2} = 6\text{Hz}$, 1H, CHOH) (figura 70, página 144).

EM m/e(%): 263 (M^+ , 18%), 235 ($\text{M}^+ - 28, 3$), 220 ($\text{M}^+ - 43, 3$), 218 ($\text{M}^+ - 45, 10$), 207 (19), 206 ($\text{M}^+ - 57, 100$), 204 (5), 178 (28) (figura 71, página 145)

UV $\lambda_{\text{m\grave{a}x}}$ (Etanol): 280 nm $\log \epsilon$ 1.90

Este producto de oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Sarett (0°C) es idéntico a L20⁽⁹²⁾. La comparación se hizo con L20 auténtico y L20 obtenido en el presente trabajo partiendo desde licopodina.

De los líquidos madres de la cristalización del producto principal se obtuvo, además, el mismo producto de la oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Jones.

2.3.5.5. Preparación de Hidrobromuro de 6- α -bromolicopodina.

A partir de 5 gr. de licopodina y siguiendo la secuencia descrita por W.A. Ayer⁹² se obtuvo 3.7 gr. de un derivado cristalino cuyo punto de fusión ($262-263^\circ$ descomposición, metanol-éter etílico) y propiedades espectroscópicas concuerdan con Hidrobromuro de 6- α -bromolicopodina (lit. $266^\circ-269^\circ\text{C}$ desc.).

2.3.5.6. Hidrólisis de Hidrobromuro de 6- α -bromolicopodina.

Siguiendo la técnica de Ayer⁹² se hidrolizó la sal con solución de NaOH y con solución de NaHCO_3 .

a) Con NaOH 3%. Desde 1 gr. de sal se obtuvo 0.5 gr. de un

producto que cristalizado de acetona funde a 170-171°C (sublimado funde a 157-159°C) y que corresponde en todas sus propiedades al producto principal de la oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Jones (vide supra), con el producto principal de la oxidación de licopodina con dióxido de selenio¹⁶ y concuerda con los datos informados por Ayer para "diosfenol"; o sea, para 5,6 dicetona enólica derivada de licopodina (lit. 185°-186°C)

- b) Con NaHCO_3 3%. Desde 1 gr. de la sal se obtuvo 0.98 gr. de un producto que cristalizado de metanol o metanol-éter etílico funde a 228-232°C y cuyas propiedades espectroscópicas y cromatográficas son idénticas con las del producto de oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Sarett ^{et} (vide supra) y con el alcaloide L20 (comparación directa con muestra auténtica proporcionada por Braeckman).

2.3.5.7. Reducción de L20 con LiAlH_4 .

La reducción de 130 mg. de L20 con hidruro de aluminio y litio¹¹⁹ produjo 45 mg. de un producto que recristalizado de acetona funde a 205-206°C y cuyas propiedades cromatográficas y espectroscópicas son idénticas con las del producto natural desacetillicoclavina.

Los intentos por obtener otro producto de reducción de L20 siguiendo las técnicas descritas por Ayer¹⁶ con sodio en propanol, epimerización de L20 con propóxido de sodio-

propanol y con alúmina fracasaron sistemáticamente. Contrariamente a lo encontrado por Ayer, solamente se obtuvo como producto caracterizable al descrito "diosfenol".

2.3.5.8. Reacción de Acetillicoclavina con "alúmina básica".

275 mg. de ^a acetillicoclavina disuelto en metanol (50 ml.) se mezcló con 10 gr. de alúmina básica (actividad I) y, en el evaporador rotatorio, se mantuvo durante 9 horas a 50°C. Se dejó a temperatura ambiente por 13 horas adicionales.

El material orgánico se recuperó desde la alúmina usando metanol y se obtuvo una laca café que cristalizó en acetona. Este derivado no ha sido caracterizado aún.

2.3.5.9. Reducción de ^A Hidrobromuro de ^b 6- α -bromolicopodina con Borohidruro de sodio.

Se disolvió 0.70 gr. de hidrobromuro en 250 ml. de etanol y se añadió, en porciones, 2.06 gr. de hidruro de boro y sodio durante una hora. La mezcla se mantuvo con agitación magnética durante 6 horas. Se diluyó con agua (80 ml.) y se adicionó cuidadosamente algunos ml. de solución de ácido clorhídrico 1%. Se continuó la agitación durante toda la noche. Se añadió solución acuosa de bicarbonato de sodio hasta pH8. Se extrajo con cloroformo. La evaporación del solvente produjo 0.40 gr. de un producto amorfo amarillento que dió reacción positivo al test de Beilstein. El producto cristalizado de acetona, aunque no ha sido mayormente

caracterizado, muestra bandas de absorción a $3.200-3.100\text{cm}^{-1}$ y ausencia de banda de carbonilo en su espectro IR y señales en su espectro de RMNP: doblete a 0.9 ppm (3H), sexteto a 3.8 ppm (1H) y triplete a 4.7 ppm $J=3$ Hz, (1H).

2.3.5.10. Intento de reacción de Desacetillicoclavina con acetona¹¹⁷.

Se disolvió 40 mg. de desacetillicoclavina en 25 ml. de acetona seca y se añadió 3.0 gr. de sulfato cúprico anhidro. Se hirvió a reflujo durante 72 horas. Se filtró, se evaporó el solvente y se recuperó casi cuantitativamente de acetillicoclavina sin reaccionar. (35 mg.) Similar resultado se obtuvo cuando se intentó obtener el O-isopropiliden derivado del alcaloide usando ácido para-toluensulfónico¹¹⁸.

Siguiendo ambas técnicas, la glucosa produjo un O-isopropiliden derivado.

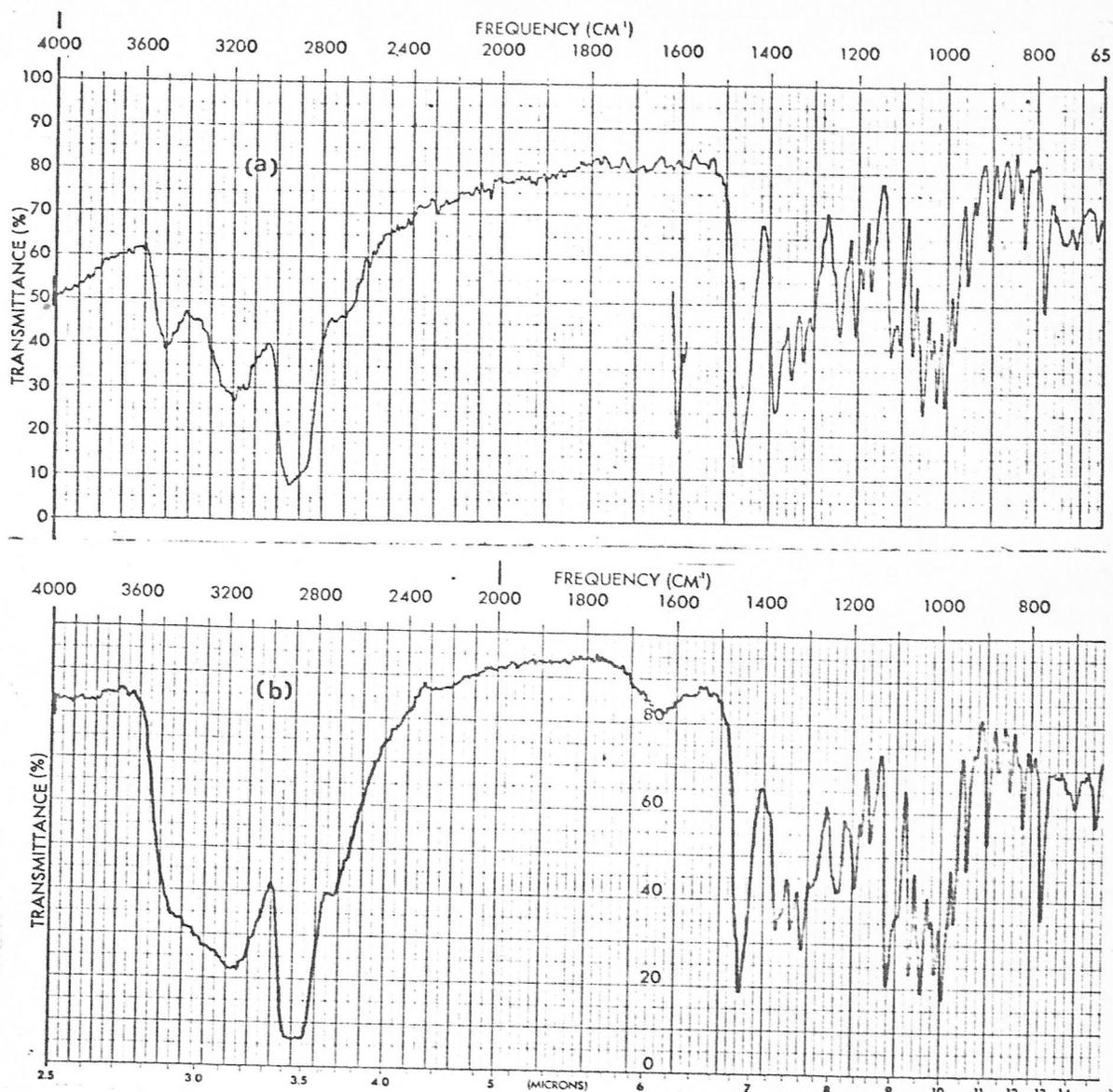


Figura 57. IR de desacetillicoclavina. a. en Nujol y b) en KBr.

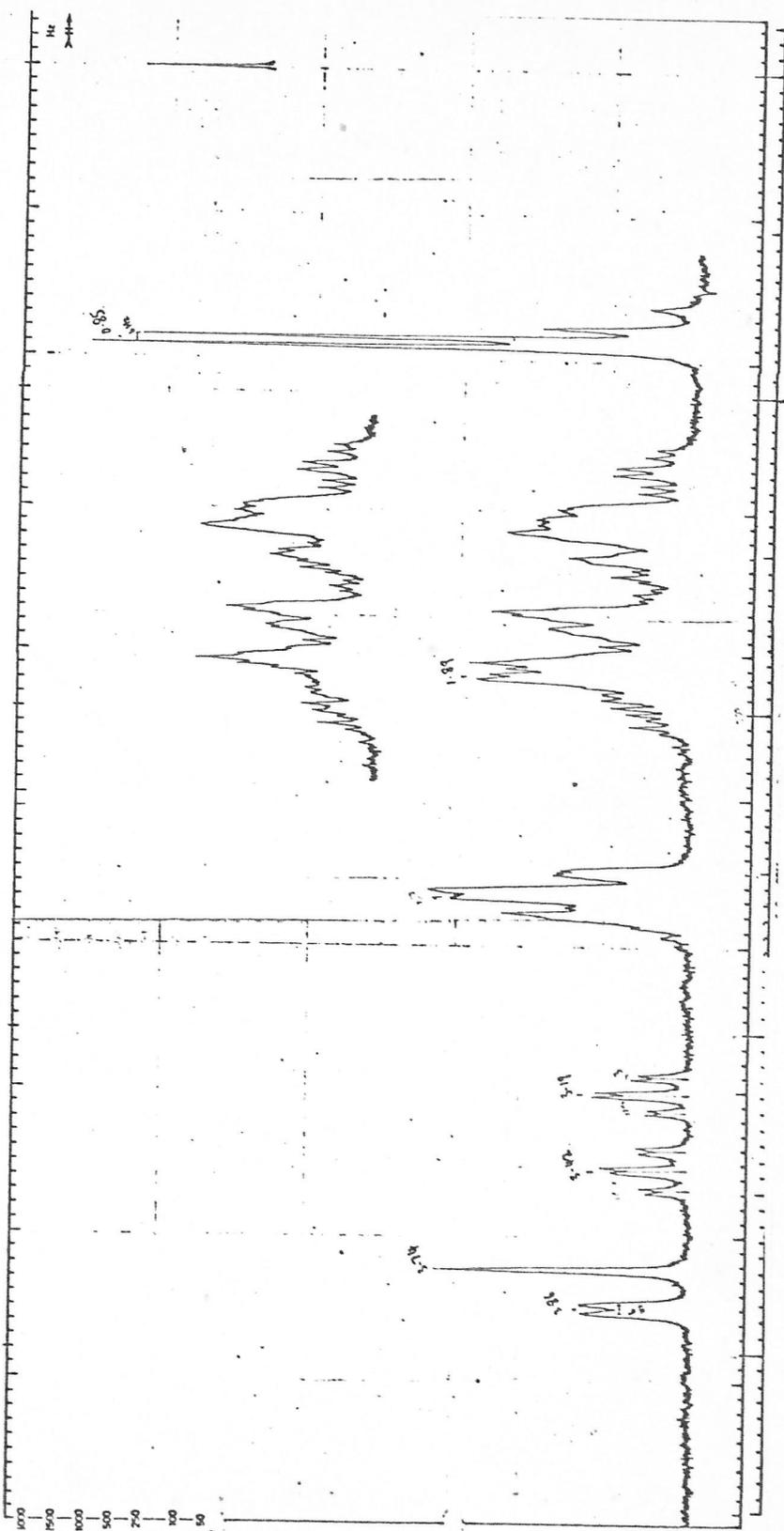


Figura 58. RMNP (220 MHz) de desacetillicoclovina.

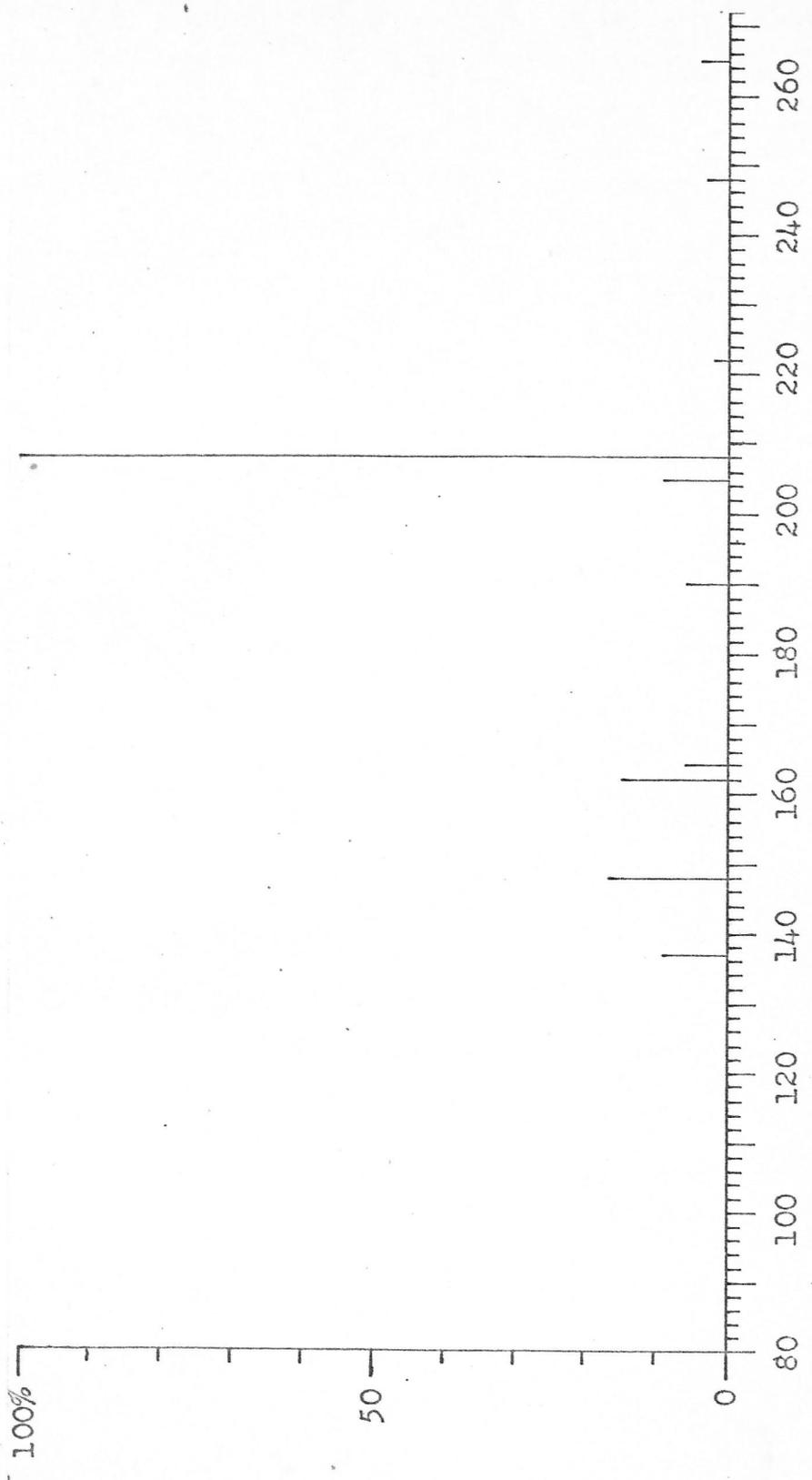


Figura 59. EM de desacetillicoclavina.

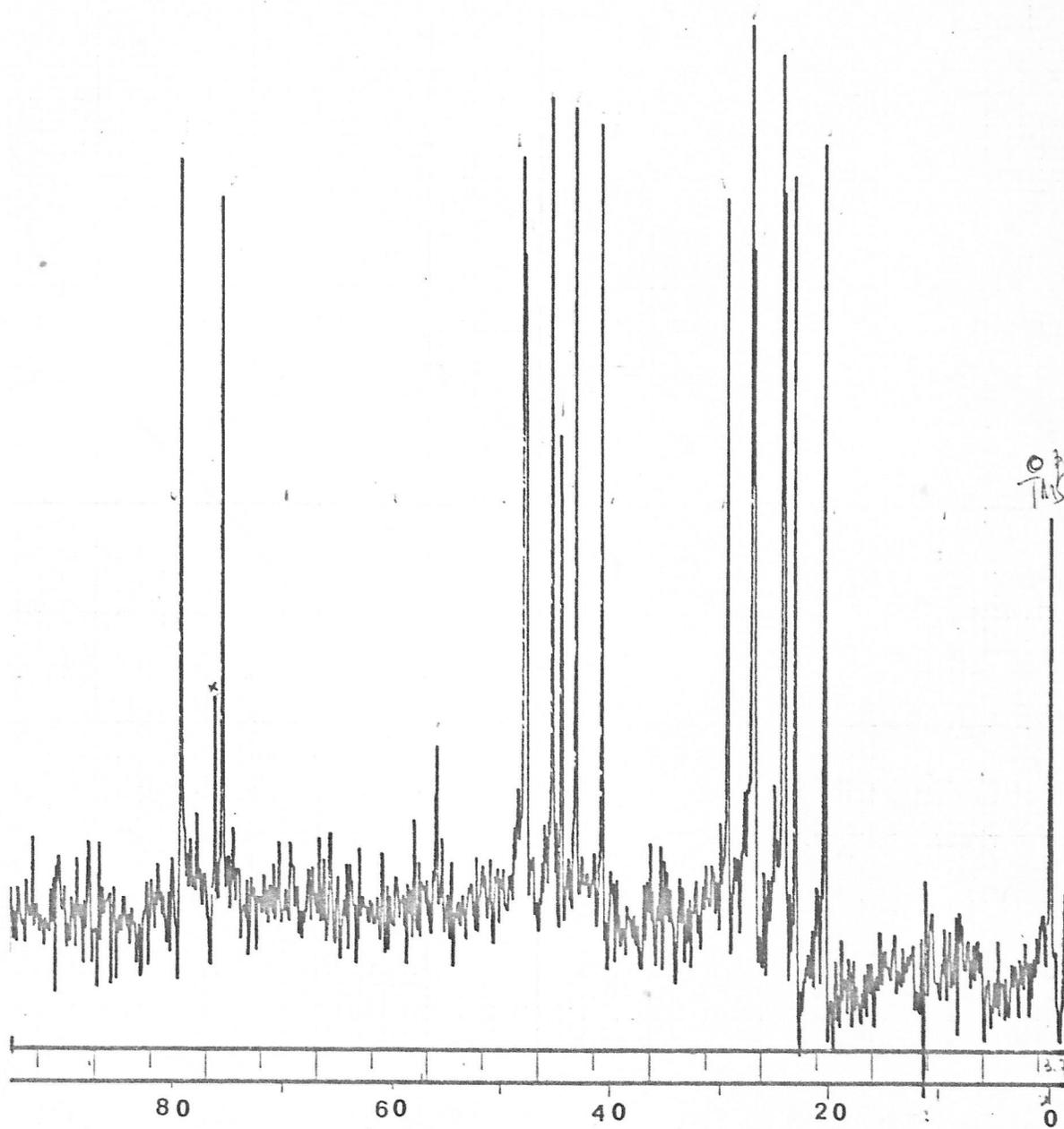


Figura 60. RMN¹³C de desacetillicoclavina.

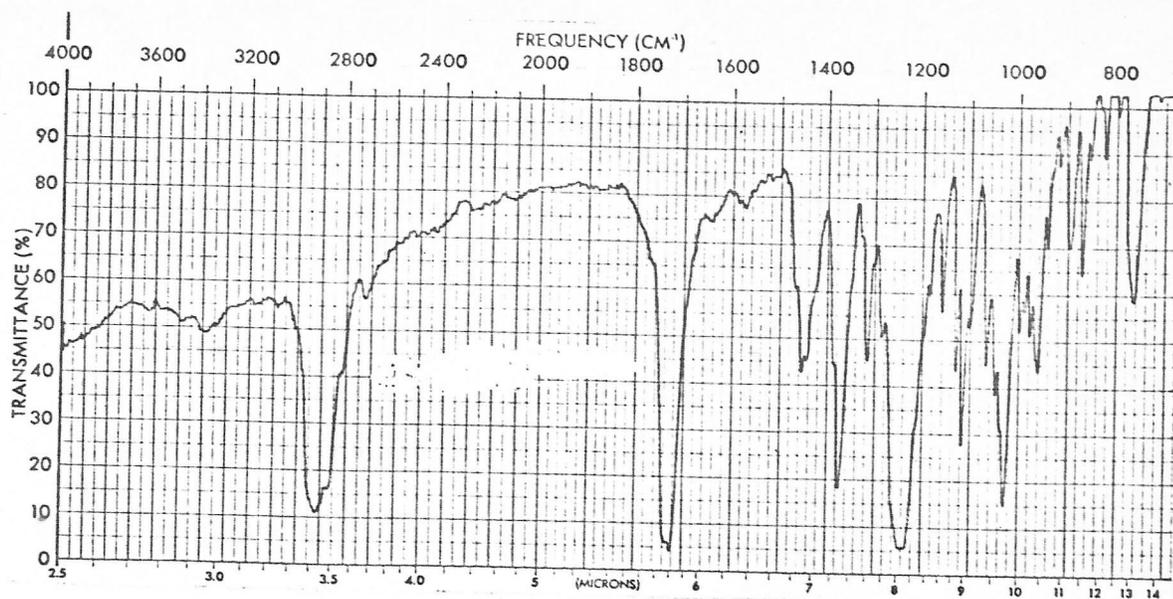


Figura 61. IR (KBr) de acetilliclavina.

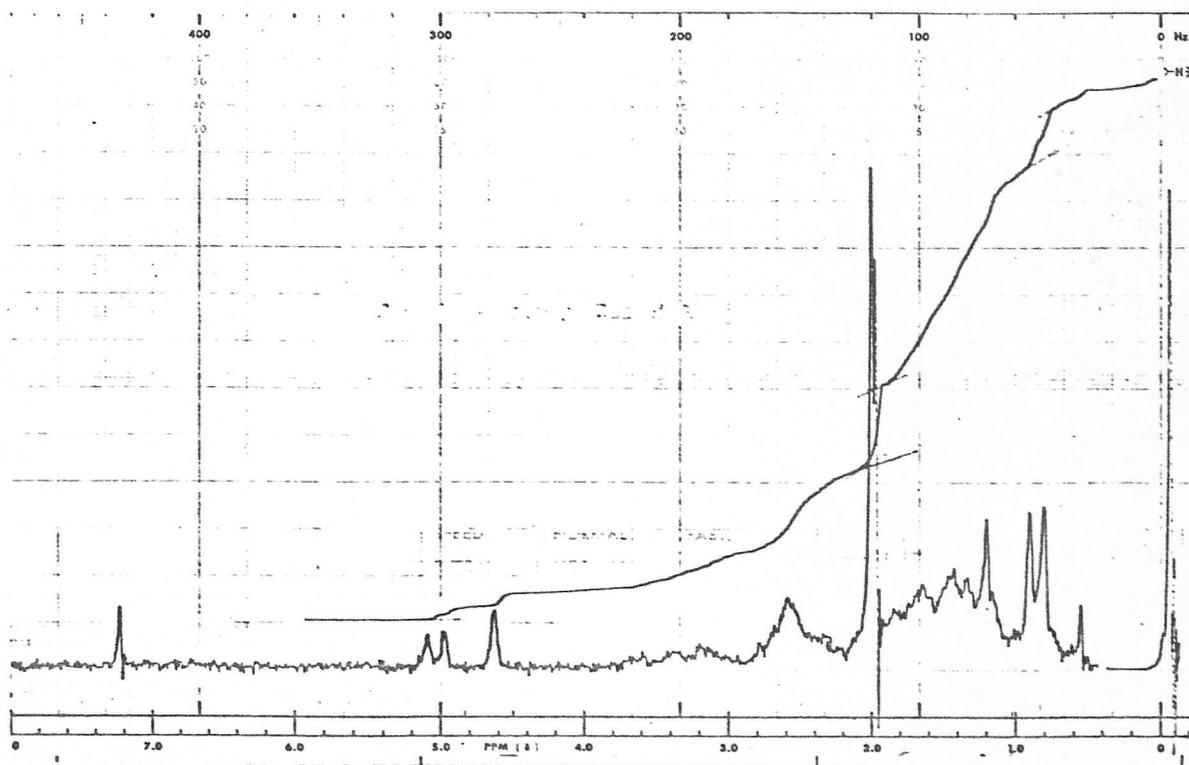


Figura 62. RMNP de acetilliclavina.

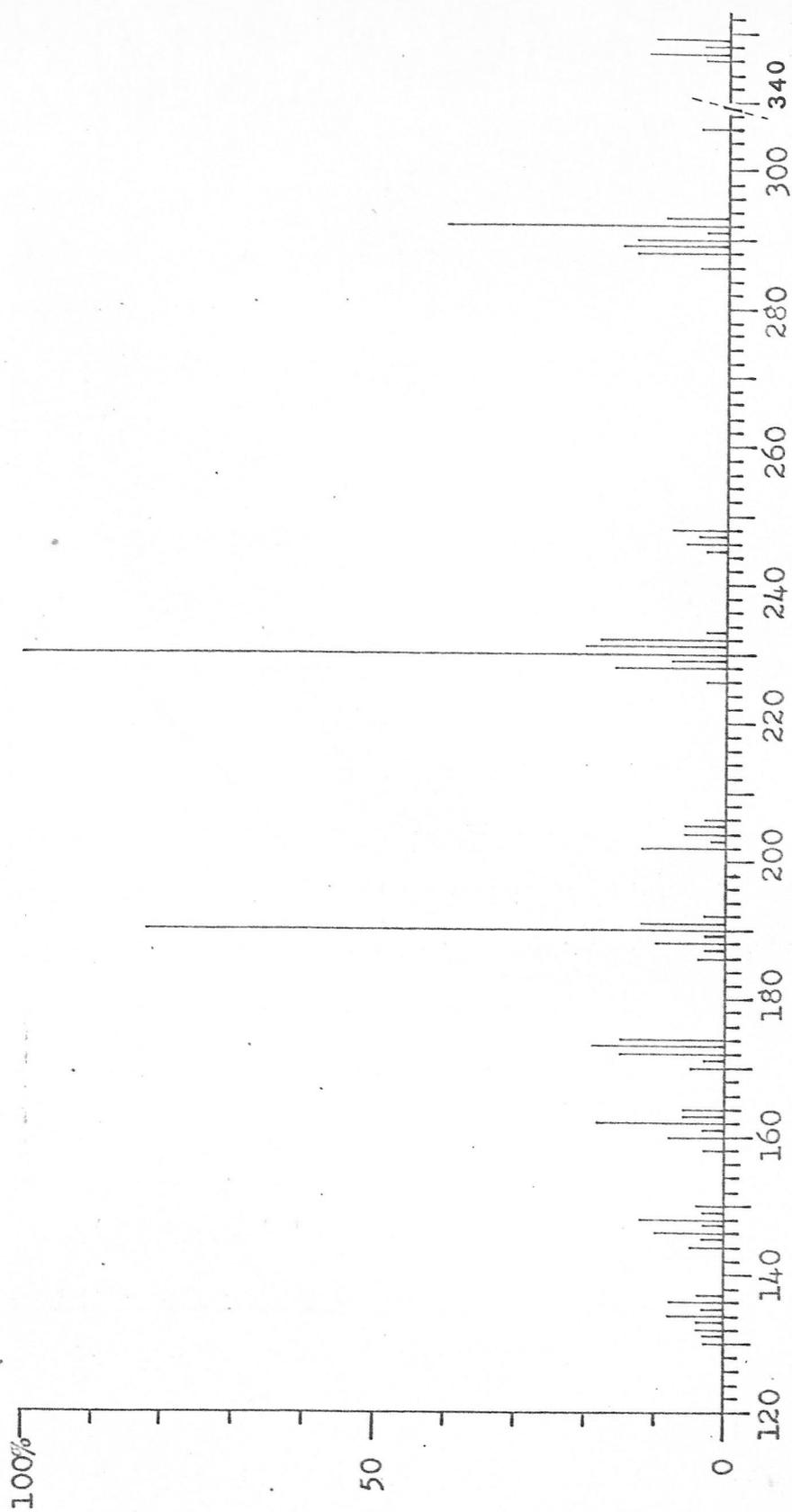


Figura 63. EM de acetillicoclavina.

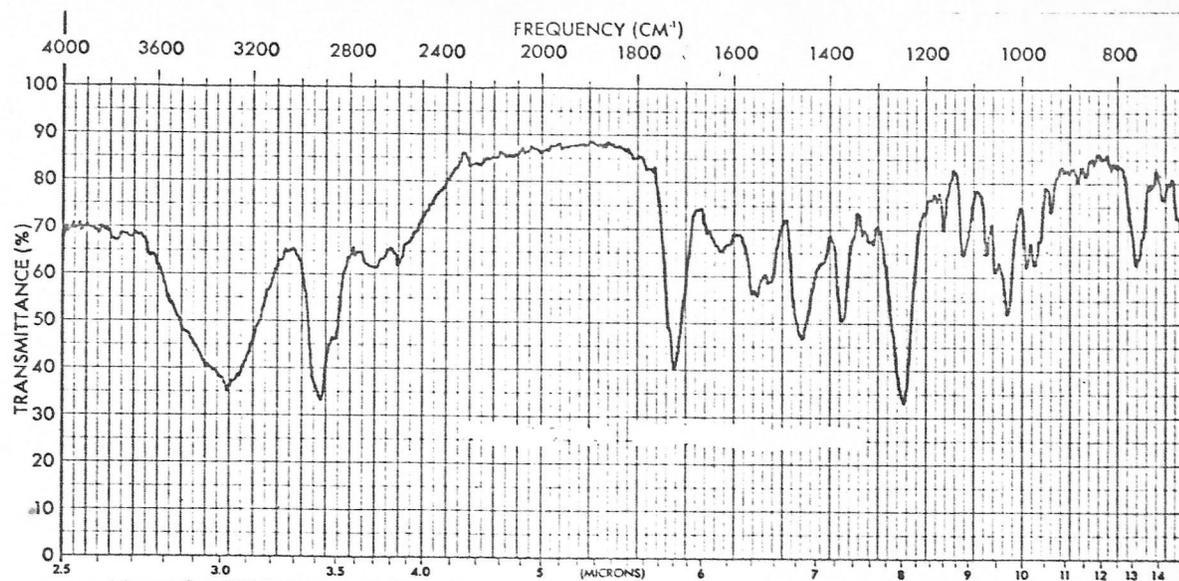


Figura 64. IR (film) de acetildesacetillicoclavina.

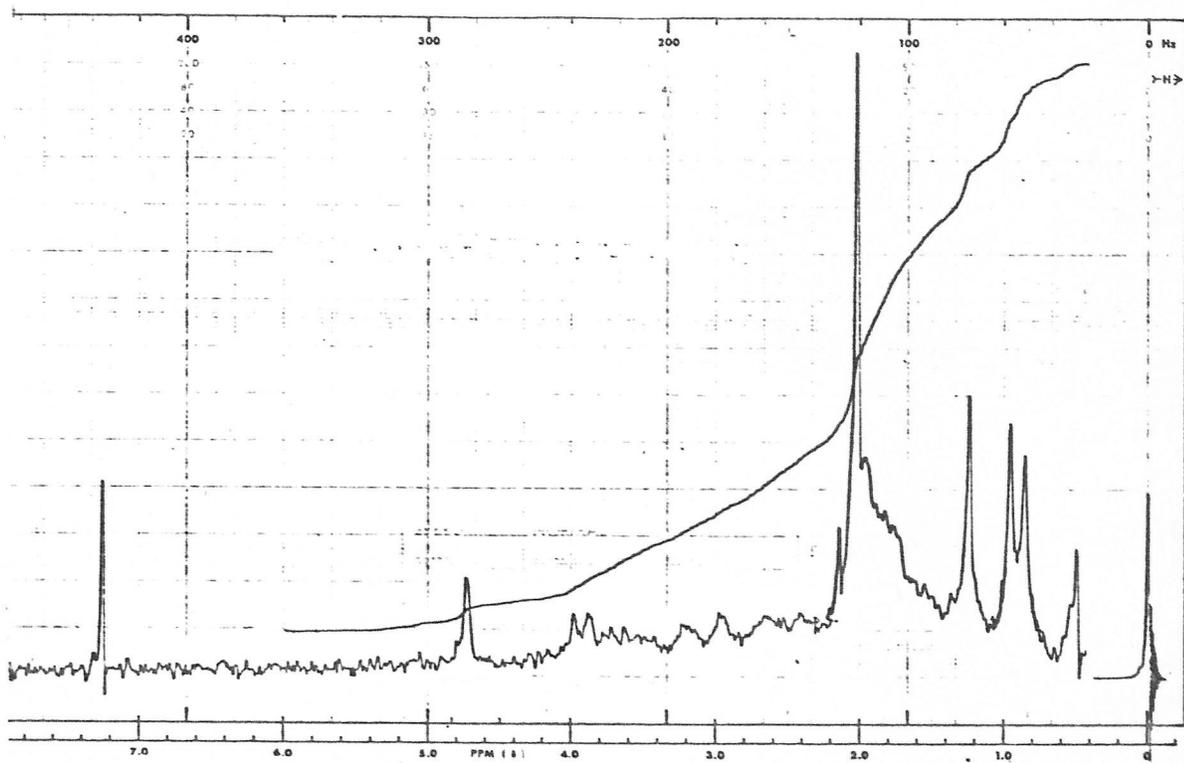


Figura 65. RMNP de acetildesacetillicoclavina.

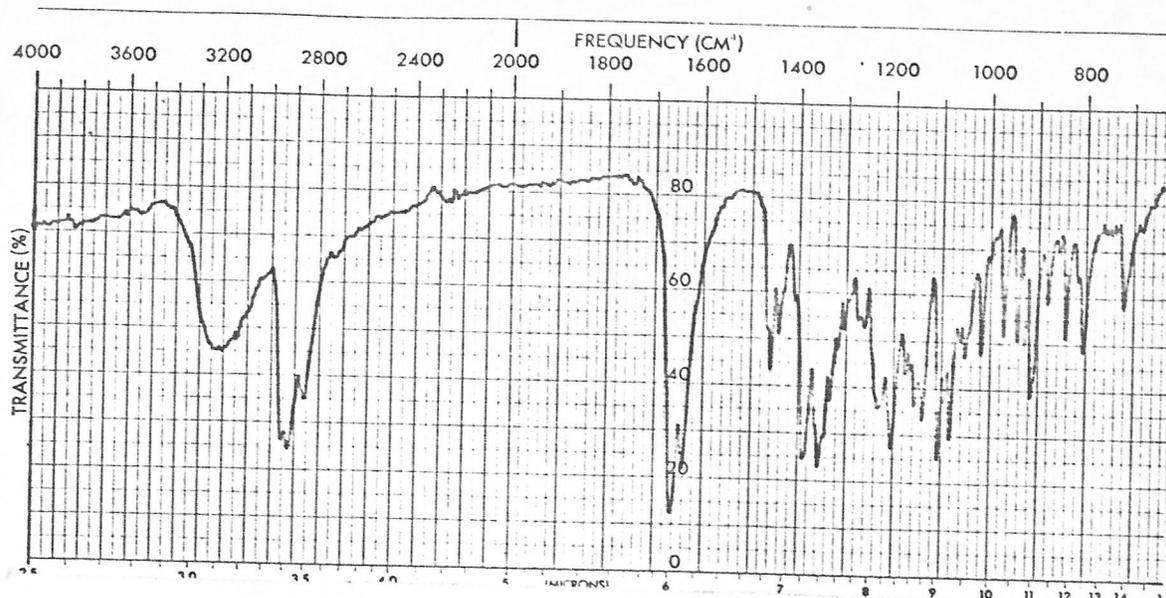


Figura 66. IR (KBr) de diosfenol. Oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Jones.

