

UCH-FC
11A6-A
M 971
C.1

1981

11

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

LA ESTRUCTURA DE PANICULINA

Tesis

ORLANDO MUÑOZ MUÑOZ

1981

2577

10

1 10 1 01 1 2

LA ESTRUCTURA DE PANICULINA



Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias con mención en Química

Facultad de Ciencias Básicas
y
Farmacéuticas
por

ORLANDO MUÑOZ MUÑOZ

Septiembre 1981

Director de tesis: Dr. Mariano Castillo

.

.

x f

f f

f

f

ff

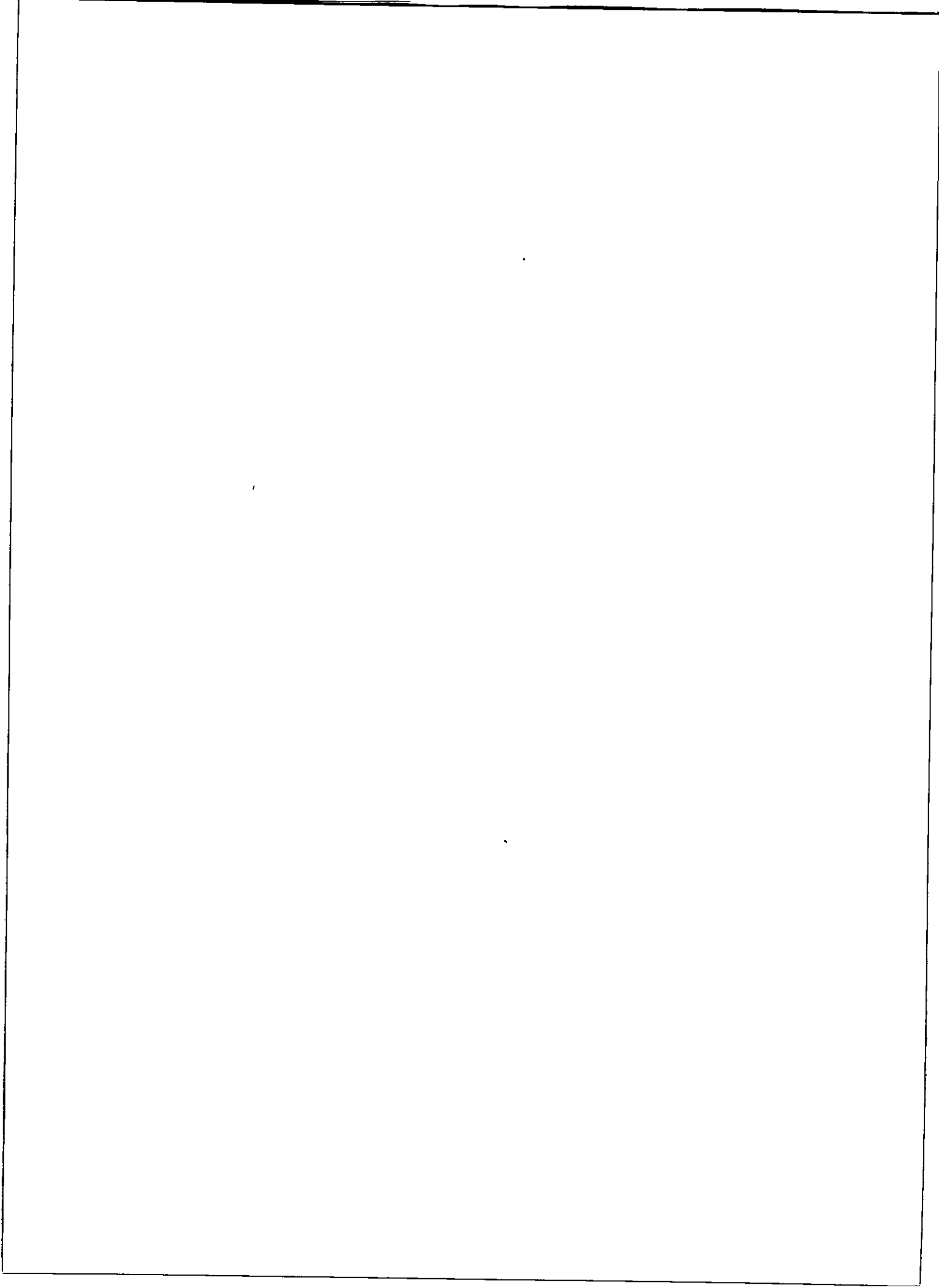
.

f c ff

.

. 7111

Al grupo del laboratorio de Productos Naturales



AGRADECIMIENTOS

Mis más profundos agradecimientos al Dr. Maria
no Castillo, Director de este Tesis, amigo y colega, por su
apoyo crítico y por entregarme una formación profesional en
investigación científica.

2 1

3 1 2

(1 2

INDICE DE MATERIAS

	pág.
1. Introducci3n	1
2. M3todos y Resultados	24
2.1 Aparatos, M3todos y Materiales	24
2.2 Recolecci3n del material bot3nico	27
2.3 Extracci3n y aislaci3n de los al- caloides. Recolecci3n 1976	28
2.3.1 Obtenci3n del crudo de alcaloides	28
2.3.2 Aislaci3n de los alcaloides	29
2.4 Reacciones de oxidaci3n	38
3. Discusi3n	54
4. Conclusiones	85
5. Bibliograf3a	87
6. Ap3ndice	93

LISTA DE FIGURAS

	pág.
FIGURA 1. Biogénesis de alcaloides de licopodio	2
FIGURA 2. Biogénesis de alcaloides de <i>L. lucidulum</i>	4
FIGURA 3. Fragmentación alcaloides tipo Licopodina para paniculina	9
FIGURA 4. Transformaciones químicas en paniculina	12
FIGURA 5. RMNP de paniculina	15
FIGURA 6. Estructura de paniculina y P ₄	14
FIGURA 7. RMNP de P ₄	15
FIGURA 8. Absorción en R.M.N.P. de protones vecinos a nitrógeno	17
FIGURA 9. Acoplamiento de los protones en ciclohexano	18
FIGURA 10. Relación de los valores de la constante de acoplamiento y el par electrónico del nitrógeno en piperidina	20
FIGURA 11. Proyección Newman para los carbonos 1 y 9 de P ₄	11
FIGURA 12. Características espectroscópicas de LC ₁ (desacetilpaniculina)	46
FIGURA 13. Propiedades espectroscópicas de LC ₃	47
FIGURA 14. Espectro de R.M.N.P. (400 M Hz) de LC ₃ -LC ₁	48
FIGURA 15. Espectro de R.M.N.P. (400 M Hz) de LC ₃ TFA	49

	pág.
FIGURA 16. Propiedades espectroscópicas de Acetil-paniculina	50
FIGURA 17. Propiedades espectroscópicas de la desacetil paniculina	51
FIGURA 18. Separación de los alcaloides de <i>Lycopodium confertum</i>	36
FIGURA 19. Fraccionamiento de los alcaloides de <i>Lycopodium confertum</i>	37
FIGURA 20. a) LC ₃ con dimetilsulfóxido/anhidrido trifluoacético	52
b);c) Hidroxicetona de LC ₁	52
FIGURA 21. a) LC ₃ + Reactivo de Jones	53
b) LC ₃ + Reactivo de Sarett	53
c) LC ₃ + complejo CrO ₃ ·2py	53
FIGURA 22. Espectro de R.M.N.P. (400 M Hz) de Acetildihidrolipodina y P ₄	56
FIGURA 23. Acoplamiento del hidrógeno geminal al OH en C-10	59
FIGURA 24. Estructuras alternativas para el LC ₃	60
FIGURA 25. LC ₃ -TFA	61
FIGURA 26. Acoplamiento del hidrógeno 9axial en LC ₃ -TFA	62
FIGURA 27. a) Espectro de R.M.N.P. (60 M Hz) de dihidrolipodina	65
b) Dihidrolipodina con Eu(dpm) ₃	65
c) Espectro de 4,5,6,6,9,9,10,10 octadeutero dihidrolipodina	65

	pág.
FIGURA 28. a) Espectro de R.M.N.P. de Fawcetina	66
b) Fawcetina con $\text{Eu}(\text{dpm})_3$	66
FIGURA 29. Hidroxicetona de LC_1 con $\text{Eu}(\text{dpm})_3$	68
FIGURA 30. LC_3 con $\text{Eu}(\text{dpm})_3$	69
FIGURA 31. Espectro de R.M.N. ^{13}C de acetildihidroli- copodina	72
FIGURA 32. Espectro de R.M.N. ^{13}C de LC_3	73
FIGURA 33. Interacción skew pentano y conformación sinclinal	75
FIGURA 34. Conformaciones γ	76

LISTA DE TABLAS

	pág.
TABLA 1. R M N P de paniculina a 220 M Hz	13
TABLA 2. R M N P de P ₄ a 220 MHz	14
TABLA 3. Comparación absorción LC ₃ y LC ₃ -TFA; LC ₁ -TFA	62
TABLA 4. R M N ¹³ C para LC ₃ y acetildihidroli- copodina	71
TABLA 5. Valores de ¹³ C experimental y calcula <u>d</u> do para acetildihidrolicopodina y LC ₃	77
TABLA 6. Reacciones de oxidación de LC ₃	78
TABLA 7. Reacciones de oxidación con reactivo de Jones	79
TABLA 8. Oxidación de OH (2°) con reactivo de Sarett	80
TABLA 9. Oxidación de alcoholes con CrO ₃ -2py	81

RESUMEN

Del estudio químico de *L. confertum*, se han aislado un total de 14 alcaloides, dos de los cuales constituyen las bases mayoritarias de la especie: deacetilpaniculina (LC₁) y paniculina (LC₃).

Se revisó la estructura de este último, mediante correlaciones espectroscópicas y químicas y se obtuvo los espectros de RMNP (400 MHz) y de ¹³C (100 MHz) para una serie de alcaloides y derivados muy relacionados a LC₃; se aclaran las asignaciones y multiplicidad de las señales en RMNP de este último, particularmente las zonas vecinas a nitrógeno, principal región de conflicto de la estructura primitiva.

La nueva estructura para LC₃ y derivados se corroboró con espectros de RMNP de alta resolución con anhídrido trifluoroacético reactivos de desplazamiento químico y con espectros de RMN¹³C, que demuestran la total consistencia para la nueva fórmula.

Se discute igualmente, la anormal resistencia de un alcohol secundario de LC₃ a su oxidación, ante variados reactivos de oxidación y condiciones experimentales descritos en la literatura.

INTRODUCCION

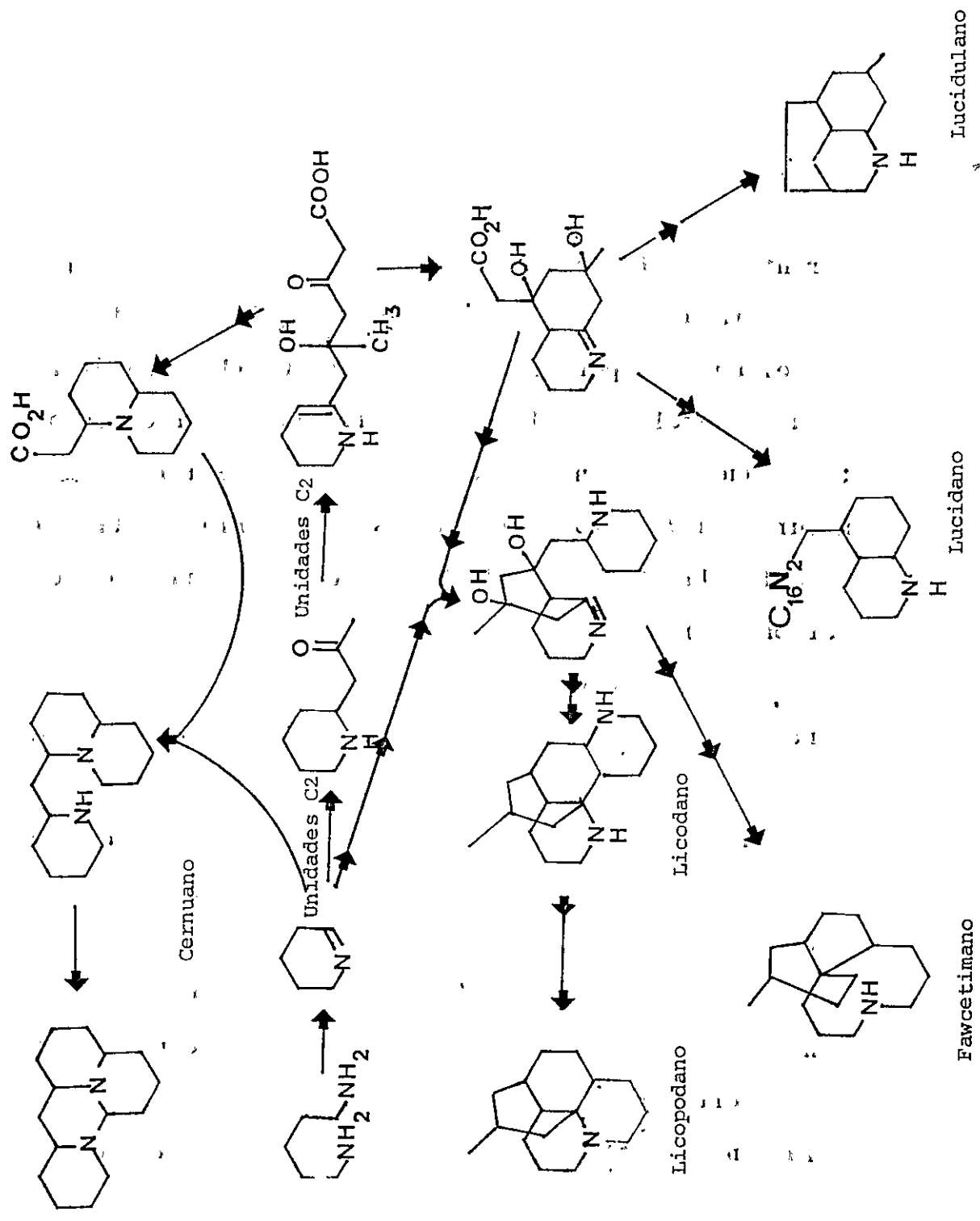
El estudio químico de los metabolitos secundarios de la familia Lycopodaceas se ha desarrollado en forma intensa durante los últimos veinte años. Este interés se justifica considerando la compleja naturaleza química de los alcaloides elaborados por especies de esta familia, su distribución botánica exclusiva, la complejidad de los procesos biosintéticos que conducen a su elaboración, como asimismo por la naturaleza de otros metabolitos secundarios restringidos a esta familia (por ejemplo Triterpenos con anillos de siete carbonos¹.)