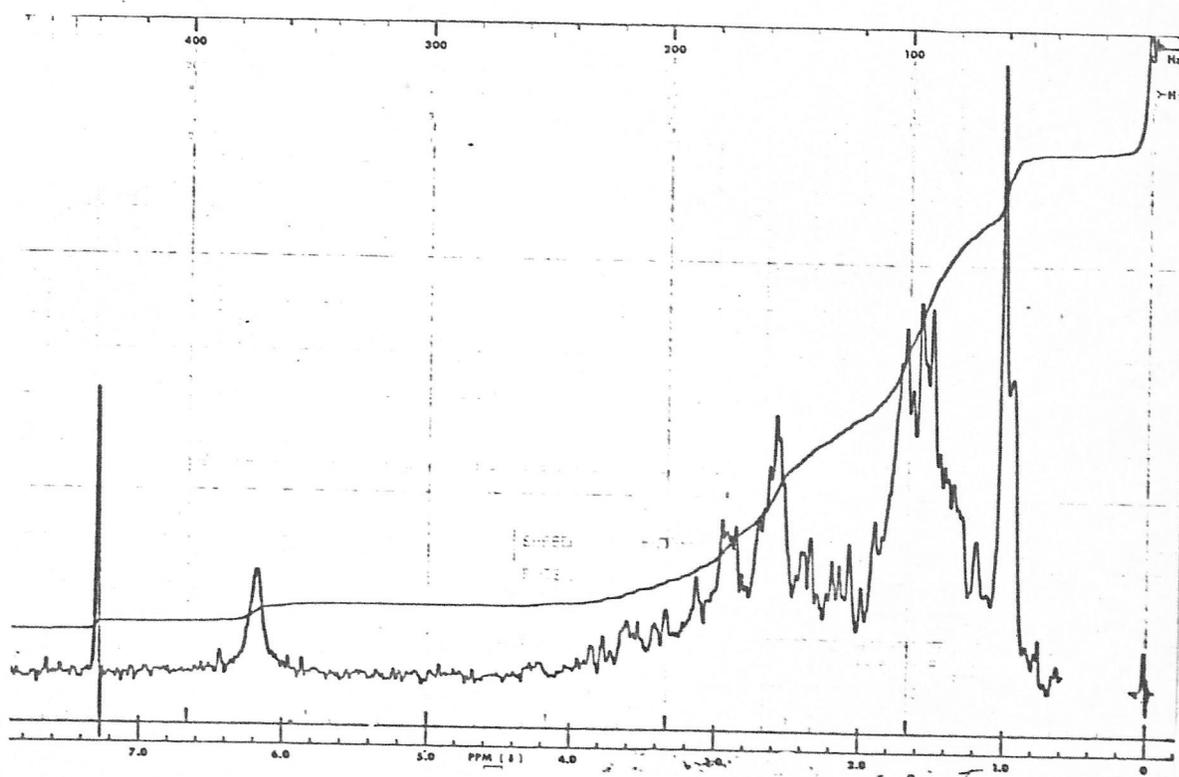


Figura 67. RMNP de diosfenol.

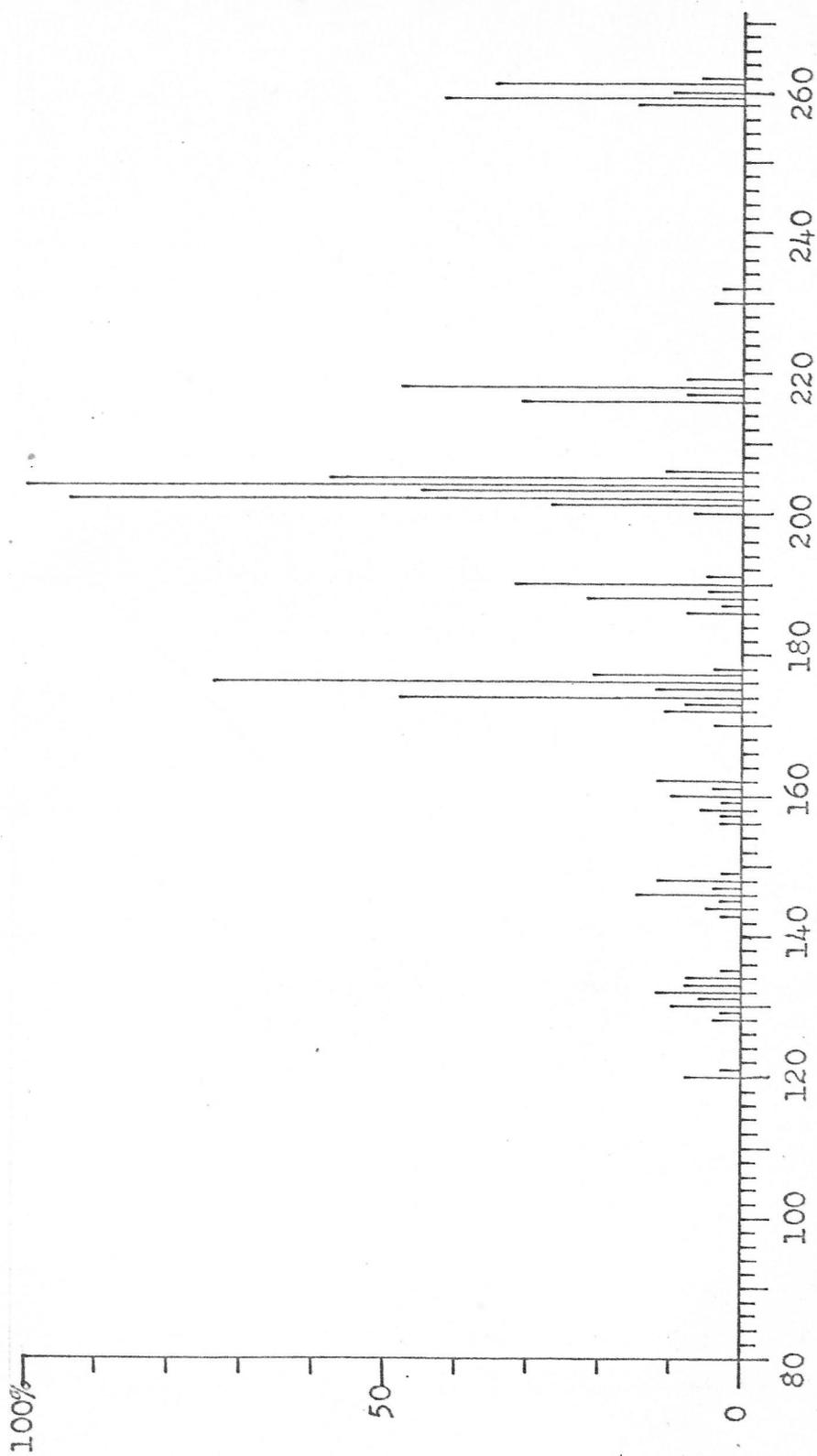


Figura 68. EM de diosfenol. Oxidación de desacetillicoclovina con reactivo de Jones.

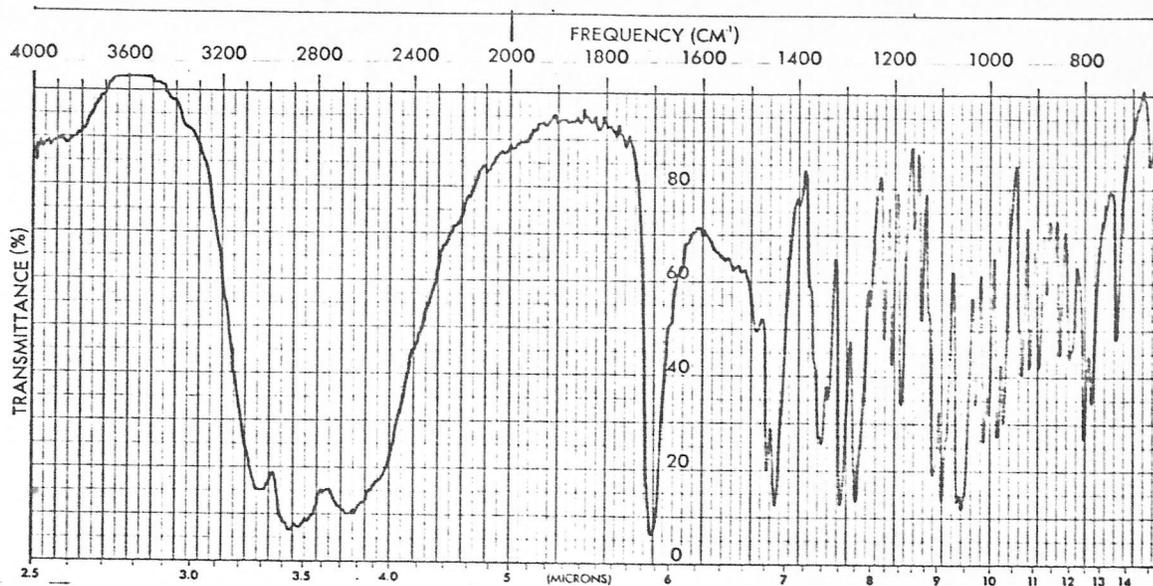


Figura 69. IR (KBr) de L-20. Oxidación de desacetiliclavina con reactivo de Sarett.

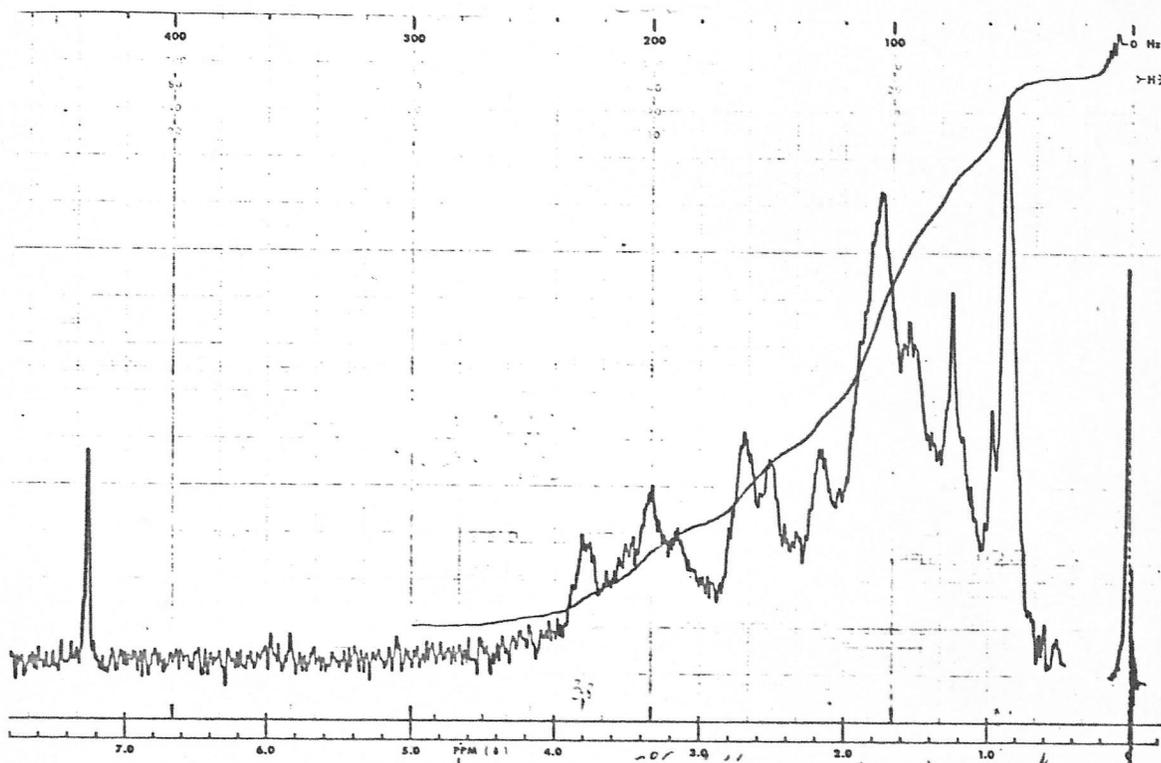


Figura 70. RMNP de L-20.

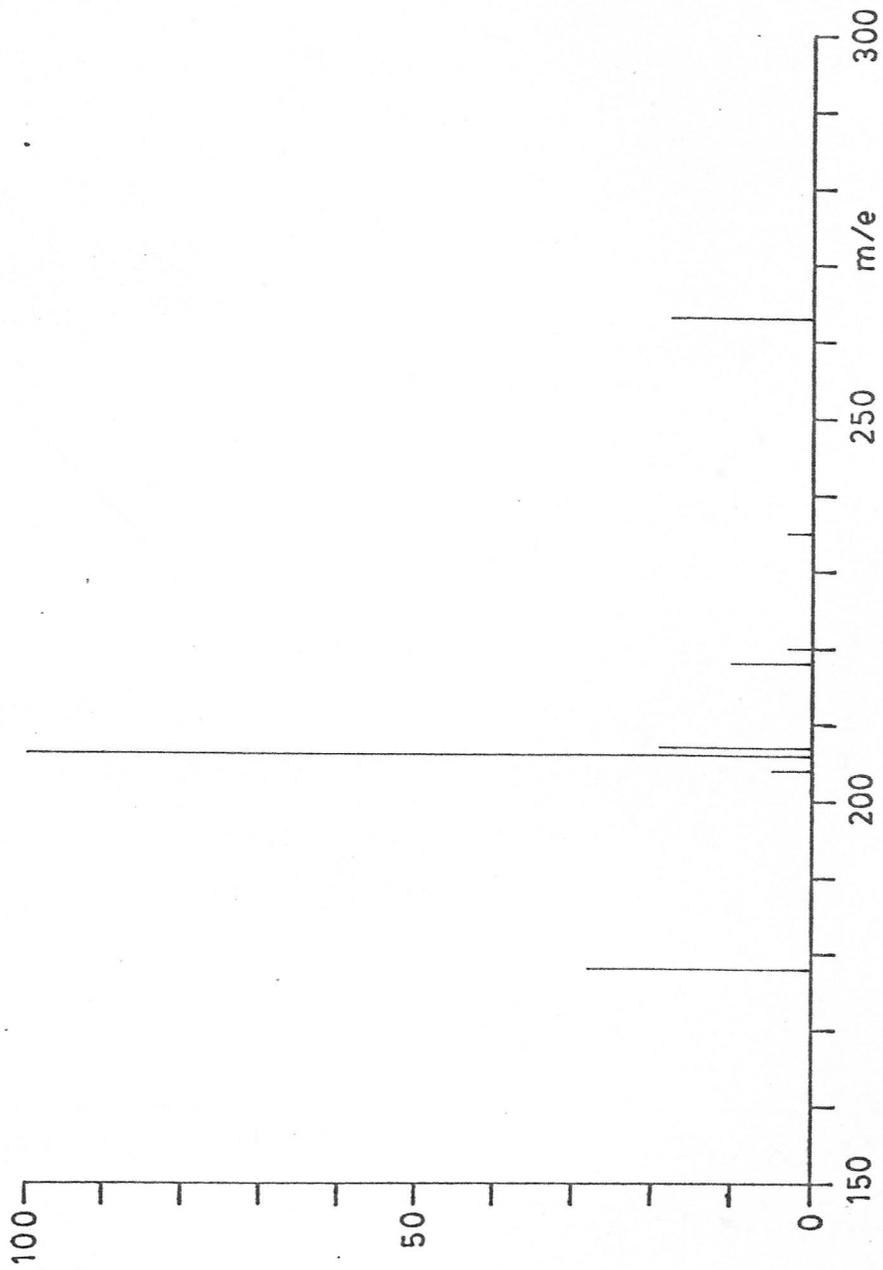


Figura 71. EM de L-20.

2.3.6. LICOCCLAVINA.

Este alcaloide cristalizado de acetona funde a 198°-201°C y muestra las siguientes propiedades espectroscópicas:

IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3.300-3.100, 3.000-2.850, 1.740, 1.250 cm^{-1}

(figura 72, página 148).

RMNP (δ): 0.9(d, J=6Hz, 3H, CH_3CH), 2.0(s, 3H, CH_3CO), 3.6(s, $a_{1/2}$ 4Hz, 1H, CHOH), 4.9(d, J=5Hz, 1H, CHOAc) (figura 73, página 148).

EM m/e (%): 307(M^+ , 4%), 264(M^+ -43, 3), 250(M^+ -57, 28), 247(M^+ -60, 30), 190(M^+ -117, 100), 172(M^+ -135, 34), 162(M^+ -141, 66), 148(10), 134(10) (figura 74, página 144).

RMN ^{13}C (CHCl_3 , 78.62): 170.61, 76.92, 75.79, 54.89, 47.17, 44.62, 42.59, 40.53, 27.64, 26.76, 26.25, 24.31, 24.14, 22.75, 21.29, 20.13, (figura 75, página 150).

2.3.6.1. Acetilación de Licoclavina.

Se disolvió 20 mg. de licoclavina en 3 ml. de una mezcla de anhídrido acético y piridina y se mantuvo a temperatura ambiente por 5 horas. Se diluyó con cloroformo (15 ml.) y se agitó con agua. El extracto clorofórmico produjo una laca (25 mg.) que se filtró en una columna de alúmina con éter etílico. La solución etérea produjo 18 mg. de un material cristalino idéntico en todas sus propiedades con el derivado de diacetilación de desacetillicoclavina (página 126).

2.3.6.2. Hidrólisis de licoclavina.

Se disolvió 12 mg. de licoclavina en 2 ml. de metanol y se añadió 3 ml. de solución 50% metanol-hidróxido de sodio 5N. Se mantuvo a temperatura ambiente por 2 horas. Se diluyó con agua (50 ml.) y se extrajo con cloroformo. El extracto produjo una laca que por sublimación da 9 mg. de un material que tiene idénticas propiedades con el producto natural desacetillicoclavina.

2.3.7. FLABELIDINA.

Esta base es un aceite. Los intentos para obtener sales cristalinas caracterizables fracasaron.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (film): 3.400-3.200, 2.950-2.850, 1.660 y 1.640 cm^{-1}
(figura 76, página 151).

RMNP (δ): 0.9(d, J=6Hz, 3H, CH_3CH), 2.2(s, 3H, CH_3CON), 4.5
(m, $a_{1/2}$ 12Hz, 1H dependiente de la concentración y se intercambia con D_2O y CD_3COOD) (figura 77, página 151)

EM m/e (%): 288(M^+ , 18%), 245(M^+ -43,9), 231(M^+ -57,100), 203
(M^+ -85,20), 188(M^+ -99,25), 161(M^+ -127,15)
(figura 78, página 152).

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (Etanol) 235 nm $\log \epsilon=3.76$

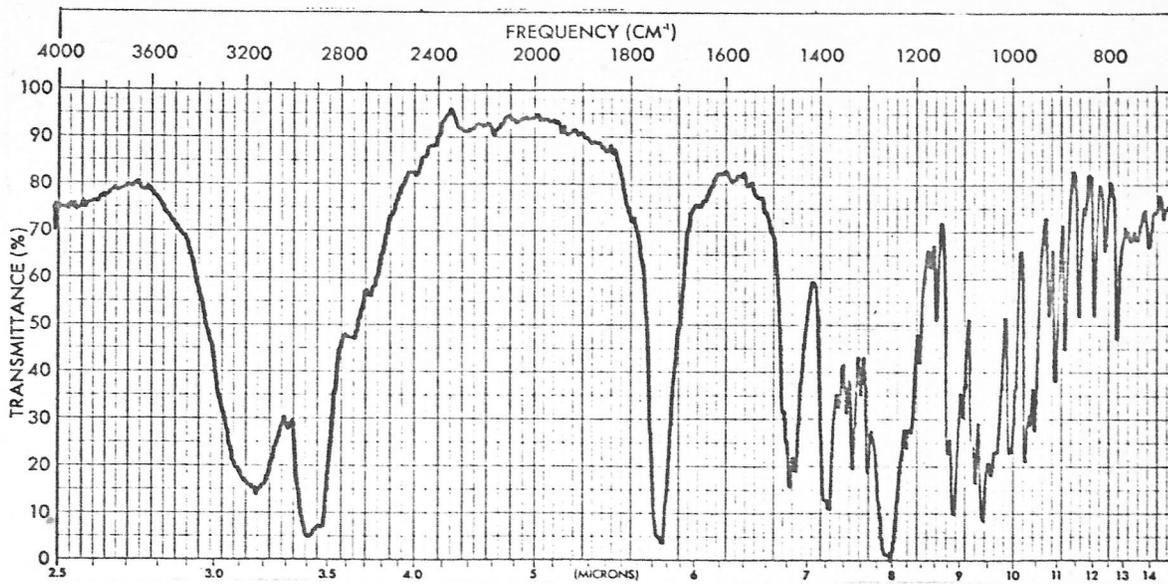


Figura 72. IR (KBr) de licoclavina.

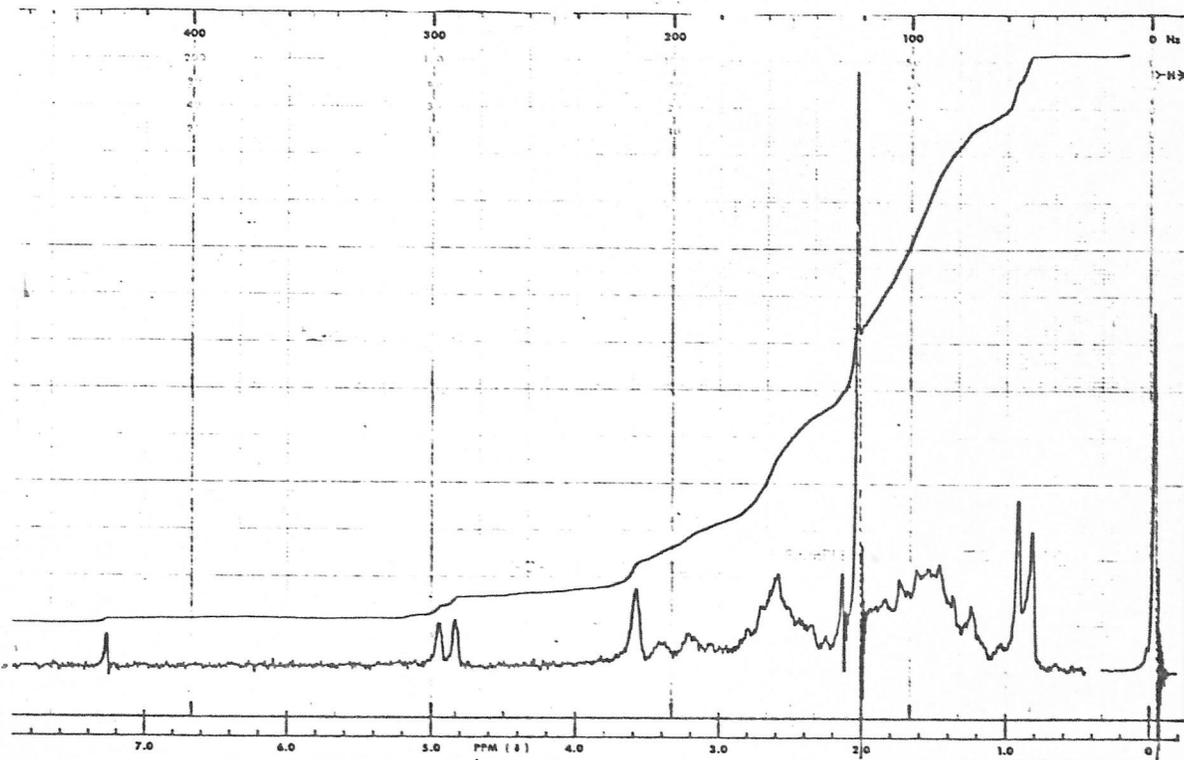


Figura 73. RMNP de licoclavina.

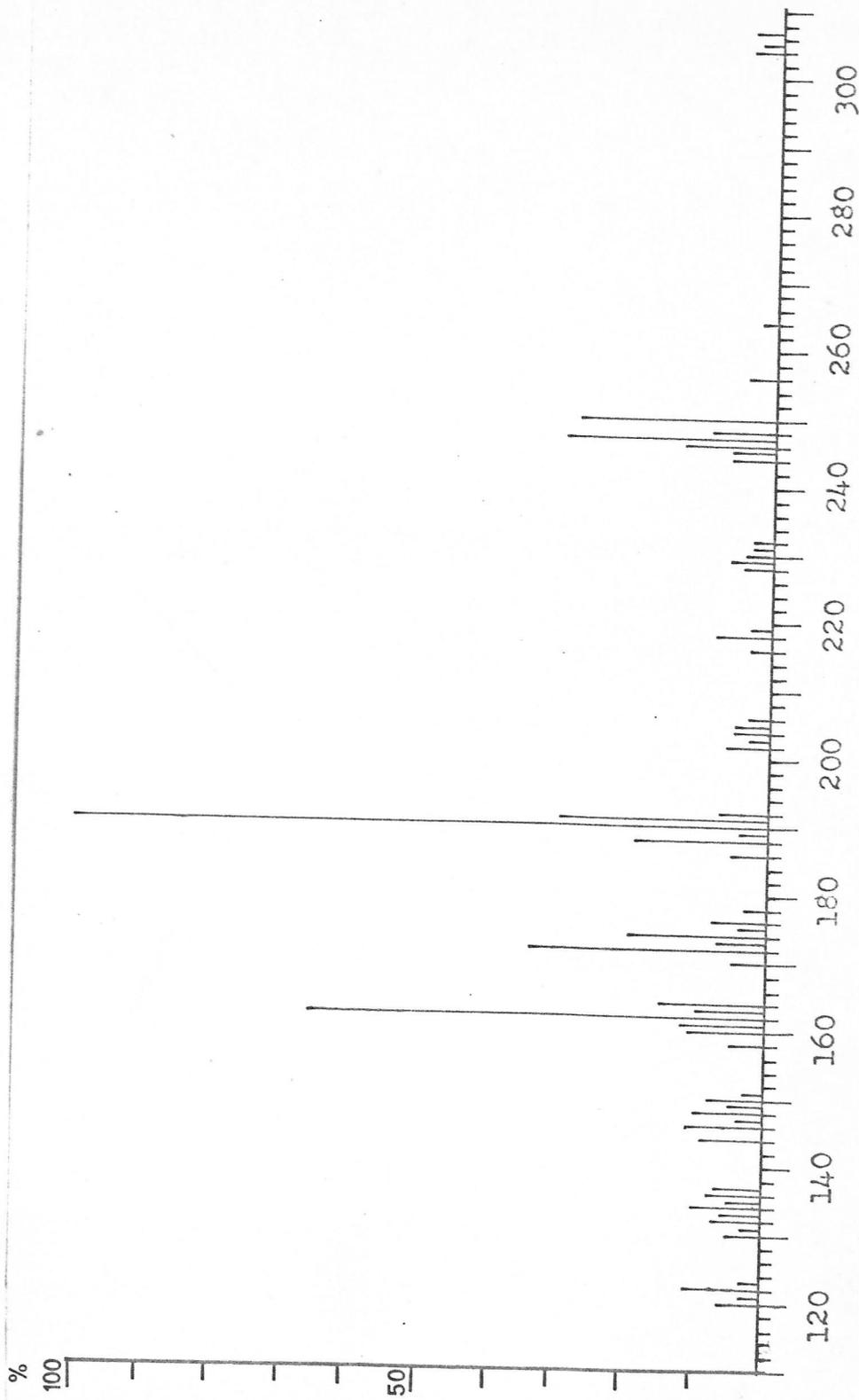
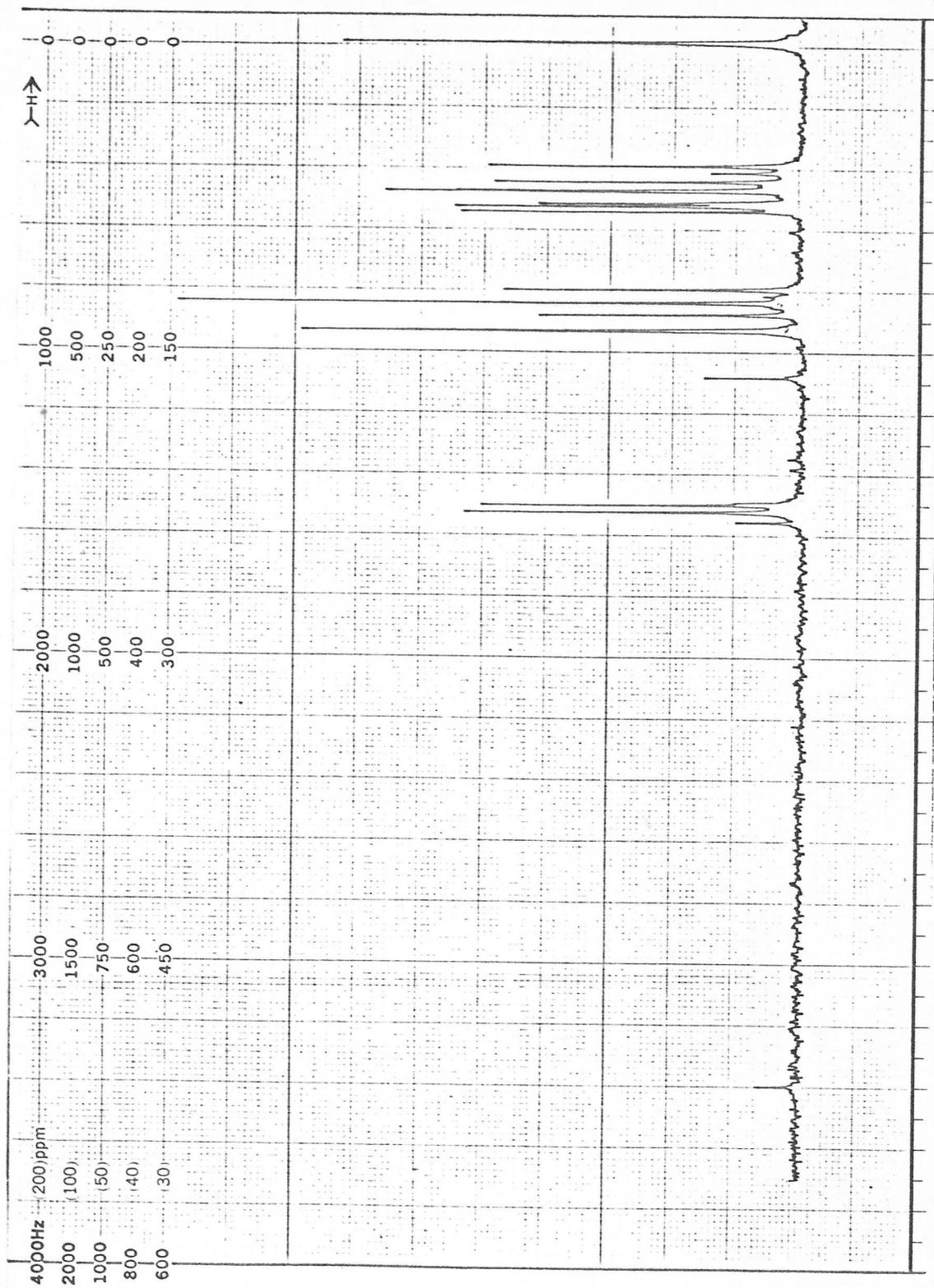


Figura 74. EM de licoclavina.

Figura 75. RMN ^{13}C de licoclavina.

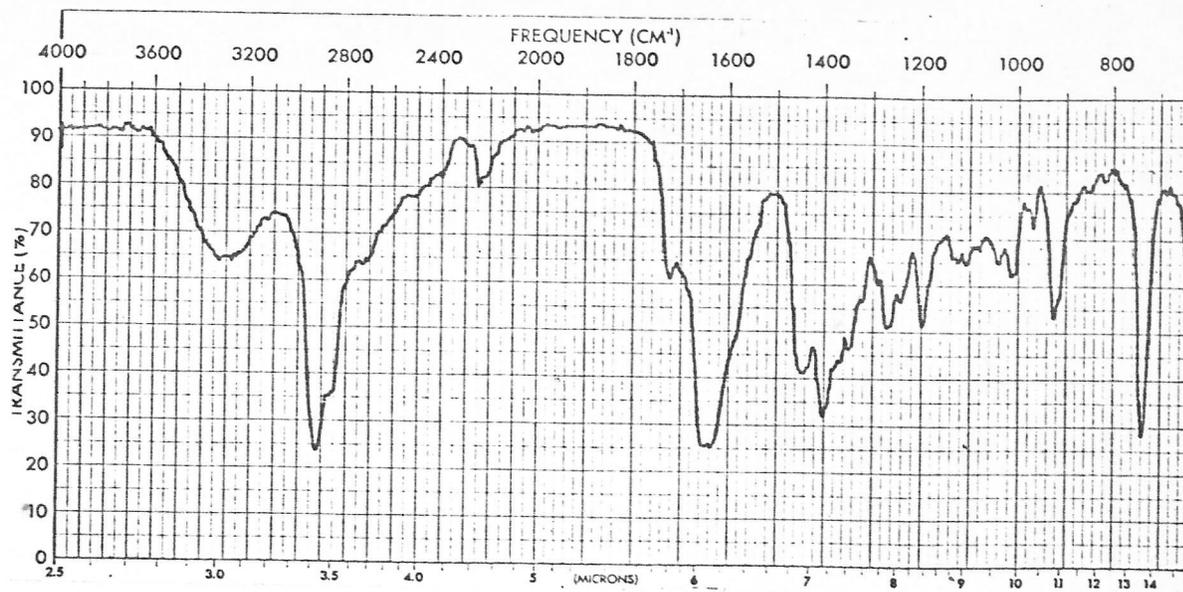


Figura 76. IR (film) de flabelidina.

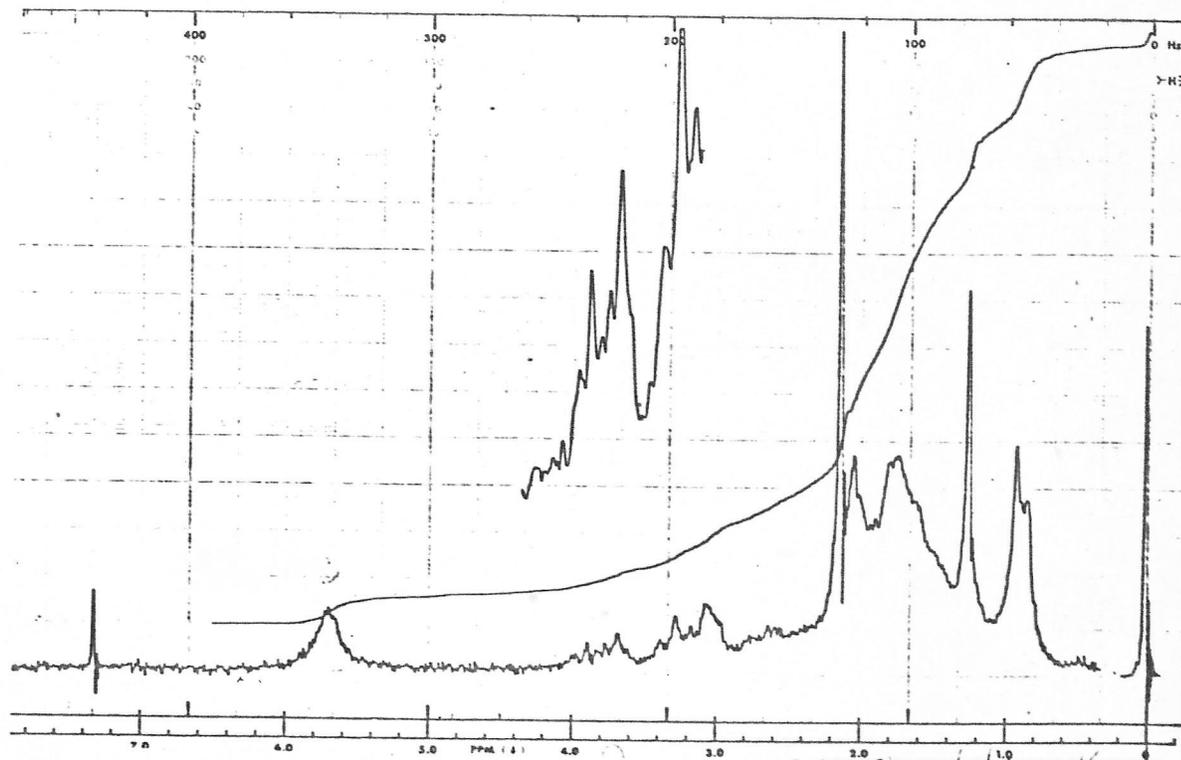


Figura 77. RMNP de flabelidina.

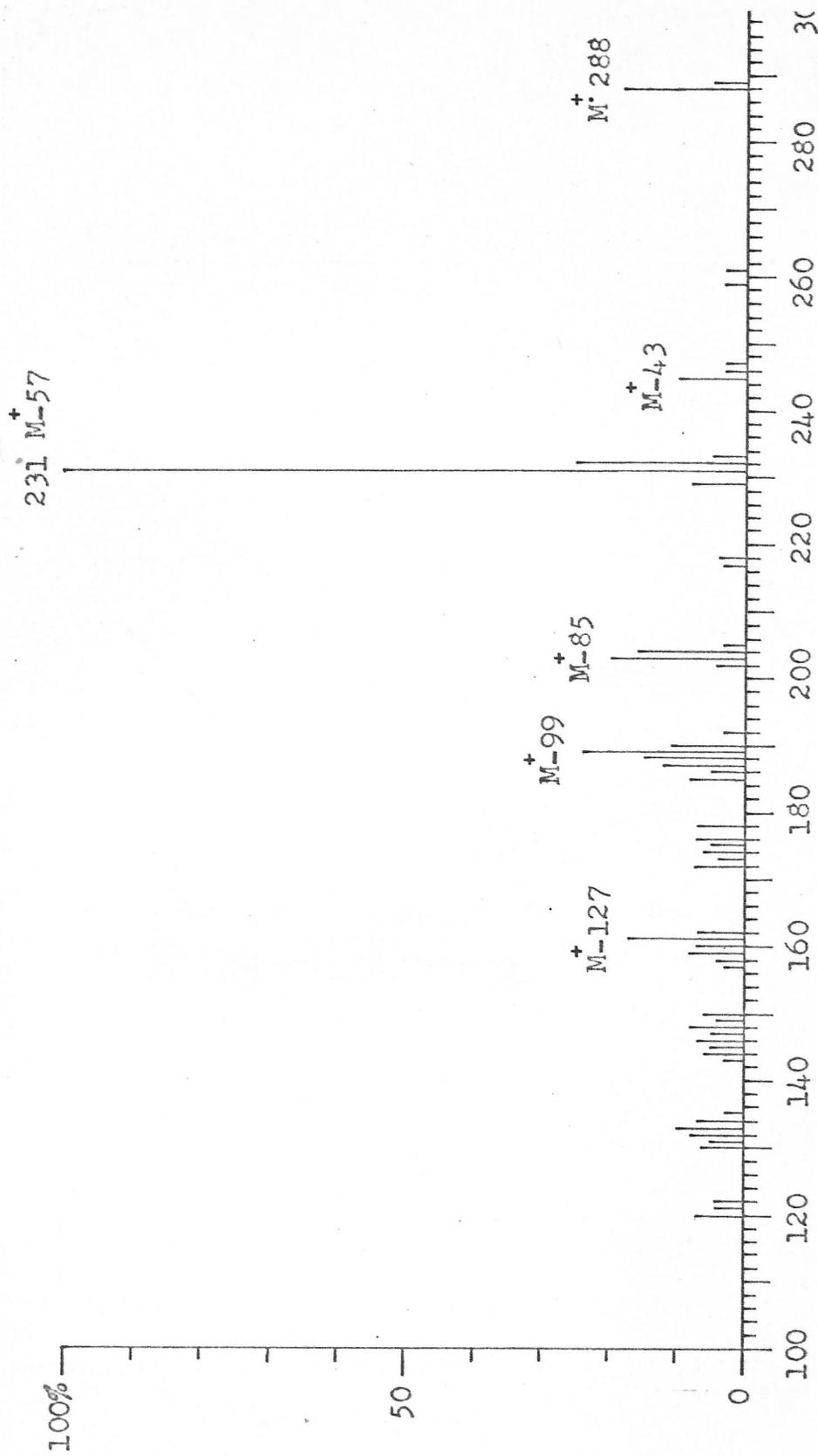


Figura 78. EM de flabelidina.

2.3.8. Alcaloide P8

Este alcaloide cristalizado de acetona funde a 229-233°C con descomposición, mostrando un cambio en la forma cristalina a 200-210°C. El producto sublimado es un aceite que solidifica lentamente pero este sólido se hidrata transformándose nuevamente en un aceite amarillento.

IR $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr): serie de bandas entre 1.740 y 1.580 cm^{-1} (figura 79, página 154).

RMNP (δ): 0.9(s, $a_{1/2}$ 10Hz, 3H, CH_3CH), 5.0(s, $a_{1/2}$ 14Hz, H_2O), 7.2(cuart. J=8 y 4Hz), 8.1(cuart. J=8 y 2Hz) y 8.5(cuart. J=4 y 2Hz) (figura 80, página 154).

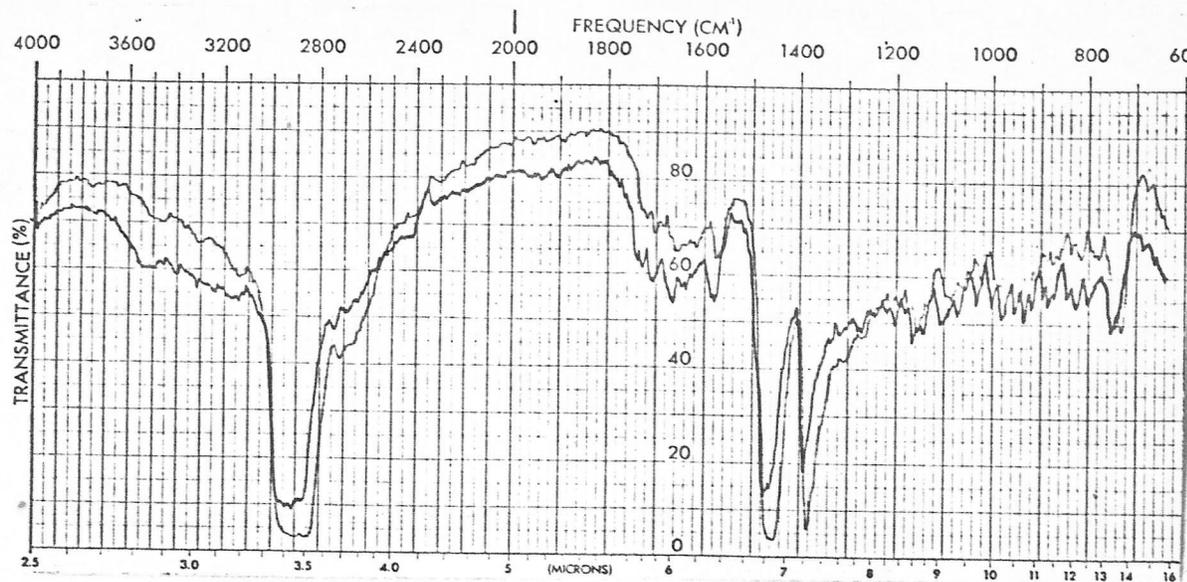


Figura 79. IR (KBr) de P8.

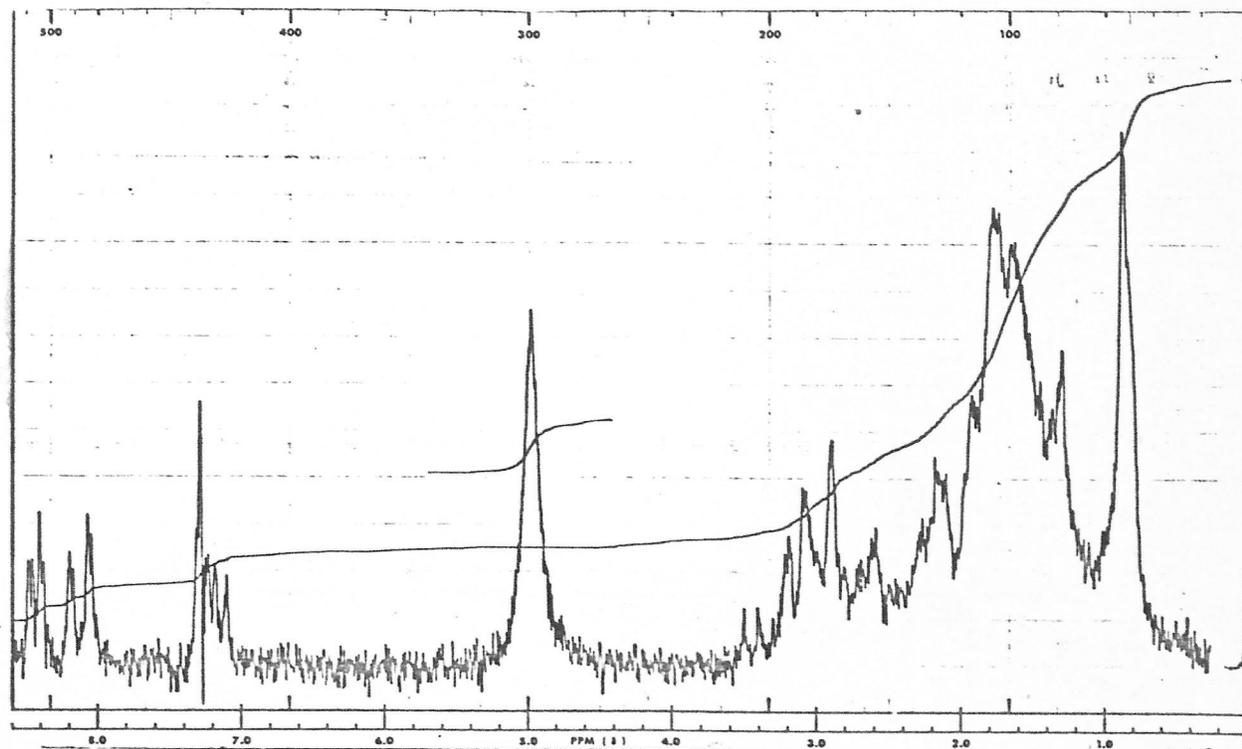


Figura 80. RMNP de P8.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 ESTRUCTURA DE PANICULATINA

3.1.1. Definición funcional de paniculatina.

El EM de alta resolución indica que la fórmula molecular de paniculatina corresponde a $C_{17}H_{27}O_2N$ y ésta concuerda con el análisis elemental encontrado.

El IR de paniculatina (figura 18, página 90) y de su hidrobromuro (figura 19, página 90) muestra una fuerte absorción entre 3.300 y 3.100 cm^{-1} que puede ser asignada a la presencia de a lo menos un grupo OH de naturaleza alcohólica en la estructura de la base natural. En solución de cloroformo el alcaloide muestra en su IR una banda a 3.620 cm^{-1} independiente de la concentración característica de grupo OH no enlazado intramolecularmente.

La naturaleza del grupo OH se puede colegir analizando las propiedades espectroscópicas de algunos derivados.

El IR de paniculatinona, (figura 25, página 95) producto de oxidación de paniculatina, es transparente en la zona de absorción de grupos OH. El EM (figura 27, página 96) muestra una señal molecular a m/e 275 que es justamente dos unidades de masa menor que la de paniculatina, indicando que la oxidación ha afectado a un grupo OH secundario.

El espectro de RMNP de paniculatina (figura 20, página 91) muestra una señal para un átomo de hidrógeno a 3.8 ppm. de un ancho medio de 8 Hz que se desplaza a 5.0 ppm.

por efecto de acetilación y a 5.3 p.p.m. por benzoilación, confirmando la existencia de un átomo de hidrógeno geminal al grupo alcohólico en la base natural.

Las bandas a 1.700 y a 1.420 cm^{-1} en los IR de paniculatinona (figura 25, página 95) y de dehidrodeoxopaniculatina (figura 31, página 99), que no aparecen en los IR de paniculatina ni de deoxopaniculatina (figura 28, página 97), permiten inferir que el grupo carbonilo generado en la oxidación se encuentra en un anillo de seis miembros y está flanqueado a lo menos por un grupo metileno¹¹². En consecuencia, podemos aceptar que en paniculatina hay "un grupo OH secundario en un anillo de seis miembros y flanqueado a lo menos por un metileno"

La fuerte absorción en el IR de paniculatina a 1.720 cm^{-1} define el otro átomo de oxígeno como parte de un grupo carbonilo y la frecuencia de la absorción sugiere la naturaleza de carbonilo cetónico en un anillo de cinco miembros. Esta naturaleza cetónica, por otro lado, es confirmada por la desaparición de esa banda de absorción en el IR del derivado deoxopaniculatina (figura 28, página 97) obtenido por reducción de paniculatina con hidrazina en medio básico. De este modo quedan definidos los grupos funcionales oxigenados de paniculatina, avalados, además, por el RMN¹³C con señales a 74.5 y 220 p.p.m. asignables a átomos de carbono alcohólicos y carbonílicos respectivamente^{61,120}.

Al comparar los RMNP de paniculatina en CDCl_3 y en $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{COOD}$ se aprecia como rasgo característico el desplazamiento a más bajo campo de algunas señales; éstas deben estar asociadas a los protones α al átomo de nitrógeno en la estructura del alcaloide. Esta conducta es típica de la desprotección magnética que sufren los átomos de hidrógeno vecinos al átomo de nitrógeno cuando éste se protona¹¹¹. Esto ocurre en presencia de gotas de CD_3COOD o de CF_3COOD . De esta forma la señal singlete para 3H a 2.2 p.p.m. en CDCl_3 debe asignarse a la existencia del grupo N-CH_3 ¹¹¹.

De la integración de las señales desplazadas es posible suponer la existencia de tres o cuatro átomos de hidrógeno α al átomo de nitrógeno.

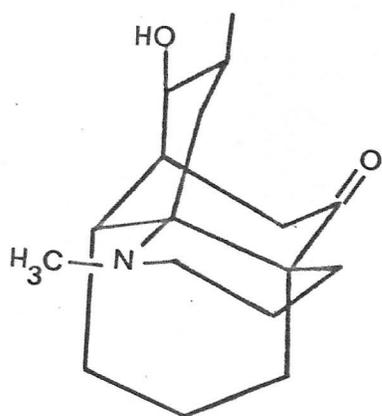
La banda de absorción a 2.780 cm^{-1} en el IR de paniculina y en casi todos sus derivados debe asociarse también a vibraciones típicas del grupo N-metilo¹¹⁰.

La no N-Acetilación de paniculatina, junto a la presencia de bandas entre 2.750 y 2.550 cm^{-1} en el IR del hidrobromuro de paniculatina hacen pensar en la naturaleza terciaria del átomo de nitrógeno.

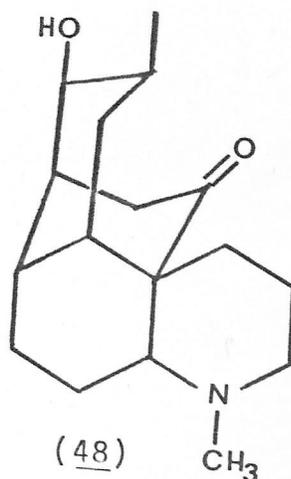
La existencia de señales de iones de bajo peso molecular que incluyen al átomo de nitrógeno en el EM de alta resolución de paniculatina parece indicar que el grupo N-Metilo forma parte de un anillo probablemente piperidínico¹²¹.

Los alcaloides de Lycopodium de estructura resuelta que han demostrado poseer un grupo N-CH₃ son: sauroxina (17)(19, 44), lucidulina(9)(23) y α y β obscurinas(42, 43) (página 4).

Las informaciones estructurales de estos alcaloides no corresponden en absoluto con las de paniculatina. Por otro lado una comparación directa reveló que paniculatina no corresponde a N-metil- α -cicloclavolonina (47) ni al producto de degradación de Hofmann de clavolonina(48), productos sintéticos, isoméricos con nuestra base natural, y que poseen todos los elementos estructurales mencionados hasta aquí para paniculatina^{57, 122}.



(47)

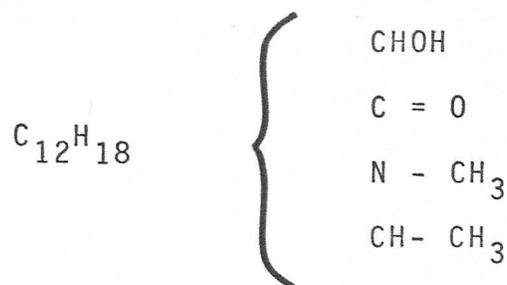


(48)

El espectro de masa de paniculatina indica que el alcaloide no posee el esqueleto estructural de licopodina, ni de ningún alcaloide conocido, debido a la ausencia de señales diagnósticas características de las distintas familias de alcaloides de Lycopodium.

Finalmente, el espectro de RMNP de paniculatina y de sus derivados muestra una señal doblete a 0.9 p.p.m. que debe asociarse a la presencia de un grupo $\text{CH}_3\text{-CH}$.

Una fórmula expandida para paniculatina debe ser:



3.1.2. Definición del esqueleto carbonado de paniculatina.

Definida la funcionalidad de paniculatina como un alcaloide que contiene un OH secundario, un N-CH_3 un $\text{CH}_3\text{-CH}$ y un carbonilo cetónico, junto con la ausencia de señales atribuibles a protones olefínicos y a C=C hacen que las insaturaciones de la fórmula $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_2\text{N}$ queden satisfechos si aceptamos que la base natural posee una estructura tetracíclica.

Dos hechos son importantísimos en el estudio del esqueleto carbonado de paniculatina:

1. La existencia del grupo N-CH_3 que, en otras familias de alcaloides es muy común, en alcaloides de Lycopodium solo ha sido descrita en cuatro bases naturales.
2. El EM de paniculatina y derivados muestra señales que indican un sistema de anillos diferentes a los ya conocidos

El rasgo más relevante en el EM de paniculatina, junto a la gran intensidad de la señal asignable al ión molecular, es la existencia de una serie de señales muy intensas a m/e 58, 70, 71, 110. En EM de alta resolución estas señales corresponden a iones cuya composición incluye el átomo de nitrógeno.

Estos antecedentes y el bajo rendimiento de paniculatina en el crudo alcaloide de L.paniculatum hizo prohibitiva la idea de realizar algún análisis degradativo como aproximación al conocimiento del esqueleto estructural de la base natural.

Así pues, se resolvió intentar solucionar el problema planteado utilizando técnicas de difracción de rayos X. Los cristales de p-bromobenzoil paniculatina no fueron lo suficientemente perfectos como se requerían. No obstante, algunos cristales de hidrobromuro de paniculatina sirvieron para el efecto.

3.1.3. Descripción de la estructura y de la estereoquímica relativa de paniculatina.

La estructura obtenida por análisis de difracción de rayos X⁽¹²³⁾ interpreta, por supuesto, todas las consideraciones estructurales previas. Confirma las asignaciones de los grupos funcionales. Define el esqueleto carbonado. Determina la estereoquímica relativa de los anillos y de los sustituyentes y permite racionalizar toda la información,

incluyendo espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de C^{13} .

La estructura de paniculatina (figura 81) consiste en cuatro anillos fusionados que conforman un sistema no informado previamente, en la secuencia que se indica: un anillo del tipo N-metilpiperidínico (anillo A) unido a un ciclo pentano (anillo B), éste va unido a una ciclopentanona (anillo C), el que a su vez se une a un anillo del tipo ciclohexanol metilado (anillo D).

Una proyección plana de paniculatina se muestra en la figura 81 b.

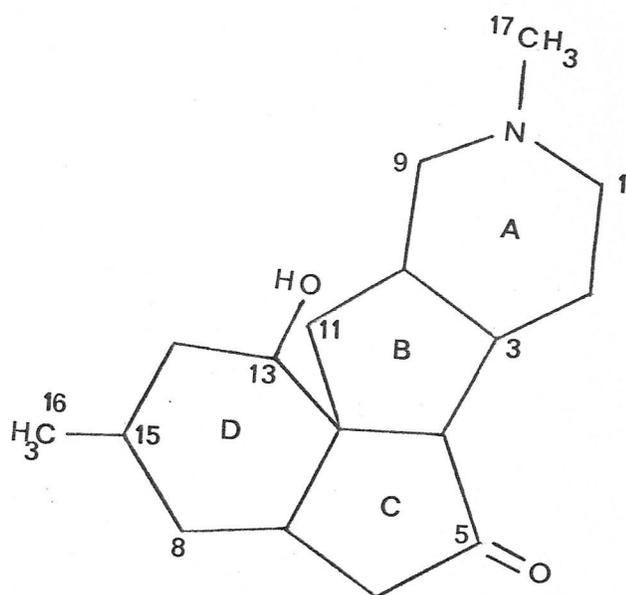


Figura 81 b. Proyección plana de paniculatina.

Las relaciones estereoquímicas de paniculatina se han deducido de las desviaciones fuera del plano obtenidas del análisis de rayos X y que se muestran en la tabla 6

TABLA 6

Distancias fuera del plano.

Atomo	Desviación del plano(Å)
Anillo D, definido por C7, C8, C12, C13, C14 y C15.	
C4	0.77
C6	1.70
C11	-1.58
C16	-0.28
OH	1.65
Anillo C, definido por C4, C5, C6, C7 y C12.	
C3	-1.59
C11	-0.64
Anillo B, definido por C3, C4, C10, C11, C12.	
C5	-0.58
C7	-1.56
Anillo A, definido por N, C1, C2, C3, C9 y C10	
C4	1.69
C11	1.57
C17	0.08

El grupo metilo (C16) del anillo D está desviado del plano definido por los C7, C8, C12, C13, C14 y C15 en -0.28 \AA , mientras que el átomo de oxígeno del grupo OH lo está en 1.65 \AA lo que implica que el CH_3 de C15 y el OH de C13 son trans entre sí; el OH ocupando una posición axial y el CH_3 una ecuatorial del anillo D.

La unión de los anillos D y C es del tipo "cis" deducido de la posición del C6 y C4 desviados con respecto al plano del anillo D en 1.70 \AA y 0.77 \AA respectivamente; indicando además que C6 está ocupando la posición axial de C7 y C4 está ocupando la posición ecuatorial de C12. Esto se confirma con el valor y el signo de la desviación de C11 con respecto al plano del anillo D de -1.58 \AA indicando que C11 es trans a C6 y C4 y ocupa la posición axial de C12.

Se comprueba que la unión de los anillos B y C es del tipo "cis" porque C3 (-1.59 \AA) y C11 (-0.64 \AA) son cis entre sí respecto al plano del anillo C, definido por los carbonos C4, C5, C6, C7 y C12.

Por su parte los átomos C5 y C7 del anillo C están desviados respecto del plano que define el anillo B en -0.58 \AA y -1.56 \AA respectivamente, confirmando la relación cis de la unión de B y C.

La unión de los anillos B y A es también del tipo "cis" dado las desviaciones de sus sustituyentes con respecto al plano del anillo A definido por C3, C10, C9, N, C1 y C2. El C4 está desviado en 1.69 \AA y C11 está desviado en 0.57 \AA . El C4 ocupa la posición axial de C3 y C11 la posición ecuatorial de C10 respecto al anillo A.

El metilo del grupo N-CH_3 ocupa una orientación ecuatorial a juzgar por la desviación de -0.08 \AA , respecto al plano del anillo A.

Los valores en $\overset{\circ}{\text{A}}$ indican la magnitud de la desviación por sobre (+) o por debajo (-) del plano que define cada uno de los anillos.

Los ángulos agudos entre los planos de los anillos en paniculatina son A y B = 60.55° , B y C = 53.27° y C y D = 64.19° .

La conformación más probable de cada uno de los anillos de paniculatina en los cristales del hidrobromuro derivado se puede deducir de los datos de desviación de cada uno de los átomos del anillo con respecto al plano que define al mismo y que es dibujado aquí en el plano del papel. De esta forma, el signo representa la desviación por sobre (+) o por debajo (-) del plano del papel.

Dados los valores de las desviaciones en la figura 82, el anillo A tiene una conformación de silla casi perfecta.

Por su parte los anillos B y C son ciclopentanos flexionados según las desviaciones de cada átomo de los respectivos anillos al plano del papel, comparados con las desviaciones calculadas para el ciclopentano en su conformación de media silla¹²⁴.

Finalmente el anillo D no es una silla perfecta a juzgar por los datos de desviaciones de cada carbono como se indica en la figura 82.

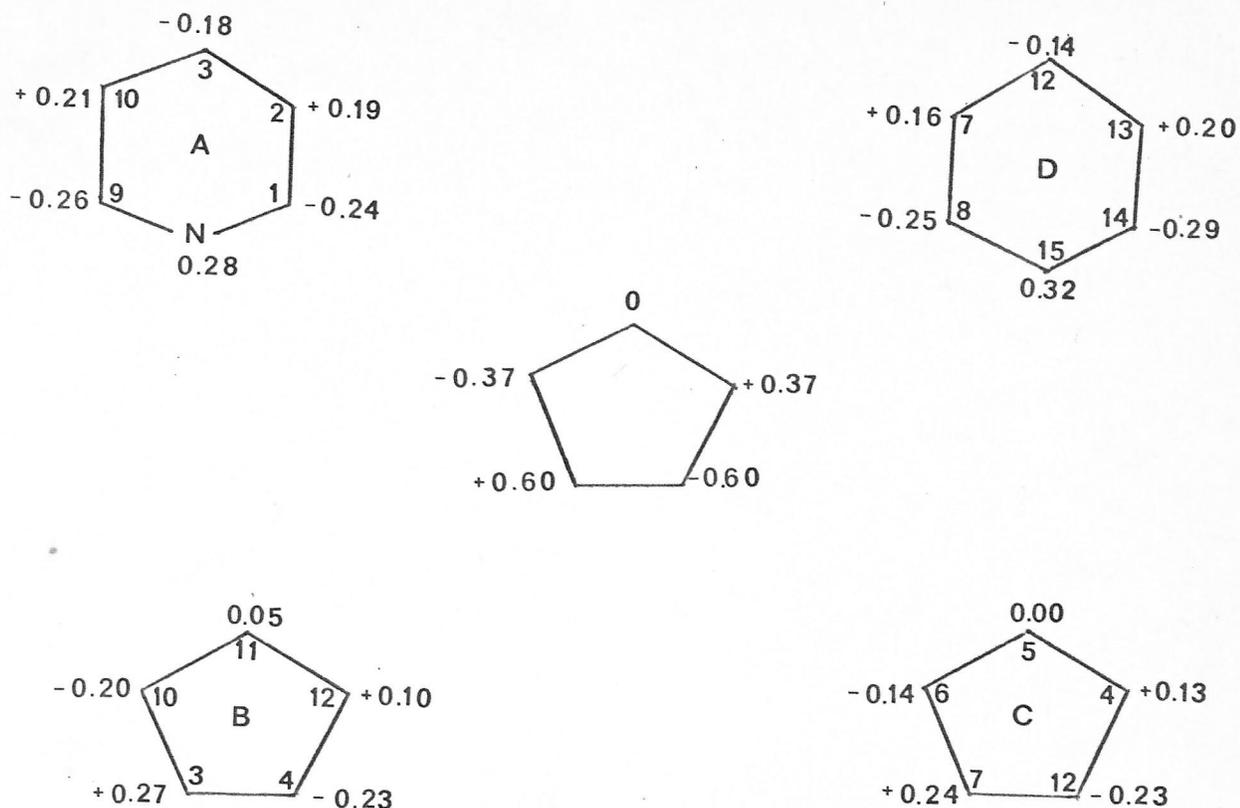


Figura 82. Desviaciones de los átomos de carbono de paniculatina relativo al plano del papel.

La estructura de paniculatina con la estereoquímica relativa asignada es la mostrada en la figura 83.

Los derivados de paniculatina preparados en este trabajo deben corresponder, en consecuencia, a las estructuras dibujadas en figura 84.

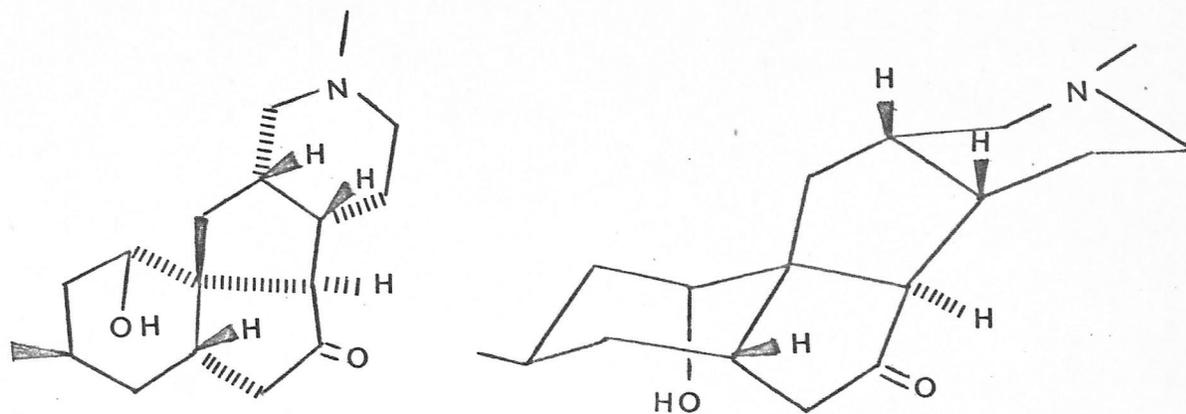
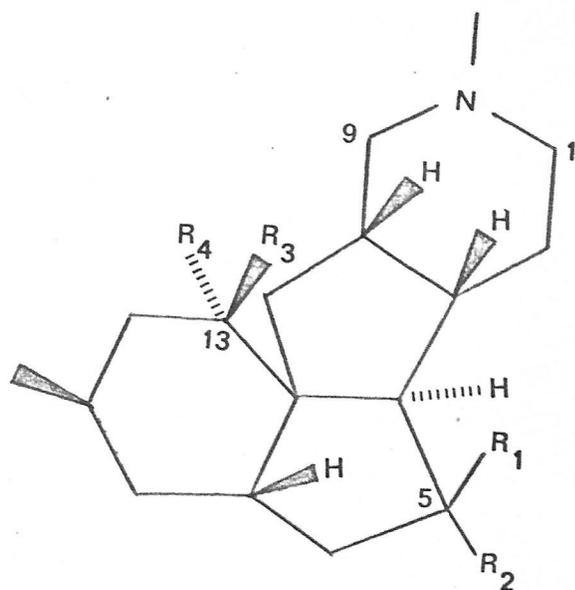


Figura 83. Estereoquímica relativa de paniculatina.



paniculatinona (49) $R_1+R_2=0$; $R_3+R_4=0$

5-deoxopaniculatina (50) $R_1=R_2=R_3=H$; $R_4=OH$

13-dehidro-5-deoxo-

paniculatina (51) $R_1=R_2=H$; $R_3+R_4=0$

Acetilpaniculatina (52) $R_1+R_2=0$; $R_3=H$; $R_4=OCOCH_3$

Benzoilpaniculatina (53) $R_1+R_2=0$; $R_3=H$; $R_4=OCOC_6H_5$

Figura 84. Derivados de paniculatina.

3.1.4. Determinación de la configuración absoluta de paniculatina.

Conociendo la estereoquímica relativa de paniculatina se planteó el problema de determinar qué enantiómero, A o B de la figura 85 corresponde al producto natural.

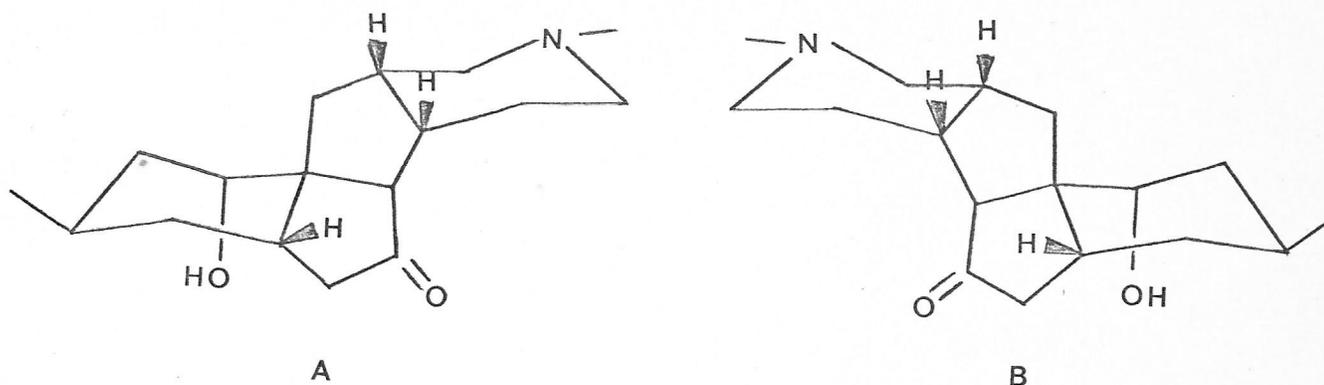


Figura 85. Enantiómeros de paniculatina.

Para tal efecto se empleó tres métodos independientes: aplicación de la regla del benzoato⁷⁹, aplicación de la regla de Horeau⁷⁴⁻⁷⁶ y el análisis de la curva de DOR de 13-dehidro-5-deoxo-paniculatina (51)

Los resultados obtenidos, que concuerdan perfectamente, indican que la configuración absoluta de paniculatina corresponde a la del enantiómero A de la figura 85 y el C13 es un centro de quiralidad (S).

3.1.4.1 Aplicación de la regla del benzoato a paniculatina.

Por correlaciones empíricas se sabe que cualquier benzoato es más o menos dextrorrotatorio que el alcohol correspondiente como consecuencia de que el benzoato esterificante .

"magnífica" las disimetrías conformacionales del alcohol (ver página 30). Esto quiere decir, que el éster benzoato adquiere como conformación más probable aquella que le signifique minimizar las constricciones estéricas y al mismo tiempo que le permite maximizar los efectos de resonancia.

Esta disimetría conformacional está relacionada -entre otros factores- a los requerimientos estéricos de los sustituyentes del carbono carbinol.

La figura 86 relaciona la conformación más favorable del benzoato, la configuración absoluta del alcohol y la diferencia en el poder rotatorio de los mismos. S y L son sustituyentes del carbono carbinol diferenciados por su menor o mayor requisito estérico.

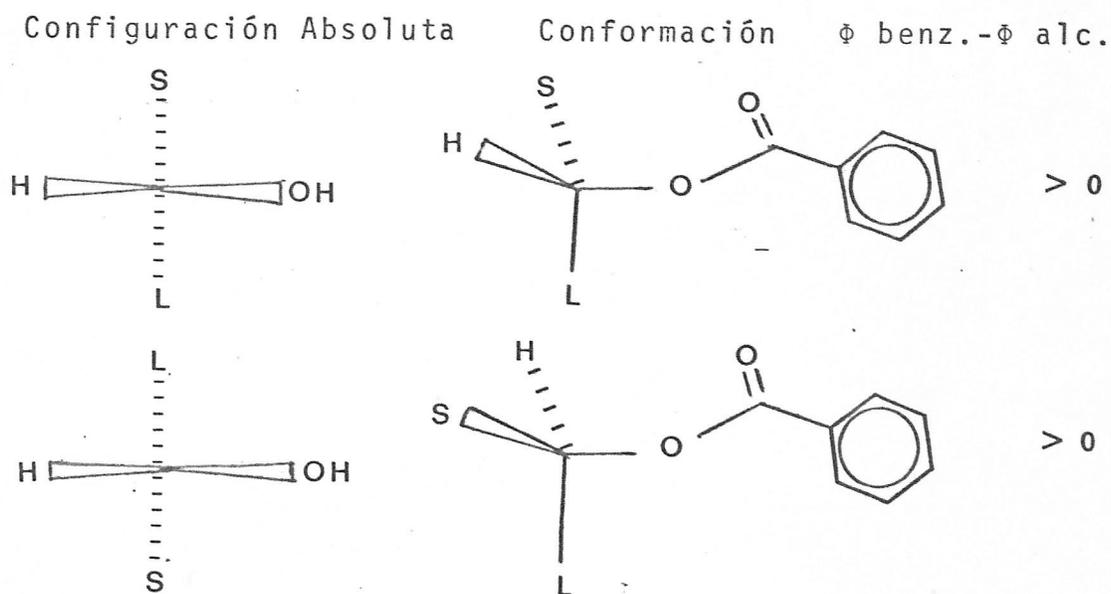
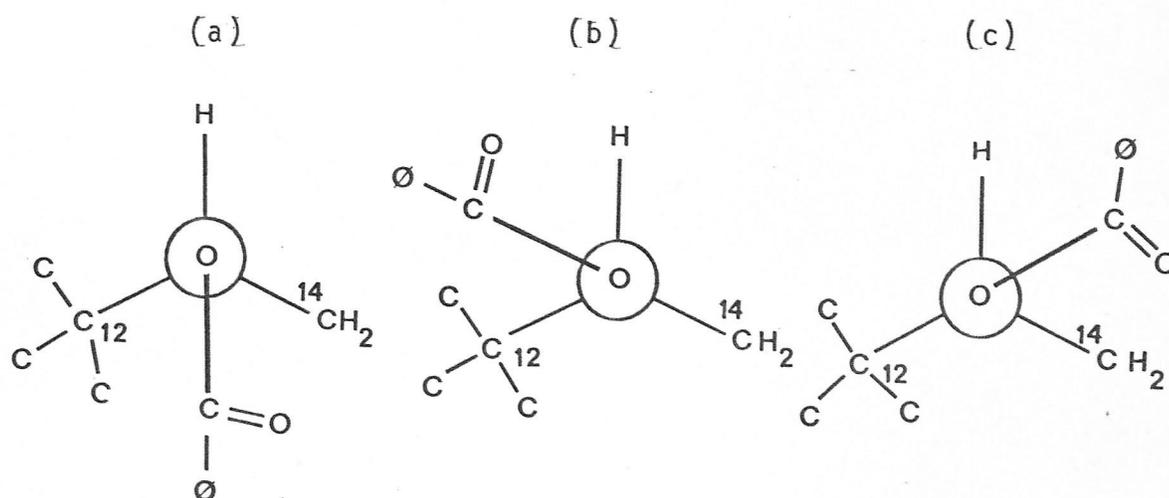


Figura 86. Relación de la conformación del benzoato y la configuración del alcohol

La predicción del signo de la diferencia Φ benz.- Φ alc.

analizando las conformaciones más probables para el 13 O-benzoil derivado en el enantiomorfo B de paniculatina determinó un resultado opuesto al experimental.