La existencia de nuevas técnicas e instrumentos (en particular, espectrometría de resonancia magnética nuclear de protones, de ¹³C de alta frecuencia y métodos de pulso) ha permitido en los últimos años reexaminar algunas especies ya estudiadas y dilucidar las estructuras de las bases minoritarias presentes en ella.

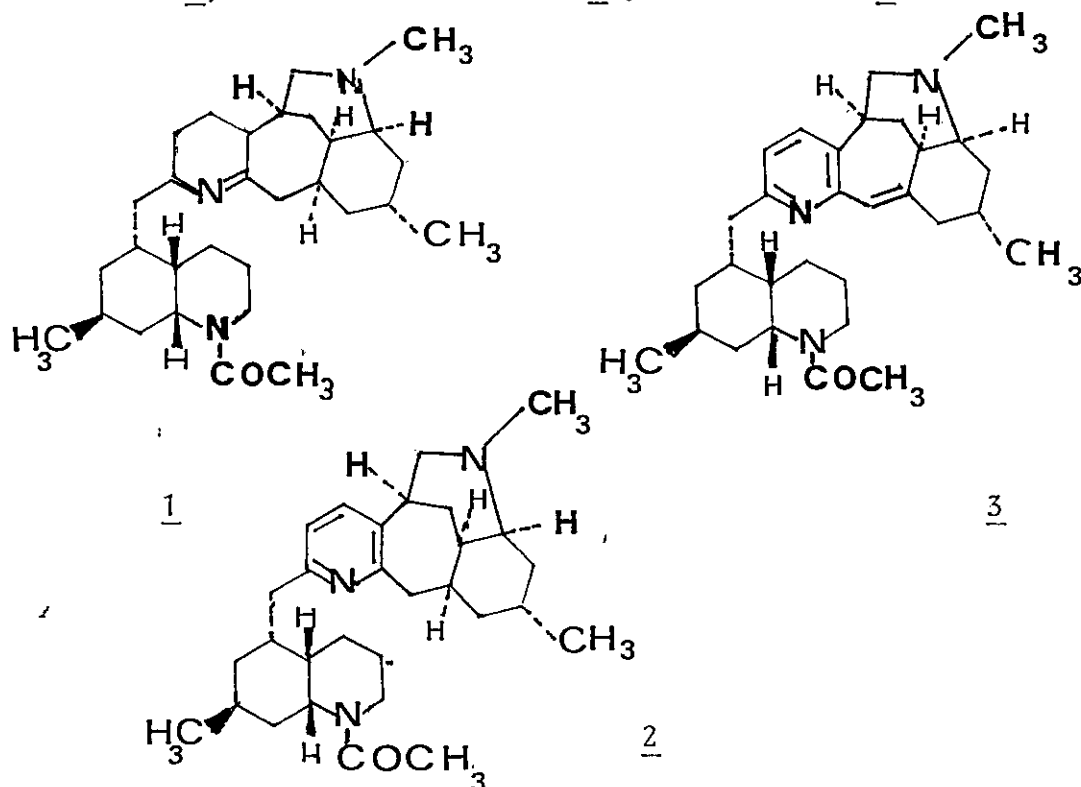
Estos estudios han revelado, en algunos casos, la presencia de compuestos minoritarios que parecen jugar un rol muy importante en la ruta biogénica que conduce a la elaboración de este grupo de alcaloides. En este sentido

FIG. 1

Biogénesis de alcaloides de Licopodio



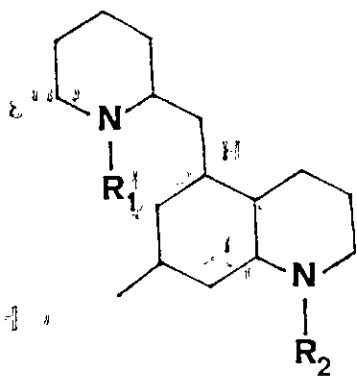
destacan por ejemplo los trabajos de Ayer² y Braekman³ en *L. lucidulum* y *L. phlegmaria* respectivamente. Ayer aisló tres bases nuevas con un distintivo tipo de esqueleto: lucidina B 1, dihidrolicolucina 2 y licolucina 3.



Característica saliente de estas nuevas bases la constituye el elevado número de carbonos que los componen (por ejemplo, licolucina: $C_{30}H_{43}N_3O$, y la presencia de tres átomos de Nitrógeno).

Los recientes trabajos de Braekman sobre las bases menores de *L. phlegmaria* y *L. megastachyum*⁴ marcan un notable aporte en nuevos esqueletos de potencial significado biogénico para los alcaloides elaborados por esta familia de plantas (Fig. 1). Son los casos de flegmarina 4 con sus derivados naturales 5 y megastaquina 6, una nueva base

pentacíclica que presenta como novedad un anillo y lactona sustituido.

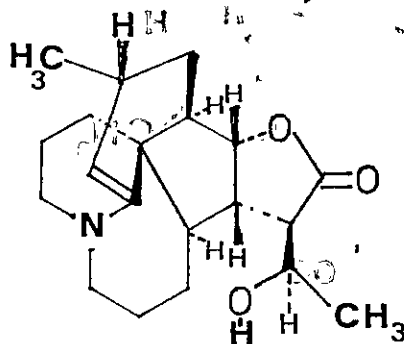


4 $R_1 = R_2 = H$ Flegmarina

5 $R_1 = CH_3CO$; $R_2 = CH_3$

$R_1 = H$ $R_2 = CH_3$

$R_1 = CH_3$ $R_2 = H$



6

Es interesante destacar, que las nuevas estructuras propuestas por Ayer para los alcaloides 1, 2 y 3 se pueden derivar formalmente uniendo dos unidades enantioméricas $C_{11}N$ a un anillo de piperidina como está ilustrado en la Fig. 2.

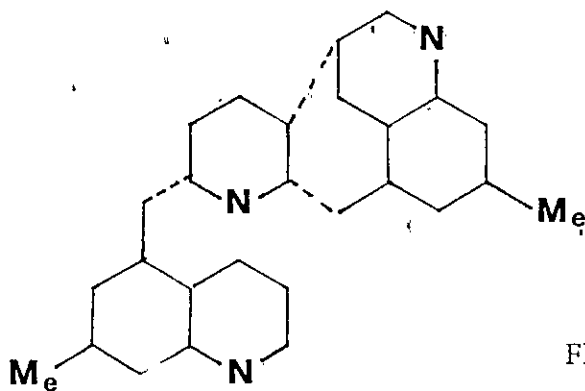


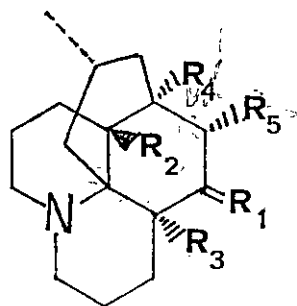
FIG. 2

BIOGENESIS ; ALCALOIDES DE *L. lucidulum*

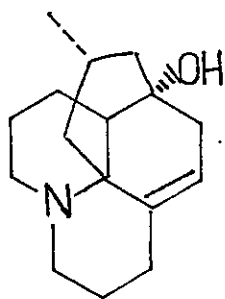
La fusión de sólo una unidad $C_{11}N$ a un anillo piperídico, conduce formalmente a phlegmarina 4 uno de los alcaloides minoritarios encontrados por Braekman en *L. phlegmaria*.

En nuestro laboratorio, los estudios químicos efectuados en *L. paniculatum* y *L. magellanicum*, condujeron a la dilucidación estructural de seis nuevos alcaloides de licopodio⁵⁻⁸, como asimismo a la identificación de numerosas bases ya descritas.

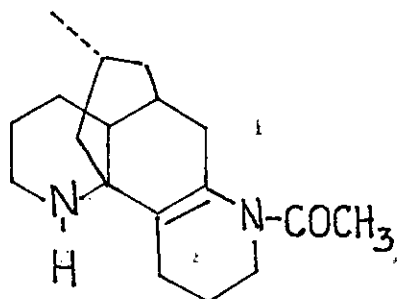
Desde *L. paniculatum*, se aisló paniculatina 16, paniculina 10, desacetilpaniculina 11 y anhidrodeacetilpaniculina 14 como bases nuevas y otros seis ya conocidos: licopodina 8, dihidrolicopodina 9, acetildihidrolicopodina 7, flabelidina 15, licoclavina 12 y deacetillicoclavina 13.



- 7 $R_1 = \beta\text{-OAc}, \alpha\text{H}; R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$
- 8 $R_1 = \text{O} \quad R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$
- 9 $R_1 = \beta\text{-OH}, \alpha\text{H}; R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$
- 10 $R_1 = \beta\text{-OAc}, \alpha\text{H}; R_2 = R_3 = R_5 = \text{H}$
 $R_4 = \text{OH}$
- 11 $R_1 = \beta\text{-OH}, \alpha\text{H}; R_2 = R_3 = R_5 = \text{H}$
 $R_4 = \text{OH}$
- 12 $R_1 = \beta\text{-OAc}, \alpha\text{H} \quad R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 $R_5 = \alpha\text{-OH}, \beta\text{H}$
- 13 $R_1 = \beta\text{-OH}, \alpha\text{H} \quad R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 $R_5 = \alpha\text{-OH}, \beta\text{H}$



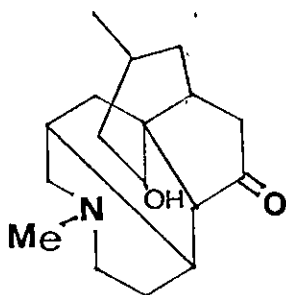
14



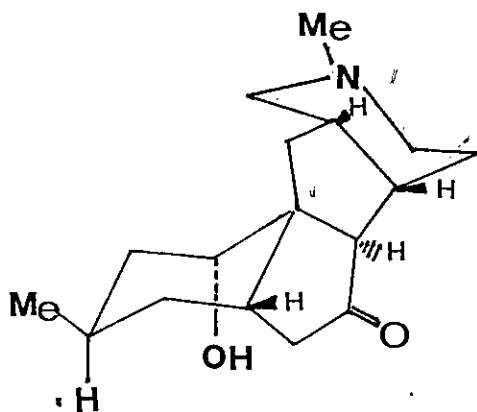
15

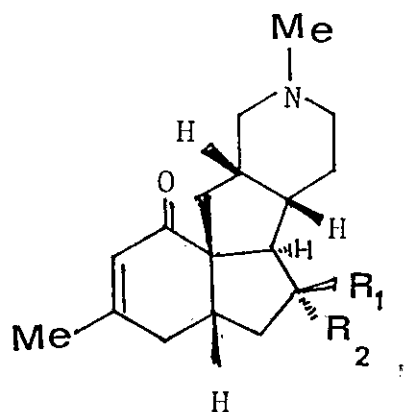
Paniculatina, 16, es representativo de un nuevo tipo de alcaloide de licopodio con un modelo estructural diferente a todos los esqueletos antes reportados⁵; otras tres bases (10, 11, 14) representan un tipo de esqueleto ya conocido, pero con una distribución de sus grupos funcionales en posiciones no antes reportadas⁸.

Por otra parte, desde *L. magellanicum*^{6,7} se aisló magellanina 17 y 5-dehidromagellanina 18 como bases nuevas, además de siete alcaloides ya conocidos; licopodina 8, N-metillicodina 19, licodina 20, acetilfawcetina 21, acetildihidrolicopodina 7, clavolonina 22 y α -obscurina 23.



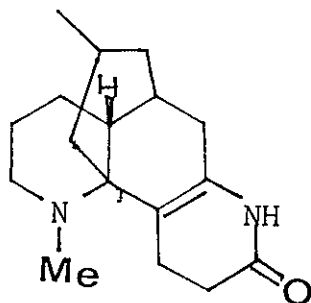
iii

16

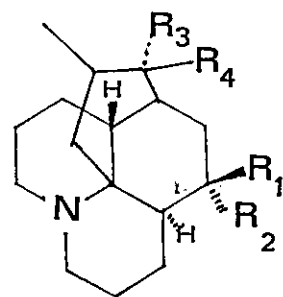


17 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$

18 $R_1 + R_2 = \text{O}$



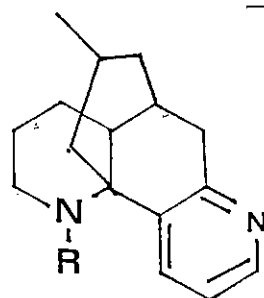
23



21 $R_1 = \beta\text{-OAc}, R_2 = \alpha\text{H}$
 $R_3 = \alpha\text{-OAc}, R_4 = \beta\text{H}$

22 $R_1 + R_2 = \text{O}$

$R_3 = \alpha\text{-OH}, R_4 = \beta\text{H}$

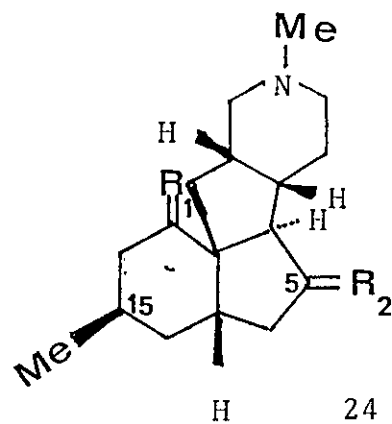


19 $R = \text{Me}$

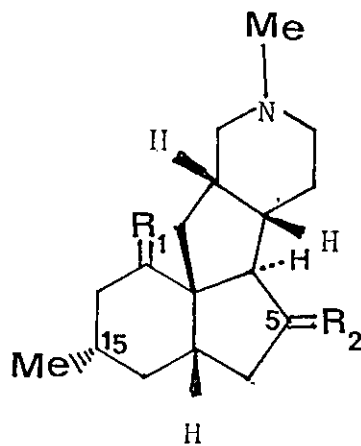
20 $R = \text{H}$

Magellanina, una cetona α, β -insaturada (λ máx 237 nm) resultó tener un esqueleto carbonato alicíclico idéntico al de "paniculatina", según lo reveló un análisis de difracción de rayos X de su metobromuro.

Se intentó relacionar químicamente, paniculatina y magellanina a través de la conversión a una dicetona común 24, por oxidación de 16 e hidrogenación-oxidación de 17. Los productos así obtenidos (24 y 25) diferían, sin embargo, en sus propiedades espectroscópicas y cromatográficas.



24 $R_1 = R_2 = \text{O}$



25 $R_1 = R_2 = \text{O}$

Loyola y colaboradores⁷, demostraron que la no equivalencia entre ambos productos (24 y 25) se debía a la configuración del carbono-15 en el producto sintético (25) proveniente de magellanina que por efecto de la reacción de hidrogenación adopta una orientación α . Con estos hechos se infirió que estando el metilo en C-15 tanto en paniculatina (como en su producto de oxidación) en el lado β de la molécula, ambos dicetonas debían ser epímeros en ese centro.

Las bases con esqueletos similares a paniculatina y magellanina muestran un modo típico y característico de fragmentación en el espectro de masas, pudiendo así diferenciar las de otros tipos de esqueletos estructurales⁹.

La dilucidación de la estructura de paniculina 10, otro de los nuevos alcaloides de *L. paniculatum* se basó principalmente en las siguientes evidencias químico-espectroscópicas¹⁰:

- a) Su fórmula $C_{18}H_{29}NO_3$, se determinó por espectroscopía de masas de alta resolución (M^+ 307,2134 encontrado, calculado 307,2142) y sus grupos funcionales se obtuvieron a partir del análisis de los espectros IR, (en KBr, Nujol y CCl_4). La naturaleza terciaria del Nitrógeno, se demostró por la absorción de $2700-2500\text{ cm}^{-1}$ del N^+H en el IR del bromhidrato de paniculina.
- b) El espectro de masas mostró pérdida de 57 unidades de masa como pico base, que constituye la característica de los

esqueletos tipo licopodina sin sustituyentes en el anillo D¹¹ (Fig. 3).

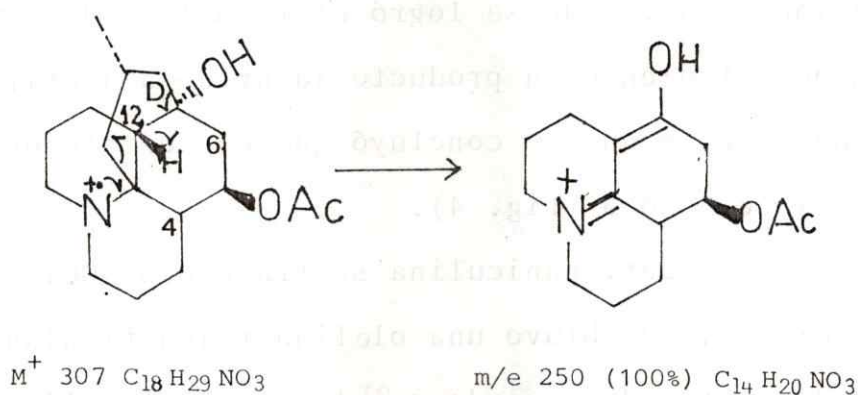


FIG. 3

FRAGMENTACION DE ALCALOIDES TIPO LICPODINA, PARA PANICULINA

En base a esta información, los grupos funcionales no pueden estar en carbono alguno del puente, que constituye el anillo D, ni tampoco en C-12, puesto que el Hidrógeno de esa posición forma parte de la fragmentación de esa unidad¹¹.

c) El IR de paniculina mostró una banda doble a 1250 cm^{-1} que se asoció al OCOCH_3 axial. El d.q. y la multiplicidad de esta señal en el espectro de R.M.N. es similar al reportado para acetildihidrolícopodina 7. Doble irradiación en esta señal, aseguran que el H geminal a este acetato, está acoplado a 2 hidrógenos, que resuenan a $\delta 1.41$ y 1.78 respectivamente, con $J = 6.0\text{ Hz}$ y que corresponden a interacciones ecuatorial-axial con los hidrógenos de los carbonos 4 y 6 respectivamente¹².

Este último hecho se confirmó tratando paniculina con pentacloruro de fósforo e hidrogenólisis del producto de reacción, con lo que se logró el reemplazo del OH por un hidrógeno obteniendo un producto idéntico a acetildihidroliscopodina, con lo que se concluyó que el acetato estaba axial y en el carbono 5 (Fig. 4).

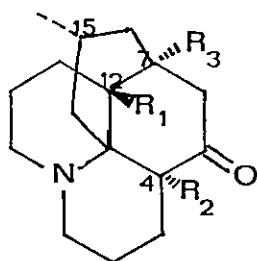
d) Cuando deacetilpaniculina se trató con SOCl_2 a temperatura ambiente, se obtuvo una olefina trisustituída cuyas propiedades están de acuerdo con la estructura 14 idéntico en todos sus aspectos al producto natural, anhídrodeacetilpaniculina P_5^{13} .

Esta deshidratación exige la presencia del OH y de un hidrógeno trans-diaxialmente orientados, situación observada para β -dihidroliscopodina 9 y que no se da en α -dihidroliscopodina.

e) La formación del diacetato de paniculina no muestra aparentemente el corrimiento en el espectro de R.M.N.P. de la señal correspondiente al hidrógeno gem. Esto último, llevó a postular que el OH deberían ser 3° . Además, el producto de hidrólisis de paniculina, por oxidación dio una hidroxiketona y no una dicetona.

Existen sólo 3 posiciones posibles para la ubicación de un OH terciario en este tipo de esqueleto: C-12, C-4 y C-7.

De las hidroxicetonas conocidas, la licodolina (OH en C-12) y la flabeliformina (OH en C-4) no correspondieron al producto de oxidación de paniculina. El espectro de masas describe una posible ubicación del OH terciario en C-15 por las razones ya mencionadas y adicionalmente, el espectro de RMNP de paniculina, presenta el doblete característico a alto campo del CH₃ acoplado a este hidrógeno. Este derivado de la paniculina por lo tanto no corresponde a ninguna de las hidroxicetonas descritas.



- 27 R₁ = OH; R₂ = R₃ = H; Licodolina
28 R₂ = OH; R₁ = R₃ = H; flabeliformina
29 R₃ = OH; R₁ = R₂ = H; hidroxicetona de paniculina

Finalmente, la resistencia de la paniculina a los reactivos convencionales de oxidación (reactivos de Jones y de Sarett) y la no aparición de la señal a bajo campo correspondiente a un H geminal asociada a la formación del diacetato ya mencionada, pareció confirmar la naturaleza terciaria del OH. Quedaba por lo tanto como única alternativa, la posición C-7. La Fig. 4 resume las transformaciones químicas efectuadas a partir de la paniculina, usando las estructuras aceptadas antes de realizar este trabajo.

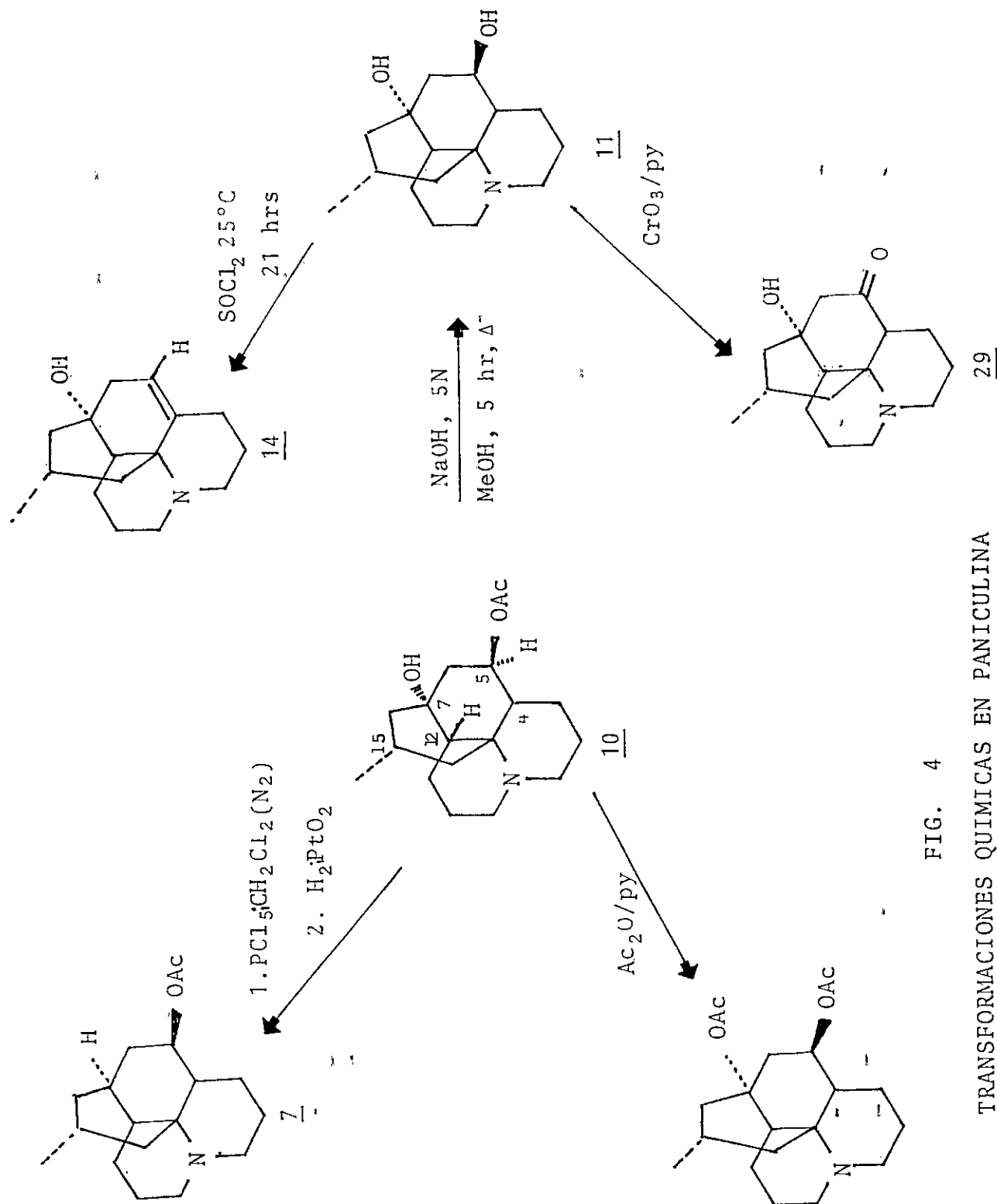


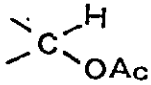
FIG. 4

TRANSFORMACIONES QUIMICAS EN PANICULINA
 (Estructuras no revisadas) 10



La principal dificultad, presentada por esta estructura, reside sin embargo, en la interpretación de su espectro de Resonancia Magnética Nuclear protónica (R M N P) a 220 MHz¹⁴. Particularmente crítica es la zona entre 3.0 y 4.0 ppm (Tabla 1, Fig. 5) en donde aparece un sexteto (tripleto desdoblado) a 3.45 ppm y un multiplete a 3.96 ppm que en esa oportunidad, no pudieron ser adecuadamente racionalizados.

TABLA 1
R.M.N.P. DE PANICULINA A 220 MHz

δ	Multipl.	Nº rel. de H.	J(Hz)	Asignación
0.94	d	3	6.0	CH ₃ -CH
2.04	s	3	-	CH ₃ -C=O
2.90	c	1	12.0; 4.0	
3.04	t	1	11.0	
3.45	sext.	1	15.0; 15.0; 3.0	
3.96	m	1	11.0; 11.0; 4.0	
5.11	t	1	6.0	

Por otra parte, se conoce con precisión la estructura de otro alcaloide de licopodio, deacetillicoclavina (P₄) aislado en su forma natural desde *L. paniculatum* y cuyo espectro de R M N P fue absolutamente aclarado^{7,15}. La diferencia estructural de esta base con paniculina, reside en la posición de un OH: Fig. 6.

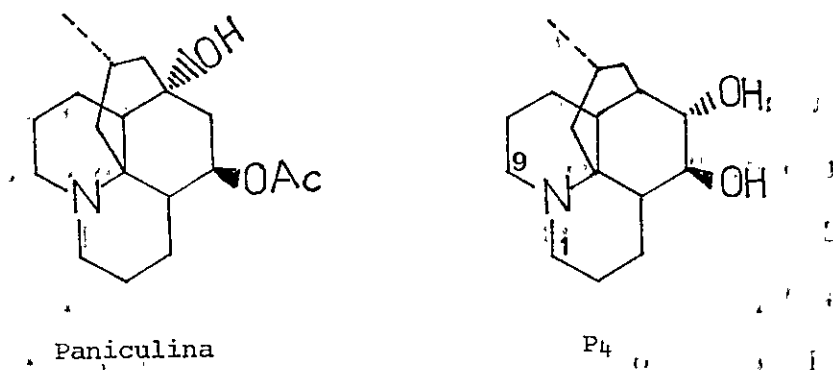


FIG. 6

ESTRUCTURA DE PANICULINA Y P₄

Si P₄ difiere en la posición de este OH, cabe esperar que el modelo espectral a 220 MHz para este último, no fuese muy diferente particularmente en lo que respecta a la zona entre 3 y 4 ppm, zona del entorno del átomo de nitrógeno y de los grupos OH (Tabla 2, Fig. 7).

Un resumen de las asignaciones e interpretación del espectro de R M N P para este alcaloide, es el siguiente:

TABLA 2

<u>R M N P de P₄ (deacetillicoclavina) a 220 MHz</u>				
δ	multiplicidad	$\frac{N^\circ}{\text{rel. de H.}}$	J (Hz)	Asignación
0.85	d	3	16	CH ₃ -CH
1.89	s (desaparece por intercambio con D ₂ O)	1		OH
3.19	sext.	1	12.0; 12.0; 3.0	-CH ₂ N-
3.42	sext.	1	14.0; 14.0; 3.0	
3.74	s (a _{1/2})	1	3.5	-CH OH
3.86	d	1	6.0	

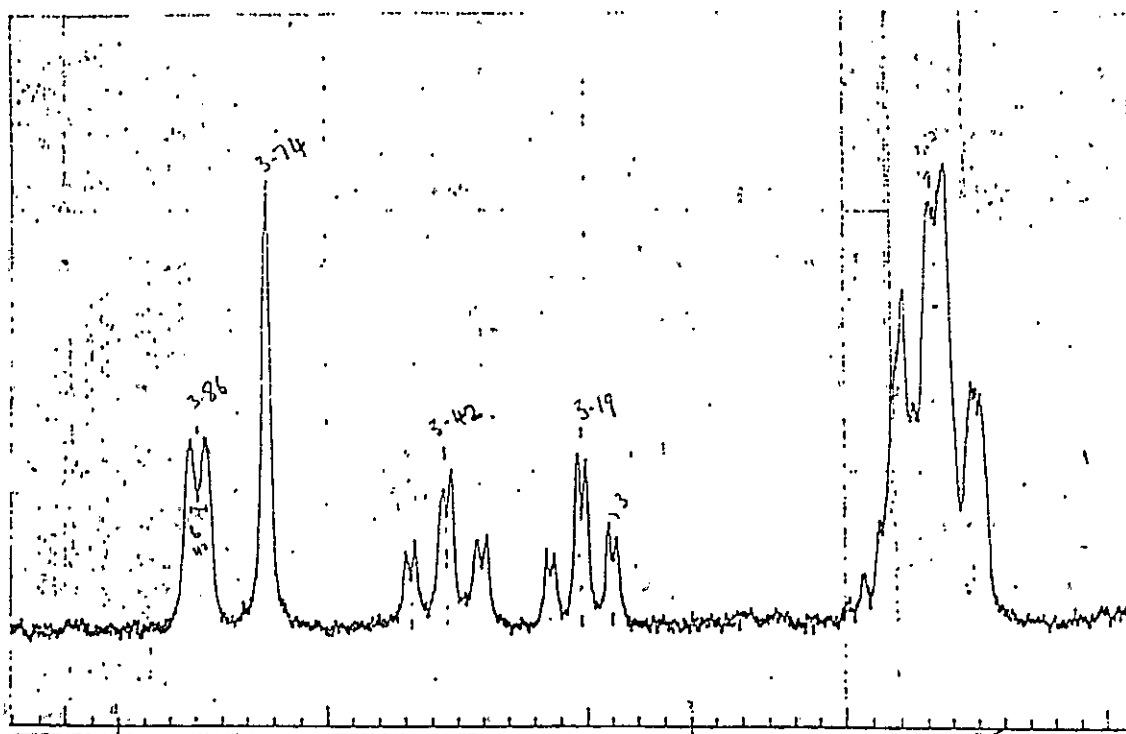


Figura 7 RMNP (2.9-3.6 p.p.m.) de desacetiliclovina.