Utilizando modelos Dreiding y analizando las probables conformaciones del benzoato derivado de la antípoda A se encontró que, excluyendo una conformación eclipsada del grupo éster con el átomo de hidrógeno de C13, sólo son posibles tres conformómeros que han sido dibujados en proyección usando como átomo central el oxígeno del éster unido al carbono C13.

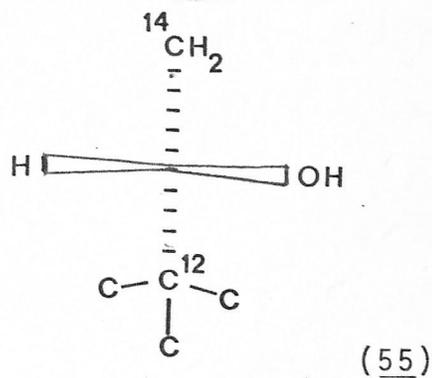
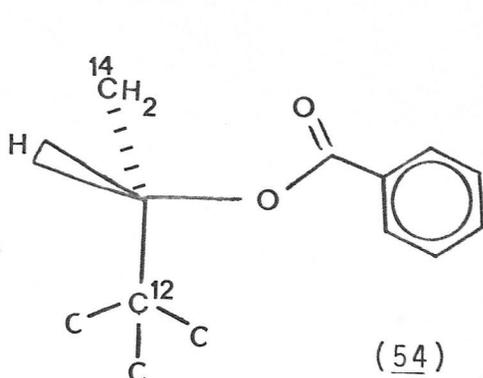


En la conformación (a) hay fuertes interacciones con los átomos de hidrógeno axiales de C15 y C6.

En la conformación (b) hay serias restricciones espaciales con el anillo A (C1 y N) y en el átomo de hidrógeno axial de C4.

La conformación (c) parece ser la más probable y donde los efectos de resonancia y estéricos deben ser máximos y

mínimos respectivamente. Así entonces, en esta conformación más estable el enlace -O-CO del éster debe estar flanqueando a los enlaces C13-H y C13-C14. De esta forma podemos representar la conformación del benzoato como (54).



Aceptando que el grupo CH₂ del C14 es el grupo S y el C12 es el grupo L el alcohol original debe tener la configuración absoluta indicada en (55) y el benzoato debe ser más dextrorrotatorio que paniculatina misma.

El poder rotatorio molecular del benzoato resultó ser de 337.2° y el de paniculatina de 159.8, en consecuencia la diferencia $\Phi_{\text{benz}} - \Phi_{\text{alc.}} = 337.2 - 159.8 = +179.4$. Este resultado está de acuerdo con el análisis conformacional a partir de la antípoda A de paniculatina. Según lo anterior, el centro asimétrico del carbono 13 es del tipo S (figura 87)

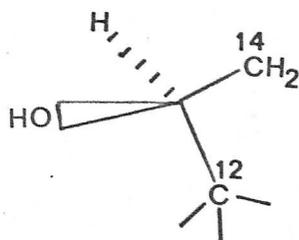
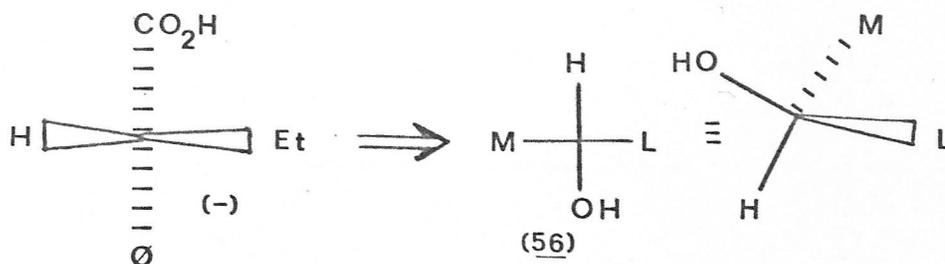


Figura 87. Configuración de C13 de paniculatina según la regla del benzoato.

3.1.4.2. Aplicación del método de Horeau a paniculatina.

El método de Horeau o del "desdoblamiento parcial" relaciona empíricamente la configuración absoluta de un alcohol secundario ópticamente activo con su esterificación preferencial con una de las antípodas ópticas del ácido α -fenil butírico⁷⁴⁻⁷⁶. En esencia el método consiste en esterificar un alcohol con anhídrido del ácido α -fenil butírico racémico y analizar la actividad óptica del ácido de exceso. De este modo, conociendo el enantiómero excedente se conoce también el que reacciona preferentemente y en consecuencia, se puede asignar la configuración absoluta del alcohol.

Horeau ha determinado, empíricamente, que si el ácido α -fenil butírico excedente es levógiro, el alcohol secundario es tal que, escrito en proyección de Fischer, el grupo OH está abajo, el átomo de H en lo alto y el sustituyente más voluminoso se encuentra a la derecha, tal como se muestra en (56)



Cuando se aplicó el método de Horeau a paniculatina usando anhídrido del ácido α -fenil butírico racémico se encontró que el ácido excedente es levógiro, mostrando una

actividad óptica de -0.150° ; con un rendimiento de esterificación de 47% y un rendimiento óptico de 25% (página 89).

La magnitud de estos resultados, que son perfectamente concluyentes, está asociada a las diferencias estéricas de los sustituyentes del carbinol y permite proponer que el carbono del carbinol tiene la configuración absoluta que se indica en la figura 88 y en consecuencia el centro asimétrico C13 es del tipo S.

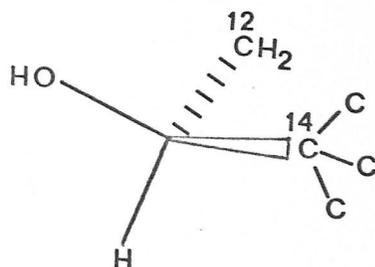
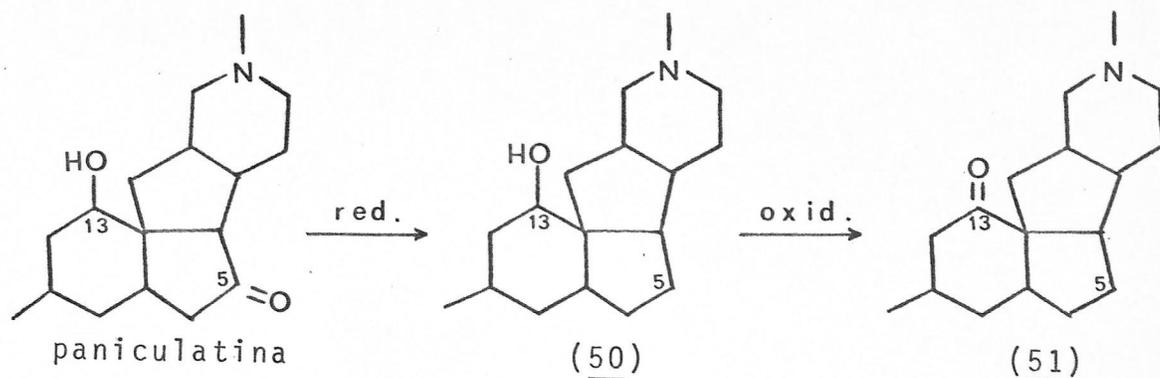


Figura 88. Configuración absoluta del C13 de paniculatina según el método de Horeau.

3.1.4.3. Análisis de la curva de DOR de 13-dehidro-5-deoxopaniculatina (51).

Dada la enorme concordancia entre las consideraciones estereoquímicas de las ciclohexanonas sustituidas y sus respectivas curvas de DOR se preparó el derivado 13-dehidro-5-deoxopaniculatina (51). Desde el punto de vista químico esto significó reducir el grupo carbonilo de C5 de paniculatina hasta un grupo metileno usando una reacción de Wolff Kishner generando el producto 5-deoxopaniculatina cuyas propiedades espectroscópicas confirman la estructura (50) (página 85). La oxidación de (50) dió origen al producto 13-



-dehidro-5-deoxopaniculatina (51) cuya estructura satisface plenamente la información espectroscópica recogida (página 86).

La curva de DOR de (51) (figura 89) muestra un efecto Cotton positivo con una amplitud $a=99$, con un máximo a 310nm. y mínimo a 270 nm.

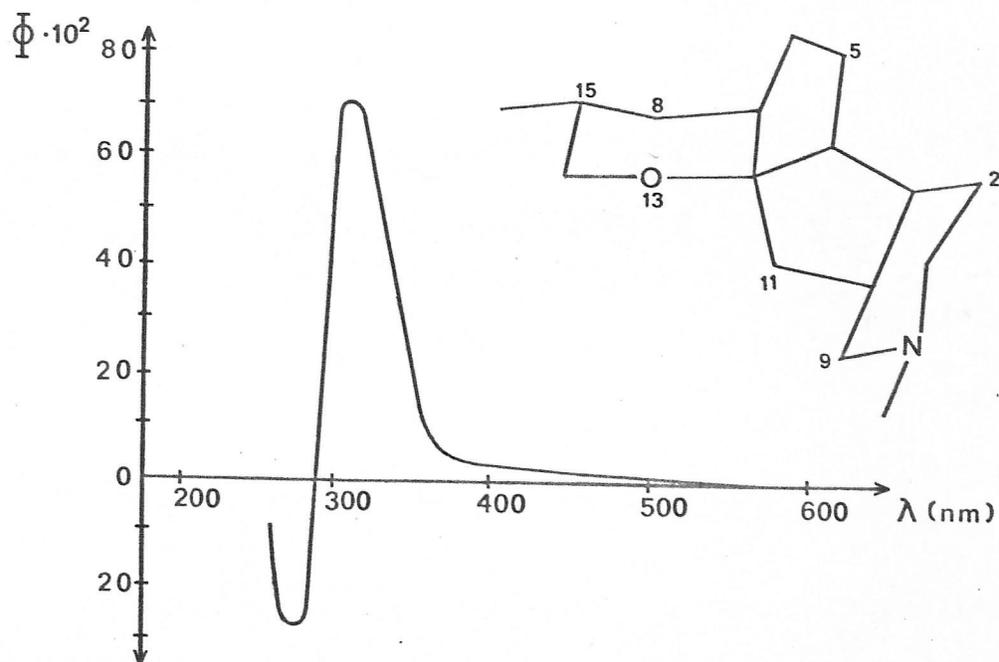


Figura 89. DOR y diagrama de octante de 13-dehidro-5-deoxopaniculatina.

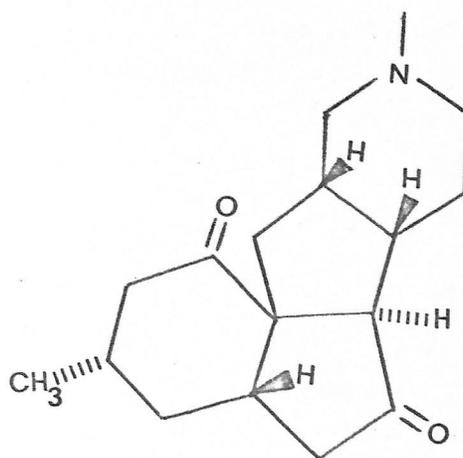
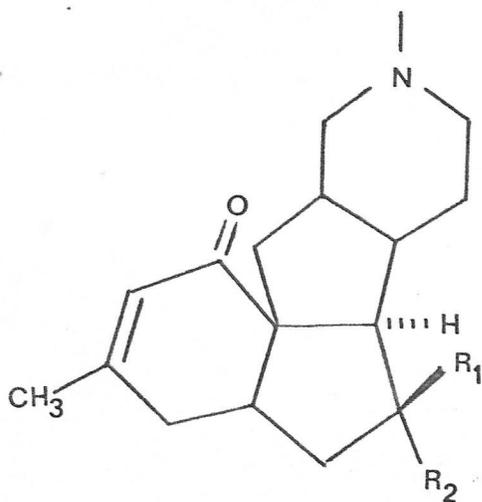
La aplicación de la regla del octante⁸²⁻⁸⁷ a las antípodas ópticas del derivado de paniculatina confirma que justamente la conformación más estable de la ciclohexanona del antípoda derivado de A, es la que explica mejor el efecto Cotton positivo observado en la curva de DOR, tal como se muestra en la figura 89.

En el diagrama de octantes de la figura 89, se aprecia que el sustituyente metilo de C15 aparece en un octante positivo y dado que pertenece a una tercera esfera de influencia⁸⁶ debe ser el que dirige el signo del efecto Cotton. Los efectos de los carbonos C6 y C11, C5 y C3 se anulan mutuamente. El C4 aparece aproximadamente, en el plano XZ del diagrama. C10 aparece en el plano que bisecta el enlace C-O del carbonilo y no tiene efecto. Si bien es cierto que las contribuciones de C9, N, C17, C1 y C2 deben ser negativas, sus efectos deben ser muy pequeños por la lejanía desde el cromóforo en C13.

En consecuencia, se puede sugerir que la forma enantiomérica de paniculatina natural corresponde a la antípoda descrito por A, definiendo así la estereoquímica absoluta de la base.

En este punto es importante señalar que Loyola ha determinado la estructura de otros dos alcaloides, que poseen el esqueleto básico de paniculatina, aislados de L. magellanicum⁹⁴: magellanina (57) y magellaninona (58).

El trabajo realizado en el problema estereoquímico planteado por (57) y su 14-15 dihidroderivado ha conducido a dos importantes conclusiones⁹⁴. Primero, paniculatina y magellanina pertenecen a la misma serie enantiomérica y segundo, el derivado 14,15 dihidromagellanina (59) es el epímero en C15 de paniculatinona (49).



Magellanina $R_1=OH$; $R_2=H$ (57) 14,15-dihidromagellanina (59)
 Magellaninona $R_1+R_2=O$ (58)

Conocida la estructura de paniculatina, se puede sugerir una interpretación racional de los experimentos de doble irradiación en RMNP. de paniculatina (figura 20, página 91).

Irradiación centrada tanto en 1.70 como a 1.22 p.p.m. provoca cambios en las constantes de acoplamiento en la señal asignada al protón geminal al grupo OH a 3.78 p.p.m. El valor de J que se "pierde" ($J=3\text{Hz}$) confirma la orientación ecuatorial del protón que resuena a 3.78 p.p.m. El

desplazamiento químico de los protones acoplados (1.70 y 1.22 p.p.m.) pueden ser interpretados asignando estas señales a protones no equivalentes del grupo metileno.

Por otro lado la irradiación a 1.70 p.p.m. provoca también un cambio en el doblete asignado a $\text{CH}_3\text{-CH}$, transformándolo en un singlete. Esto puede ser racionalizado aceptando que el protón geminal al metilo tiene desplazamiento químico muy similar a un protón del metileno C14 que resuena a 1.70 p.p.m. tal como se ilustra en la figura 90.

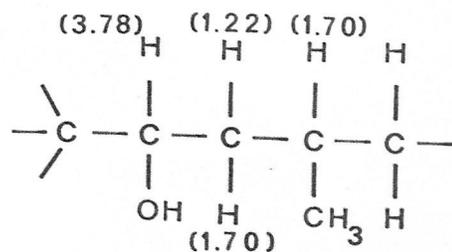


Figura 90. Interpretación de doble irradiación en RMNP de paniculatina.

El espectro de RMN^{13}C de paniculatina, por su parte, revela claramente la presencia de los grupos $\text{CH}_3\text{-C}$, $\text{CH}_3\text{-N}$, CHOH y CO , asignables a las señales 19.1⁽⁶⁰⁾, 46.7⁽¹²⁵⁾, 75.4⁽⁶¹⁾ y 220.8⁽¹²⁰⁾ p.p.m., respectivamente.

A la luz de la estructura de paniculatina es posible asignar tentativamente las restantes señales de tal espectro. Para este efecto se considera conveniente utilizar compuestos modelos. Son adecuados los compuestos 2,2,3,5-tetrametilciclohexanol para el anillo D, el 1,3,4-trimetilpiperidina para el anillo A, el 1,1,2,3,4-pentametilciclopentano para el anillo B y 2,3,3,4-tetrametilciclopentanona

para el anillo C.

Los desplazamientos químicos de los diferentes carbonos de 2,2,3,5-tetrametilciclohexanol y de 1,3,4-tetrametilpiperidina se han calculado desde los espectros descritos de 1,1-dimetilciclohexano⁶⁰ y de N-metilpiperidina¹²⁶ respectivamente, utilizando los parámetros de sustitución provocados por la introducción, en anillos de seis miembros, de un CH₃ axial (α 1.1, β 5.2 y γ -5.4 p.p.m.), un CH₃ ecuatorial (α 5.6, β 8.9 y γ 0 p.p.m.) señalados por Grant⁶⁰ y los efectos de sustitución debido a la introducción de un grupo OH axial (α 37.8, β 8 y γ -6.8 p.p.m.)⁽⁶¹⁾. El signo positivo indica una desprotección magnética.

En la tabla 7 se muestra el espectro calculado para 2,2,3,5,-tetrametilciclohexanol desde el 1,1-dimetilciclohexano. Se incluyen los carbonos de paniculatina correspondientes.

Tabla 7

RMN¹³C calculado para 2,2,3,5-tetrametilciclohexanol.

δ 1,1 dimetil ciclohexano ⁶⁰	Δ CH ₃ ax. C2	Δ CH ₃ ec. C4	Δ OH ax. C6	δ 2,2,3,5 - C de pa tetrametil ciclohexa- nol.	C de pa nicula- tina.
C1 29.8	5.2		8	43.0	C12
C2 39.7	1.1	0	-6.8	34.0	C7
C3 22.4	5.2	8.9		36.5	C8
C4 26.5	-5.4	5.6	-6.8	19.9	C15
C5 22.4		8.9	8	39.3	C14
C6 39.7	-5.4	0	37.8	72.1	C13

En la tabla 8 aparece el espectro calculado para 1, 3,4-trimetilpiperidina desde N-metilpiperidina

Tabla 8

RMN¹³C calculado para 1,3,4-trimetilpiperidina

	δ N-metil piperidina ¹²⁶	Δ CH ₃ ec C3	Δ CH ₃ ax C4	δ 1,3,4 tri metilpiperi- dina	C de panicu- latina.
C2	57.4	8.9	-5.4	60.9	C9
C3	26.7	5.6	5.2	37.5	C10
C4	22.7	8.9	1.1	32.7	C3
C5	26.7		5.2	31.9	C2
C6	57.4		-5.4	52.0	C1

En la tabla 9 se muestra los desplazamientos químicos calculados para los carbonos del 1,1,2,3,4-pentametilciclopentano a partir del espectro descrito de 1,1-dimetilciclopentano¹²⁷, y los parámetros de sustitución indicados para ciclopentanos^{127,128}, suponiendo orientación axial y ecuatorial de los metilos.

Tabla 9

RMN¹³C calculado para 1,1,2,3,4-pentametilciclopentano

	δ 1,1-dimetil ciclopentano	Δ CH ₃ ec C2	Δ CH ₃ ax C3	Δ CH ₃ ec C4	δ 1,1,2,3,4 pentametil ciclopenta- no.	C de pa- nicula- tina.
C1	38.9	9.2			48.1	C12
C2	41.1	9.1	7.5		57.7	C4
C3	24.7	9.2	9.1	9.2	52.2	C3
C4	24.7		7.5	9.1	41.3	C10
C5	41.1			9.2	50.3	C11

En la tabla 10 se muestra la resonancia de cada carbono de la ciclopentanona¹²⁰ y los valores calculados para 2,3,3,4-tetrametilciclopentanona utilizando los efectos indicados para ciclopentanos y suponiendo las orientaciones axiales y ecuatoriales de los metilos de acuerdo a la conformación del anillo C deducida por rayos X.

Tabla 10

RMN ¹³C calculado para 2,3,3,4-tetrametilciclopentanona

δ ciclopentanona	Δ CH ₃ C2 ^{ax}	Δ CH ₃ C3 ^{ax}	Δ CH ₃ C3 ^{ec}	Δ CH ₃ C4 ^{ec}	δ 2,3,3,4 tetrametilciclopentanona.	C de paniculatina.
C1 213.60	7.5				221.1	C5
C2 36.70	9.1	7.5	9.2		62.5	C4
C3 22.00	7.5	9.1	9.1	9.2	56.9	C12
C4 22.00		7.5	9.2	9.1	47.8	C7
C5 36.70				9.2	45.9	C6

La figura 91 muestra los valores calculados para los compuestos modelos utilizados.

La numeración de los mismos es la que corresponde a los carbonos de paniculatina.

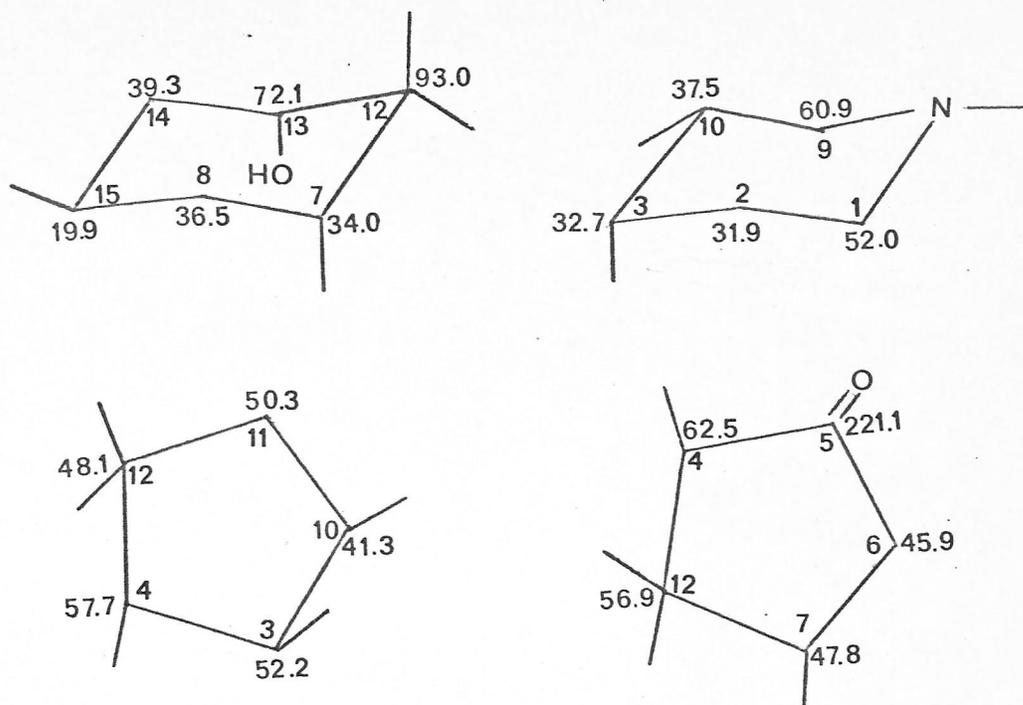


Figura 91. RMN¹³C calculados para compuestos modelos.

La asignación de las resonancias de cada carbono de paniculatina se hizo considerando que los desplazamientos químicos de los modelos son del orden de magnitud de los observados y en el caso de los carbonos que participan en la unión de anillos (C7, C12, C4, C3 y C10) se ha elegido aquel valor de resonancia calculado, que significa una menor diferencia con los valores experimentales.

En la tabla 11 y figura 92 se indican las asignaciones de RMN¹³C de paniculatina señalando el modelo utilizado en el cálculo de $\Delta_{\text{obs-calc}}$.

Tabla 11.

Asignaciones de RMN ^{13}C de paniculatina

	$\delta \text{ C}^{13}$ calc.	$\delta \text{ C}^{13}$ obs.	$\Delta(\text{obs.}-\text{calc.})$
C1	52.0 ^a	53.4	1.4
C2	31.9 ^a	32.3	0.4
C3	32.7 ^a	40.4	7.7
C4	57.7 ^b	58.5	0.8
C5	221.1 ^c	220.8	-0.3
C6	45.9 ^c	44.0	-1.9
C7	34.0 ^d	38.1	4.1
C8	36.5 ^d	39.5	3.0
C9	60.9 ^a	58.1	-2.8
C10	41.3 ^b	41.2	-0.1
C11		26.0 ^g	
C12	48.1 ^b	52.1	4.0
C13	72.1 ^d	75.4	3.3
C14	39.3 ^d	39.7	0.4
C15	19.9 ^d	22.4	2.5
C16		19.1 ^e	
C17		46.7 ^f	

a. calc. desde N-metilpiperidina.

b. calc. desde 1,1 dimetilciclopentano

c. calc. desde ciclopentanona

d. calc. desde 1,1 dimetilciclohexano

e. ref.60

f. ref. 125

g. esta asignación se hizo suponiendo una fuerte protección magnética, por cuanto el valor calculado ^b difiere en 24.3 p.p.m. del valor observado asignable.

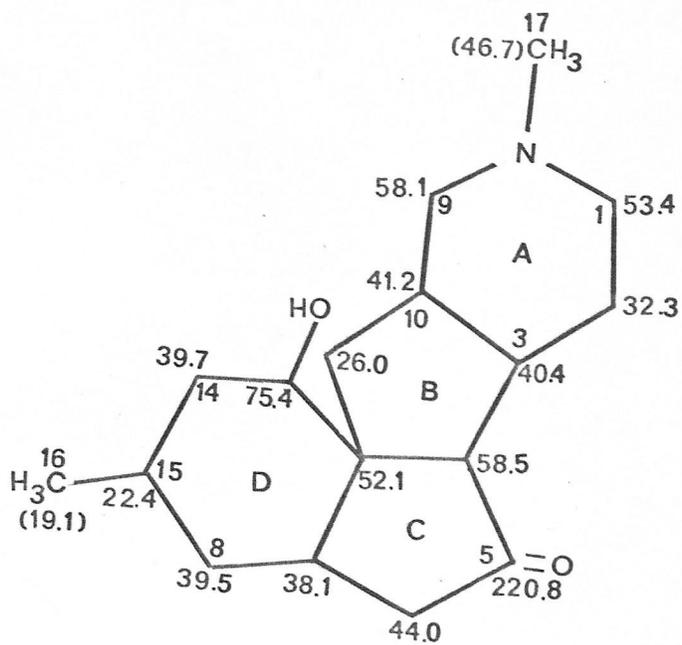


Figura 92. Asignaciones de RMN¹³C de paniculatina.

Conociendo la estructura de paniculatina es conveniente también, intentar una interpretación de los EM de la base natural y de sus derivados: 5-deoxopaniculatina (50), paniculatinona (49), 13-dehidro-5-deoxopaniculatina(51). Estos espectros se han reunido en la figura 93, página 185.

El EM de alta resolución de paniculatina mostró señales asignables a iones del tipo CHN, CHNO, CHNO₂ y CHO₂, tal como se indica en la tabla 12.

Tabla 12

Masa y composición de varios iones de paniculatina.

Masa obs.	Masa calc.	composición
58.0681	58.0656	C ₃ H ₈ N
71.0729	71.0734	C ₄ H ₉ N
96.0818	96.0813	C ₆ H ₁₀ N
110.0967	110.0969	C ₇ H ₁₂ N
180.1397	180.1388	C ₁₁ H ₁₈ NO
192.1162	192.1150	C ₁₂ H ₁₆ O ₂
192.1380	192.1388	C ₁₂ H ₁₈ NO
204.1409	204.1388	C ₁₃ H ₁₈ NO
206.1317	206.1307	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
206.1543	206.1545	C ₁₃ H ₂₀ NO
235.1580	235.1572	C ₁₄ H ₂₁ NO ₂
248.2019	248.2014	C ₁₆ H ₂₆ NO
262.1829	262.1805	C ₁₆ H ₂₄ NO ₂
277.2041	277.2042	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂

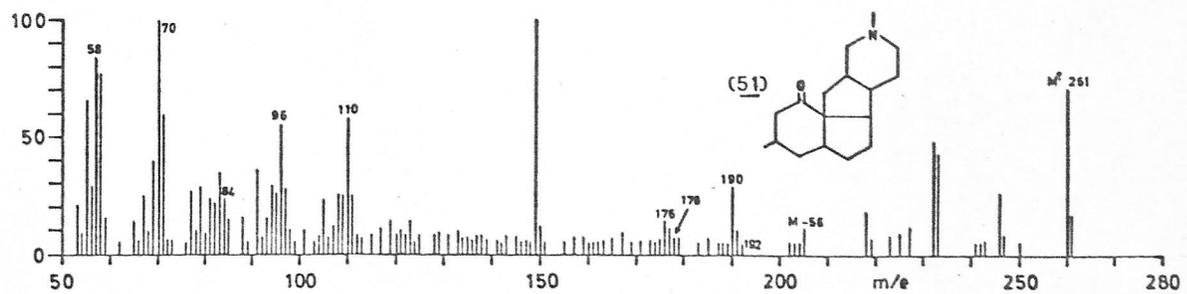
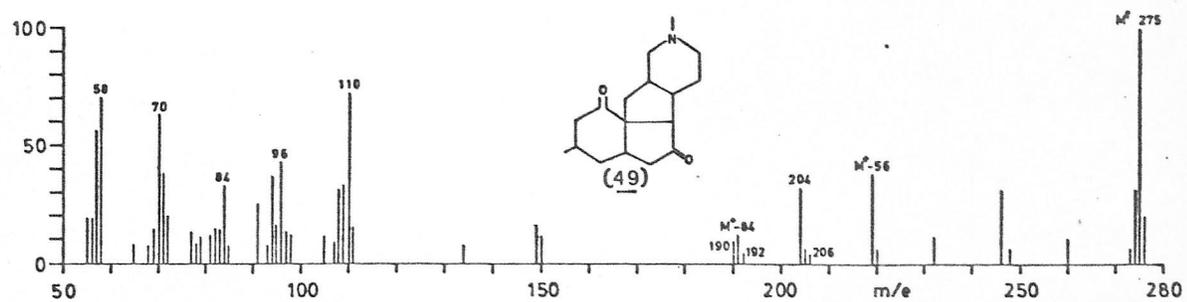
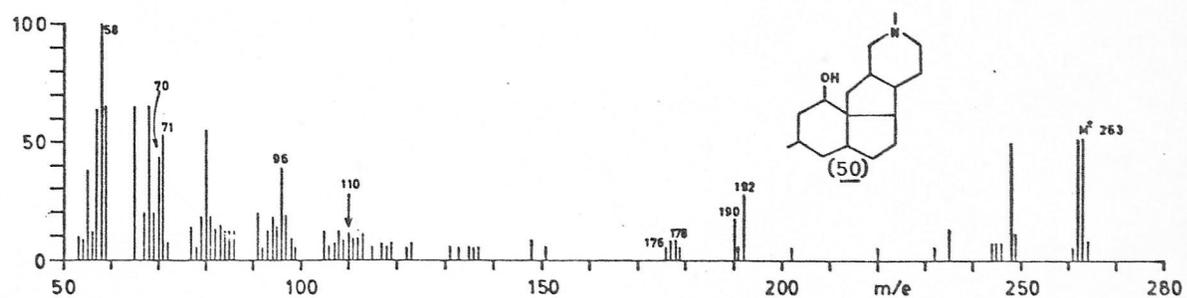
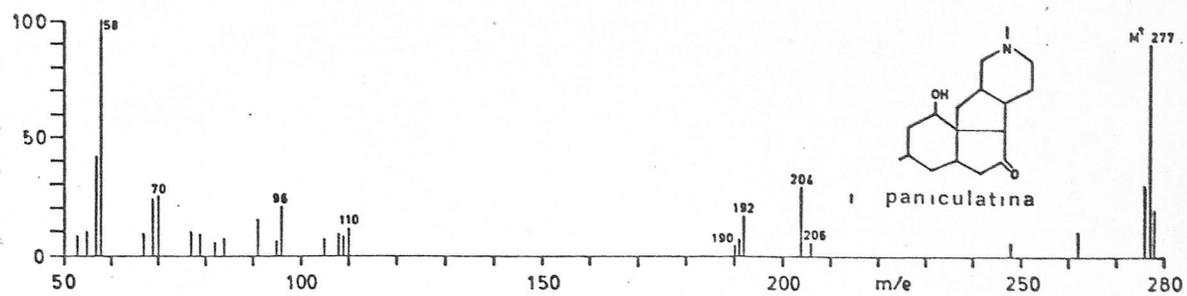


Figura 93. EM de paniculatina y derivados.

Algunos rasgos que pueden tener carácter diagnóstico interesante de anotar corresponden a:

1. La gran intensidad relativa de la señal del ión molecular

	m/e	%	
paniculatina	277	90	
5-deoxopaniculatina	263	52	
paniculatinona	275	100	
13-dehidro-5-deoxo-paniculatina	261	71	y

2. La gran intensidad relativa de señales que corresponden a iones de masas bajas y de composición del tipo CHN.

	m/e 58	m/e 70	m/e 96	m/e 110
paniculatina	100	24	21	11
5-deoxopaniculatina	100	44	39	25
paniculatinona	70	63	43	72
13-dehidro-5-deoxo-paniculatina	77	100	55	58

Estas señales se deben asociar a la presencia del sistema N-metilpiperidina sustituido¹²¹ en el esqueleto de estos alcaloides.

Estas señales, que no aparecen en los EM de otros alcaloides de Lycopodium adquieren un valor diagnóstico pues caracterizan el esqueleto de paniculatina.

Esquemas de fragmentación plausible del ión molecular de paniculatina y derivados se muestra en las figuras 94, 95 y 96.

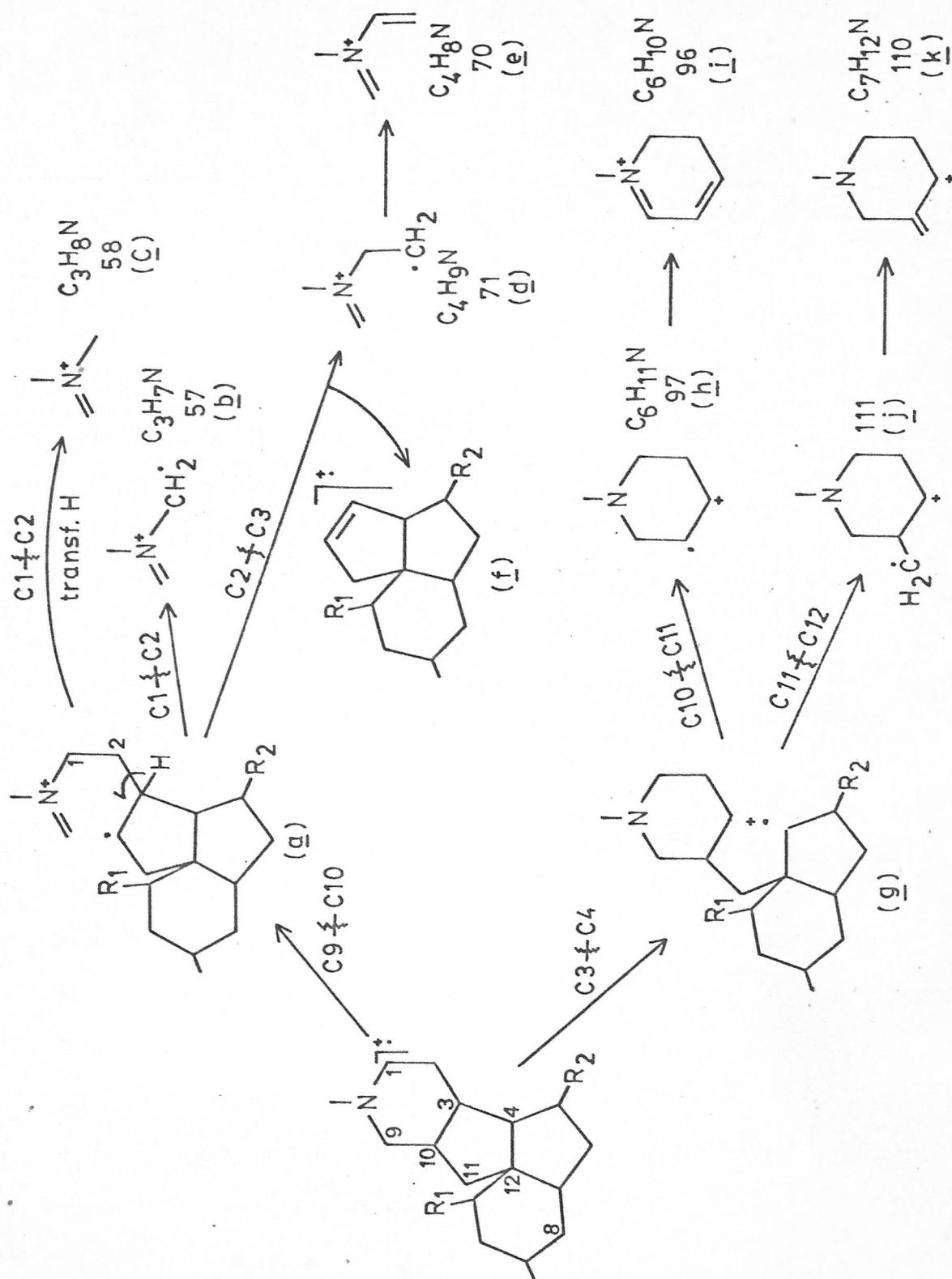


Figura 94. Mecanismo de fragmentación para iones de masas bajas.