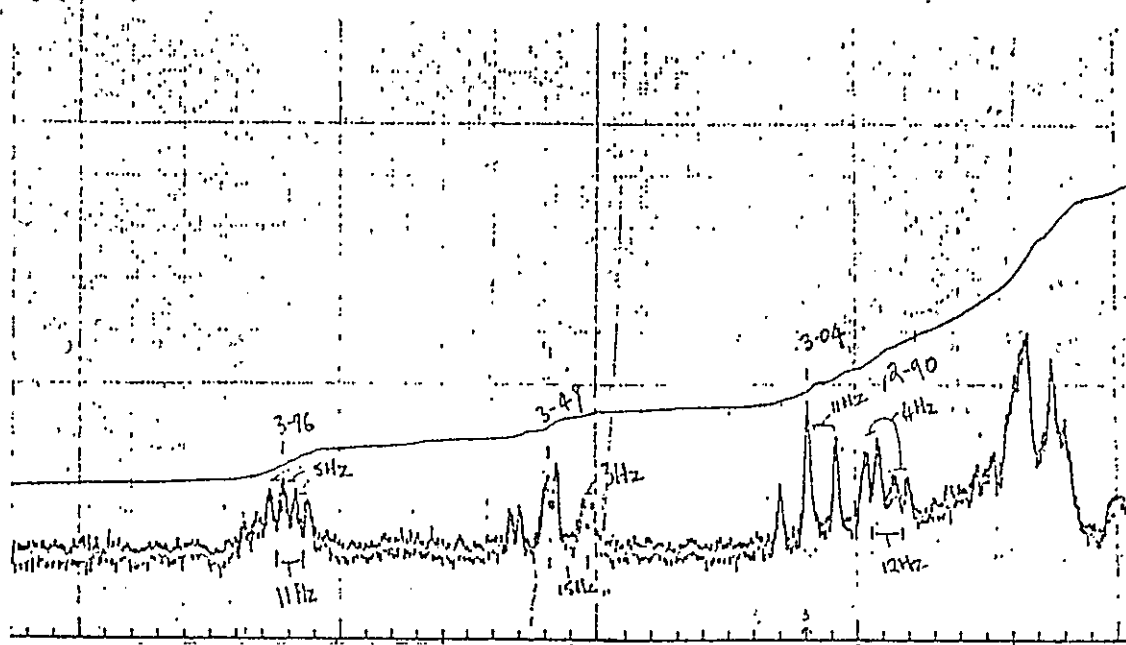


Figura 5 RMNP (2.9-3.6 p.p.m.) de paniculina.

Por datos de tablas de d.q. Morales¹² y colaboradores racionalizaron las señales a δ 3.19 y 3.42 asignándolas a la absorción de hidrógenos unidos a átomos de carbono vecinos a nitrógeno; además, por doble irradiación demostraron que estas señales no están acopladas entre sí, y por tanto, deberían corresponder a átomos de hidrógeno pertenecientes a metilenos diferentes (C₁ y C₉). (Fig. 6).

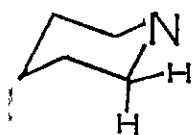
Quedaba en consecuencia por aclarar dos problemas al respecto:

- a) Naturaleza axial o ecuatorial de estos hidrógenos
- b) Adjudicar las absorciones a cada uno de los carbonos adyacentes al nitrógeno de P₄.

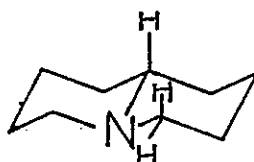
Es conocida la diferencia que se observa en los d.q. de protones axiales y ecuatoriales^{16,17}, en particular si son adyacentes a heteroátomos; estas diferencias ($\Delta\delta_{ae}$) que en sistemas derivados del ciclohexano es de 0,4 ppm²⁰, aumenta aún más en sistemas que contienen nitrógeno^{17,18}, situación observada en piperidina, quinolizidinas y otros heterociclos nitrogenados (Fig. 8) (en todos los casos señalados, el hidrógeno axial aparece a más alto campo que el hidrógeno ecuatorial).



$$\Delta \delta_{ae} = 0.40 \text{ Ref. 18}$$



$$\Delta \delta_{ae} = 0.44 \text{ Ref. 16}$$

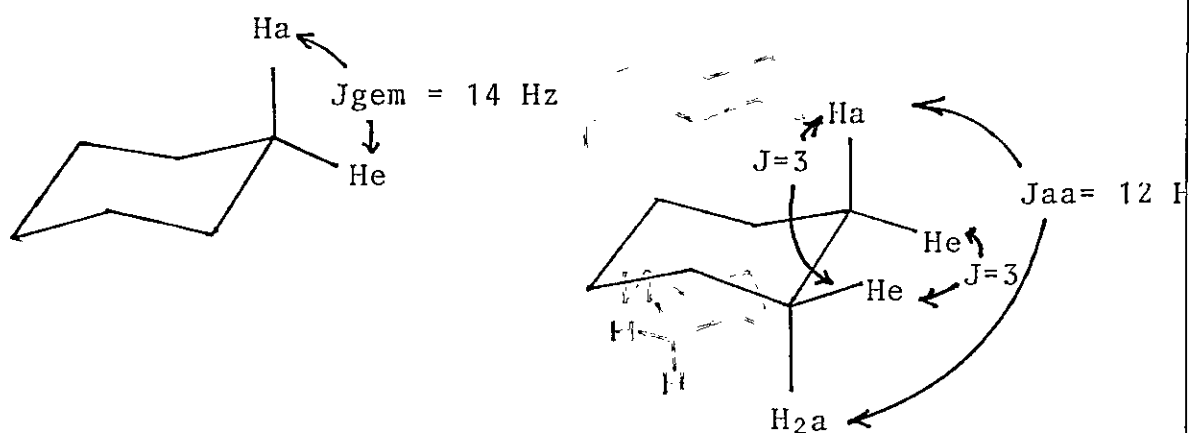


$$\Delta \delta_{ae} = 0.6 \text{ Ref. 21}$$

FIG. 8

ABSORCION EN R.M.N.P. DE PROTONES VECINOS A NITROGENO

Estas diferencias han sido atribuidas a la interacción de los H axiales con el par de electrones no compartido del nitrógeno y su efecto es máximo, cuando su disposición geométrica es trans-diaxial con este hidrógeno¹⁹. Aceptando esto, las señales para P₄ a δ 3.19 y 3.42 deberían corresponder en consecuencia a hidrógenos ecuatoriales, en tanto los hidrógenos axiales deberían estar a más alto campo. Esta asignación, sin embargo, no es consecuente con los valores de J. Para un sistema ciclohexano, los valores de J son los siguientes: (Fig. 9)



Tomando estos valores para un sistema piperidina, se tiene la siguiente multiplicidad:

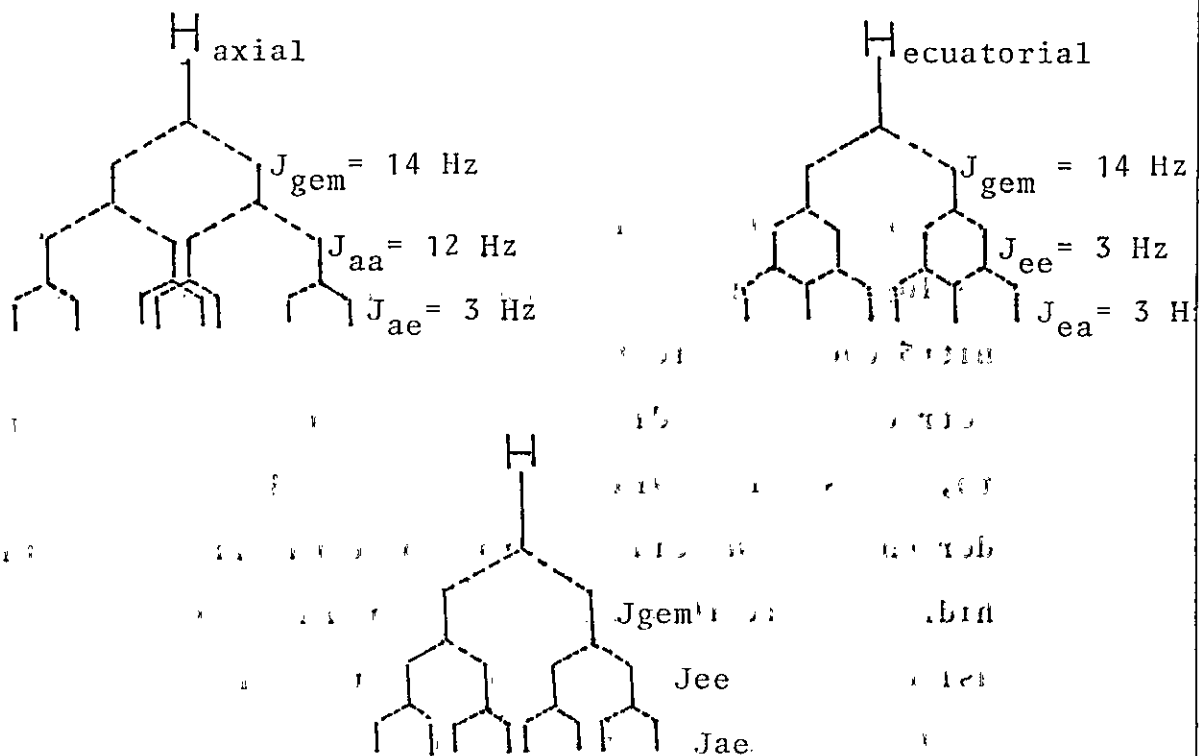


FIG. 9

ACOPLAMIENTO DE LOS PROTONES EN CICLOHEXANO

Vale decir, el H axial exhibiría un triplete desdoblado y para el H' ecuatorial dos cuartetos de igual intensidad, o bien, 2 triplete 1:2:1 (según los valores de J).

Se concluye según esto, que la multiplicidad de las señales en el espectro de P_4 (δ 3.4 y 3.19) debería corresponder a los hidrógenos axiales y en ningún caso a hidrógenos ecuatoriales.

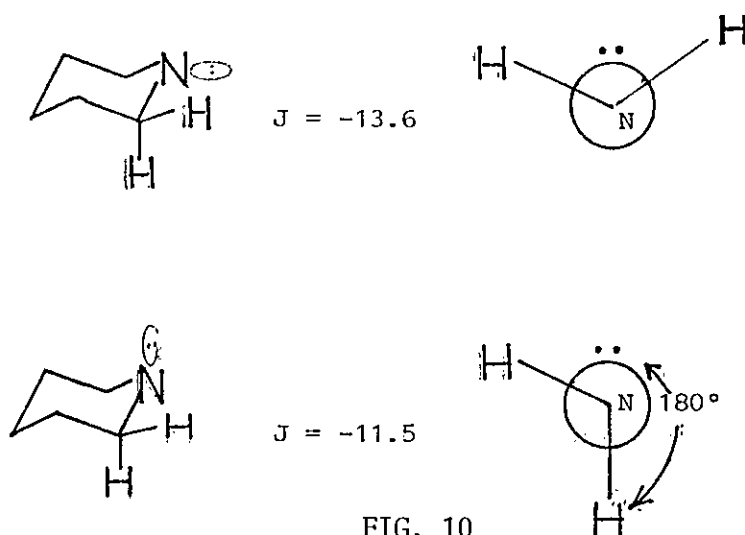
No hay gran cantidad de antecedentes en la literatura acerca de esta situación anormal. Este hecho se ha podido observar en esta ocasión, debido a la particular estereoquímica y rigidez del sistema presente en estos compuestos y se originan en las interacciones de H-1 axial con C-14 y de H axial con C-4 y C-2 ^{10, 22}

En P_4 *, se hace evidente la asignación de los dos triplete desdoblados, asignados a los dos hidrógenos axiales vecinos al nitrógeno. Castillo y colaboradores²⁴ demostraron a su vez, la distinta absorción de los 2 hidrógenos axiales de P_4 , correlacionando las diferencias que existen entre los ángulos diédricos formados por los hidrógenos vecinos a nitrógeno y el par electrónico de este último. En efecto,

* El singlete a δ 3.74 y el doblete ancho a 3.86 en P_4 y que también resuenan en la zona de 3-4 pp, son las absorciones de las 2 H geminales a OH.

es sabido que las constantes de acoplamiento geminal de un $\text{CH}_2\text{-N}$, es dependiente de la orientación geométrica del orbital del par electrónico no compartido del heteroátomo relativo a los hidrógenos metilénicos²³. En este contexto, se ha demostrado que el valor de J es más negativo cuando el par electrónico bisecta el ángulo formado por el $-\text{CH}_2-$:

Fig. 10.



RELACION DE LOS VALORES DE LA CONSTANTE DE ACOPLAMIENTO Y EL PAR ELECTRONICO DEL NITROGENO EN PIPERIDINA

En cambio, J se hace menos negativo para ángulos dihédricos de 0° y 180° . La inspección de 'modelos Dreiding' para P_4 , demuestra que el par electrónico del átomo de nitrógeno "bisecta" el metileno de C_1 , por tanto, a éste debe corresponder el mayor valor de J (14.0; 14.0; 3.5), en cambio, el hidrógeno axial del C-9 tiene una relación trans con respecto al par electrónico del nitrógeno y por lo tanto el valor absoluto de J se hace menor (12.0; 12.0; 3.0).

Dos proyecciones "Newman" para P_4 son las siguientes: (Fig. 11)

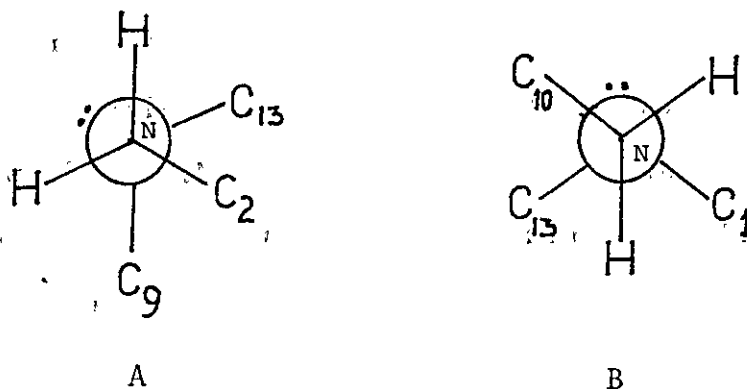
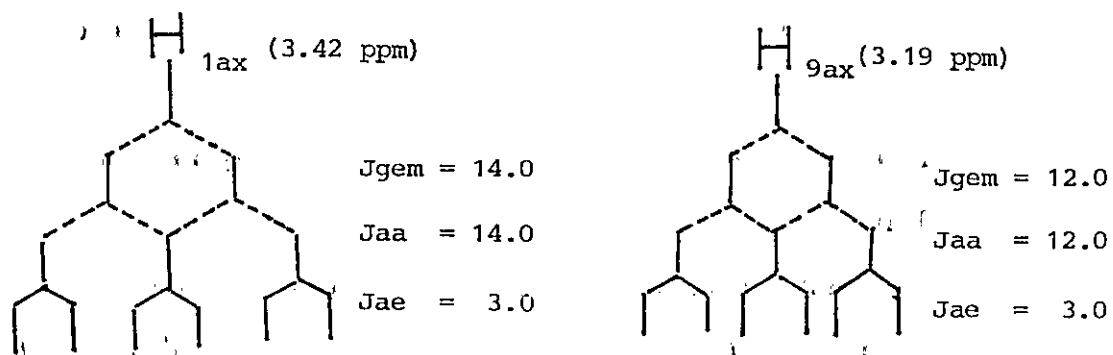


FIG. 11
PROYECCION NEWMAN PARA LOS CARBONOS 1 Y 9 DE P_4

Según esto, la señal a δ 3.42 ($J = 14.0; 14.0; 3.0$) corresponde a la resonancia del hidrógeno axial de C-1 (A) y la señal a 3.19 ($J = 12.0; 12.0; 3.0$) a la resonancia del protón axial en C-9 (B).

La multiplicidad de estos 2 tripletes desdoblados para P_4 se pueden racionalizar en consecuencia, de la siguiente manera:



Las correlaciones hechas para P₄, permiten a nuestro juicio determinar en forma inequívoca la naturaleza del entorno del átomo de nitrógeno en otros alcaloides de licopodio que posean el mismo esqueleto carbonado.

Es interesante en consecuencia, comparar la situación que se observa en el espectro de paniculina.

Al comparar los espectros de R.M.N.P. de paniculina y de acetillicoclavina (P₄) se aprecia rápidamente la diferencia en el número y naturaleza de las señales presentes entre δ 3 y 4; considerando que el entorno espacial alrededor del átomo de nitrógeno es muy similar en ambos alcaloides, esta falta de concordancia era inquietante.

Por otra parte, al tratar la hidroxiketona de paniculina con Eu (dpm)₃ en relación molar igual a 0,5 se aprecia a 60 MHz, un desplazamiento del OH hacia bajo campo, mostrando un hidrógeno muy desprotegido y una serie de absorciones, que por doble irradiación mostraron estar acopladas. Lo anterior no se logra racionalizar de manera alguna, si suponemos la existencia de un OH (3°) en el C-7.

Estos resultados obtenidos en forma preliminar pusieron otro alerta a la ya cuestionada estructura para paniculina.

En Chile están descritas seis especies del género *Lycopodium*²⁵: *L. paniculatum*, *L. magellanicum*, *L. gayanum*,

L. fuegianum, *L. chonoticum* y *L. confertum*.

En nuestro laboratorio se han hecho estudios químicos sistemáticos de las tres primeras especies;^{10, 26, 27} *L. fuegianum* y *L. chonoticum* son especies muy escasas, quedando por analizar *L. confertum*.

Nuestro estudio se ha dirigido a la aislación y resolución de los problemas estructurales planteados con las bases presentes en *L. confertum*.

La base mayoritaria de esta planta corresponde a paniculina. La obtención de mayores cantidades de este compuesto nos ha permitido emprender un estudio sistemático de este alcaloide con técnicas de mayor resolución, a fin de aclarar las dudas relacionadas con la interpretación detallada del R M N P y ¹³C de esta base y otras que no eran consecuentes con la estructura propuesta.

2. METODOS Y RESULTADOS

2.1 Aparatos, Métodos y Materiales

Los espectros de masas (E M) se tomaron en un espectrómetro de masa VARIAN-MAT CH-7 a un potencial de ionización de 70-80 ev, y los de alta resolución en un VARIAN MAT 312 (70 ev, 1 m A).

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (R.M.N.P.) se registraron a 60 MHz en un instrumento VARIAN T-60; a 90 MHz en un Bruker HX-90; 360 MHz en un Bruker WH-360 y a 400 MHz en un Bruker WH-400 (indicado en cada espectro). Los desplazamientos químicos se indican en unidades δ utilizando cloroformo (CDCl_3) como solventes y TMS como referencia interna. Para determinar la multiplicidad de las señales se usan los siguientes símbolos: s (singlete); d (doblete); dd (doble dobletes); t (triplete); td (triplete desdoblados); m (multiplete) b.a. (banda ancha); s.c. (señal compleja); $a_{1/2}$ denota el ancho (Hz) de una banda a la mitad de su altura; sext (sexteto).

Los espectros de IR se registraron en pastillas de KBr, suspensión (Nujol), en solución de CCl_4 o en película, en instrumentos Perkin Elmer 621 ó 700.

Los espectros U.V. se registraron en un espectrofotómetro CARY 17 utilizando etanol como solvente.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de C-13 se tomaron en un instrumento VARIAN CFT-20 y en un BRUKER WH-100 en soluciones clorofórmicas y usando TMS como referencia interna. Los espectros se registraron con desacoplamiento total y algunos de ellos fueron registrados con acoplamiento parcial (SFORD).

Los puntos de fusión se tomaron en un aparato THOMAS HOOVER UNIMETT y no están corregidos.

En cromatografía de gases (GLC) se usó un aparato PERKIN-ELMER 900 con detector de ionización de llama de Hidrógeno y en otros casos con detector termoiónico de Nitrógeno usando columnas de OV-17 (3%), SE-30 (5%) y OV-225, en chromosorb W.

En los análisis por cromatografía de capa fina (c c f.) se usó cromatoplasmas preparadas de sílica gel 60 F 254 (Kiesel 60 F, Merck) de vidrio preparadas con sílica gel GF 254 ó alúmina GF 254 tipo E ajustadas a 0.2 mm de espesor y activadas a 110°C por 1 hora. Las muestras se revelaron con reactivo de Dragendorff y/o vapor de yodo o luz ultravioleta de onda corta (254 nm). Las separaciones por cromatografía de absorción en columna se hizo con óxido de aluminio básico 90 actividad I. Cuando fue necesario, el soporte se

desactivó añadiendo las cantidades de agua apropiadas.

La distribución en contra corriente, se realizaron en un aparato de Craig de 100 tubos con una capacidad de 25 ml de fase orgánica y 25 ml de fase acuosa ó bien, usando 12 em budos de decantación de 500 y 1000 ml. En el primer caso, la fase móvil fue la acuosa. Este último fue una solución de McIlvaine de ácido cítrico y fosfato disódico con pH indicado para cada caso.

Los reactivos de Jones, Sarett y Dragendorff se prepararon según técnicas descritas por Morales¹⁰.

Los bromhidratos y percloratos se prepararon por acidificación de una solución del alcaloide en etanol o acetona (aproximadamente 20 mg de base en 2 ml de solvente) con el ácido correspondiente (por ej.: HBr al 47% ó solución de éter etílico saturada con ácido bromhídrico) gota a gota hasta que la solución mostró reacción ácida al papel pH. Se indujo a cristalizar añadiendo acetona-éter etílico a 0°C.

En los procesos de extracción, se utilizó solventes 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 destilada. La eliminación de esta última se realizó por destilación conjunta con agua y etanol por dos veces.

Para los estudios con reactivos de desplazamiento se usó Eu (d.p.m.)_3 , (tris-(dipivalometanoato) europeo), utilizando un aparato de R.M.N.P. de 60 MHz (VARIAN T-60). Los espectros se registraron con ancho de barridos entre 500 y 3000 Hz. El reactivo de desplazamiento fue agregado según la técnica de incremento de la relación reactivo-sustrato^{28, 29}.

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. En algunos casos se usó cromatoplasmas (GF 254) y se aplicó manualmente con tubo capilar ó bien con el uso de microjeringas utilizando un aplicador "Camag Linomat III".

2.2 Recolección del material botánico

El material botánico, se recolectó en la zona cordillera de Antillanca (Provincia de Osorno) y corresponde a dos recolecciones:

Octubre 1976 (20,1 Kg)

Enero 1978 (46,6 Kg)

Identificada por el profesor Manuel Mahú (Facultad de Ciencias) como *Lycopodium confertum* (var. *confertum*) se dispone de muestras representativas en el herbario de la Facultad de Ciencias.

2.3 Extracción y aislación de los alcaloides - Recolección 1976

2.3.1 Obtención del crudo de alcaloides

La planta seca y molida (20,1 Kg) se extrajo exhaustivamente con etanol en un aparato Soxhlet de 20 l durante 72 hrs. La solución etanólica se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio y el residuo obtenido se trató varias veces con una solución acuosa de ácido clorhídrico al 5% v/v (6 l). El extracto ácido se dejó por 24 hrs a 0°C y posteriormente se filtró sobre una tela fina. El extracto ácido así obtenido, se lavó varias veces con éter etílico en embudos de decantación de 2 l, hasta que la fracción etérea resultó incolora. El material insoluble en ácido y el extracto etéreo dieron reacción negativa de alcaloides y no fueron analizados.

La solución ácida se alcalinizó con solución acuosa de NaOH al 20% hasta pH 11. La solución acuosa básica se extrajo repetidamente con cloroformo y luego por 96 hrs en un extractor líquido-líquido con cloroformo. Los extractos clorofórmicos combinados se secaron con sulfato de sodio anhidro se filtró sobre papel filtro y se llevó a sequedad obteniéndose un total de 21.4 g de una laca color café-rojizo ("crudo").

El "crudo" obtenido, fue de nuevo reprocesado con ácido clorhídrico al 5% continuándose el mismo procedimiento ya descrito, obteniendo así un "crudo" final de 18.0 gr.

2.3.2 Aislación de los alcaloides

El "crudo" de alcaloides (18.0 gr) se disolvió en 100 ml de cloroformo y se sometió a una distribución por contracorriente en 12 embudos de decantación, usando un tampón de McIlvaine de pH 6.0.

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

<u>FRACCION</u>	<u>Nº EMBUDOS</u>	<u>(Gr)</u>
A	1	3.7
B	8-9-10-11	4.1
C	2-3-7-12	5.1
D	4-5-6	4.2

Fracción A: Del embudo 1, después de concentrar la solución clorofórmica, se obtuvo gran cantidad de cristales blancos, que al disolverse en acetona y enfriar dio mayores cantidades de un alcaloide que se denominó LC₁.

(LC₁) Deacetilpaniculina

LC₁, tiene Rf = 0,30 en el sistema CH₂Cl₂/MeOH 98:2 y tiene un tiempo de retención en columna OV-17 a 230°C de 11.4 y un P.F 181-183° (acetona).

Características espectroscópicas (Fig. 12, pág.46)

IR
 KBr (cm⁻¹): 3620 - 3000 (banda estiramiento de OH)
 v max
 v max (Nujol): 3788 (OH libre)
 v max (CHCl₃): 3571 (OH asociado)

RMNP(60 M Hz, δ ppm)

0.9 (d, 3H, J = 6 Hz) CH₃ - CH

3 - 3.8 (2 H, m)

3.9 (1 H, m)

EM

m/e (%), 265 (10), 222 (4), 209 (24)

208 (100), 190 (5), 172 (7), 146 (5)

Fracción B: Esta fracción fue sometida a contracorriente de variados pH (4.0; 5.0, 5.5 y 7.0) sin lograrse la aislación de las bases mayoritarias, que en todos estos pH, resultaron mezcladas en porcentajes similares.

Por este motivo, los 3.5 g obtenidos, se disolvieron en acetona (4 ml) y se trataron con HBr (2,5 ml). De esta forma se obtuvo 480 mg del bromhidrato respectivo (denominado hidrobromuro de LC₂). Después de separar y cristalizar la sal (etanol-éter 2:1), las aguas madres fueron alcalinizadas con solución acuosa de NaOH, extraído con cloroformo y secado con sulfato de sodio anhidro, obteniéndose 2,1 g de la mezcla original. Por regeneración de la base a partir del bromhidrato de LC₂, se obtuvo 315 mg de cristales blancos alargados de licopodina, idéntica en su comportamiento cromatográfico (ccf y c.g.) punto de fusión y propiedades espectroscópicas con una muestra auténtica.

Fracción C: Los análisis cromatográficos permitieron reunir esta fracción con la fracción procesada en B, obteniéndose una mezcla de bases menores muy heterogénea. La mezcla se sometió a contracorriente pH 5,8 en un aparato Craig de 62 tubos.

Por análisis por placa fina en el sistema diclorometano-metanol (95:5) y c.g. (OV-17, 3%) se obtuvo 1,65 g de LC₁, proveniente de los tubos 51-60. Las restantes fracciones dieron mezclas de variada composición, que no fueron resueltas.

Fracción D: Después de eliminar el cloroformo, se obtuvo gran cantidad de cristales blancos, los que fueron redisolu-
tos en éter etílico en caliente, obteniéndose 2.8 gr del com-
puesto impuro. Recristalización en el mismo solvente dio
1.3 g de esta nueva base, denominada LC₃.

(LC₃): Paniculina

LC₃ tiene Rf = 0.41 en el sistema CH₂Cl₂- MeOH (97:3),
tiempo de retención de 12.4 en columna OV-17 (230°C) y un
P.F. 114-116°.

LC₃ cristalizada de la mezcla éter-acetona 3:1

IR

ν max : 3500-3100 cm⁻¹ (banda de estiramiento de OH)

(KBr) 1730-1710 cm⁻¹ (estiramiento C=O.)