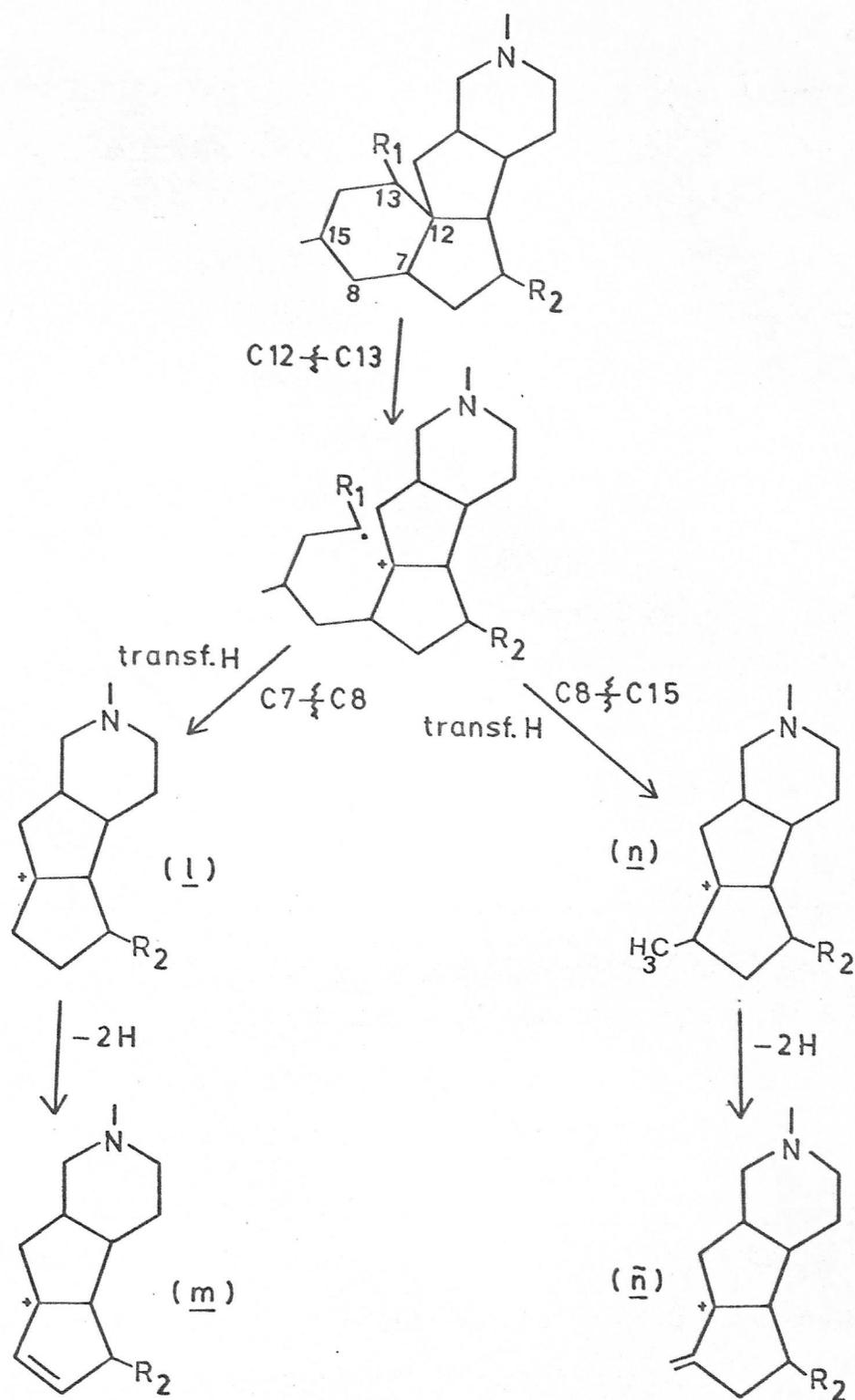


Figura 95. Mecanismo de fragmentación para iones del tipo CHN de masas altas.

Una ruta de fragmentación puede comenzar con una ruptura del enlace C9-C10 produciendo el ión a. Una ruptura del enlace C1-C2 puede dar directamente el ión b (m/e 57) o el ión c (m/e 58) con transferencia de hidrógeno. Una ruptura del enlace C2-C3 puede proporcionar el ión d (m/e 71) y éste el ión e (m/e 70) o bien el ión f si la carga es retenida en el fragmento sin nitrógeno.

Otra secuencia puede iniciarse con una ruptura del enlace C3-C4 generando el ión g, desde éste se puede justificar los iones h e i por ruptura del enlace C10-C11 y los iones j y k por ruptura del enlace C11-C12.

Los iones de masas altas que contienen nitrógeno pueden racionalizarse (figura 95) como derivados desde el ión molecular por ruptura del enlace C12-C13 y posteriores rupturas de los enlaces C8-C15 o C7-C8. Las masas de los iones l, m, n y ñ, que dependen de la naturaleza de los sustituyentes en C5 y C13, se muestran en la tabla 13.

Tabla 13

Masa de algunos iones de paniculatina y derivados

Compuesto	M ⁺	<u>l</u>	<u>m</u>	<u>n</u>	<u>ñ</u>
paniculatina R ₁ =OH, R ₂ =O	277	192	190	206	204
5-deoxopaniculatina R ₁ =OH, R ₂ =H ₂	263	178	176	192	190
paniculatinona R ₁ =R ₂ =O	275	192	190	206	204
dehidrodeoxopaniculatina R ₁ =O, R ₂ =H ₂	261	178	176	192	190

En la figura 96 se muestra un mecanismo de fragmentación probable del ion molecular de 13-dehidroderivados de paniculatina.

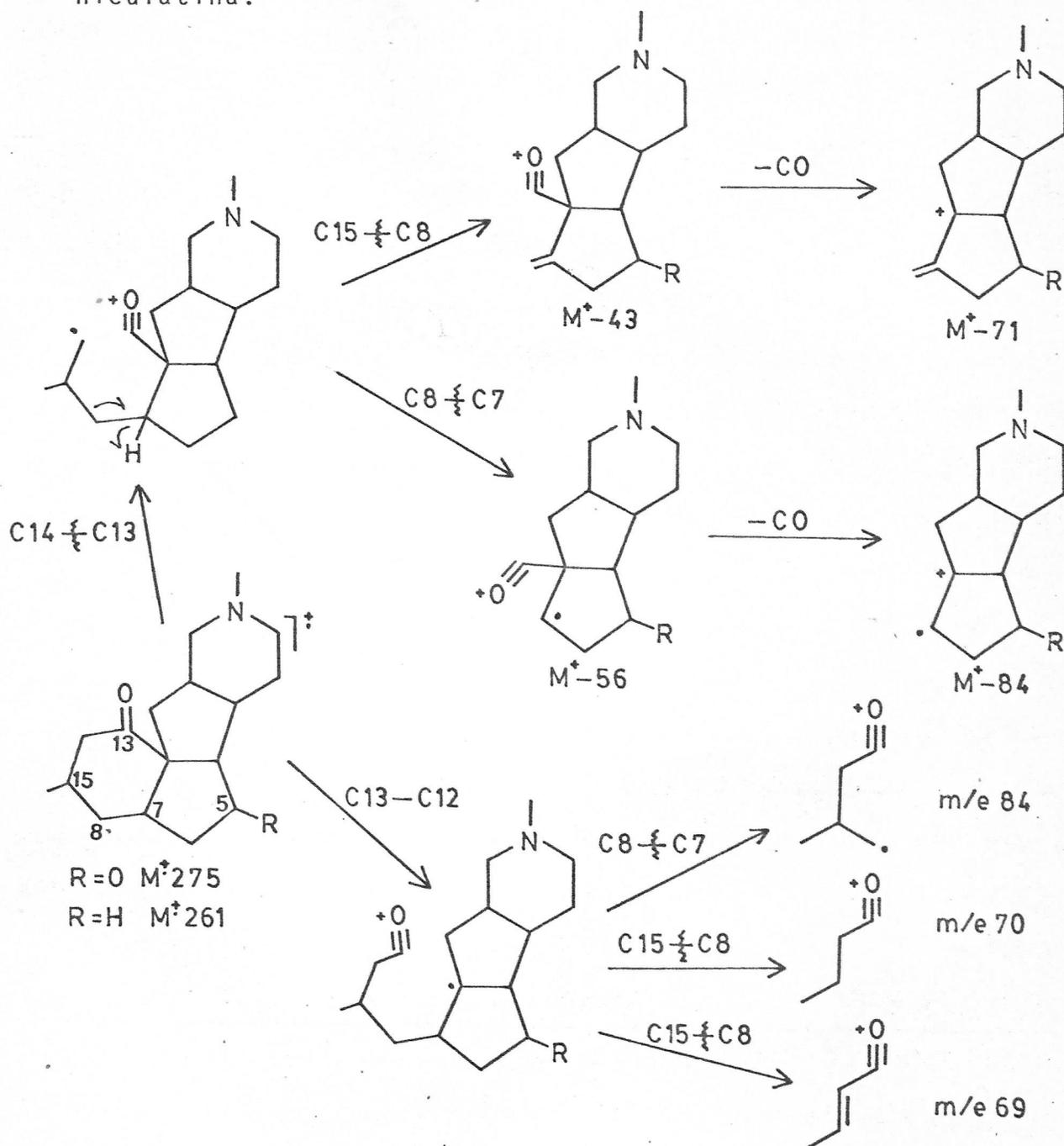


Figura 96. Mecanismos de fragmentación de 13-dehidroderivados de paniculatina.

Finalmente, dado que el esqueleto de paniculatina constituye un nuevo sistema de anillos entre los alcaloides de Lycopodium, es bueno intentar una relación formal con otros alcaloides del género. La figura 97 pretende mostrar las probables relaciones estructurales a través de una secuencia biogenética desde licopodina (1)

Aunque no se han realizado estudios biosintéticos de paniculatina, la postulación de un intermediario del tipo de A es necesario para justificar el cambio de la configuración de C4.

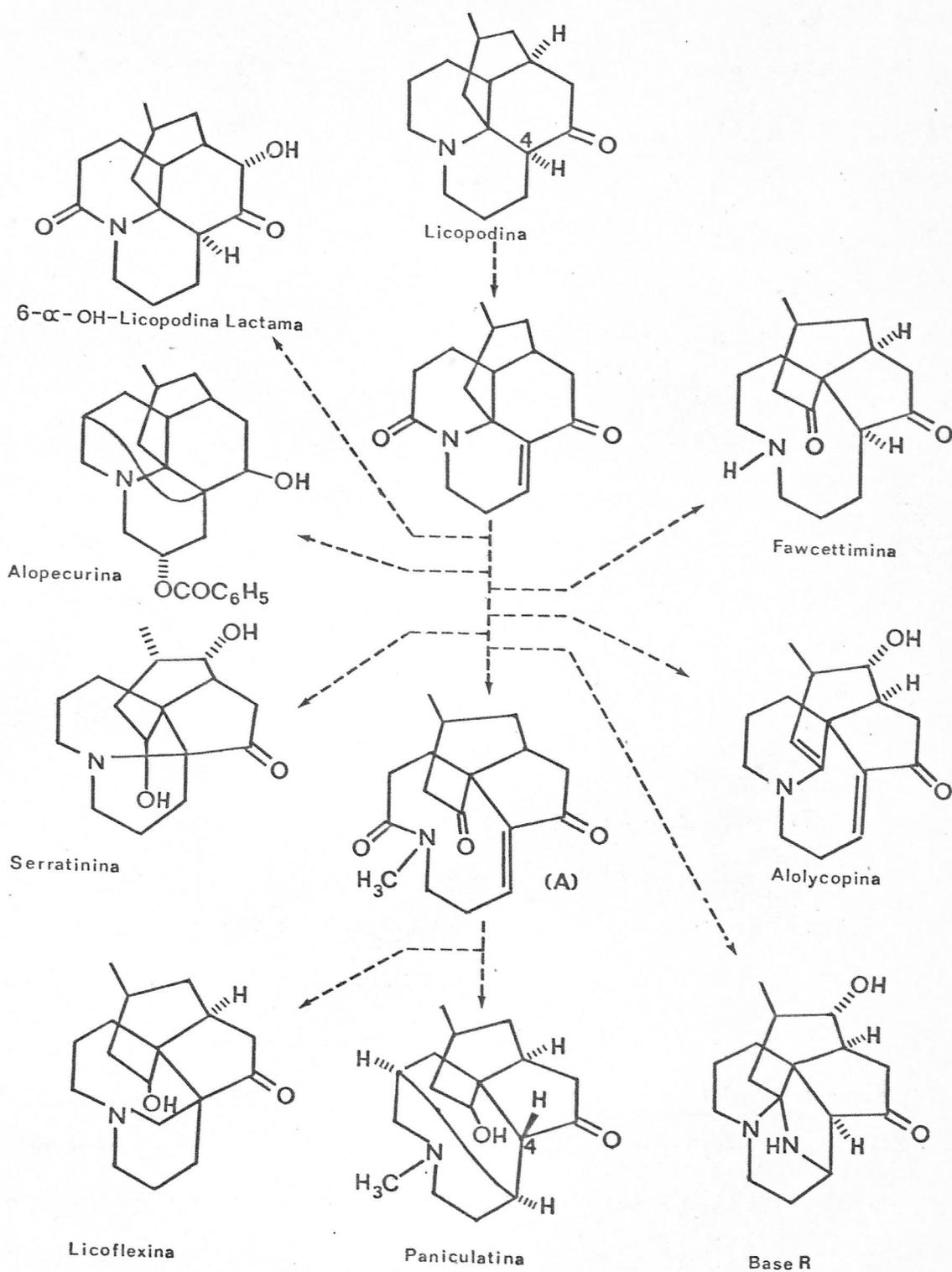


Figura 97. Relaciones estructurales de paniculatina y otros alcaloides de Lycopodium.

3.2. ESTRUCTURA DE PANICULINA Y DERIVADOS NATURALES (DESACETILPANICULINA Y ANHIDRODESACETILPANICULINA).

Paniculina cristaliza deficientemente en acetona (o acetona-éter etílico). El producto cristalino funde a 65°C-66°C. El hidrobromuro funde a 247-249°C.

3.2.1. Definición funcional.

El espectro de masas de alta resolución del alcaloide determinó la fórmula $C_{18}H_{29}NO_3$ (M^+ 307).

El IR de paniculina registrado en KBr (figura 38, página 112) mostró una banda anormalmente ancha en la zona de frecuencia de absorción típica de grupos hidroxilos y por lo menos tres bandas entre $1.710-1.730\text{ cm}^{-1}$. Esta conducta, causada tal vez por algún tipo de interacciones intermoleculares o por diferencias cristalinas, no es observada cuando el IR se registra en nujol o en solución. El espectro del hidrobromuro en KBr no presenta las anomalías indicadas.

El IR en CCl_4 (o en $CHCl_3$) presenta una banda centrada a 3.640 cm^{-1} (o a 3.620 cm^{-1}). independiente de la concentración, indicativa de la existencia de un grupo OH no enlazado y una sola banda de carbonilo a 1.736 cm^{-1} . En el IR del hidrobromuro (figura 39, página 112) estas absorciones aparecen como una banda bien definida a 3.250 y a 1.740 cm^{-1} que conjuntamente con un doblete a 1.240 cm^{-1} sugiere fuertemente la presencia de un grupo O-acetil en la estructura de paniculina.

Por su parte, el espectro RMNP del alcaloide (figura 40, página 113) permite asegurar la presencia del grupo $\text{CH}_3\text{-CH}$ debido al doblete a 0.94 p.p.m. ($d, J=6\text{Hz}$) y de un sustituyente O-Acetil asignado en virtud de la señal a 2.04 p.p.m. ($s, 3\text{H}$). La señal a 5.11 p.p.m. ($t, J=6\text{Hz}, 1\text{H}$) sugiere la presencia de un átomo de hidrógeno geminal al grupo O-Acetil definiendo entonces, la naturaleza secundaria de tal sustituyente.

El tercer átomo de oxígeno de la molécula de paniculina debe ser parte del grupo OH ya señalado; no obstante, la definición de la naturaleza de este sustituyente provocó algunas dificultades de interpretación.

En RMNP de 60 MHz (figura 42, página 115) aparece un multiplete centrado a 3.7 p.p.m. que integra para 1-2 átomos de hidrógeno que, debido fundamentalmente al desplazamiento químico, se asignó provisoriamente a un hidrógeno geminal al grupo OH⁽⁹⁶⁾. En el espectro de 100 MHz (figura 41, página 114), la misma señal aparece como multiplete centrado a 3.7 p.p.m. a $1/2$ 14 Hz. En el espectro a 220 MHz, aparece una señal sexteto a 3.96 p.p.m. que integra para un protón y cuyas constantes de acoplamiento corresponden a 11 y 4 Hz, una señal sexteto a 3.49 p.p.m. que también integra para un hidrógeno con $J=15$ y 3Hz además de señales a 3.04 p.p.m. ($t, J=11\text{Hz}$) y a 2.90 p.p.m. ($\text{cuart. } J=12$ y 4Hz).

Esto quiere decir que entre 3.1 y 4.0 p.p.m. hay señales que corresponden a 2 protones. Probablemente estas

señales deben ser asignadas a átomos de hidrógeno unidos a carbonos α a nitrógeno, aunque por lo menos una de ellas, por su desplazamiento químico, podría ser asignada a hidrógeno geminal al grupo OH.

Nuevos argumentos aparecen cuando se analizan algunas propiedades espectroscópicas y químicas de los derivados de paniculina.

Cuando paniculina fue tratada con trióxido de cromo en varias condiciones se recuperó casi cuantitativamente, el alcaloide sin sufrir cambios. Luego, entonces, paniculina es inerte a la oxidación.

El producto de hidrólisis alcalina, que es idéntico a desacetilpaniculina, también proporciona información adicional: su espectro de masas (figura 46, página 117) muestra una señal correspondiente al ión-molecular a m/e 265, indicando que la hidrólisis significa pérdida de 42 unidades de masa, pérdida característica de la hidrólisis de acetatos. El IR (figura 44, página 116) mostró una banda polimérica de OH centrada entre $3.300-3.050\text{ cm}^{-1}$. Mientras que en nujol aparecen dos bandas a 3.350 y 3.100 cm^{-1} . En cloroformo éstas aparecen a 3.620 y 3.580 cm^{-1} , respectivamente, indicando la presencia de dos grupos OH. El RMNP (figura 45, página 116) muestra una señal multiplete centrada a 3.8 que integra aproximadamente para dos protones; entre 3.0 p.p.m. y 4.0 p.p.m. hay señales que integran para tres átomos de hidrógeno en total. Cuando se oxidó desacetilpaniculina

se obtuvo un compuesto cuyas características espectroscópicas sugieren que es una hidroxiketona, dehidrodesacetilpaniculina. Así, por ejemplo, su EM (figura 49, página 119) muestra una señal molecular a m/e 263 indicando que la oxidación del diol implica la oxidación de un grupo OH secundario.

El IR (figura 47, página 118) muestra bandas importantes a $3.400 - 3.100 \text{ cm}^{-1}$ asociables al grupo OH retenido (no oxidado), a 1.700 cm^{-1} una banda asignable a carbonilo cetónico de ciclohexanona y a 1.420 cm^{-1} una banda que sugiere la presencia de a lo menos un grupo metileno α al carbonilo¹¹²⁻¹¹³. El RMNP de la hidroxiketona (figura 48, página 118) muestra señales atribuibles a dos protones entre 3.0 y 4.0 p.p.m. y justamente a 3.8 p.p.m. aparece una señal para un átomo de hidrógeno. Lo que implica que por efecto de la oxidación se "perdió" un átomo de hidrógeno que resuena a 3.8 p.p.m. en desacetilpaniculina. La inercia de paniculina a la oxidación y la oxidación selectiva de un solo grupo OH en desacetilpaniculina permite asignar la señal 3.7-3.8 p.p.m. en RMNP de este diol a la presencia de dos átomos de hidrógeno: uno de los cuales es geminal al grupo OH (en consecuencia geminal al O-Acetil de paniculina) y que desaparece con la oxidación; el otro átomo de hidrógeno no está unido al carbono que soporta el grupo OH restante. Esto es, desacetilpaniculina posee en su estructura un

grupo OH secundario y un grupo OH terciario y en consecuencia paniculina posee en su molécula un grupo CH_3COO secundario y un grupo OH terciario.

Un argumento que favorece la postulación la proporción a la reactividad química de anhidrodesacetilpaniculina, alcaloide que es idéntico al producto de deshidratación de desacetilpaniculina (vide infra). Las propiedades espectroscópicas de anhidrodesacetilpaniculina (IR figura 54, página 123 RMNP figura 55, página 123 y EM figura 56, página 124) indican que su molécula posee un grupo OH alcohólico y un enlace doble trisustituído. Anhidrodesacetilpaniculina no se oxida bajo diferentes condiciones (página 111) lo que lleva a pensar en que el grupo OH es de naturaleza terciaria.

Tratando de probar esta posibilidad se realizó una acetilación de paniculina. Junto a paniculina que no reaccionó, se obtuvo un producto cristalino que mostró ser el derivado acetilado y cuyas propiedades confirman esta asignación.

El EM de acetilpaniculina muestra una señal molecular a m/e 349 (figura 53, página 122), indicando la incorporación de 42 unidades de masas, típicas de la acetilación de un grupo OH. El IR de acetilpaniculina (figura 51, página 121) no muestra banda de OH pero sí una banda a 1.730 cm^{-1} bastante intensa. Por su parte el RMNP del derivado (figura 52, página 121) muestra una señal a 2.0 p.p.m. (s,6H) indicando la existencia de dos grupos O-Acetil y una señal a 5.11 p.p.m.

que integra para un átomo de hidrógeno: el geminal a un O-Acetil. La ausencia de una señal asignable a un hidrógeno geminal al segundo grupo acetato parece confirmar la naturaleza terciaria del grupo OH en el alcaloide paniculina. La razón de la esterificación de este grupo OH terciario, cuando genera acetilpaniculina, podría ser de naturaleza estérica, en orden a que este grupo OH debería estar lo suficientemente desprotegido como para que sea esterificado fácilmente.

La naturaleza del átomo de nitrógeno debe ser terciaria dado las frecuencias de absorción de las bandas típicas del grupo $-N^+-H$ en la región $2.700-2.500\text{ cm}^{-1}$ en el espectro IR del hidrobromuro de paniculina. Así entonces la ausencia de señales espectroscópicas asignables a enlaces dobles o a átomos de hidrógeno olefínicos hace pensar que la molécula de paniculina debe ser tetracíclica.

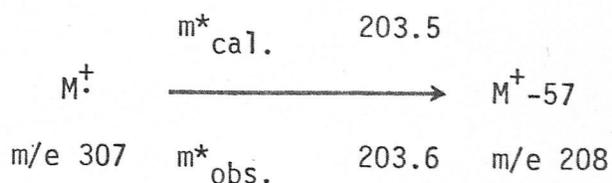
3.2.2. Definición del esqueleto carbonado.

El análisis de EM de paniculina y derivados (figura 102, página 212) muestra la existencia de señales que se pueden asociar a la fragmentación típica de alcaloides que estructuralmente pertenecen a la familia de licopodina⁵¹. El sistema de anillos presente en el esqueleto de licopodina que no lleva sustituyentes en el anillo puente D ni en el carbono 12 permite racionalizar los EM de paniculina y derivados, fundamentalmente por las siguientes razones:

1. La apariencia general del EM es característica.

2. Existe la señal molecular de una intensidad relativamente baja.
3. Existe la señal diagnóstica de $M^+ - 43$
4. La presencia de señal a $M^+ - 57$ muy intensa. En EM de paniculina (m/e 250, 100%), desacetilpaniculina (m/e 208, 100%), dehidrodesacetilpaniculina (m/e 206, 100%) y acetilpaniculina (m/e 292, 3%).

La última señal, pérdida de 57 unidades desde el ión molecular, es muy sugerente en la decisión del esqueleto carbonado de paniculina (página 11). Por otra parte los EM de alcaloides tipo licopodina y también en el EM de paniculina aparece una señal metaestable que se puede asociar a la fragmentación:



En consecuencia podemos pensar que una buena estructura parcial para el alcaloide paniculina se muestra en la figura 98.

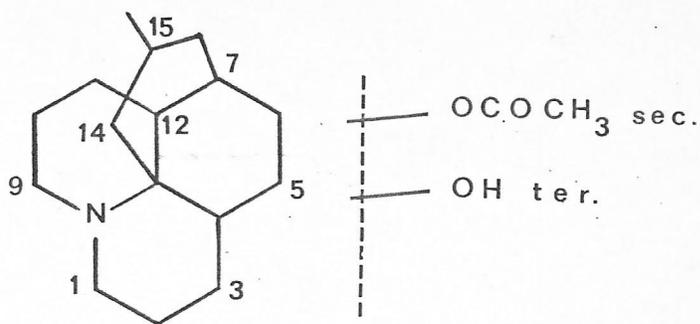


Figura 98. Estructura parcial de paniculina.

La ubicación funcional en este esqueleto carbonado se alcanzó considerando los siguientes argumentos:

1. Los grupos funcionales no pueden estar ubicados en los carbonos C12, C13, C14, C15 ni C16, porque estos carbonos forman parte de la unidad C_4H_9 que justifica la señal base a $M^+ - 57$ observada en EM de paniculina y derivados. La sustitución en C15 se desecha, adicionalmente, por la presencia del doblete a 0.9 p.p.m. en el RMNP.
2. No ha sido descrito ningún alcaloide de Lycopodium que no lleve, o muestre, un "resto" estructural de sustitución oxigenada o nitrogenada en el C5⁽⁵⁻⁷⁾.

Según esta razón biogénética es probable que un sustituyente esté en el citado C5.

3. El UV de dehidrodesacetilpaniculina es indicador que este derivado pertenece al grupo de licopodina con un carbonilo en C5, con idéntica estereoquímica en el C12 y en el átomo de nitrógeno, esto en razón a la existencia de una banda de absorción a 220 nm. ϵ 900 en su espectro ^{48,56.}

4. La presencia de una banda a 1.420 cm^{-1} en el IR de dehidrodesacetilpaniculina sugiere la presencia de un metileno vecino al grupo carbonilo en C5⁽¹¹²⁻¹¹³⁾.
5. La curva de dispersión óptica rotatoria de dehidrodesacetilpaniculina muestra un efecto Cotton positivo, similar al de licopodina y característico de alcaloides de éste tipo con carbonilo en C5^(48,65).

Estas consideraciones sugiere la ubicación del grupo OH secundario en desacetilpaniculina y en consecuencia la del grupo acetato en paniculina en el carbono 5 del esqueleto de licopodina.

La naturaleza axial del grupo O-acetil en paniculina se deduce de los siguientes antecedentes:

1. Cuando desacetilpaniculina se trata con SOCl_2 a temperatura ambiente se obtiene un producto de deshidratación, cuyas propiedades concuerdan totalmente con el alcaloide aislado en este trabajo denominado anhidrodesacetilpaniculina.

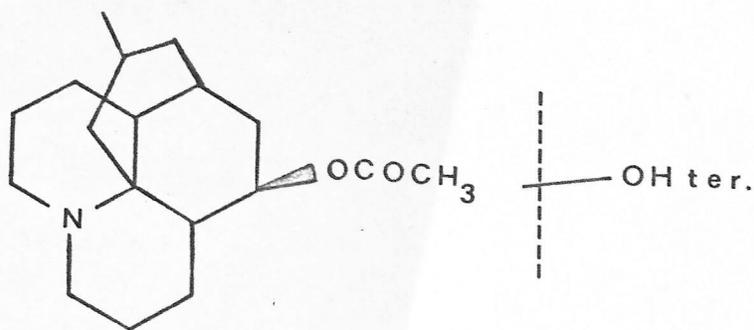
La gran facilidad de deshidratación del diol está de acuerdo con los resultados publicados para un número importante de alcaloides con un grupo OH axial en carbono 5^(16,69,70).

Esta deshidratación exige la presencia del grupo OH y de un átomo H α trans-diaxialmente orientados, situación que ha sido observada para β -dihidrolicopodina y que no se da para α -dihidrolicopodina⁶⁹.

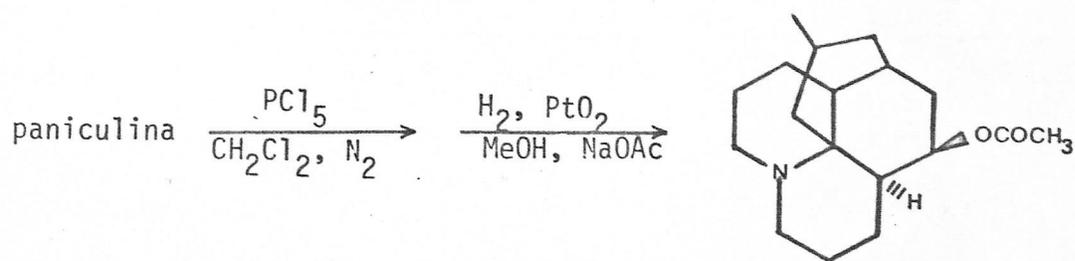
2. El alcaloide anhidrodesacetilpaniculina es resistente a la reducción catalítica. Esta situación ha sido evidenciada para un enlace doble entre los carbonos C4 y C5 en el esqueleto de licopodina. Así; anhidrodihidrolicopodina y anhidrodihidrolicodolina son totalmente inertes a la hidrogenación catalítica⁴⁷. Usando modelos se ve que, por razones estéricas, es muy improbable que moléculas que poseen tal enlace doble sean hidrogenadas.
Enlaces dobles entre C11 y C12 han sido fácilmente reducidos^{48,129}.
3. En el RMNP de anhidrodesacetilpaniculina (figura 55, página 123) aparece una señal asignable a un átomo de hidrógeno olefínico; esto implica que la deshidratación de desacetilpaniculina utiliza el átomo de hidrógeno de C4 y no de C6.
4. En el IR de paniculina (figura 38 y 39 página 112) aparece una banda doblete a 1.250 cm^{-1} . Esta absorción también se puede asociar al hecho que el grupo O-acetilo debe ser axial por los antecedentes reportados en la literatura⁷⁰.
5. El desplazamiento químico y la multiplicidad de la señal asignada al protón geminal al O-acetilo en RMNP de paniculina (figuras 40, 41 y 42, página 113) es muy similar a la observada en acetildihidrolicopodina⁹⁶.
6. Las experiencias de doble irradiación en dicha señal aseguran que tal átomo de hidrógeno geminal en paniculina

está acoplado a dos protones que resuenan a 1.41 y 1.78 p.p.m. La magnitud de la constante de acoplamiento (6Hz) es indicativo de una interacción del tipo ecuatorial-axial, asegurando así la naturaleza axial del grupo O-acetil. Una discusión más detallada se hará más adelante.

El alcaloide paniculina debe ser entonces β -acetildihidrolicopodina hidroxilada.



Esta idea fue comprobada experimentalmente al obtener acetildihidrolicopodina (idéntica a una muestra auténtica en todas sus características) desde paniculina por sustitución del grupo alcohólico por un átomo de cloro y luego hidrogenólisis del haluro sin aislación de éste ¹³⁰⁻¹³². La siguiente secuencia ilustra el procedimiento seguido.



Este resultado asegura la estructura y estereoquímica de paniculina restando solamente la ubicación del grupo OH terciario.

En un primer intento por realizar esta conversión usando SOCl_2 como halogenante no fue posible aislar acetildihidrolicopodina, debido a que la mezcla de la reacción mostró otros cuatro productos, aunque por c.g. y c.c.f. fue detectado un componente que mostró idéntica conducta que acetildihidrolicopodina patrón.

La ubicación del grupo hidróxilo terciario en C7 de esta estructura se alcanzó considerando los hechos siguientes:

1. Se deben descartar totalmente las posiciones C12, C4 por las razones dadas anteriormente y porque la comparación directa de dehidrodesacetilpaniculina con licodolina y flabelliformina mostró que las tres bases son diferentes. Licodolina⁴⁷ y flabelliformina⁴⁶ corresponden a 12-hidroxicopodina y 4-hidroxicopodina, (las muestras analíticas fueron proporcionadas por W.A. Ayer).
2. Con ocasión de la resolución de la estructura de serratinina¹³⁰ Inubushi preparó, entre otros, un derivado cuyo p.f., IR y EM son bastante coincidentes con los de desacetilpaniculina. Una comparación de los IR se muestra en figura 99, página 205. No ha sido posible una comparación directa.
3. Como se dijo, así como licopodina, dehidrodesacetilpaniculina

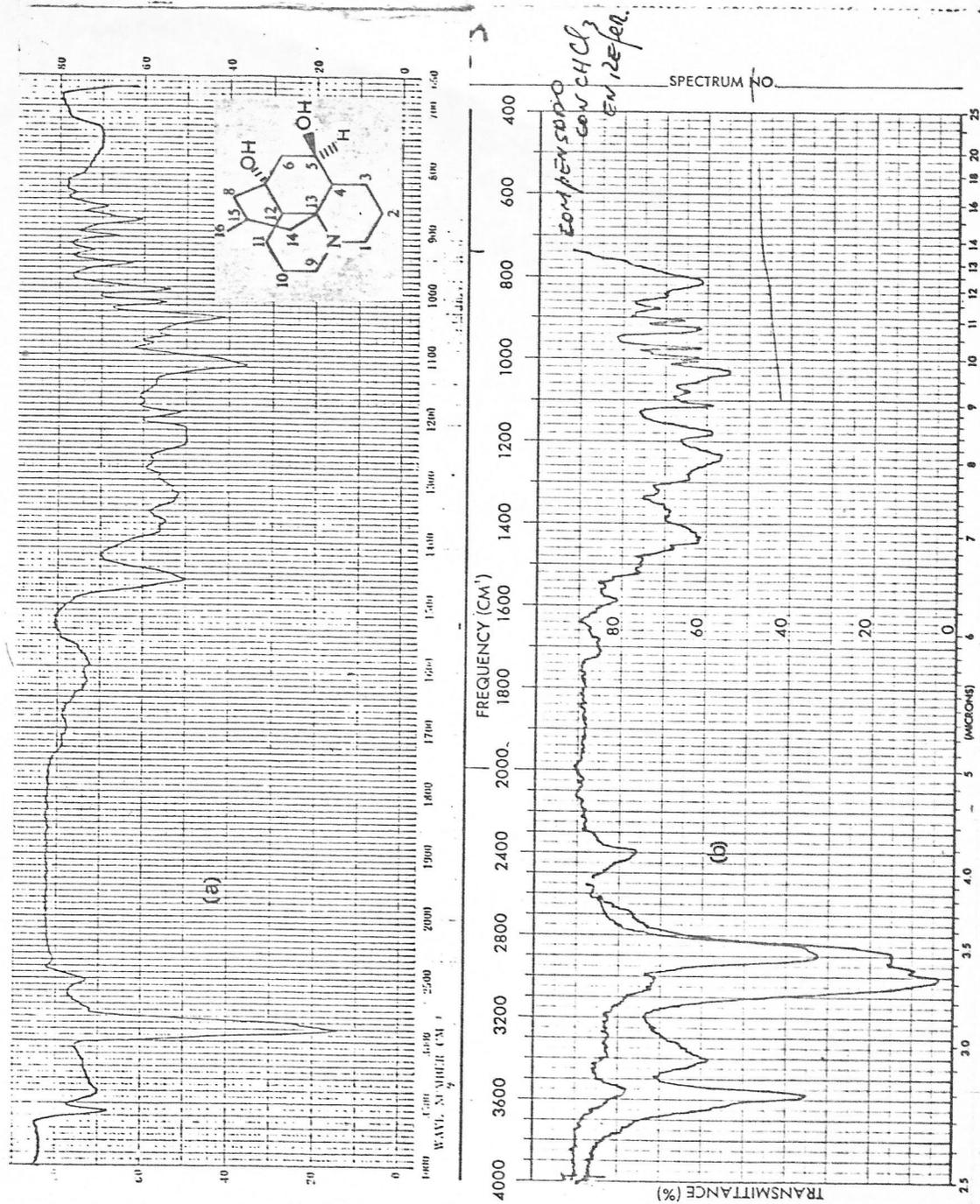


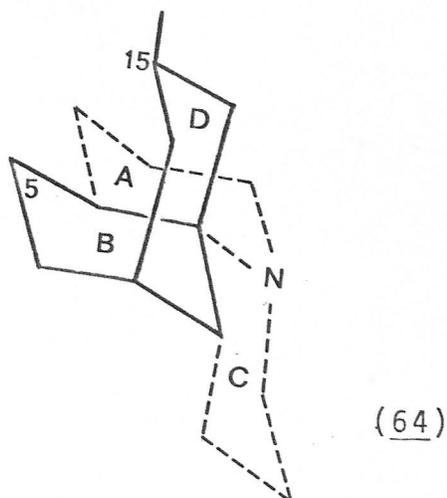
Figura 99. a. IR de dihidro A130 y b. IR de desacetilpaniculina.

muestra un efecto Cotton positivo en DOR con un máximo a 312 nm (+2.498) y un mínimo a 270 nm (-3.944) de $a=+66.6$ (figura 100, página 207). Este hecho implica que, dado que dehidrodesacetilpaniculina pertenece a la misma serie enantiomérica de licopodina, la diferencia en la amplitud del efecto Cotton se puede atribuir al efecto del grupo OH extra.

La disminución en la amplitud del efecto Cotton observada para dehidrodesacetilpaniculina ($a=+66.6$) en relación a licopodina ($a=+170.0$) se puede explicar aplicando la regla de octantes de Djerassi⁸²⁻⁸⁷, suponiendo que el anillo de la ciclohexanona posee el grupo OH ubicado en un octante de influencia negativa. La ubicación del grupo OH en C7 significaría una contribución negativa al efecto Cotton como se muestra en el diagrama de octantes de la figura 100.

Debido al pequeño efecto del grupo OH⁸⁴, nosotros pensamos que éste no sería capaz de invertir el signo del efecto Cotton con relación a licopodina, sino solamente disminuiría la amplitud del efecto Cotton positivo.

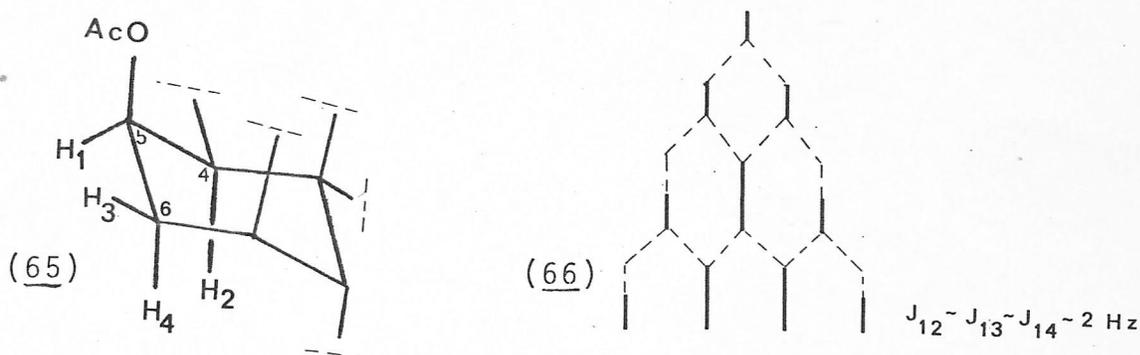
sistema bicíclico [3,3,1] nonano¹³¹ que forman los anillos B y D del esqueleto de licopodano (64) se debe traducir en una distorsión de ambos anillos desde una conformación de silla perfecta hacia una de "media silla". Esta distorsión que ha sido verificada en tales sistemas en estado gaseoso¹³¹ se debe hacer todavía más importante en solución.



Si se añade a esta situación la presencia de un sustituyente axial en C5, un acetato como en paniculina por ejemplo, las interacciones de la función oxigenada y el C15 debe ser de tal severidad que necesariamente debe ocurrir una mayor distorsión de los anillos B y D. Usando modelos Dreiding, se estima que la distancia internuclear entre el átomo de oxígeno del éster unido a C5 y el C15 debe ser aproximadamente de 1 Å, mientras que la suma de los radios de Van der Waals es aproximadamente de 2.6 Å⁽¹⁶⁾. Tal interacción debe ser minimizada con una distorsión de las conformaciones de sillas perfectas hacia una menos constreñida, una media silla por ejemplo.

Este aplanamiento de los anillos B y D se debe reflejar en los espectros de resonancia magnética nuclear protónica.

En conformación de silla perfecta el átomo de hidrógeno ecuatorial (H_1) en C5 (65) debe aparecer en RMNP como un cuarteto de $J=2\text{Hz}$ aproximadamente como se muestra en (66).

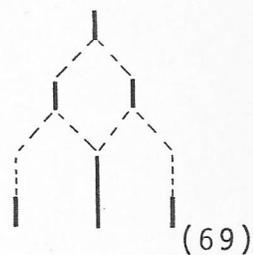
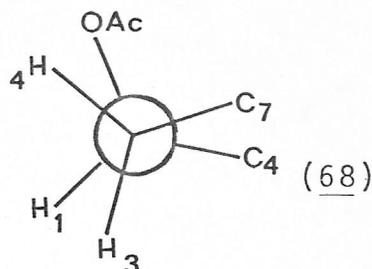
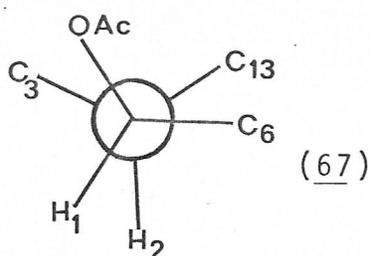


Los acoplamientos H_1H_2 , H_1H_3 y H_1H_4 deben ser de la misma magnitud y del orden de 2Hz, valor típico para acoplamientos de protones vecinos que forman un ángulo dihédrico de 60° (132).

El cambio en la conformación, debido a la distorsión del anillo B, trae como consecuencia una alteración en la magnitud de los ángulos dihédricos $H_1-C_5-C_4-H_2$ y $H_1-C_5-C_6-H_4$ de 60° en una silla normal a alrededor de 30° , mientras que el ángulo dihédrico $H_1-C_5-C_6-H_3$ debe llegar a ser del orden de 90° . La magnitud de las constantes de acoplamiento calculadas desde la ecuación de Karplus¹³², resultan de 6 y 0 Hz para ángulos dihédricos de 30° y 90° , respectivamente.

Esto significa que al observar constantes de $J=6\text{Hz}$

para la señal correspondiente a C₅-H, existe una distorsión en el anillo B tal que los ángulos dihédricos se acercan a los valores señalados, vale decir, 30 y 90° respectivamente, tal como se ilustra en las proyecciones (67) y (68).



El análisis (69) permite explicar la multiplicidad y el valor de J de la señal a 5.11 p.p.m. de RMNP de paniculina y al mismo tiempo asignar tentativamente las señales a 1.78 y a 1.41 p.p.m. a los protones axiales de C4 y C6. Las señales a 3.96 (J=11,11 y 5Hz) y a 3.49 (J=15,15 y 3Hz) de RMNP de paniculina (figura 40, página 113) se discuten en la página junto al análisis de señales similares del RMNP de desacetillicoclavina.

Los EM de paniculina y bases relacionadas (figura 102, página 212), pueden ser racionalizados, según los resultados informados por MacLean (página 11), del mismo modo que los EM de alcaloidestipo licopodina sin sustituyentes ni en el anillo D ni en C12.

El comienzo de la secuencia se produce con una ruptura de un enlace β al átomo de nitrógeno del sistema ciclohexilamina

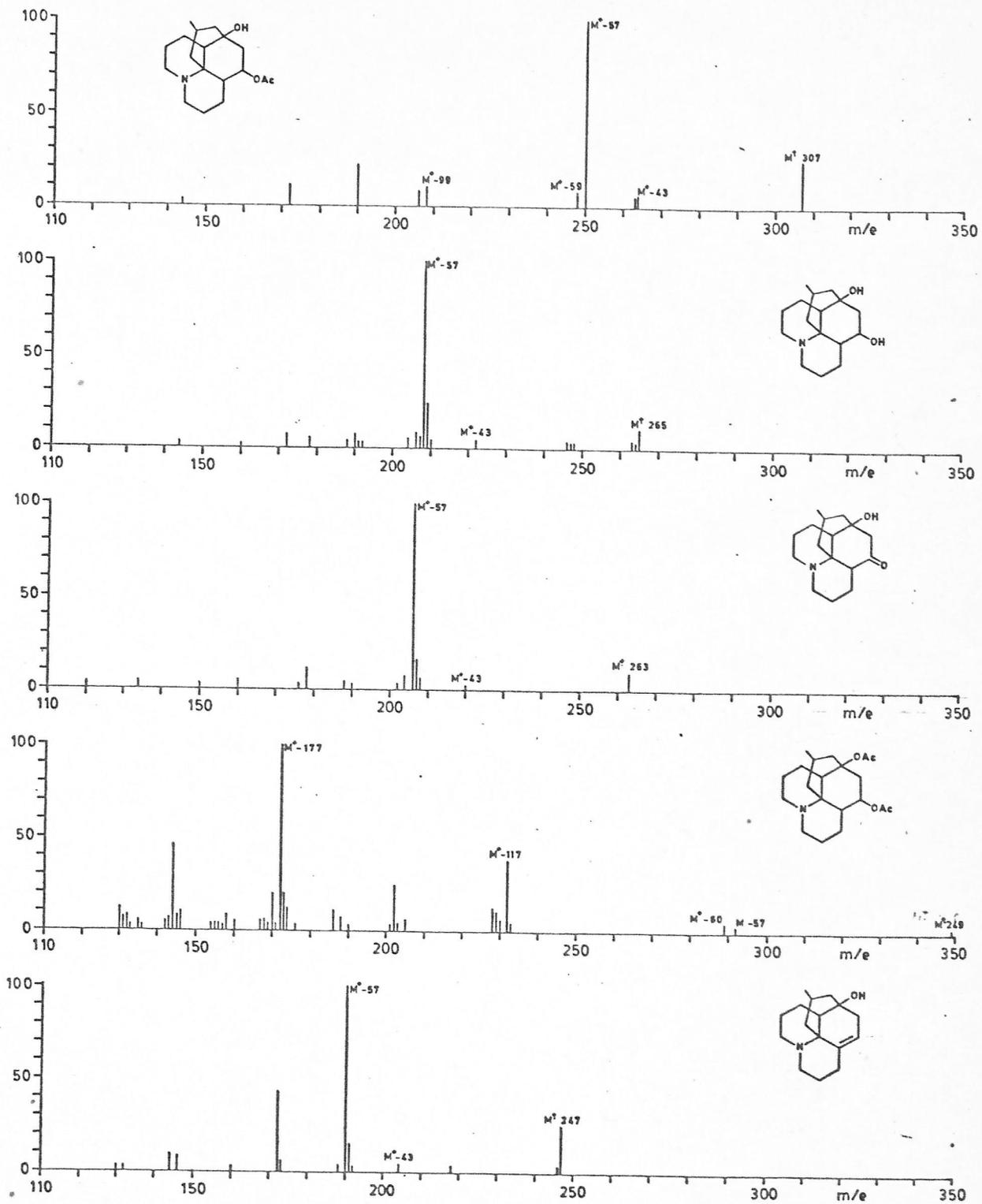


Figura 102. EM de paniculina y derivados

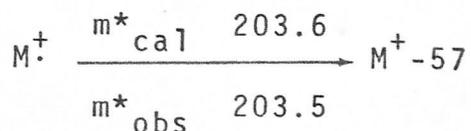
presente. Una ruptura posterior significa que el ión molecular (M^+) pierde, en una etapa, los elementos del anillo puente (C_4H_9) generando un ión par (M^+-57).

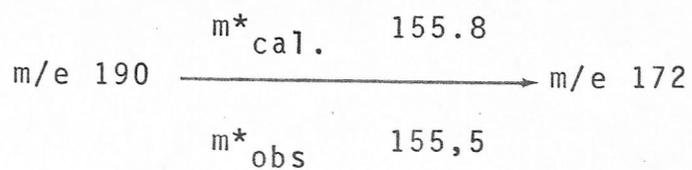
Es interesante señalar que esta señal da cuenta de la señal de máxima intensidad en los EM de paniculina(61), desacetilpaniculina (62), anhidrodesacetilpaniculina (63) y de dehidrodesacetilpaniculina (70) mientras que la misma sólo corresponde a un 3% de la señal base del espectro de acetilpaniculina.

La señal base en EM de acetilpaniculina corresponde a un ión par de m/e 172 y esto significa, de acuerdo a lo esperado, que la factibilidad de pérdida de ácido acético es mucho mayor que la de agua, cuando los grupos CH_3COO y OH ocupan los mismos sitios de sustitución.

Pérdidas consecutivas de los elementos de ácido acético, de agua y de etileno racionalizan las señales importantes del EM de paniculina tal como se ilustra en la figura 103, página 215 .

En el EM de paniculina aparecen señales metaestables que concuerdan bastante bien con las metaestables calculados para los tránsitos que se indican:





Los EM de dehidrodesacetilpaniculina y de anhidrodesa cetilpaniculina pueden ser racionalizados tal como se muestra en la figura 104, página 216.

La postulación de la estructura de los iones a m/e 160 y m/e 178 de EM de dehidrodesacetilpaniculina se hizo suponiendo que la pérdida de 28 unidades corresponde a la eliminación de etileno más bien que de carbonilo.

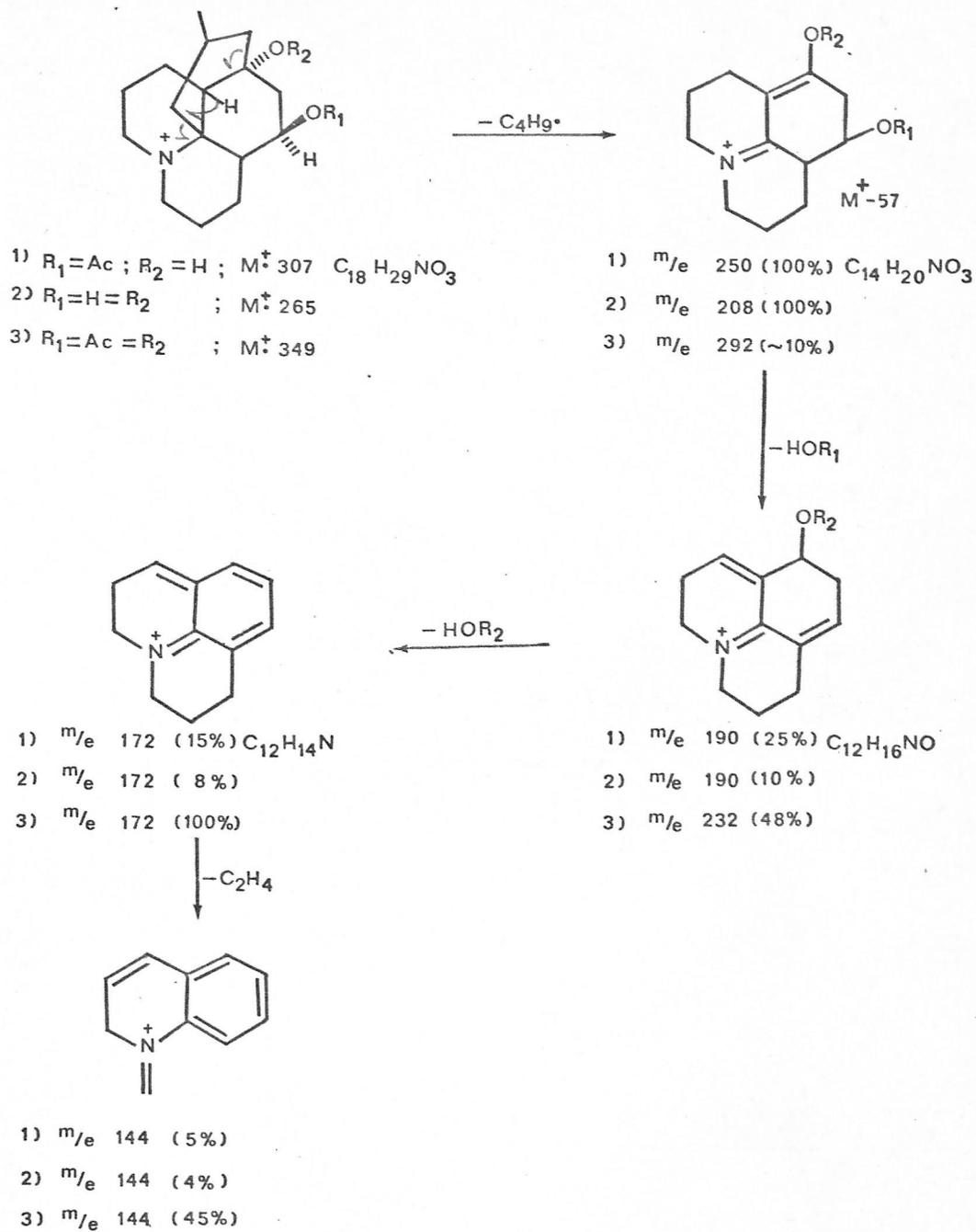


Figura 103. Mecanismo de fragmentación de paniculina y derivados.

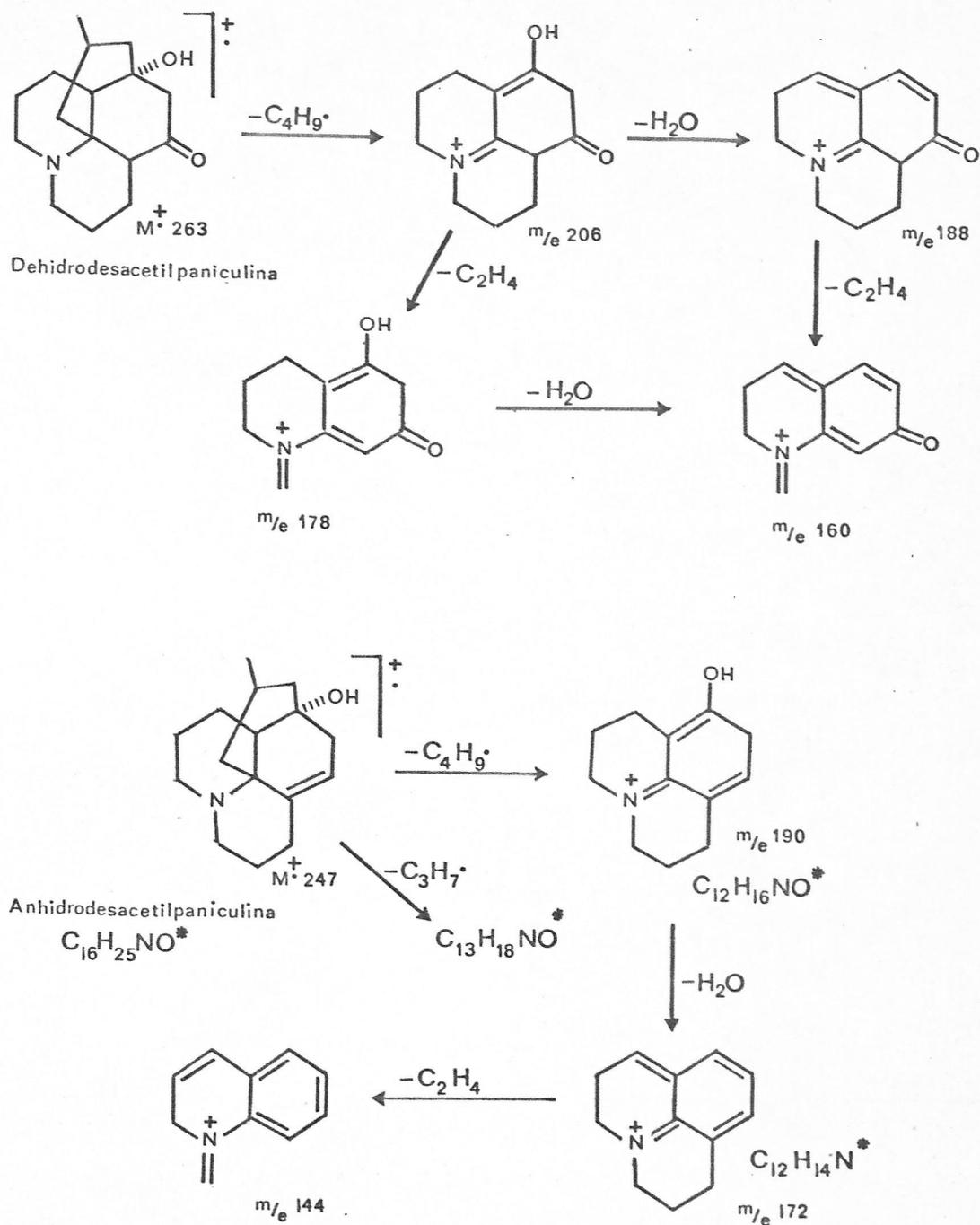


Figura 104. Mecanismo de fragmentación de dehidro y anhidro de desacetilpaniculina.

3.3. ESTRUCTURA DE DESACETILLICOCLAVINA

3.3.1. Definición funcional.

El espectro de masas de alta resolución permitió asignar la fórmula $C_{16}H_{27}O_2N$ para este alcaloide y éste resulta de acuerdo con los valores del análisis elemental.

El IR de desacetillicoclavina registrado en Nujol (figura 57, página 135) muestra bandas de fuerte absorción centrada a 3.500 y a 3.200 cm^{-1} que pueden asignarse a la presencia de dos grupos hidróxilos alcohólicos. En el IR en solución clorofórmica (o en CCl_4) se observa una sola absorción centrada a 3.600 cm^{-1} , independiente de la concentración, indicando que los grupos OH no están enlazados intramolecularmente.

El RMNP de desacetillicoclavina (figura 58, página 136) muestra, junto a la señal característica en alcaloides de *Lycopodium* asignable a CH_3CH (d, 0.9 p.p.m.), la existencia de una señal doblete a 3.8 p.p.m. que en términos de su desplazamiento químico y multiplicidad se puede asignar a la presencia de un átomo de hidrógeno geminal a un grupo OH. Por su parte, la señal singlete a 3.4 p.p.m., que no desaparece con D_2O a distintas temperaturas, resultó difícil de asignar porque, aunque su desplazamiento químico es el esperado para un átomo de hidrógeno geminal a OH, la multiplicidad de la señal hace pensar en la ausencia de átomos de hidrógeno vecinos. O bien, que por razones estereoquímicas las constantes de acoplamiento sólo dan señales de ancho de banda

de sólo 3.5 Hz. Sin embargo, la naturaleza y el número de los grupos hidroxilos presentes en la molécula de la base se pudo resolver analizando espectroscópicamente sus derivados acetilados.

El producto de acetilación exhaustiva-acetillicoclavino muestra en el IR (figura 61, página 139) señales asignables a grupo OH y asimismo, indica la presencia de dos grupos ésteres deducido de las bandas a 1.740 y 1.725 cm^{-1} y la banda relativamente intensa a 1.240 cm^{-1} .

El EM del derivado (figura 63, página 140) informa de una señal molecular a m/e 349 indicando la incorporación en la molécula del alcaloide (M^+ 265) de 84 unidades de masa correspondientes a la acetilación de dos grupos OH, incrementando 42 unidades de masa por cada grupo CH_3CO que se incorpora en la molécula. El RMNP (figura 62, página 139) confirma lo anterior al mostrar dos señales singletes a 2.0 p.p.m. que se pueden asociar a dos grupos CH_3CO .

El desplazamiento de las señales asignables a átomos de hidrógeno geminal a OH en desacetillicoclavina (3.8 d y 3.4 s) por efecto de la acetilación (5.0 d y 4.6 s) hacen pensar en la naturaleza secundaria de los grupos alcohólicos.

La acetilación controlada del alcaloide (anhidrido acético y piridina a 0°C) produjo un compuesto cuyo IR (figura 64, página 141) muestra una absorción centrada a 3.300 cm^{-1} asignable a un grupo OH alcohólico, junto a las bandas a 1.730 y 1.240 cm^{-1} asignables a la presencia de un grupo O-

Acetato.

El RMNP del derivado (figura 65, página 141) es confirmatorio de la naturaleza de hidroxí-acetato de este producto. El singlete a 2.0 p.p.m. (3H) indica la presencia de un grupo O-acetil. El desplazamiento químico (4.7 p.p.m.) y la multiplicidad (s, $a_{1/2}$ 3.5Hz) se puede asociar al protón CHOAc y así el grupo alcohólico acetilado debe corresponder al que en desacetillicoclavina lleva un átomo de hidrógeno geminal que absorbe a 3.4 p.p.m. (s, $a_{1/2}$ 3.5Hz).

La señal doblete a 3.9 p.p.m. en el derivado se puede asignar al protón geminal al grupo OH que no ha sido acetilado en las condiciones de la reacción

Tabla 14

Resonancia de desacetillicoclavina y
derivados bajo 3.4 p.p.m.

	doblete	singlete
Desacetillicoclavina	3.8	3.4
Acetillicoclavina	5.0	4.8
Acetildesacetillicoclavina	3.9	4.7
Licoclavina	4.9	3.6

Dada la diferente reactividad de los dos grupos OH, pensamos que deben existir implicancias estereoquímicas importantes.

No fue posible obtener desde desacetillicoclavina el otro mono acetil derivado esperable. Sin embargo, como producto

natural se aisló el alcaloide licoclavina que mostró ser tal isómero monoacetilado.

Además, el análisis de los productos de oxidación de desacetillicoclavina, que se discuten más abajo, proporciona antecedentes adicionales para sostener que las funciones oxigenadas de la base natural son dos grupos hidroxílicos secundarios.

La ausencia de antecedentes espectroscópicos para aceptar la presencia de CH_3N y la no N-acetilación de desacetillicoclavina sugieren que la base natural posee en su molécula un átomo de nitrógeno terciario. Esto puede ser justificado asignando las bandas en el IR. de sus sales (hidrobromuro $2.750\text{-}2.600\text{ cm}^{-1}$ y perclorato $2.750\text{-}2.650\text{ cm}^{-1}$) a la presencia en estos derivados del grupo funcional N^+H .

De ésta manera podemos pensar que la molécula de desacetillicoclavina posee dos grupos OH secundarios, un grupo CH_3 y un átomo de nitrógeno terciario. Debido a la ausencia de señales espectroscópicas asignables a enlaces dobles o a protones olefínicos podemos deducir que su estructura es tetracíclica.

3.3.2. Definición del esqueleto carbonado.

Los EM del alcaloide y de sus derivados (figura 105, página 222) muestra todas aquellas características típicas de los alcaloides que pertenecen estructuralmente a la familia de la licopodina sin sustituyentes en el anillo puente ni en

el carbono C12.

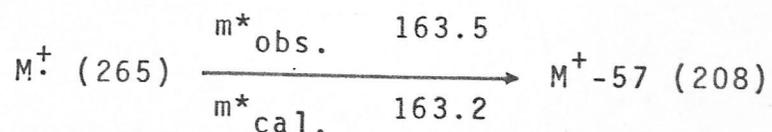
Así, por ejemplo, la señal del ión molecular de desacetillicoclavina y derivados es relativamente poco intensa. La baja intensidad de la señal a $M^+ - 43$ y la gran abundancia de la señal $M^+ - 57$ tiene gran importancia diagnóstica.

Tabla 15

Algunas señales de EM de desacetillicoclavina y derivados.

	M^+ (%)	$M^+ - 43$	$M^+ - 57$ (%)
Desacetillicoclavina	265(16)	224(4)	208(100)
Acetillicoclavina	349(11)	306(5)	292(40)
Hidroxiketona	263(18)	220(3)	206(100)
Dicetona enólica	261(35)	218(48)	204(100)

La señal base en EM de desacetillicoclavina y derivados, con excepción de acetillicoclavina, es la señal $M^+ - 57$ que en desacetillicoclavina corresponde al ión $C_{12}H_{18}NO_2$, implicando una pérdida de C_4H_9 desde el ión molecular. Esta señal a $M^+ - 57$ se debe generar en una sola etapa según se deduce de la presencia en el EM del alcaloide de una señal metaestable que concuerda con el valor calculado para el tránsito:



Estos antecedentes, que se ajustan perfectamente con

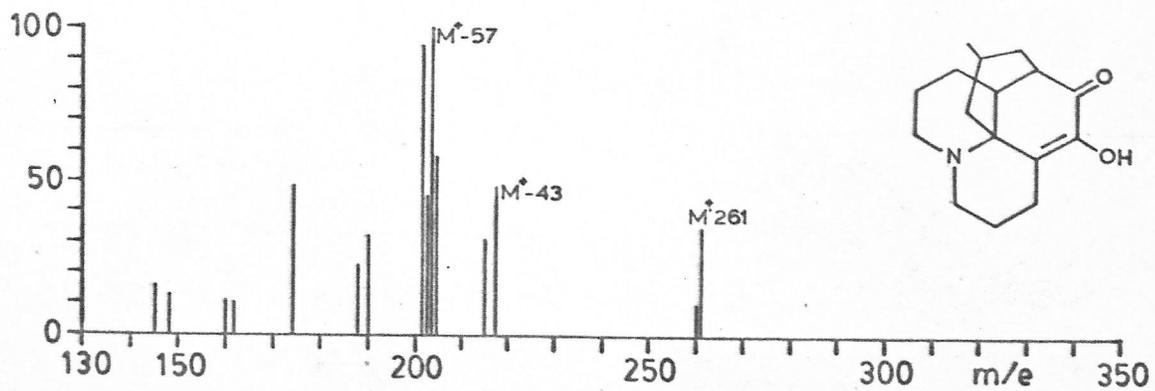
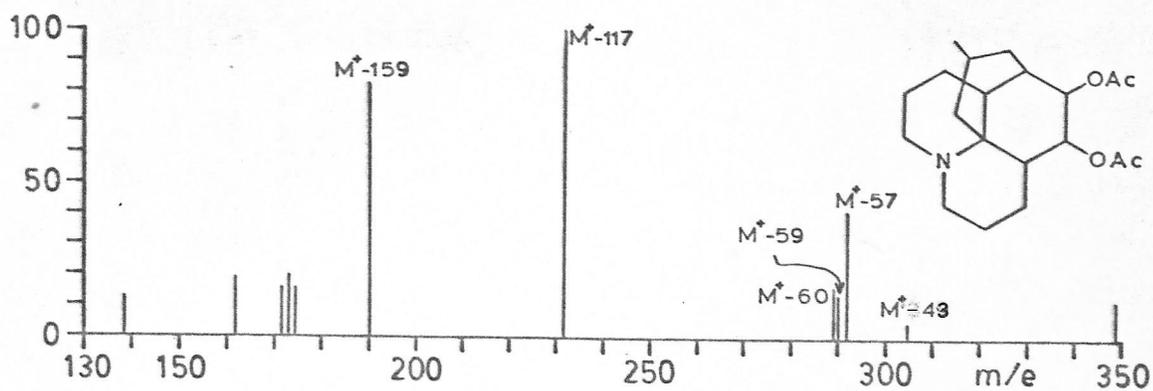
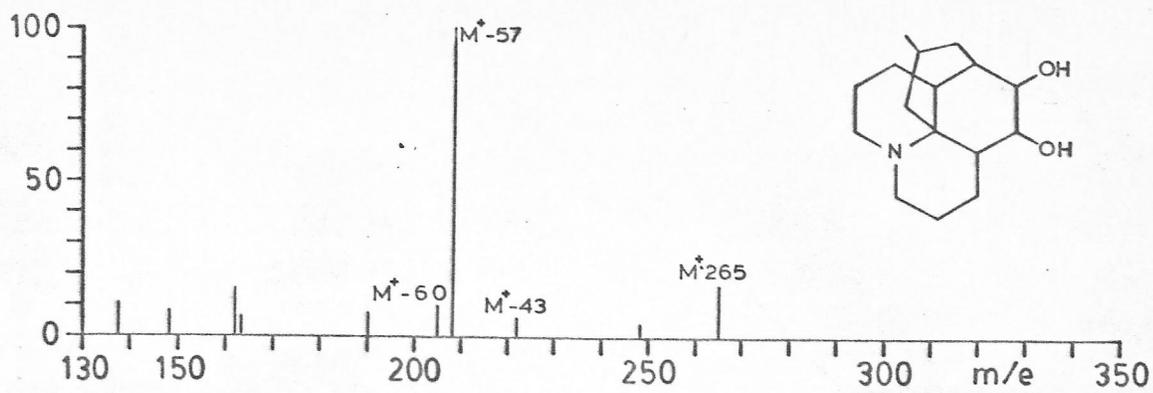
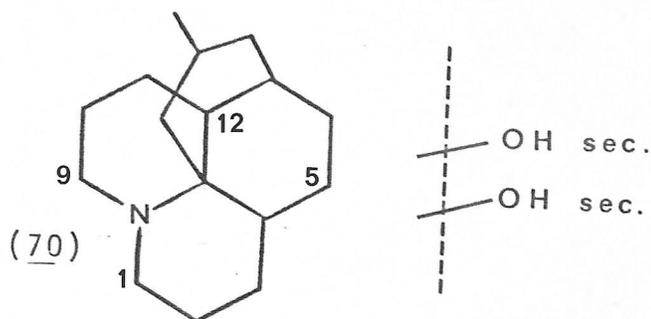


Figura 105. EM de desacetylliclavinolol B y derivados.

Las consideraciones realizadas por MacLean⁵¹ y discutidas en página 111, permiten sugerir que el sistema de anillos presente en el alcaloide y derivados corresponde enteramente a un esqueleto de lycopodina sin sustituyentes en el anillo D. La gran intensidad de $M^+ - 57$ asegura adicionalmente la presencia de un átomo de hidrógeno en el carbono 12.

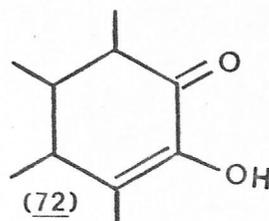
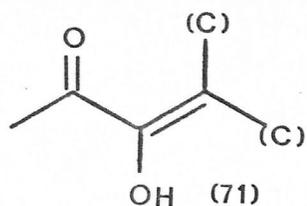
Una representación plana adecuada para desacetillicoclavina es la mostrada en (70)



La ubicación de los grupos OH en este esqueleto se logró analizando y comparando los derivados de desacetillicoclavina con productos obtenidos en este laboratorio desde alcaloides conocidos y siguiendo técnicas propuestas por Ayer⁹².

Cuando desacetillicoclavina se oxidó con trióxido de cromo en medio ácido (reactivo de Jones) se obtuvo como producto principal un derivado que tiene propiedades espectroscópicas atribuibles a la presencia de un rasgo funcional característico de una α -dicetona enólica (71). El IR del derivado (figura 66, página 142) muestra una banda asignable a

a carbonilo α , β no saturado a 1.660 cm^{-1} y una banda de doble enlace olefínico a 1.640 cm^{-1} . El IR en CHCl_3 muestra una banda a 3.450 cm^{-1} atribuibles a un grupo OH fuertemente enlazado intramolecularmente. El RMNP (figura 67, página 142) no muestra señales de protones olefínicos.



El EM (figura 68, página 143) del derivado es indicativo de la naturaleza dicetónica del mismo. El ión molecular tiene una masa de 261 que significan 4 unidades menos que el peso molecular de desacetillicoclavina (265).

En consecuencia en la oxidación con reactivo de Jones reaccionaron los dos grupos OH secundarios.

Aplicando las reglas de Woodward a un sistema cíclico como (72) resulta una muy buena concordancia del valor experimental (280 nm.) con el calculado (279 nm.) para la absorción ultravioleta ¹³³.

Las características estructurales de este derivado de oxidación de desacetillicoclavina con reactivo de Jones son fuertemente indicadoras que los grupos OH en la base natural son vecinales, o sea, se trata de un 1,2 diol.

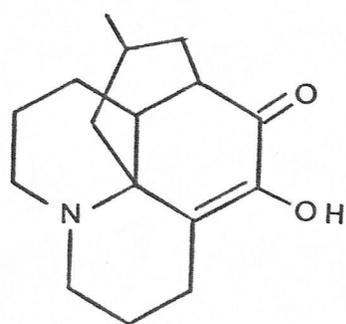
Esta apreciación se ve confirmada por los dos hechos siguientes:

1. Desacetillicoclavina dá una reacción positiva (2-3 min.)

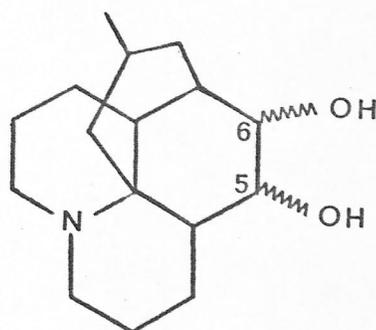
al test del ácido peryódico¹³⁴.

2. La hidroxicetona derivada de desacetillicoclavina por oxidación con reactivo de Sarret a 0°C no muestra en su IR (figura 69, página 144) banda asignable a grupos metilénos α a carbonilo. Esto es, la zona de 1.440-1.400 cm^{-1} es transparente.

La ubicación de los sustituyentes oxigenados en C5 y C6 se vió confirmada cuando al oxidar licopodina con dióxido de selenio¹⁶ se obtuvo la α dicetona enólica (diosfenol) idéntica al producto de oxidación con reactivo de Jones y que debe tener la estructura indicada en (73).



diosfenol (73)



(74)

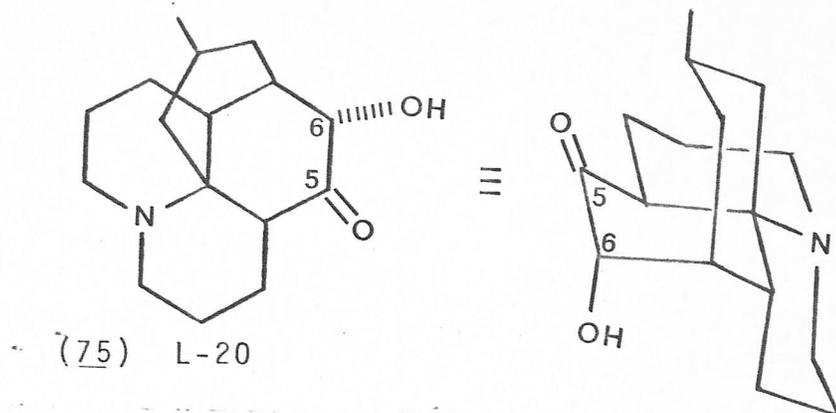
Hasta aquí entonces, desacetillicoclavina debe corresponder a la estructura (74): 5,6-dihidroxilicopodano.

La orientación espacial de los grupos OH se deduce, principalmente, del producto de oxidación con reactivo de Sarret a 0°C.