1240 cm⁻¹ (Fig. 13, pág.47)
(Acetato)

ν max 3640 cm⁻¹ (OH libre)

CCl₄ 1736 cm⁻¹ (carbonilo)

1250 cm⁻¹ (estiramiento acetato)

RMNP (CDCl₃, 60 MHz)

0.9 (d, J = 6 Hz, 3H) 2.0 (s.3H)

3.5 - 4.0 (m, 2H), 5.1 (t, J = 6 Hz, 1 H)

(Fig. 13, pág.47)

EM

m/e (%): 307 (8.2), 251 (11); 250 (100),
 248 (5), , 190 (54.2), 172 (100),
 43 (100) (Fig. 13, pág.47)

R.M.N.P. (CDCl₃, 400 M Hz) (Fig. 14, pág.48)

Multipl.	Absorción (ppm)	Nº rel. H.	J (Hz)	Asignación
0.75	dd	1	13.03; 13.0	H-14ax
0.91	d	3		CH ₃ de C-16
1.25	Triplete desdoblado	1	13.0; 13.0; 6.0	H-8ax
1.36	cuádruplete desdoblado (multiplete)	1		H-2ec
1.68	cuádruplete desdoblado	1	13.5; 13.5; 13.6; 2.4	H-3ax
1.78		1		H-7ec
1.93	quíntuplete desdoblado	1	13.5; 13.5; 13.5; 5.9; 5.9	H-2ax
2.01	s	3		CH ₃ -C=O
2.09	par de triplete	1	16.4; 6.0; 6.0	H-6ec
2.42	cuarteto desdoblado	1	13.0; 6.0; 2.4	H-4ax
2.49	dd	1	14.6; 5.9	H-1ec
2.64	m	1	6.1; 13.0; 13.0 6.0; 6.0	H-15ax
2.65	dd	1	13.0; 6.0	H-14ec
2.75	cuarteto desdoblado (c.d.)	1	9.3; 5.1; 1.8	H-9ec
2.95	dd	1	10.8; 9.3	H-9ax

Multipl.	Absorción (ppm)	N° rel. H.	J (Hz)	Asignación
3.42	triplete de dobletes (triplete desdoblado)	1	14.6; 13.8 4.8	H-1ax
3.80	m	1	10.8; 10.8; 5.2 5.2	H-10ax
5.07	dd	1	6.0; 6.0	H-5eē M.

R.M.N.P. (CDCl₃, 400 MHz, LC₃-TFA) Fig. 15 pág 49

1.00	d	3		CH ₃ de C-16
1.39	dd	1	14.0; 14.0; 6.0	H-8ax
1.40	dd	1	12.0; 12.0; 7.0	H-14ax
1.63	dd	1		H-3ec
1.64	d	1	15.1	H-6ax
1.74	cd	1	13.8; 6.2; 2.4	H-8ec
1.97		1		H-12ec
2.03	s (ancho)			H-7ec
2.09	s	3		acetato
2.17		1		H-6ec
2.54		1		H-4ax
2.60		1	12.7; 5.9	H-14ec
2.77	m	1		H-15ax
3.14	dd	1	13.0; 5.4	H-1ec
3.48	c	1	10.0; 10.0 10.0	H-9ax
3.60	dd	1	10; 6.0	H-9ec

Multipl.	Absorción (ppm)	N°rel. H	J (Hz)	Asignación
3.81	td indefinido	1	13.5; 13.5; 6.3	H-1ax
5.28	t	1	6.8; 6.8	H-5gem Ac.
5.46	m	1	11.0; 10.0 6.0; 6.0	H-10ax

Acetilpaniculina

IR:

ν max : 1730 cm^{-1} (CO acetato)
KBr 1240 cm^{-1} (C-O estiramiento)

RMNP (60 M Hz)

0.9 (d, J = 6 Hz, 3H) 2.0 (s, 3H)
5.1 (t, deformado, 2H)

EM

m/z (%): 349 (17.6), 307 (5,8), 292 (100)
285 (24.1), 232 (41.1), 172 (82.9)

Fig. 16, pág.50

Deacetilpaniculina acetilado (producto de transformación)

IR:

ν max : 3600 - 3100 cm^{-1} (estiramiento OH)
KBr 1730 cm^{-1} (CO acetato)
1240 cm^{-1} (C-O estiramiento)

RMNP (60 M Hz)

0.9 (d, J = 6 Hz, 3H), 2.0 (s, 3H)
5.1 (t, J = 6 Hz, 1H)
6.7 (s, a, 1H)

Fig. 17, pág.51

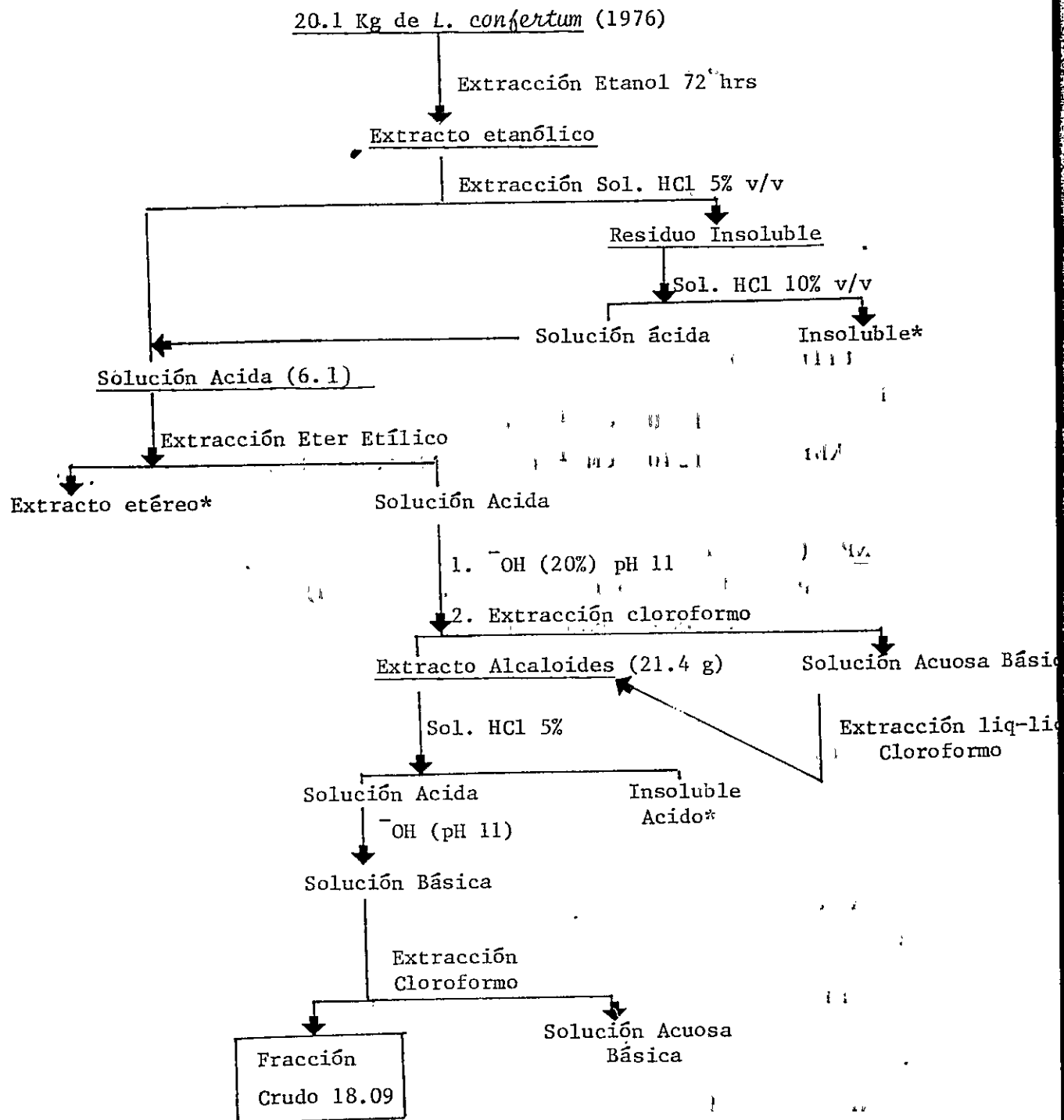


FIG. 18

SEPARACION ALCALOIDES DE *L. confertum*

12 51, 1

* Fracciones no revisadas

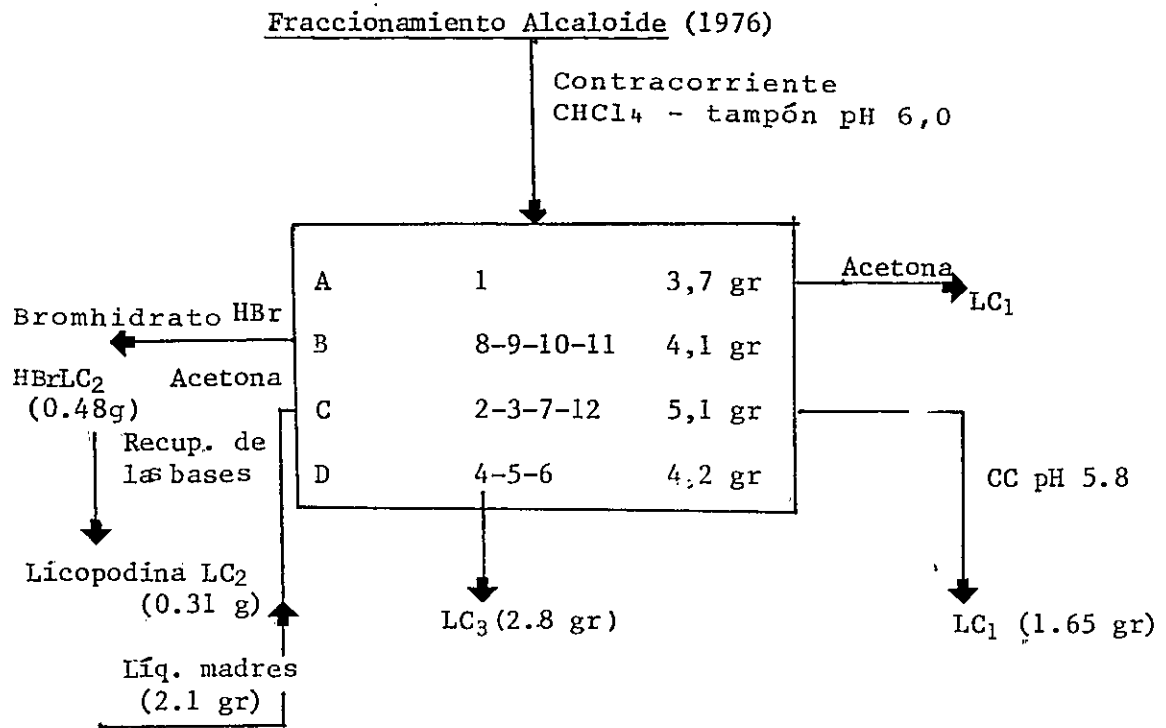


FIG. 19

FRACCIONAMIENTO ALCALOIDES *L. confertum*

2.4 Reacciones de oxidación

1. Oxidación de deacetilpaniculina con Reactivos de Jones

Se disolvió 62.8 mg de deacetilpaniculina (LC₁) en 20 ml de acetona y se añadió reactivo de Jones gota a gota, (5.1 ml) durante 20 minutos, hasta persistencia del color rojo-anaranjado. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y con constante agitación. Después de 2 hrs se añadió 30 ml de solución acuosa de amoníaco y se trasvasijó en un embudo de decantación de 250 ml. Repetición del lavado con 15 ml adicionales y posterior extracción por 3 veces con porciones de 35 ml de cloroformo dio después de concentrar y secar 59.4 mg de producto crudo. Purificación del crudo, por columna corta, de sílica gel (5 g) y elución con CHCl₃- MeOH (2%) dio un total de 3 productos: A) 45.5 mg; B) mezcla de A con LC₁: 9.1 mg y C) 3.02 mg de LC₁ sin reaccionar. Los compuestos A y C son idénticos en sus características cromatográficas y espectroscópicas, con la hidroxiketona de LC₁ y LC₁ respectivamente. Fig.20 b, c, pág.52

2. Oxidación de dihidrolicopodina con Reactivo de Jones.

184 mg de dihidrolicopodina se disolvieron en 30 ml de acetona; luego se agregó 5,5 ml de reactivo de Jones, gota a gota por 30 min. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y con agitación constante por 2 hrs. El tratamiento

posterior fue idéntico al descrito en 1. Evaporación de la fase clorofórmica dio un producto crudo total de 153.8 mg. Disolución en acetona se indujo a cristalizar, dando 145.1 mg de un compuesto cristalino, idéntico en sus características cromatográficas y espectroscópicas con licopodina 8.

3. Oxidación de LC₃ con reactivo de Jones

50 mg de LC₃ se disolvieron en 20 ml de acetona, luego se agregó 3 ml de reactivo de Jones, durante 5 min gota a gota. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y con agitación constante por 2 hrs. El tratamiento posterior fue idéntico al descrito en 1. Evaporación de la fase clorofórmica dio un total de 30.1 mg de un compuesto semicristalino, que mostró las siguientes características espectroscópicas:

<u>IR</u>	3600 - 3100 (OH) cm ⁻¹
	1730 (CO)
ν _{máx} (KBr):	1640 (CO lactama)
	1240 (C-O estiramiento)

Fig. 21 a, pág.53

4. Reacción de LC₃ con Reactivo de Sarett³¹ (25°C)

Se disolvieron 102.1 mg de LC₃ en 15 ml de piridina (destilada) y se añadió a una solución que contenía 150 mg de trióxido de cromo en 4 ml de piridina. Se dejó a temperatura ambiente por 72 hrs, bajo constante agitación.

Después se diluyó la mezcla reactante con 200 ml de H₂O fría, se alcalinizó con amoníaco y se extrajo con cloroformo. La solución clorofórmica se evaporó en un evaporador rotatorio y al residuo se le agregó 3 porciones de 100 ml de etanol; finalmente, se evaporó a sequedad y se guardó en desecador por 24 hrs. El peso del compuesto recuperado fue el que muestra conducta cromatográfica y espectroscópica similar a LC₃.

Fig. 21 b (53)

5. Reacción de LC₃ con Reactivo de Sarett (70°C)

En esta oportunidad se procesaron 70 mg de LC₃ procediendo en forma similar a las fases descritas en 4, pero con calentamiento de 70°C por 10 hrs. Se obtuvo un total de 48.4 mg de una compleja mezcla de compuestos. Por placa fina y c. de g. se observaron una serie de compuestos de variados Rf.

El procedimiento se repitió con 150 mg de LC₃ en un rango de temperatura entre 30° - 40°C por 8 hrs. El peso del compuesto impuro obtenido fue de 130.1 mg. Análisis cromatográfico mostró compuestos de variados Rf difíciles de separar.