Esta hidroxicetona derivada resultó ser idéntica en todas sus propiedades con el alcaloide L20⁽⁹²⁾ (muestra auténtica

proporcionada por Braekman) y con L20 obtenido en este trabajo desde licopodina⁹².

Según el trabajo estructural realizado por Ayer⁹² la hidroxiketona derivada de desacetillicoclavina corresponde entonces, a la estructura indicada en (75)



Este resultado es relevante por cuanto no sólo fija la estereoquímica del grupo OH de C6 sino que, con excepción de la orientación del sustituyente en C5, fija también la estereoquímica relativa y absoluta de todos los centros de desacetillicoclavina (v. gr. C4, C12, C15, C7 y C13).

El resultado experimental sugiere, entonces, que el alcaloide debe tener un grupo OH secundario en el carbono C6 con una orientación axial.

La estereoquímica del grupo OH del C5 se determinó analizando el producto de reducción de L20 con hidruro de aluminio y litio^{92,135}.

Se ha evidenciado en numerosos alcaloides del tipo de licopodina que llevan un grupo carbonilo en C5 que una reducción con LiAlH_4 produce, debido al gran impedimento estérico

que ofrece el anillo D al acercamiento del hidruro, el alcohol con el grupo OH orientado en forma cis a tal anillo D. Esto es, se produce el alcohol con el OH axial, o sea el, β -dihidroderivado ^{17,70}.

Así entonces, el producto de reducción de L20 con hidruro de aluminio y litio debe ser el 5,6 diaxial diol derivado. En la práctica éste producto resultó ser idéntico en todas sus propiedades con el producto natural desacetillicoclavina. Este resultado indica que en la molécula el grupo OH en C5 es también de naturaleza axial y la esteoestructura del alcaloide debe ser la que se muestra en figura 106 .

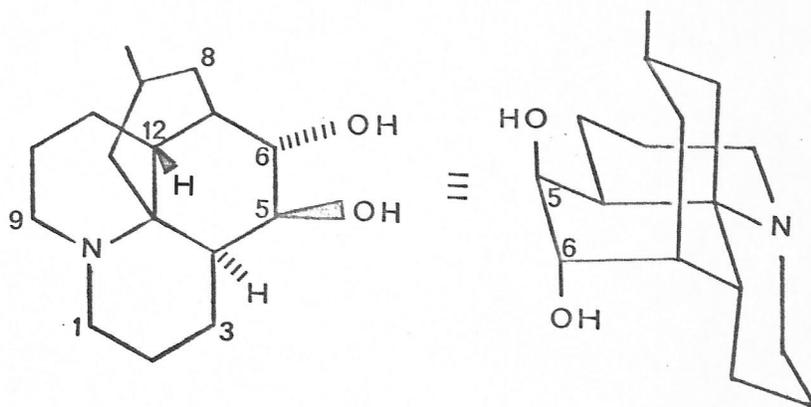


Figura 106. Estructura de desacetillicoclavina.

Esta estructura 5- β , 6- α -dihidroxiclopodano propuesta para desacetillicoclavina ha sido previamente asignada al producto de hidrólisis de licoclavina ¹⁶. No ha sido posible una comparación directa de ambas bases, pero su identidad parece ser consistente. Este es el primer informe

de la caracterización de desacetillicoclavina aislada desde fuente natural.

La presencia de este rasgo estructural de glicol 1,2 trans diaxial en la base desacetillicoclavina se confirmó experimentalmente al fallar los intentos de obtener el 0-isopropiliden derivado.

Se ha demostrado ^{136,137} que, en anillos de ciclohexano saturados, conformacionalmente rígidos, de los isómeros posibles para 1,2-glicoles, sólo los cis y el trans-diecua-torial forman isopropiliden derivados con relativa facilidad; el isómero trans-diaxial no puede generar dicho derivado.

Esta consecuencia, desacetillicoclavina corresponde al diol trans-diaxial indicado en la figura 106, página .

No obstante la importancia del resultado anterior, su estricta validéz es sólo limitada por cuanto no se ha intentado formar las acetónidos de los tres 5-6 dihidroxilicopodanos isómeros restantes.

Gran parte de nuestro esfuerzo se dedicó a intentar obtener los cuatro 5,6-dioles derivados de licopodina. Sin embargo, todos los intentos fracasaron. Siguiendo las técnicas propuestas por Ayer⁹² para epimerizar el grupo OH de L20, usando n-propóxido de sodio en n-propanol, o alúmina, por reducción de L20 usando sodio en n-propanol, sólo obtuvimos como producto caracterizable la conocida α -dicetona enólica o diosfenol (73).

Nuevos intentos se han iniciado partiendo de acetillicoclavina (epimerización) y de hidrobromuro de 6- α -bromolicopodina (reducción con NaBH_4).

3.3.3. Obtención sintética de desacetillicoclavina⁹².

La secuencia sintética seguida significa introducir un grupo α -OH en C6 en la estructura de licopodina y luego una reducción estereoselectiva del carbonilo de C5.

La figura 107, página²³⁰, resume el trabajo realizado y al mismo tiempo muestra las relaciones de desacetillicoclavina y los productos sintéticos.

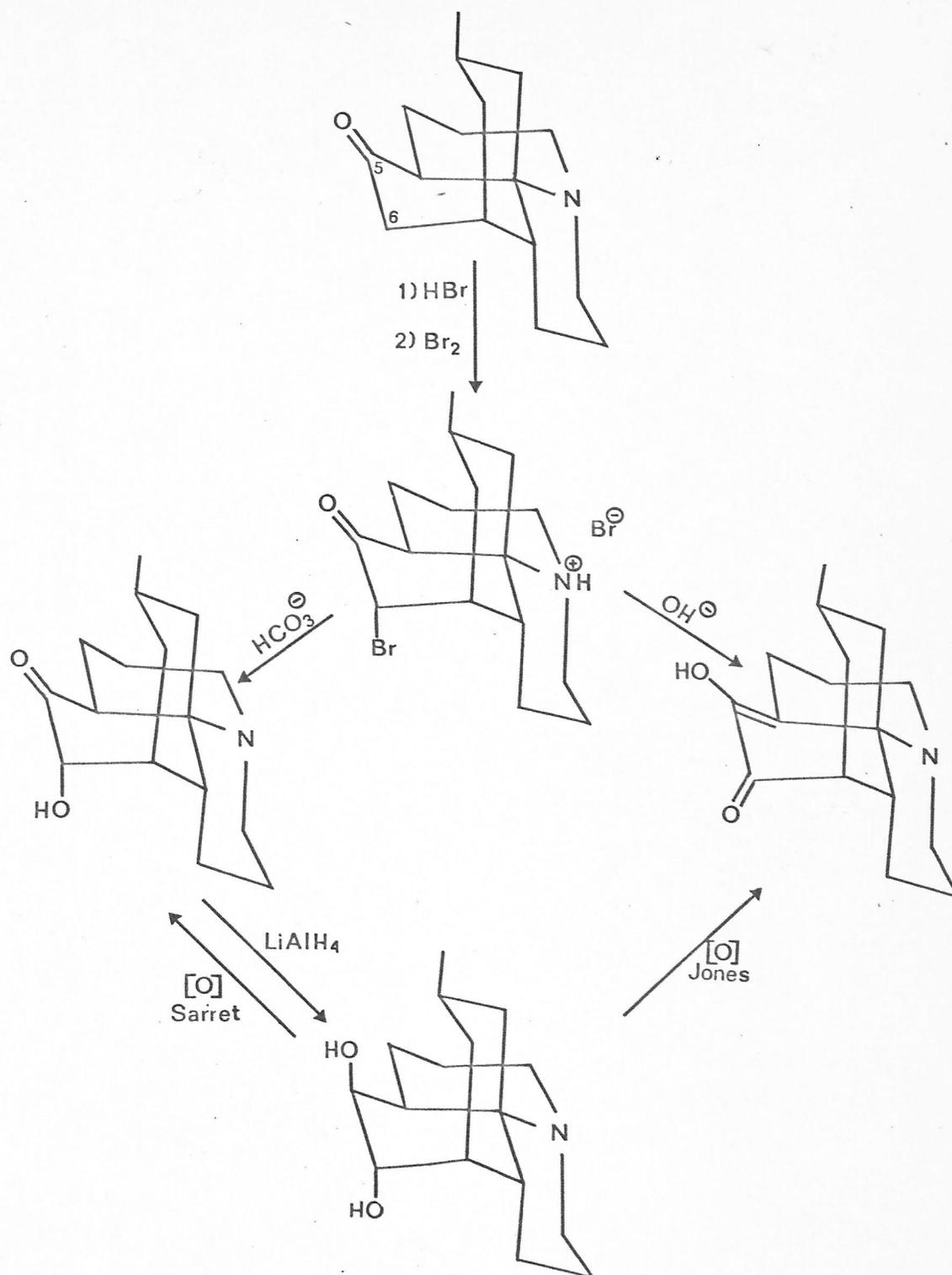


Figura 107. Síntesis de desacetillicoclavina.

La estructura propuesta para desacetillicoclavina permite hacer asignaciones tentativas a las señales de RMN¹³C (figura 60, página 138). Se aprecia claramente la presencia de 16 señales asignables a cada carbono de la molécula del alcaloide.

La forma general del espectro concuerda perfectamente con la encontrada por W.A. Ayer⁵⁶ en orden a que con excepción de los carbonos que llevan los sustituyentes oxigenados y C13, único centro cuaternario del alcaloide, las resonancias de los demás carbonos se pueden agrupar ya en el rango de 20-30 p.p.m. (7 carbonos), ya en el rango de 40-48 p.p.m. (6 carbonos), de acuerdo con su particular naturaleza química.

Utilizando los argumentos y las asignaciones hechas por W.A. Ayer para β -dihidrolicopodina⁵⁶ junto con las alteraciones de protección en posiciones α , β y γ provocadas por la introducción de un grupo OH axial informados por Roberts⁶¹, hemos calculado los desplazamientos químicos esperables para los carbonos afectados por tal sustitución en C6.

Los efectos de desprotección de un grupo OH axial en posición α y β son de 37.8 y 5 p.p.m. respectivamente. Mientras que, en posición γ se produce un efecto de protección que involucra un desplazamiento de 6.8 p.p.m. a mayor campo.

La tabla 16 contiene las asignaciones de Ayer para dihidrolicopodina, los valores calculados y las asignaciones

para desacetillicoclavina.

Tabla 16
Asignaciones de RMN¹³C de desacetillicoclavina

N°Carbono	Dihidrollicopodina	$\delta_{\text{cal.}}$	$\delta_{\text{obs.}}$	$\Delta(\delta_{\text{obs.}} - \delta_{\text{calc.}})$
1	47.1		47.17	
2	20.1		20.31	
3	23.5		23.93	
4	32.6	25.8	26.66	0.8
5	68.5	73.5	74.70	1.2
6	34.0	71.8	78.50	6.7
7	35.6	40.6	40.33	0.3
8	42.0	35.2	42.67	7.4
9	47.4		47.34	
10	26.6		26.85	
11	25.0		29.10	
12	45.8	39.0	44.02	5.0
13	55.2		55.30	
14	43.2		44.82	
15	23.5		23.04	
16	24.1		24.11	

A juzgar por los valores de Δ (p.p.m.) para los carbonos C4 y C7 se aprecia una buena concordancia de los valores.

Las resonancias de los carbonos C5 y C6 son fácilmente asignables, por la magnitud de su desplazamiento químico, propio de carbonos alcohólicos⁶¹. Para los carbonos C8 y C12

se observa un Δ de 7.4 y 5.0 p.p.m. respectivamente. Si se compara el valor de la resonancia para C8 y C12 en dihidrolicopodina con las asignaciones hechas en desacetillicopodina se aprecia diferencias de 0.6 y 1.8 p.p.m. respectivamente, que están dentro de un orden de magnitud aceptable. Esto parece indicar que el efecto γ del grupo OH en C6 sobre estos carbonos es minimizado por algún otro factor.

Una situación un tanto similar se advierte al observar el efecto γ del grupo OH axial en flabelliformina (4- α -hidroxilicopodina) en relación con licopodina. La introducción de un grupo OH axial en C4 de licopodina desplaza en 3.7 p.p.m. a C6 y en 2.4 p.p.m. al C2 a más alto campo.

De tal suerte que proponemos las asignaciones para RMN ^{13}C de desacetillicoclavina, que se muestra en la figura 108 y en la tabla 15

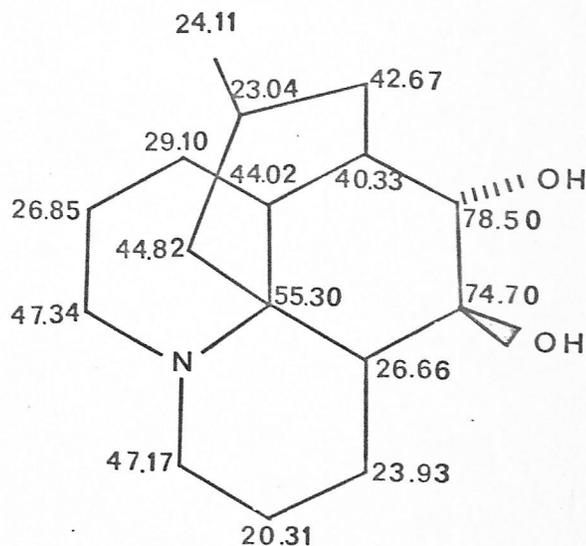


Figura 108. Asignaciones de RMN ^{13}C de desacetillicoclavina

Disponiendo de la estructura propuesta para desacetillicoclavina es bueno también analizar brevemente algunos aspectos de sus espectros de RMNP.

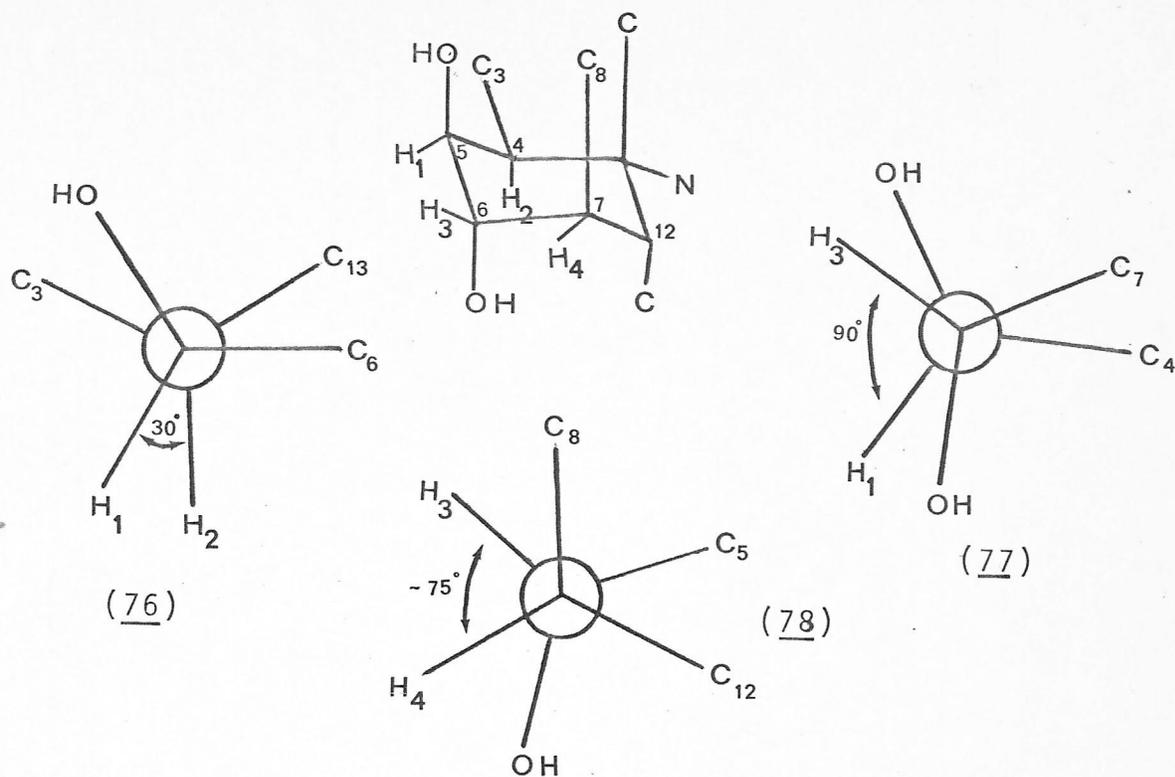
Si bien es cierto que, tanto en la base natural como en sus derivados acetilados las señales asignables a átomos de hidrógeno geminales a las funciones oxigenadas muestran un desplazamiento químico esperable, no es menos cierto que la multiplicidad de las mismas merecen un comentario adicional.

Teniendo en consideración la eventual distorsión de los anillos B y D del sistema bicíclico [3,3,1] nonano, discutido en página 209 es posible justificar la multiplicidad de las señales que nos ocupan.

Aceptando una conformación del anillo B (y del D) que tiende más a una media silla, entonces el ángulo diédrico definido por los átomos $H_1-C_5-C_4-H_2$ debe tener un valor aproximado a 30° , implicando una constante de acoplamiento de 6Hz aproximadamente (76).

Esta distorsión también provoca que el ángulo diédrico $H_1-C_5-C_6-H_3$ cambie de 60° en una silla normal hasta aproximadamente 90° , implicando de paso una constante de acoplamiento de aproximadamente a 0 Hz (77).

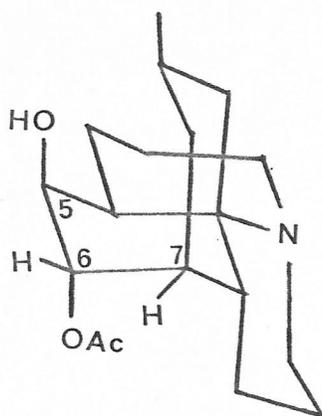
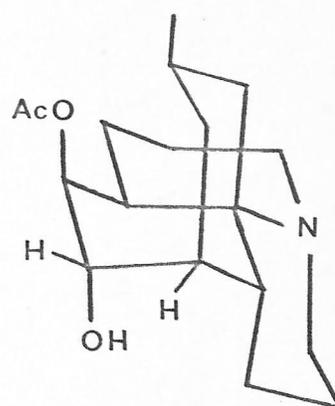
Según esto, la señal doblete a 3.86 p.p.m. en desacetillicoclavina, a 5.0 p.p.m. en el diacetil derivado, a 3.9 p.p.m. en el monoacetil (y a 4.9 en licoclavina) deben ser asignadas al protón ecuatorial en C5 que está acoplado



solamente con un átomo de hidrógeno vecinal, el del carbono 4 con un $J=6\text{Hz}$. Al irradiar el multiplete a 2.52 p.p.m. en la base natural (y a 2.5 p.p.m. en el diacetil) el doblete respectivo se transformó en un singlete de $a_{1/2} 6\text{Hz}$, de donde se deduce que el átomo de hidrógeno de carbono 4 resuena en 2.52 p.p.m.

Este análisis permite justificar la multiplicidad de la señal singlete ($a_{1/2} 3.5\text{ Hz}$) a 3.74 p.p.m. en desacetillicoclavina; a 4.6 en diacetillicoclavina; a 4.7 en el monoacetil (79) (y a 3.6 en licoclavina (80)), como la señal correspondiente al átomo de hidrógeno ecuatorial de C6 acoplado solamente con el hidrógeno ecuatorial de C7. El valor de J debe ser del orden de 1-1.5 Hz para un ángulo diédrico $\text{H}_3\text{-C}_6\text{-C}_7\text{-H}_4$ de $70 - 80^\circ$ (78).

El RMNP del derivado monoacetilado de desacetillicoclavina (figura 65, página 141), muestra una señal singlete a 4.7 p.p.m. y un doblete a 3.9 p.p.m. significando que la acetilación selectiva solamente afectó al grupo OH de C6, de tal forma que este derivado debe ser el 5- β -hidroxi, 6- α -O-acetillicopodano (79).

(79)(80)

El alcaloide licoclavina-como se discute más adelante-mostró ser el isómero natural 5- β -O-acetil, 6- α -hidroxilicopodano (80).

A la luz de la estructura propuesta para desacetillicoclavina es bueno justificar los EM de la base y sus derivados (figura 109, página 238). El EM de desacetillicoclavina en virtud de la composición del ión m/e 162 ($C_{11}H_{16}N$ y $C_{10}H_{12}NO$) puede ser racionalizado suponiendo que coexisten dos rutas mecanísticas paralelas como se muestra en la figura 109, página 238.

El ión molecular sufre una ruptura del enlace C13-C14 generando el ión radical a. Desde este ión a, en la secuencia I, típica de la familia de licopodina⁵¹ se puede generar los iones m/e 208 ($M^+ - 57$, 100%), m/e 190 y m/e 162 ($C_{10}H_{12}NO$).

Desde el ión a, es posible, a través de la secuencia II, racionalizar la pérdida de 60 unidades de masa generando el ión m/e 205 y desde éste las señales para los iones a m/e 162 ($C_{11}H_{16}N$) y m/e 148 ($C_{10}H_{14}N$).

Esta secuencia II adquiere importancia debido a la naturaleza 1,2 de la sustitución oxigenada¹²⁹.

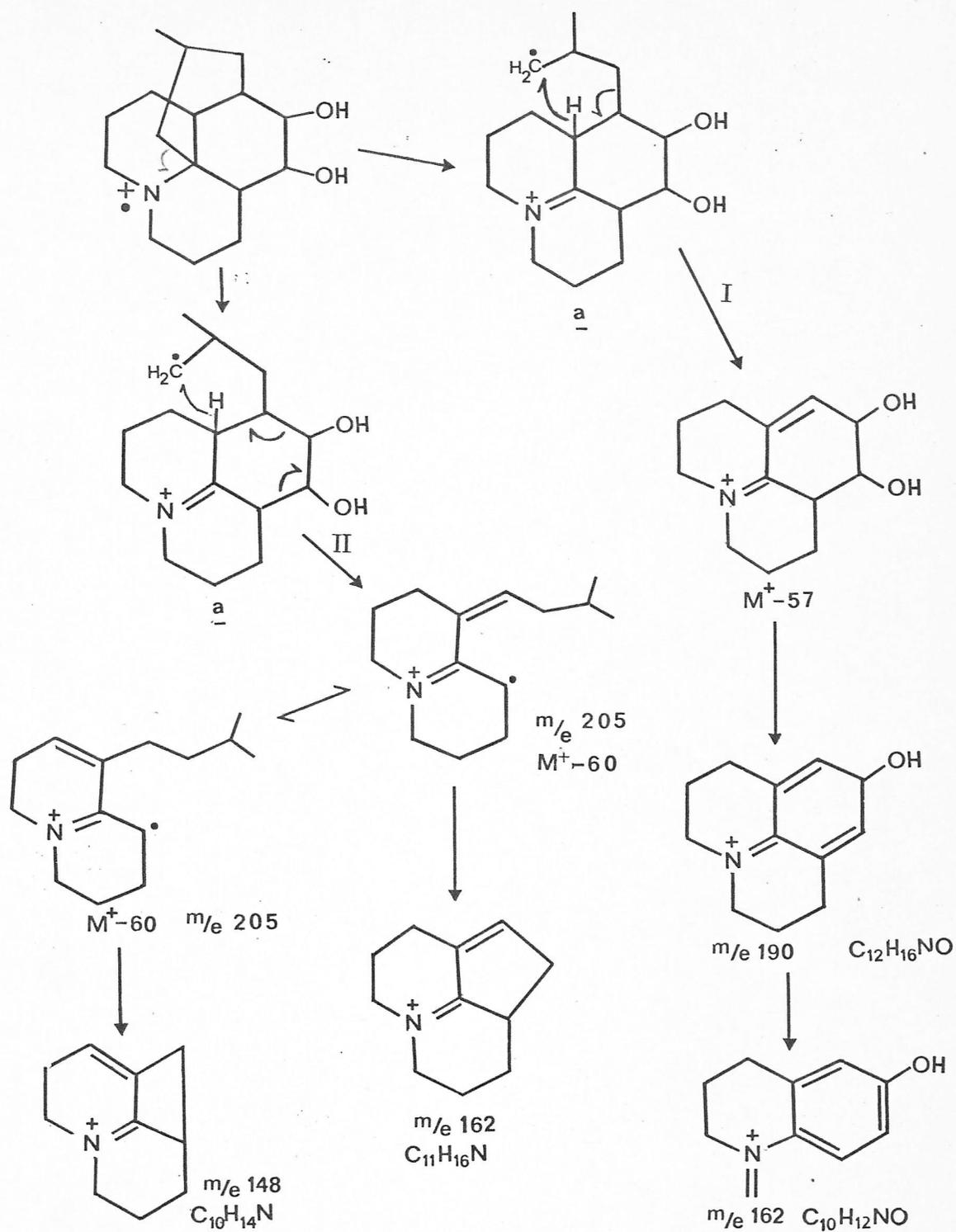


Figura 109. Mecanismo de fragmentación de desacetyllicoclovina.

Resta por discutir un aspecto de los espectros de RMNP de desacetillicoclavina y paniculina. Nos referimos al análisis de las señales que aparecen entre 2.9 y 3.6 p.p.m. (figura 110 y 111 página 240-1).

Se observa en el espectro de desacetillicoclavina dos señales que corresponden a un sexteto centrado a 3.42 p.p.m. (1 H) con $J=14,14$ y 3Hz y otro sexteto a 3.19 p.p.m. (1 H) con $J=12,12$ y 3Hz.

Por el desplazamiento químico, estas señales deben corresponder a átomos de hidrógeno unidos a átomos de carbono adyacentes a nitrógeno. Experimentos de doble irradiación indicaron que éstas señales no están acopladas entre sí, por lo que se puede afirmar que corresponden a átomos de hidrógeno pertenecientes a metilenos diferentes (en C9 y C1). El problema estriba en asignar las señales observadas a dos de los cuatro átomos de hidrógeno α al átomo de nitrógeno (H9ax, H9ec, H1ax y H1ec).

Es bastante conocida ya la diferencia que se observa en los desplazamientos químicos de protones axiales y ecuatoriales en metilenos adyacentes a heteroátomos; esta diferencia, que en sistemas derivados del ciclohexano es de 0.4-0.5 p.p.m., aumenta aún más en sistemas que contienen átomos de nitrógeno y en el caso de quinolizidina y otros con átomos de nitrógeno en cabeza de puente puede llegar a 1.7 p.p.m., con los protones axiales resonando a más alto campo¹³⁸.

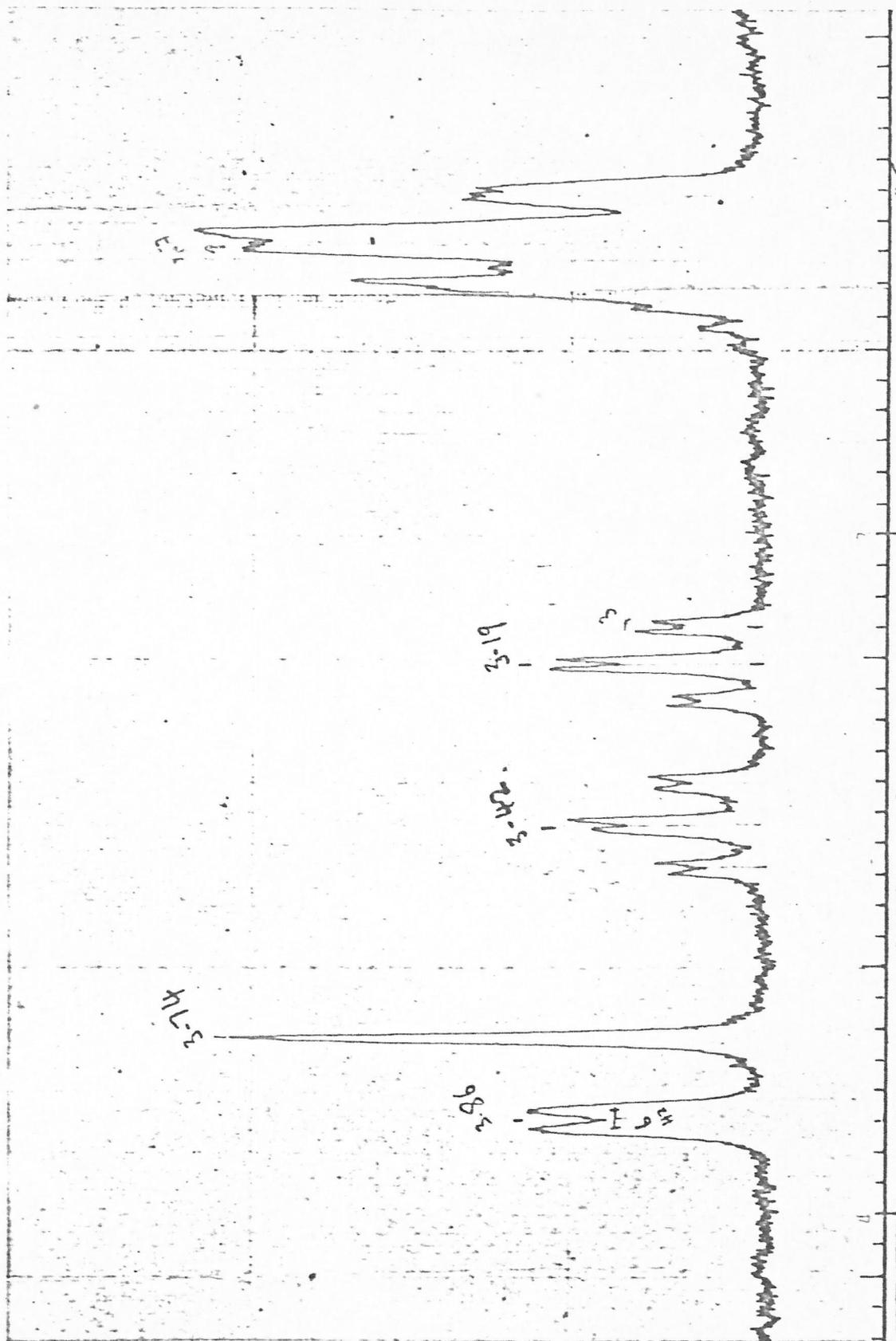


Figura 110 RMNP (2.9-3.6 p.p.m.) de desacetillicoclovina.

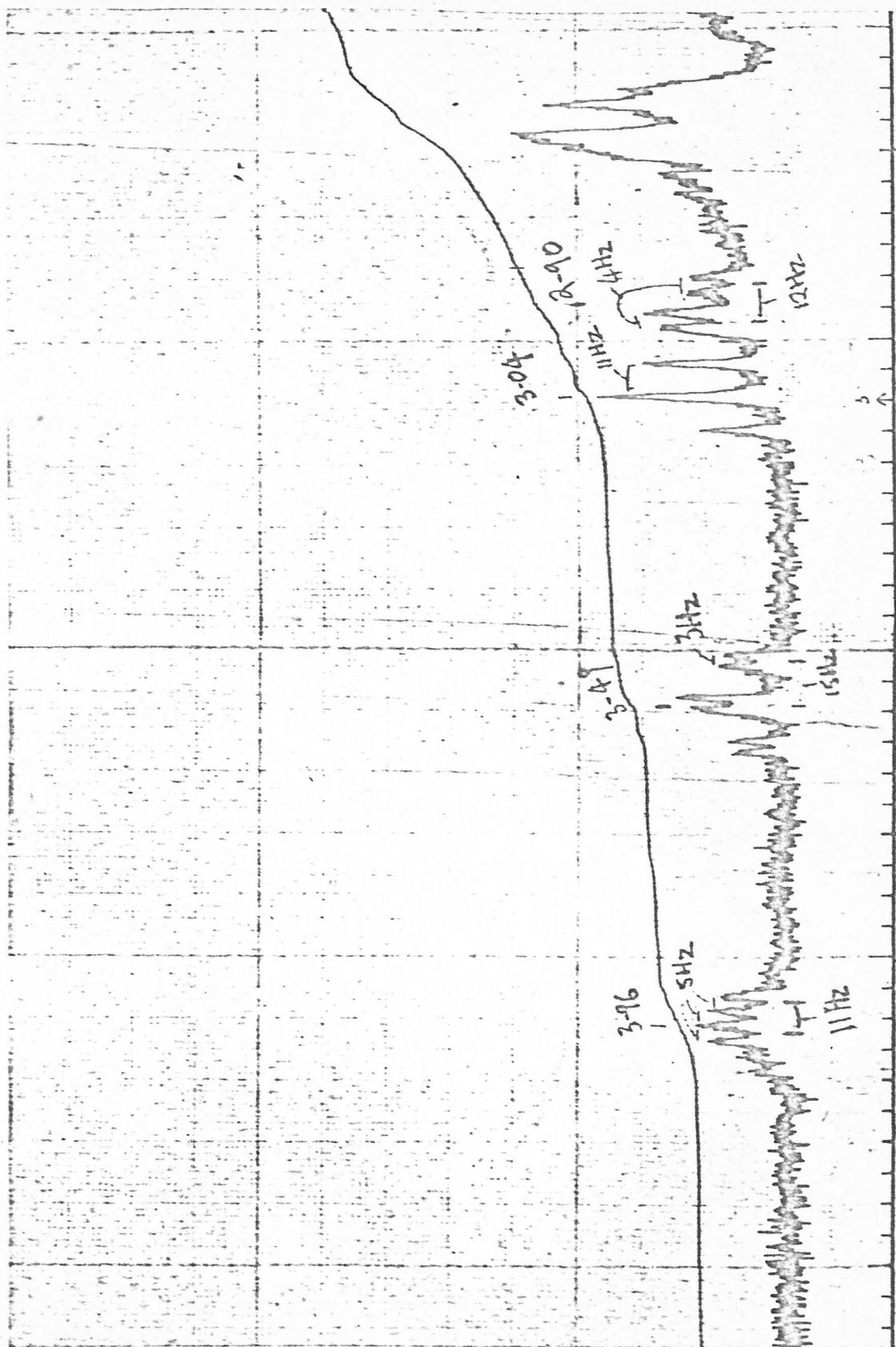
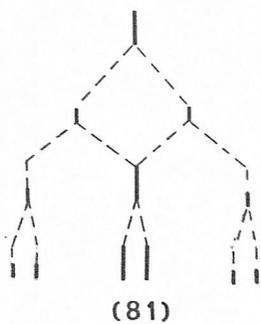


Figura 111. RMNP (2.9-3.6 p.p.m.) de paniculina.

Este desplazamiento preferencial hacia campo más alto para los protones axiales en estos sistemas se ha asociado a la interacción con el par de electrones no compartidos del átomo de nitrógeno y su efecto es máximo cuando su disposición geométrica es transdiaxial con el protón axial.

Sin embargo, la asignación de las señales a 3.49 y a 3.19 p.p.m. a los protones ecuatoriales de C9 y C1 conduce a una aparente contradicción cuando se analiza la estructura de las mismas en función de los valores de J. En efecto, los valores de 14 y 12 Hz corresponderían a un acoplamiento geminal y a un acoplamiento de protones vecinos, transdiaxiales, mientras que 3Hz reflejaría un acoplamiento de tipo ecuatorial-axial, como se indica en (81)

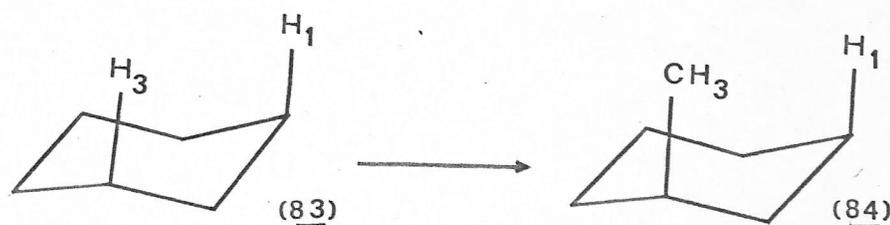


Para un protón ecuatorial cabría esperar un multiplete del tipo de (82), cuya forma exacta (dos tripletes 1:2:1 o dos cuartetos 1:1:1:1) dependería de los valores de J_{ea} y J_{ee} . Es decir, dado que la multiplicidad de las señales a 3.19 y 3.49 concuerdan mejor con (81), cada una de ellas correspondería a un protón axial y no a uno ecuatorial, como cabe

esperar en base a sus desplazamientos químicos.

Esta aparente anomalía podría racionalizarse en forma plausible considerando algunos antecedentes de la literatura respecto de la influencia de sustituyentes alquílicos en los desplazamientos químicos de protones en compuestos derivados del ciclohexano.

Booth¹³⁹, en una revisión sobre este aspecto, destaca la desprotección magnética del protón axial H_1 que se observa al reemplazar el protón H_3 por un grupo metilo (conversión (83) \rightarrow (84)). Esto provoca una desprotección de H_1

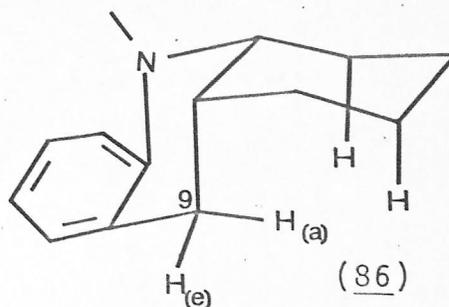
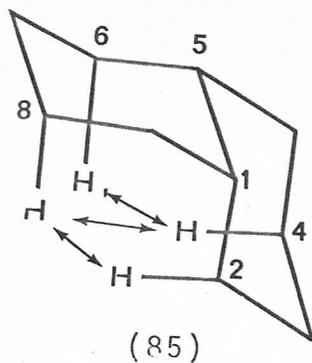


de 0.18 p.p.m. e incluso de 0.25 p.p.m. en transquinolizidinas. Este efecto de desprotección se hace más importante cuando aumenta la rigidez del sistema, de tal manera que la compresión de tipo van der Waals sobre los protones axiales no puede aliviarse por cambios conformacionales.