6. Reacción de LC₃ con CrO₃(C₅H₅N)^{32, 33.}

En un balón de 50 ml enfriado bajo hielo, se colocó 78.2 mg de CrO₃ (secado con P₂O₅). A este se agregó 0.126 ml de piridina (secada y destilada de BaO) disuelta en 2 ml de diclorometano y manteniendo el sistema en agitación por 15 min tapado con una trampa de sulfato de calcio (CaSO₄). El alcohol LC₃, 40 mg) disuelto en cloruro de metileno (2 ml) seco, se agregó de una sola vez. Después de agitar por 25 min a 25°C la reacción se completa por la precipitación de un producto de reducción de cromo de color café oscuro. La mezcla se filtra y el solvente es removido (dejando el producto crudo). Después de lavar el precipitado con diclorometano se combinaron los extractos orgánicos, los cuales se lavaron con una solución acuosa de NaOH y luego con solución de NaCl saturada. Finalmente, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró dando 29.04 mg de un producto semicristalino, cuyo espectro es similar al obtenido en 4. Fig. 21 c.

7. Reacción de LC₃ con dimetilsulfóxido-anh. trifluoroacético.

A una solución de DMSO seco (45.24 mg) en 5 ml de diclorometano, enfriado a -65°C con un baño de hielo seco-acetona, se le agregó 90.3 mg de anh. trifluoroacético disuelto en 2.5 ml de diclorometano y se agitó mecánicamente por 10 min. Posteriormente, se agregó 91.2 mg de LC₃ disuelto en 5 ml de

diclorometano en un tiempo de 10 min. Finalmente, la mezcla de reacción se mantuvo a -65°C por 30 min más; al final de dicho tiempo se agregó 2 ml de trietilamina gota a gota por 10 min. Se retiró el enfriamiento y se dejó a temperatura ambiente por 2 hrs.

La fase orgánica se lavó con agua destilada y la capa acuosa a su vez con diclorometano. Después de combinar los extractos orgánicos se obtuvo un residuo húmedo de 82.9 mg. Después de secar por 24 hrs se procedió a purificar el compuesto por técnica de columna corta en columna de sílica gel (10 g) y elución con cloroformo-metanol 10:1. Después de eluir 90 fracciones de 9 ml se obtuvo 46.8 mg de un compuesto semicristalino I.

Características espectroscópicas de I

	3600 - 3100	(OH)
IR v máx(film):	1730	(CO)
	1660	(CO lactama)
	1240	(C-O estiramiento)

Fig. 20 a
y 25.1 mg de otro compuesto II, idéntico en sus características cromatográficas y espectroscópicas con LC₃.

8. Reacción de dihidrolicopodina con RuO₄

Una solución de 117 mg de RuCl₃ · 3H₂O en 2,15 ml de HCl 0,5 N, se calentó a ebullición. A esta solución se le agregó gota a gota una solución acuosa de KBrO₃ (1 M) (437 mg/100 ml de solución) y se mantuvo bajo constante agitación. La mezcla de RuO₄, Br₂ y H₂O que destilan se recogieron a 0°C por 15 min en una trampa de hielo y se extrajo con 20 ml de CCl₄. Después de lavar la fase orgánica con NaHCO₃ (ac) (para remover el Bromo retenido) la solución roja de RuO₄ queda lista para su empleo.

El RuO₄ obtenido se agregó gota a gota y bajo agitación a una disolución de 100 mg de dihidrolicopodina disueltos en 2 ml de CCl₄ a 0°C y se dejó por 8 hrs bajo agitación.

El compuesto orgánico se alcalinizó directamente con NaOH (ac) y se extrajo con diclorometano. Después de centrifugar (para eliminar parte del RuO₂ arrastrado) y secar se obtuvo 82.3 mg de compuesto impuro.

9. Oxidación de LC₃ con RuO₄

El método de oxidación y la generación de RuO₄ para este alcaloide fue similar a las ya descritas. Para 59.3 mg de LC₃, se empleó 56.2 mg de RuCl₃ · 3H₂O; 1.02 ml de HCl 0,5 N y 214 mg de bromato de potasio en 100 ml de agua. Se

obtuvo 56.5 mg de un compuesto de transformación, cuyas características cromatográficas y espectroscópicas son similares a las anotadas en 7.

10. Oxidación de LC₁ con benzofenona en medio alcalino³⁷

A 206 mg de terbutóxido de potasio (purificado por sublimación) se le agregó 10 ml de benceno, 100 mg de LC₁ y 672 mg de benzofenona. Todo este sistema, fue colocado en un balón de 50 ml sumergido en un baño maría y mantenido bajo agitación por 20 hrs. Posteriormente, la mezcla de reacción se vació en un vaso de 100 ml que contenía hielo y se lavó con una solución de HCl al 10%, hasta que las aguas del lavado ácido, quedaron incolora. Los extractos ácidos se juntaron y se extrajeron dos veces con éter, se alcalinizó con solución acuosa de NaOH y finalmente se extrajo con cloroformo. Después de secar con sulfato de sodio y concentrar se obtuvo 81.0 mg de material oxidado impuro. Purificación por columna corta de sílica gel y elución con cloroformo:metanol 1:1 se obtuvo 63.5 mg de un compuesto cuyas características cromatográficas y espectroscópicas son idénticas a la hidroxiketona de LC₁.

11. Oxidación de LC₃ con benzofenona en medio alcalino

La reacción se efectuó con 100 mg de LC₃ procediendo de manera similar a la ya descrita para LC₁. En este caso, se empleó 91 mg de terbutóxido de potasio, 300 mg de benzofenona y 10 ml de benceno destilado. El producto se purificó por columna corta de sílica gel y eluido con CHCl₃-MeOH al 4%. Se obtuvieron dos compuestos que pesaron 32.0 y 18.2 mg y una mezcla de 17.5 mg. El primero de ellos (A = 32.0 mg) por análisis cromatográfico y espectroscópico correspondió a la hidroxicetona de LC₁ y el segundo (B = 18.2 mg) a un compuesto idéntico en sus características espectroscópicas y cromatográficas con LC₃.

Características espectroscópicas de A

RMNP (δ) 60 M Hz:	0.9 (d, deformado, 3H, CH ₃ CH)	
	3.0 (s, OH); 3.0-4.0 (2H)	Fig. 20 b, c, pág. 52
EM m/e (%) :	263 (M ⁺ 5.1)	
	220 (35) 188 (10)	
	207 (20) 160 (10)	
	206 (100) 178 (11)	
IR :	3400 - 3100 (OH)	
vmáx (KBr) :	1690 (C=O)	
	1420 (C-O estiramiento)	

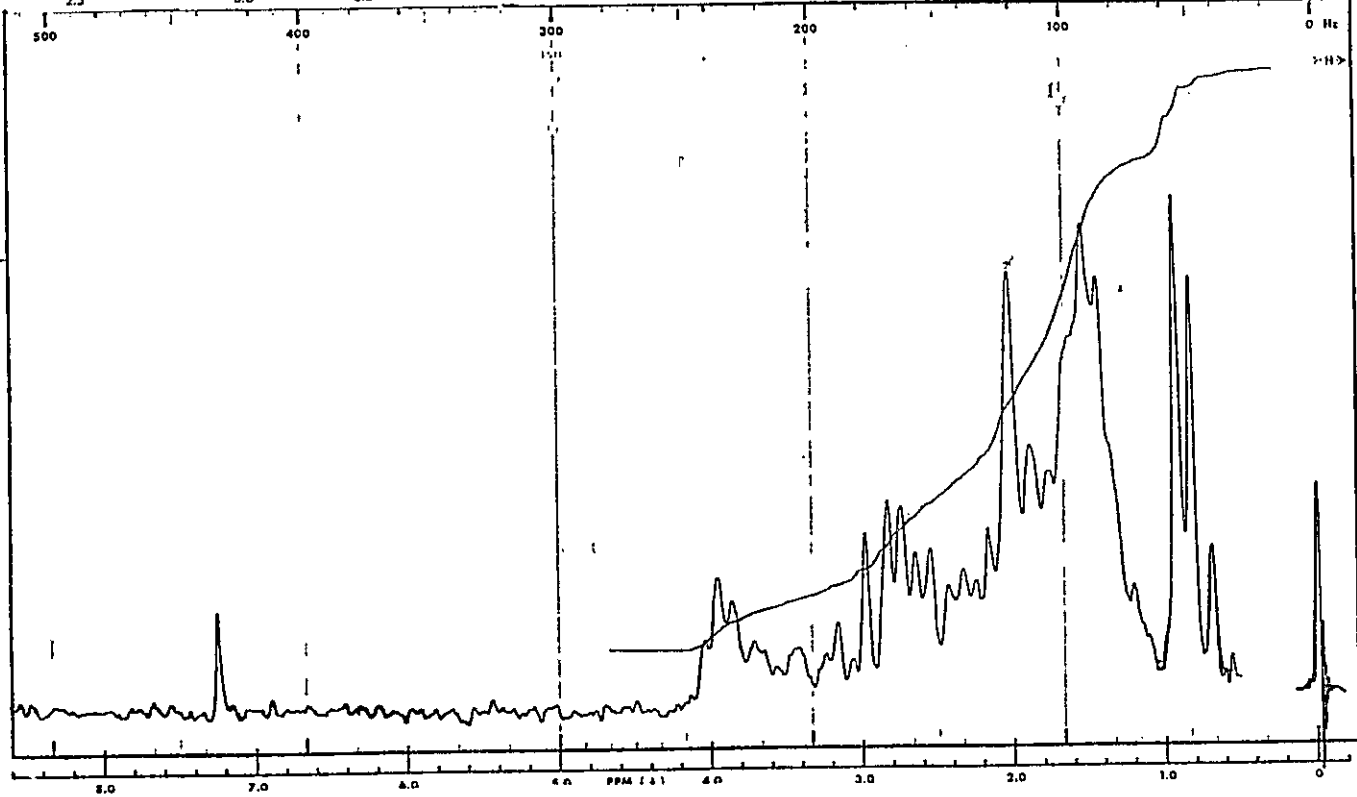
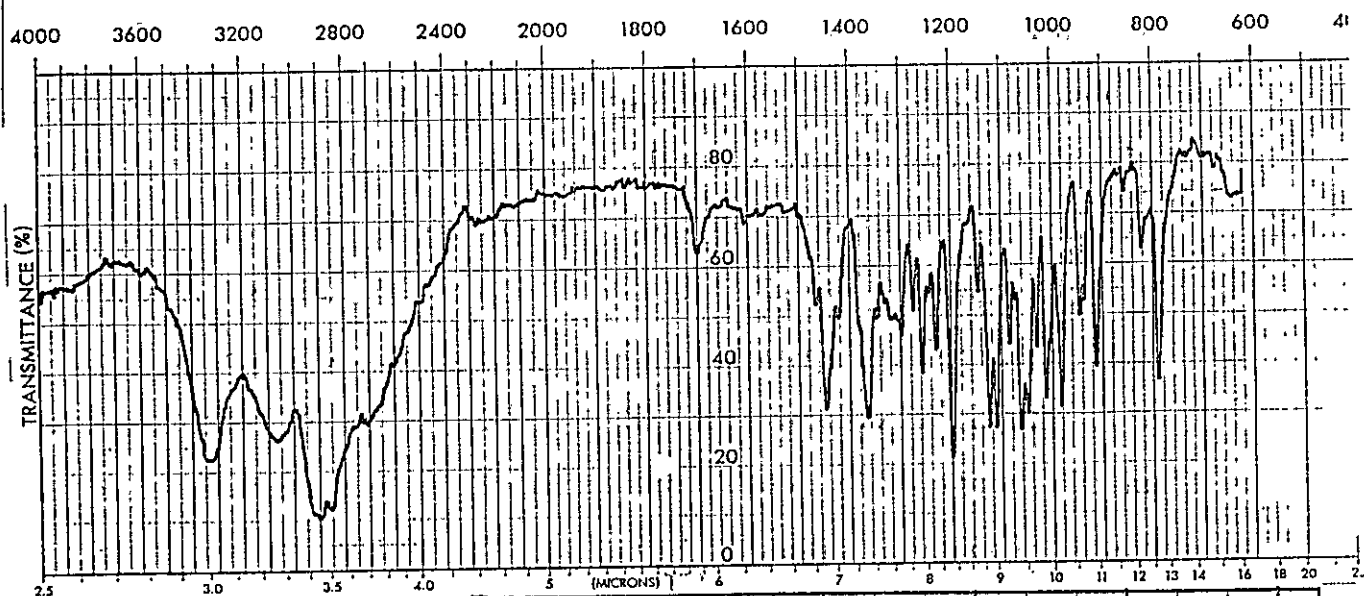
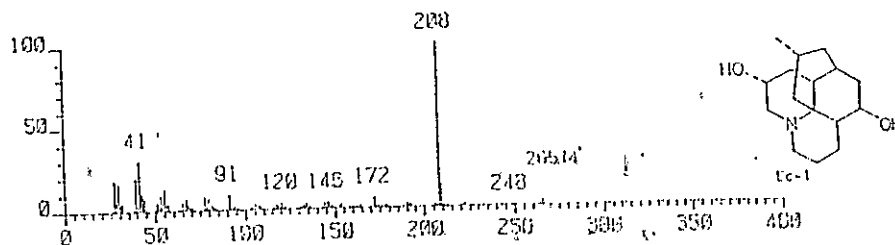


FIG. 12
 CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS DE LC (DESACETILPANICTINA)