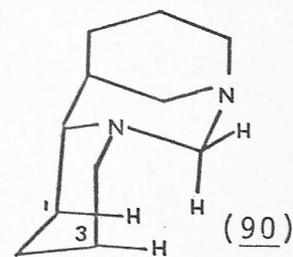
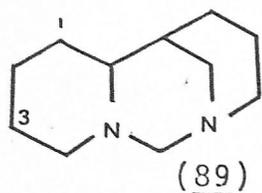
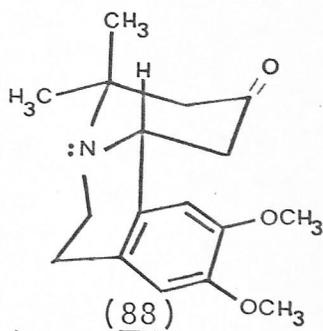
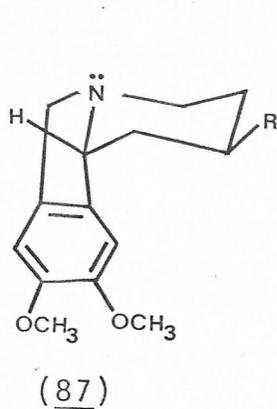
Así por ejemplo, en cis decalina (85), los protones axiales de C6 y C8 se desprotegen mutuamente con los protones axiales de C4 y C2 debido al efecto señalado¹³⁹.

Una demostración de este efecto se observa en N-metilacridina (86), donde se encontró que el protón axial en C9 absorbía a más bajo campo que el protón ecuatorial¹⁴⁰ (a

pesar del efecto desprotector que ejerce el anillo aromático sobre el protón ecuatorial en C9).



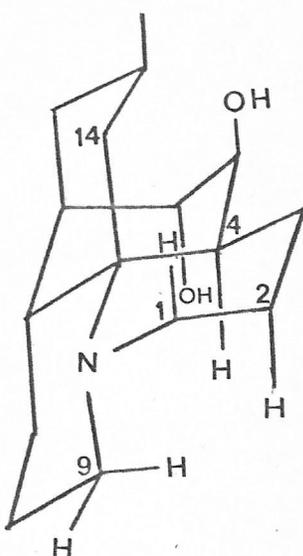
Otro ejemplo pertinente lo constituyen los compuestos (87) y (88). En (87) el protón ecuatorial angular α a nitrógeno absorbe a 4.0 p.p.m. (un triplete $J=5\text{Hz}$) y en (88) este mismo protón, que es axial, resuena a 4.15 p.p.m. (doble doblete, $J=11\text{Hz}$ y 5Hz) (140).



Aún más interesante es el ejemplo proporcionado por el compuesto (89) cuya estereoestructura (90) corresponde al isómero anti (141).

Se demostró que el protón axial del metileno adyacente a los átomos de nitrógeno absorbía a 4.29 p.p.m. ($d, J = -10.5\text{Hz}$) y el protón ecuatorial a 3.37 p.p.m. Nuevamente, se observa la interacción de los metilenos en C1 y C3.

Estos antecedentes nos permiten postular una interacción semejante en la estructura de desacetillicoclavina (y en paniculina) para los protones axiales en C9 y C1.

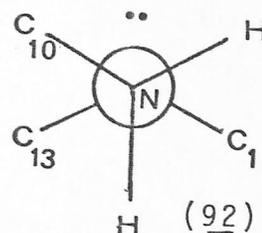
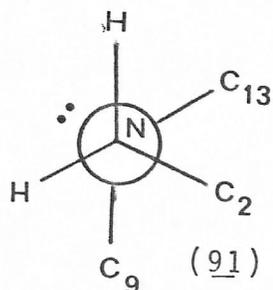


Así, el H_{9ax} estaría desprotegido por los metilenos en C2 y C4 y el H_{1ax} por el metileno en C14. Inspección de modelos Dreiding hace evidente una severa compresión entre los protones señalados, sobretodo si se considera la rigidez del sistema y en particular su estructura tipo "diamante" (71).

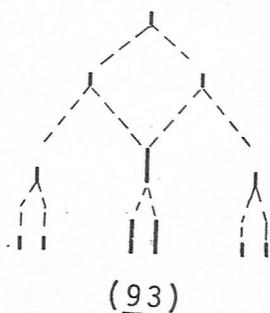
Adicionalmente, se sabe que el valor de J geminal de un metileno α a nitrógeno, depende de la orientación geométrica del orbital del par electrónico no compartido del heteroátomo respecto a los protones metilénicos. Se ha

demostrado^{141,142} que el valor de J aumenta negativamente cuando el par electrónico bisecta el ángulo formado por el CH_2 ; en cambio, J se hace más positivo para ángulos dihédricos de 0° y 180° (o sea, cuando el par electrónico es paralelo a uno de los enlaces C-H).

La inspección de modelos Dreiding de desacetillicoclavina demuestra que el par electrónico (ecuatorial) del átomo de nitrógeno es gauche al metileno en C1 (91) y transdiaxial al H axial de C9 (92). Esto nos permitiría asignar tentativamente la señal a 3.42 p.p.m. ($J=14,14$ y 3Hz) a la resonancia del protón axial de C1 y la señal a 3.19 p.p.m. ($J=12,12$, 3Hz) a la resonancia del protón axial en C9.



Un análisis plausible para las señales que nos ocupan se muestra en (93)



El caso de paniculina es análogo, con una complicación

adicional, cuál es la presencia de otro multipleta a 3.96 p.p.m. que no es posible racionalizar con argumentos similares a los empleados.

La falta de evidencias experimentales, que en paniculina prohíben cualquier asignación, plantea la necesidad de un estudio más detenido del problema. Este estudio debe aclarar la situación de paniculina y verificar las asignaciones hechas en desacetillicoclavina. El uso combinado de reactivos de desplazamiento y de compuestos adecuadamente deuterados, junto con el análisis de otros compuestos de esta familia de alcaloides del tipo lycopodina, podría significar la obtención de la información requerida.

3.4. ASIGNACION ESTRUCTURAL DE LICOCCLAVINA.

Los antecedentes espectrales de licoclavina (IR, figura 72, página 148; RMNP, figura 73, página 148 ; EM, figura 74, página 149) muestran que la base posee en su molécula un grupo OH y un grupo O-acetil.

El producto de hidrólisis de licoclavina es idéntico con desacetillicoclavina (página 147). El producto de acetilación es idéntico con el producto de diacetilación de desacetillicoclavina. En consecuencia, licoclavina debe corresponder a 5- β -O-acetil 6- α -hidroxilicopodano (figura 112) por las siguientes razones:

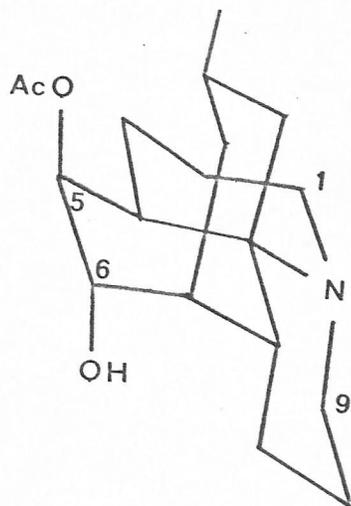


Figura 112. Estructura de licoclavina.

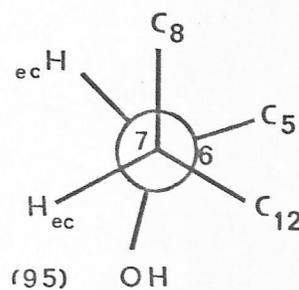
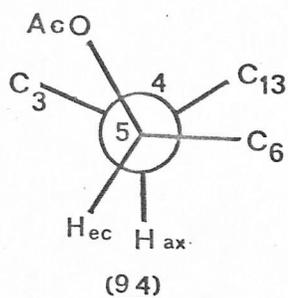
1. La imposibilidad de obtener sintéticamente tal derivado desde desacetillicoclavina en una monoacetilación selectiva implica que en licoclavina el CH_3COO -ocupa ya una orientación axial en C5 y cis al anillo D.
2. La señal a 4.9 p.p.m. RMNP (figura 73, página 148) muestra un desplazamiento químico y una multiplicidad (d, $J=6\text{Hz}$)

similar a la señal a 5.0 p.p.m. en acetillicoclavina. Estas señales se pueden justificar como resonancias de un protón geminal a CH_3COO en C5.

La distorsión del anillo B (página 211) justifica la multiplicidad de la señal en virtud del acoplamiento de H5ec. con H4ax. de $J=5\text{Hz}$. El acoplamiento de H5ec. con H6ec. es del orden de $J\sim 0\text{Hz}$ ($\theta\sim 90^\circ$).

La señal singlete a 3.6 p.p.m. en licoclavina se puede asociar a la señal singlete a 3.4 p.p.m. en desacetillicoclavina.

La multiplicidad se puede explicar asignando esta resonancia al protón ecuatorial geminal al grupo OH en C6. El acoplamiento de H6ec. con H5ec. y de H6ec. con H7ec. deben ser pequeños resultando una señal singlete a $1/2$ 3.5Hz tal como se muestra en (94) y (95).



La relación química de licoclavina y desacetillicoclavina se muestra en figura 113, página 250.

Este alcaloide aislado en este trabajo no ha sido comparado directamente con licoclavina aislada anteriormente

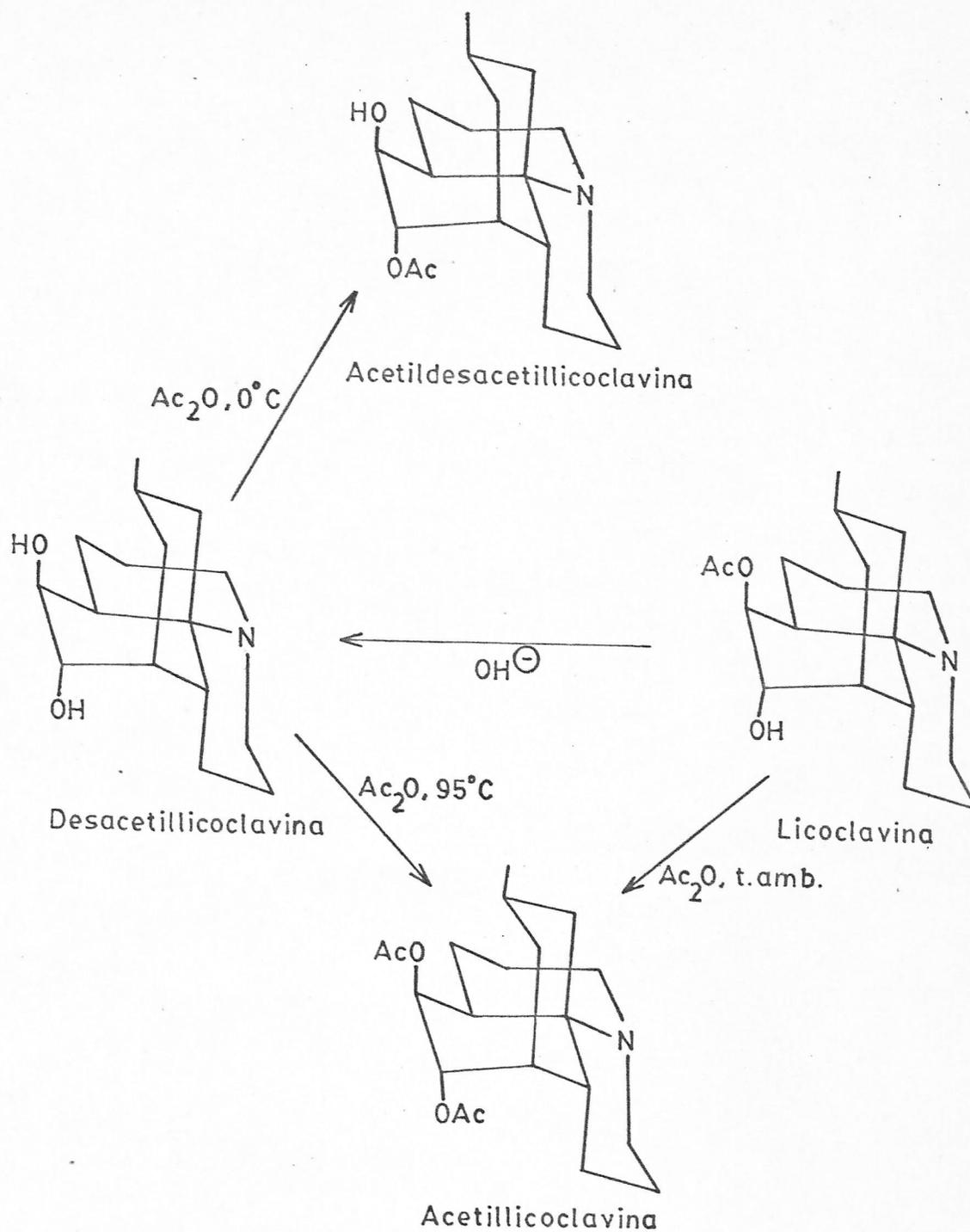


Figura 113. Relación química de licoclavina y desacetillicoclavina.

de L. clavatum var megastachyon¹⁶ y L. alpinum¹⁴³.

El esquema de fragmentación del ión molecular de licoclavina⁵¹ racionaliza ajustadamente el EM de la base aislada de L. paniculatum.

Utilizando las asignaciones de RMN¹³C de desacetillicoclavina (página 252) y el efecto de la acetilación de un grupo OH en los carbonos α y β se ha intentado asignar las señales correspondientes en el RMNC¹³ de licoclavina (figura 75. página 150). La acetilación de un grupo OH alcohólico provoca un desplazamiento α a más bajo campo (1.5 a 4 p.p.m.) y un desplazamiento β a mayor campo (1 a 5 p.p.m.) (145).

Los valores usados fueron 2.7 y -3 p.p.m. para efectos α y β respectivamente.

Dado que en RMN¹³C de licoclavina solamente aparecen 16 señales, hemos supuesto que hay 2 señales que corresponden a 2 carbonos cada una. Por el ancho de las señales y por el desplazamiento químico hemos asignado la señal 47.17 p.p.m. a C9 y C1 y la señal 42.59 p.p.m. a C14 y C8. Las señales a 170.61 y a 21.29 p.p.m. se pueden asignar a los carbonos del grupo acetato⁵⁶.

Las señales a 75.79 a 76.92 y a 24.14 p.p.m. se pueden asignar a C6, C5 y C4, respectivamente, por efecto de la acetilación del OH en C5.

La asignación del resto de las señales concuerda, en

general, con las proposiciones de Ayer⁵⁶ y con las asignaciones en desacetillicoclavina. En la figura 114 y en la tabla 17 se muestran las asignaciones para RMN¹³C de licoclavina.

Tabla 17
Asignaciones de RMN¹³C de licoclavina.

$\delta^{13}\text{C}$ desacetil- licoclavina	$\delta_{\text{cal.}}$	$\delta_{\text{obs.}}$	$\Delta(\delta_{\text{obs.}} - \delta_{\text{cal.}})$	$\delta^{13}\text{C}$ licocla- vina.		
C1	47.17			47.17		
C2	20.31			20.13		
C3	23.93			26.25		
C4	26.66	-3.0	23.6	24.14	0.5	24.14
C5	74.70	2.7	77.4	76.92	-0.5	76.92
C6	78.50	-3.0	75.50	75.79	0.2	75.79
C7	40.33					40.53
C8	42.67					42.59
C9	47.34					47.17
C10	26.85					26.76
C11	29.10					27.64
C12	44.02					44.62
C13	55.30					54.89
C14	44.82					42.59
C15	23.04					22.75
C16	24.11					24.31
CH ₃						21.29
CO						170.61

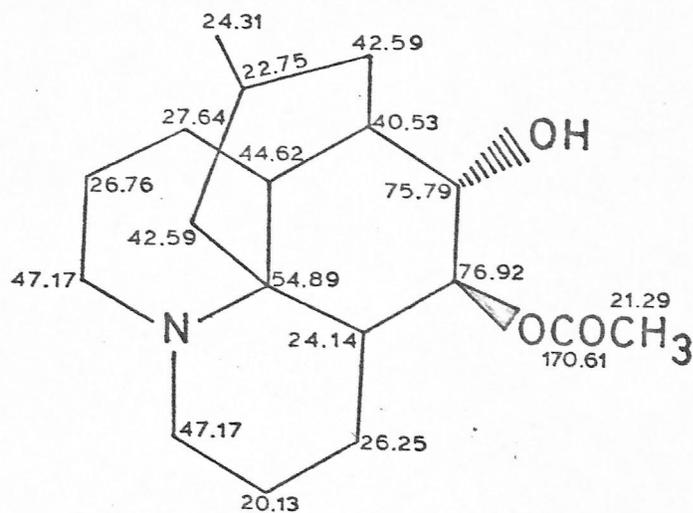


Figura 114. Asignaciones de RMN¹³C de licoclavina.

3.5. ASIGNACION ESTRUCTURAL DE FLABELIDINA

El peso molecular 288 de flabelidina y la forma de su EM (figura 78, página 152) sugieren fuertemente que la base pertenece a la familia de alcaloides de Lycopodium con dos átomos de nitrógeno del tipo de licopodina o licodina⁽¹¹⁾

La funcionalidad de la base deducida de su IR (figura 76, página 151) indica la presencia de un grupo OH o NH ($3.400-3.200\text{ cm}^{-1}$) un carbonilo de amida ($1,660\text{ cm}^{-1}$) un enlace doble carbono-carbono (1.640 cm^{-1}).

El análisis del espectro RMNP (figura 77, página 151) confirma la existencia del grupo N-acetilo (2.2 p.p.m. s, 3H). Por otro lado el desplazamiento químico de la señal a 4.5 p.p.m. , que varía con la concentración y desaparece con D_2O o CD_3COOD , permite aceptar la existencia de un átomo de hidrógeno muy lábil, probablemente del tipo NH. La ausencia de señales a bajo campo asignables a protones olefínicos sugiere que el enlace doble es tetrasustituído.

La banda observable en el UV a 235 nm ($\log.\epsilon\ 3.76$) es decisiva en la presunción que el alcaloide corresponde a la base conocida como flabelidina¹⁴⁵ (97) de la figura 115.

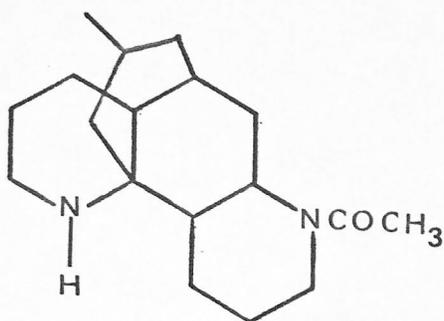


Figura 115. Estructura de flabelidina.

Aunque no ha sido posible una comparación directa con muestra auténtica de flabelidina, su identidad parece ser definitiva dada la concordancia de sus respectivos antecedentes espectrales.

Flabelidina ha sido aislada previamente sólo en la especie L. flabelliforme¹⁴⁵.

El esquema de fragmentación del ión molecular de flabelidina¹⁴⁵ racionaliza adecuadamente el EM de la base aislada de L. paniculatum.

REFERENCIAS.

1. a) Conolly, J.D. (1971) en "Terpenoids and Steroids".
The Chemical Society Burlington House, London, 1,
p. 196-197.
b) ibid (1972), 2, p. 179
c) ibid (1973), 3, p. 228-229
2. Burnell, R.H., Mo, L y Moinas, M (1972), Phytochemistry,
11, 2815.
3. White, E y Towers, G.H.N. (1973), Phytochemistry, 6, 663.
4. Lytle, T.F. y Sever, J.R. (1973), Phytochemistry, 12, 623.
5. MacLean, D.B. (1968), en "The Alkaloids". Ed. por Manske,
R.H.F. , Academic Press, New York, 10, p. 305.
6. MacLean, D.B. (1970), en "Chemistry of the Alkaloids". Ed.
por Pelletier, S.W. Van Nostrand Reinhold Co., New York,
p. 469
7. MacLean, D.B. (1973), en "The Alkaloids" Ed. por Manske,
R.H.F. Academic Press, New York y London, 14, p. 347.
8. Ayer, W.A. (1976), Comunicacion personal
9. Harrison, W.A. y MacLean, D.B. (1960), Chem and Ind.
(London), 261.
10. Harrison, W.A. , Curcumelli-Rodostamo, M., Carson, D.F.
Barclay, L.R.C. y MacLean, D.B. (1961), Can. J. Chem.,
39, 2086.

11. Wiesner, K., Ayer, W.A., Fowler, L.R. y Valenta, Z. (1957), Chem. and Ind. (London), 564.
12. Rao, G.S., Sinsheimer, J.E. y McIlhenny, H.M. (1972), Chem. and Ind. (London), 537.
13. a) Engler, A. (1954), "Syllabus der Pflanzenfamilien". Ed por Melchior, H., 12^a ed., Borntrager, Berlin, p. 275.
b) Looser, G. (1961), "Los pteridófitos o helechos de Chile". Revista Universitaria. Universidad Católica de Chile., p. 213-262.
14. Manske, R.H.F. y Marion, L. (1942), Can. J. Research. B 20, 87.
15. Johns, S.R., Lamberton, J.A. y Sioumis, A.A. (1969), Austr. J. Chem., 22, 1317.
16. Ayer, W.A. y Law, D.A. (1962), Can. J. Chem., 40, 2088
17. Ayer, W.A., Altenkirk, B., Valverde-López, S., Douglas, B., Raffauf, R.F. y Weisbach, J.A. (1968), Can. J. Chem., 46, 15.
18. Burnell, R.H., Mootoo, B.S. y Taylor, D.R. (1960), Can. J. Chem., 38, 1927.
19. Deulofeu, V. y Delanghe, J. (1942), J. Am. Chem. Soc., 64, 968.
20. Burnell, R.H. y Mootoo, B.S. (1961), Can. J. Chem. 39, 1090.

21. Burnell, R.H., Chin, C.G., Mootoo, B.S. y Taylor, D.R. (1963), Can. J. Chem. 41, 3091.
22. Inubushi, Y., Ishii, H., Yasui, B., Harayama, T., Hosokawa, M., Nishino, R., y Nakahara, Y. (1967), Yakugaku Zasshi, 87, 1394.
23. Ayer, W.A., Masaki, N., Nkunya, D.S. (1968), Can. J. Chem., 46, 3631.
24. Burnell, R.H. (1959), J. Chem. Soc., 3091
25. Ayer, W.A., Altenkirk, B., Masaki, N. y Valverde-López, S. (1969), Can. J. Chem., 47, 2449.
26. Conroy, H. (1960), Tetrahedron Letters, N°10, 34
27. Ayer, W.A. e Iverach, G.G. (1960), Can. J. Chem. 38, 1823.
28. Anet, F.A. y Rao, M.V. (1960), Tetrahedron Letters N°20, 9.
29. Inubushi, Y., Ishii, H., Yasui, B., Hashimoto, M. y Harayama, T. (1966), Tetrahedron Letters, 1537.
30. Inubushi, Y., Ishii, H., Yasui, B., Hashimoto, M. y Harayama, T. (1968), Chem. Pharm. Bull. 16, 82.
31. Inubushi, Y., Ishii, H., Yasui, B., Hashimoto, M. y Harayama, T., (1968), Chem. Pharm. Bull., 16, 92.
32. Inubushi Y., Ishii, H., Yasui, B. y Harayama, T (1968), Chem. Pharm. Bull., 16, 101.

33. Inubushi Y., Ishii, H., Yasui, B. y Harayama, T., (1966), Tetrahedron Letters, 1551
34. Ayer, W.A., Jenkins, J.K., Valverde-López, S. y Burnell, R.H. (1967), Can. J. Chem., 45, 433.
35. Ayer, W.A., Jenkins, J.K., Piers, K y Valverde-López, S. (1967), Can. J. Chem., 45, 445.
36. Ayer, W.A. y Piers, K. (1967), Can. J. Chem., 45, 451
37. Ayer, W.A., Iverach, G.G., Jenkins, J.K., Masaki, N. (1968), Tetrahedron Letters, 4597.
38. Valenta, Z., Yoshimura, H., Rogers, E.F. Ternbah, M. y Wiesner, K. (1960), Tetrahedron Letters, N°10, 26.
39. Yoshimura, H., Valenta, Z y Wiesner, W. (1960), Tetrahedron Letters, N°12, 14.
40. Anet, F.A., Haq, M.Z., Khan, N.H., Ayer, W.A., Hayatsu, R., Valverde-López, S., Deslongchamps, P., Reiss, W., Ternbah, M., Valenta, Z. y Wiesner, K., (1964), Tetrahedron Letters, 751.
41. Ayer, W.A., Fukazawa, Y., Singer P.P., y Altenkirk, B. (1973), Tetrahedron Letters, 5045
42. Ayer, W.A. e Iverach, G.G. (1960), Tetrahedron Letters, N°10, 19
43. Ayer, W.A., Berezowsky, J.A. e Iverach, G.G. (1962), Tetrahedron, 18, 567.

44. Ayer, W.A., Habgood, T.E., Deulofeu, V. y Juliani, H.R. (1965), Tetrahedron, 21, 2169.
45. Szarek, W.A., Adams, K.H.A., Curcumelli-Rodostamo, M., MacLean, D.B. (1964), Can.J.Chem, 42, 2584.
46. Curcumelli-Rodostamo, M. y MacLean, D.B. (1962), Can. J. Chem. 40, 1068.
47. Ayer, W.A. e Iverach, G.G. (1964), Can. J. Chem. 42, 2514.
48. Ayer, W.A., Altenkirk, B., Burnell, R.H. y Moinas, M., (1969), Can. J. Chem., 47, 449
49. Ayer, W.A. y Masaki, N. (1971), Can. J. Chem., 49, 524.
50. Braekman, J.C., Hootele, C. y Ayer, W.A., (1971), Bull. Soc. Chim., 80, 83.
51. MacLean, D.B. (1963), Can. J. Chem., 41, 2654.
52. Ayer, W.A. Jenkins, J.K. y Valverde-López, S. (1964), Tetrahedron Letters, 2201.
53. MacLean, D.B., Curcumelli-Rodostamo, M., (1966), Can. J. Chem., 44, 611.
54. Ayer, W.A., Bowman, W.R., Kebarle, P. y Burnell, R.H. (1965), Can. J. Chem. 43, 328.
55. a) Budzikiewicz, H., Djerassi, C. y Williams, D.H., (1964), "Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds" Holden-Day, San Francisco, p.73.

- b) Budzikiewicz, H., Djerassi, C. y Williams, D.H., (1964). "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry" Vol 1, Alkaloids, Holden-Day, San Francisco, p.203-211.
56. Nakashima, T.T., Singer, P.P., Browne L.M. y Ayer, W.A., (1975), Can. J. Chem, 53, 1936.
57. Chin-You, N.M., (1971), M.Sc. Thesis, (Chemistry), McMaster University.
58. Wenkert, E., Bindra J.S., Chang, C., Cochran, D.W., y Schell, F.M. (1974), Acc. of Chem. Res., 7, 46.
59. Crain, W.O., Wildman, W.C., Roberts, J.D. (1971), J. Am. Chem. Soc., 93, 990
60. Dalling, D.K., y Grant, D.M. (1967), J. Amer. Chem. Soc., 89, 6612.
61. Roberts, J.D., Weigert, F.J., Kroschwitz, J.I. y Reich, H.J. (1970), J. Am. Chem. Soc., 92, 1338.
62. Henderson, D.R., Stonner, F.W., Valenta, Z. y Wiesner, K. (1954), Chem. and Ind. (London), 544.
63. Henderson, D.R., Stonner, I.W. Valenta, Z. y Wiesner, K., (1954), Chem and Ind (London), 852.
64. Wiesner, K., Valenta, Z., Ayer, W.A., Fowler, L.R. y Francis, J.E. (1958), Tetrahedron Letters, N°4, 87.
65. Wiesner, K., Francis, J. E., Findlay, J.A. y Valenta, Z.

- (1961), Tetrahedron Letters, 187.
66. Ho, T-L. (1969), Tetrahedron Letters, 1307
67. Przybylska, M. y Marion. L (1957), Can. J. Chem., 35, 1075.
68. Nishio, K., Fujiwara, T., Tomita, K., Ishii, H., Inubushi, Y. y Harayam, T. (1969), Tetrahedron Letters, 861
69. Anet, F.A.L. (1960), Tetrahedron Letters, N°20, 13.
70. Burnell, R.H. y Taylor, D.R. (1961), Tetrahedron, 15, 173.
71. Rogers, D., Quick, A. y Mazhar-VI Haque, (1974) J.C.S. Chem. Comm., 522.
72. Ayer, W.A., Altenkirk, B. y Fukasawa, Y. (1974), Tetrahedron, 30, 4213.
73. Burnell, R.H., Chapelle, A., Fischer, J. y Ricard, L. (1974), J.C.S. Chem.Comm., 391
74. Horeau, A. (1961), Tetrahedron Letters, 506.
75. Horeau, A. (1962), Tetrahedron Letters, 965.
76. Horeau, A y Kagan, H.B. (1964), Tetrahedron 20, 2431.
77. Horeau, A. y Novaille, A. (1966), Tetrahedron Letters, 3953.
78. Brooks, C.J.W. Y Gilbert, J.D. (1973), J.C.S. Chem. Comm, 194.

79. Brewster, J.H. (1961), Tetrahedron, 13, 106.
80. Brewster, J.H. (1959), J. Am. Chem. Soc., 81, 5475, 5483 y 5493.
81. Murphy, W.S. (1975), J. Chem. Ed. 52, 774.
82. Moffitt, W., Woodward, R.B., Moscovitz, A., Klyne, W. y Djerassi, C. (1961), J. Am Chem. Soc., 83, 4013.
83. Djerassi, C. (1961), Tetrahedron, 13, 13. .
84. Klyne, W. (1961), Tetrahedron, 13, 29. .
85. Djerassi, C. (1960), "Optical Rotatory Dispersion" McGraw-Hill, New York, p. 41-129
86. Snatzke, G. (1967), "Optical Rotatory Dispersion and Circular Dicroism in Organic Chemistry" Heyden of Son Ltda. Spectrum House, Aldertori Cresceut, London, p. 208-210
87. Crabbé, P. (1965), "Optical Rotatory Dispersion and Circular Dicroism in Organic Chemistry" Holden-Day p. 103-104.
88. Djerassi, C., y Klyne, W. (1957) J. Am. Chem. Soc., 79, 1506.
89. Djerassi, C., Osiecki, J., Riniker, R. y Riniker, B. (1958), J. Am. Chem. Soc., 80, 1216. .
90. Cookson, R.C. (1954), J. Chem. Soc., 282.
91. Jones, R.M., Ramsey, D.A, Herling F. y Dobriner, K. (1952), J. Am. Chem. Soc., 74, 2828.

92. Ayer, W.A., Berezowsky, J.A. y Law, D.A. (1963), Can. J. Chem., 41, 649
93. a) Loyola, L.A., (1974). Tesis de Licenciatura en Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
b) Castillo, M., Loyola, L.A., Morales, G., Singh, I., Calvo, C., Holland, H. y MacLean, D.B. (1976), Can. J. Chem., 54, 2893.
94. Loyola, L.A. Tesis de Doctorado (en preparación).
95. Valdés, P.E. (1976). Tesis de Licenciatura en Química. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
96. Morales, G., (1974). Tesis de Licenciatura en Química Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
97. Sixma, F.L. y Wynberg, H., (1964), "A manual of Physical Methods in organic Chemistry", John Wiley and Sons, New York, p. 40-42
98. Loev, B. y Goodman, M. (1967), Chem and Ind. (London) 2026.
99. Wolf, F.J. (1969), "Separation Methods in Organic Chemistry and Biochemistry", Academic Press, New York and London, p.79-99.
100. Hodgman, C., Weast, R y Selby, S., (1959), "Handbook of Chemistry and Physics" 40^aed. Chemical Rubber Publishing Co., USA, 1715.
- 101 Weast, R. y Selby, S. (1966) "Handbook of Chemical and Physics". 47^aed. Chemical Rubber Co., USA, p. D. 79.

102. Fieser, L.F. y Fieser, M. (1967) " Reagents for Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc. New York, p. 142
103. ref. 102 p. 145.
104. Stahl, E. (1969), "Thin-Layer Chromatography", Springer-Verlag, New York Inc., p. 873.
105. Nakanishi, K. (1962) "Infrared Absorption Spectroscopy: Practical". Holden-Day, Inc. San Francisco
106. Bellamy, L.J. (1966), "The infra-red Spectra of Complex molecules", Methuen and Co. Ltd. London.
107. Bovey, F.A. (1967), "n.m.r. data table for organics compounds", vol. 1, Interscience Publisher John Wiley and Sons Inc., New York.
108. Dyer, T.R. (1965), "Applications of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds", Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New York.
109. Jackman, L.M. y Sternhell, S. (1969), "Applications of Nuclear Magnetic Resonance in Organic Chemistry", 2^aed., Pergamon Press, Oxford.
- 110 Hills, R.D. Y Meakins, G.D. (1958), J. Chem. Soc., 760.
111. Ma, J.C.N. Y Warnhoff, E.W., (1965), Can J. Chem. 43, 1849.
112. Jones, R.N., Cole, A.R.H. y Nolin, B., (1952) J. Am. Chem. Soc., 74, 5662.

113. French, W.N. y MacLean, D.B. (1961) Can J. Chem. 39, 2100.
114. Albert, A y Clark, J. (1964) J. Chem. Soc., 1666.
115. Vogel, A.I. (1962) "Elementary Practical Organic Chemistry, Longmans London, p. 396.
116. a) Reinecke, M.G. (1964), J. Org. Chem., 29, 299.
b) Denton, D.A., McQuillin, F.J. y Simpson, P.L. (1964), J. Chem. Soc., 5535
117. a) Wood, H.B., Stomberg, V.L. Kersztesy, J.C. y Horning, E.C. (1954). J. Am. Chem. Soc., 76, 5689.
b) Mayor, P.A. y Meakins, G.D. (1960), J. Chem. Soc., 2792.
118. Kubota, T. y Takeda, K. (1960), Tetrahedron, 10, 1.
119. Ref. 102, p. 583-584
120. Weigert, F.J. y Roberts, J. D. (1970) J. Am. Chem. Soc., 92, 1347.
121. Veith, H.J., Hesse, M. y Schmid, H. (1970), Helv. Chim. Acta., 53, 1355
122. Chin-You, N.M., MacLean, D.B., Prakash, A. y Calvo, C. (1971) Can. J. Chem., 49, 3240.
123. Castillo, M., Morales, G., Loyola, L.A. Singh, I., Calvo, C., Holland, H.L. y MacLean, D.B., (1975), Can. J. Chem., 53, 2513.

124. Eliel, E.L., (1962). Stereochemistry of Carbon compounds, McGraw-Hill, New York, p. 250.
125. Ellis, G. y Jones, R.G. (1972), J.Chem. Soc. Perkin Transactions II, 437.
126. Levy, G.C. y Nelson, G.L. (1972), "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists", John Wiley and Sons. Inc., New York, p. 54.
127. Cristl, M., Reich, H.J. y Roberts, J.D. (1971) J. Am. Chem. Soc., 93, 3463 .
128. Breitmaier, E. y Voelter, W. (1974) "¹³C NMR Spectroscopy", Verlag Chemie, p. 122-123.
129. Ayer, W.A. y Altenkirk, B. (1969), Can. J. Chem., 47, 499
130. Inubishi, Y., Harayama, T., (1968) J.C.S. Chem. Com., 1138
131. Osina, E.L., Mastryukov, V.S., Vilkov, L.V. y Belikova, N. (1976), J.C.S. Chem. Comm., 12 .
132. ref. 108, p. 115-118.
133. Scott, A.I. (1964), "Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press, London, p. 58-60.
134. ref. 115, p. 389.
135. Mićović, V.M. y Mihailović, M.L. (1953), J. Org. Chem., 18, 1198.

136. Angyal, S.J. y McDonald, C.G. (1952), J. Chem. Soc., 686.
137. Lemieux, R.U., Stevens, J.D. y Fraser, R.R. (1962), Can. J. Chem., 40, 1955.
138. Halls, P.J., Jones, R.A.Y., Katritzky, A.R., Snarey, M. y Trepanier, D.L. (1971). J. Chem. Soc. (B), 1320 y referencias mencionadas.
139. Booth, H. (1966), Tetrahedron, 22,615
140. Uskovic, M., Bruderer, H., von Planta, C., Williams, T. y Brossi, A. (1964), J. Am. Chem. Soc., 86, 3364.
141. Chivers P.J. y Crabb, T.A. (1970), Tetrahedron, 26, 3389.
142. Cahill, R., Cookson, R.C. y Crabb, T.A. (1969), Tetrahedron, 25, 4681.
143. Miller, N. Mees, F. y Braekman, J.C. (1971) Phytochemistry, 10, 1931.
144. ref. 128, p. 142.
145. Alam, S.N., Adams, K.A.H. y MacLean, D.B. (1964), Can J. Chem., 42, 2456.