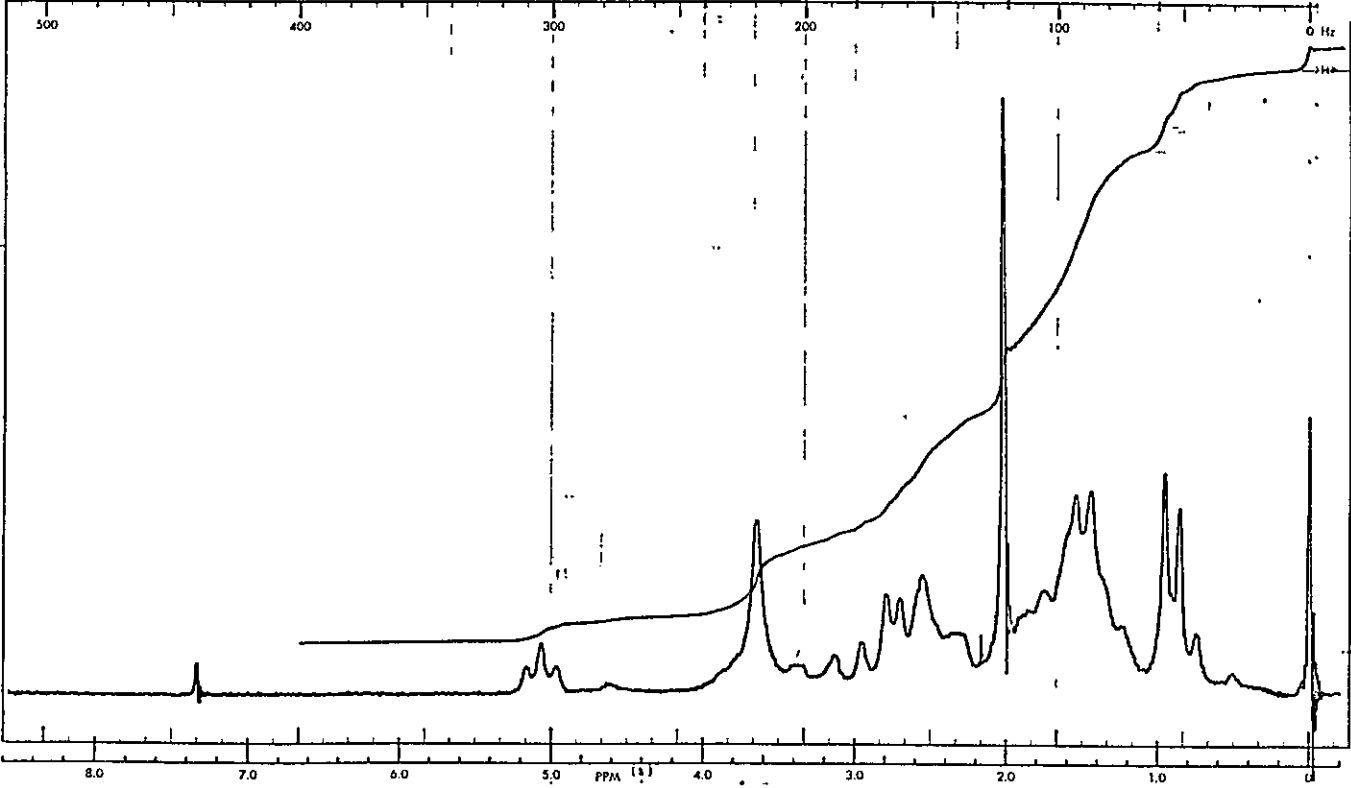
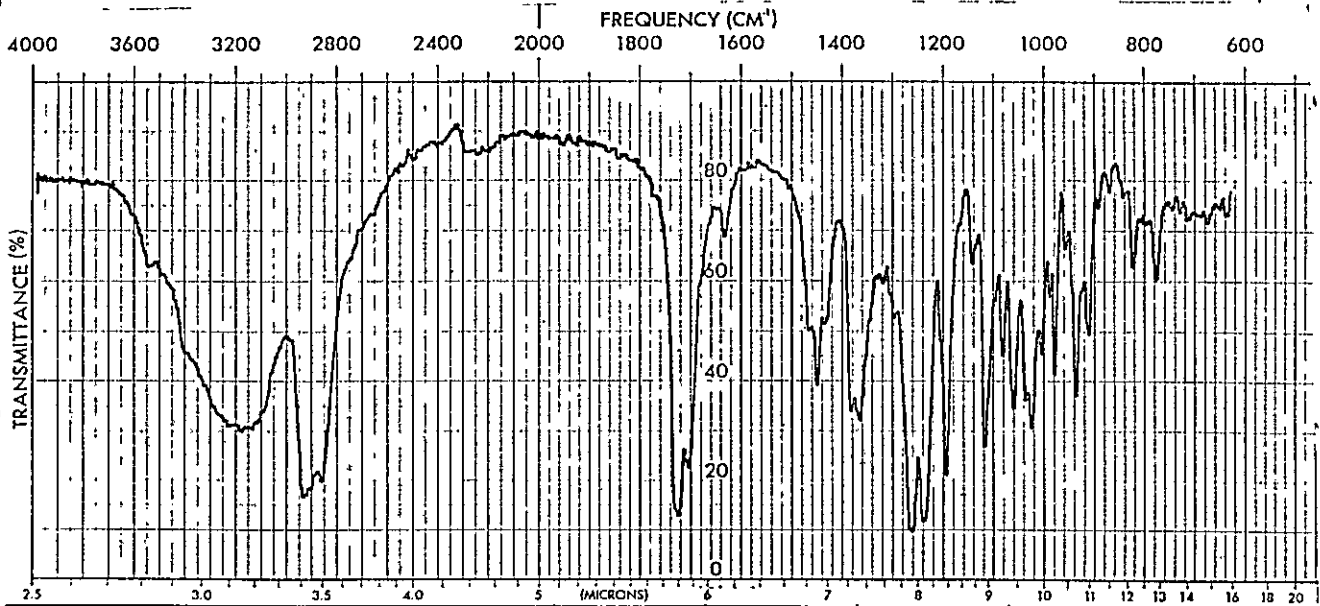
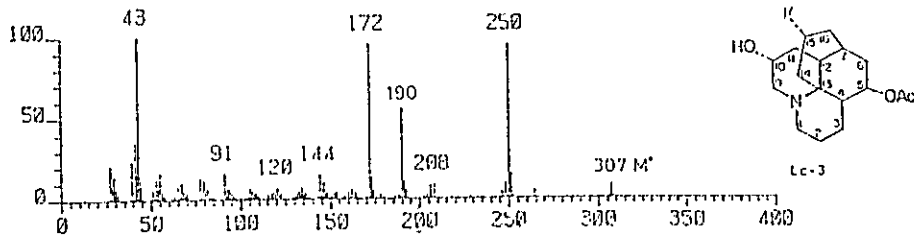


FIG. 13
 CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS DE LC₃ (PANICULINA)

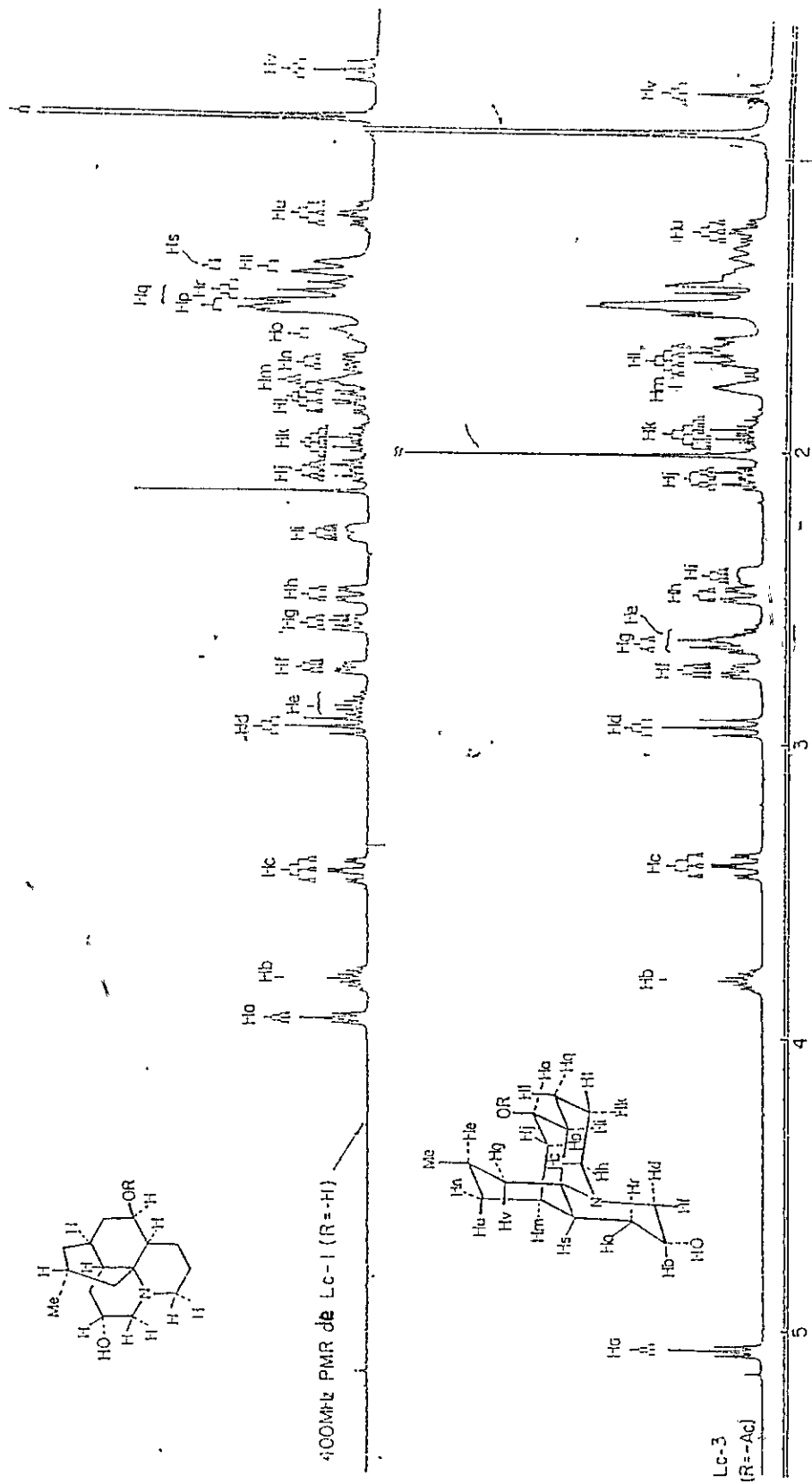


FIG. 14
 ESPECTRO DE R M N P (400 M HZ) DE LC3 Y LC1

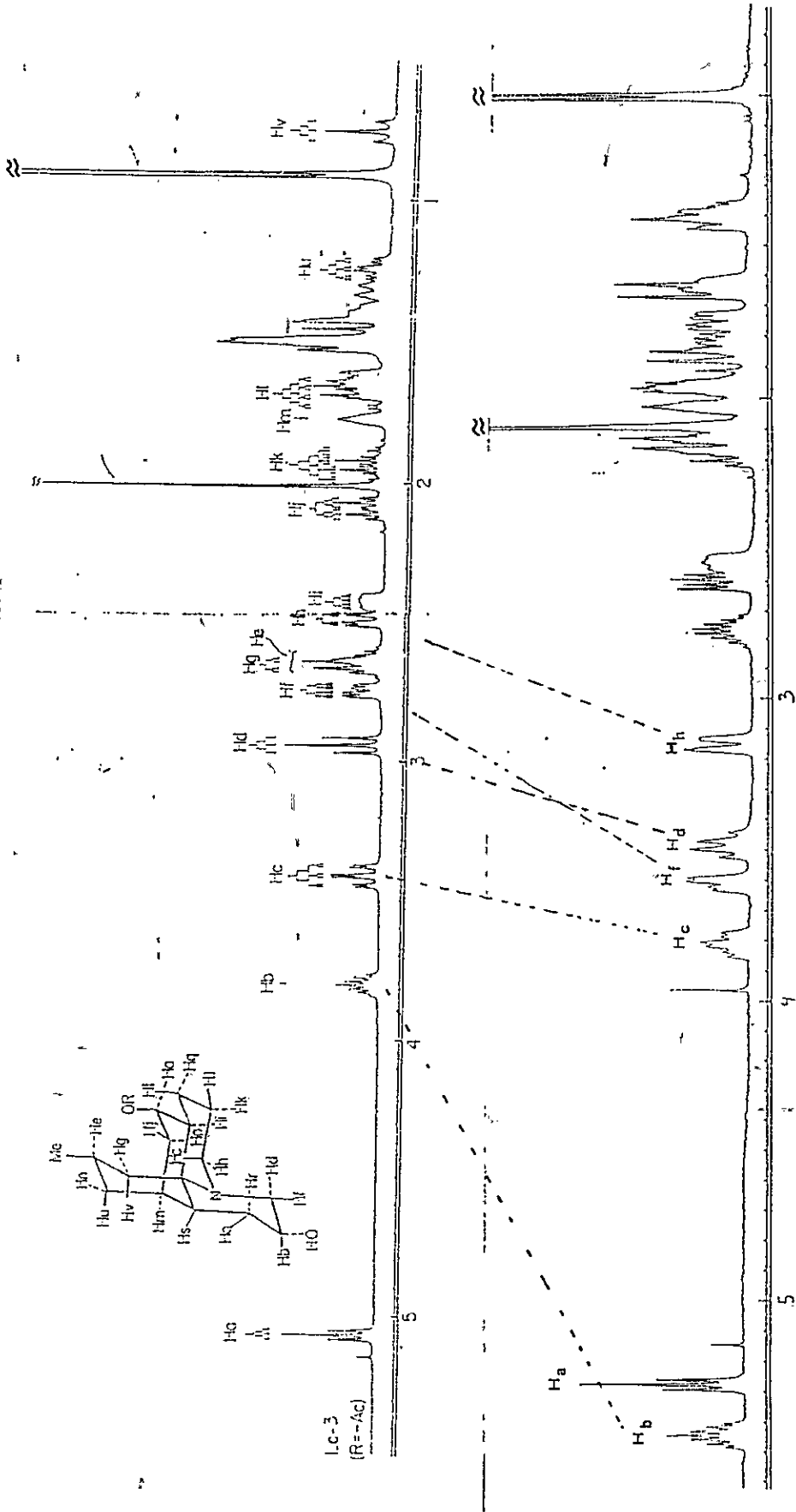
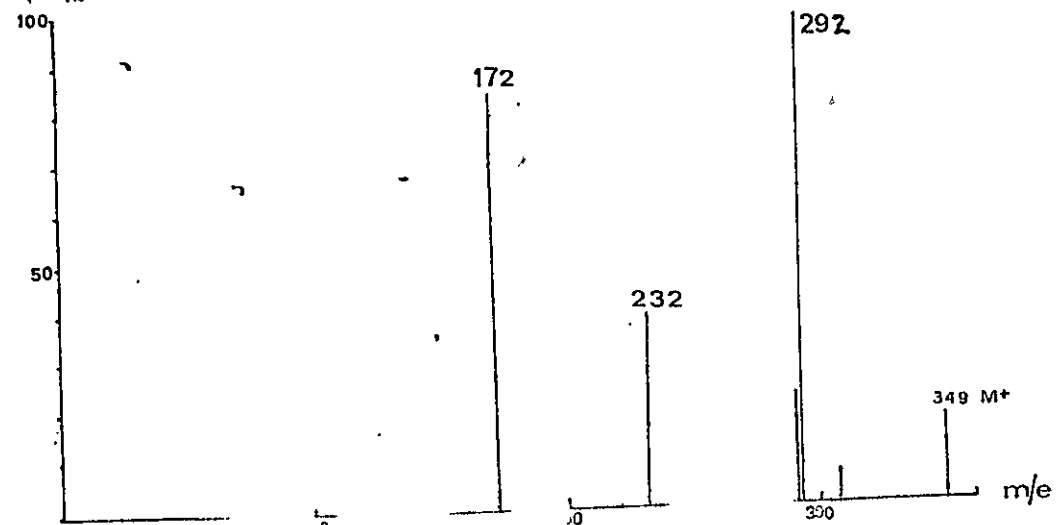
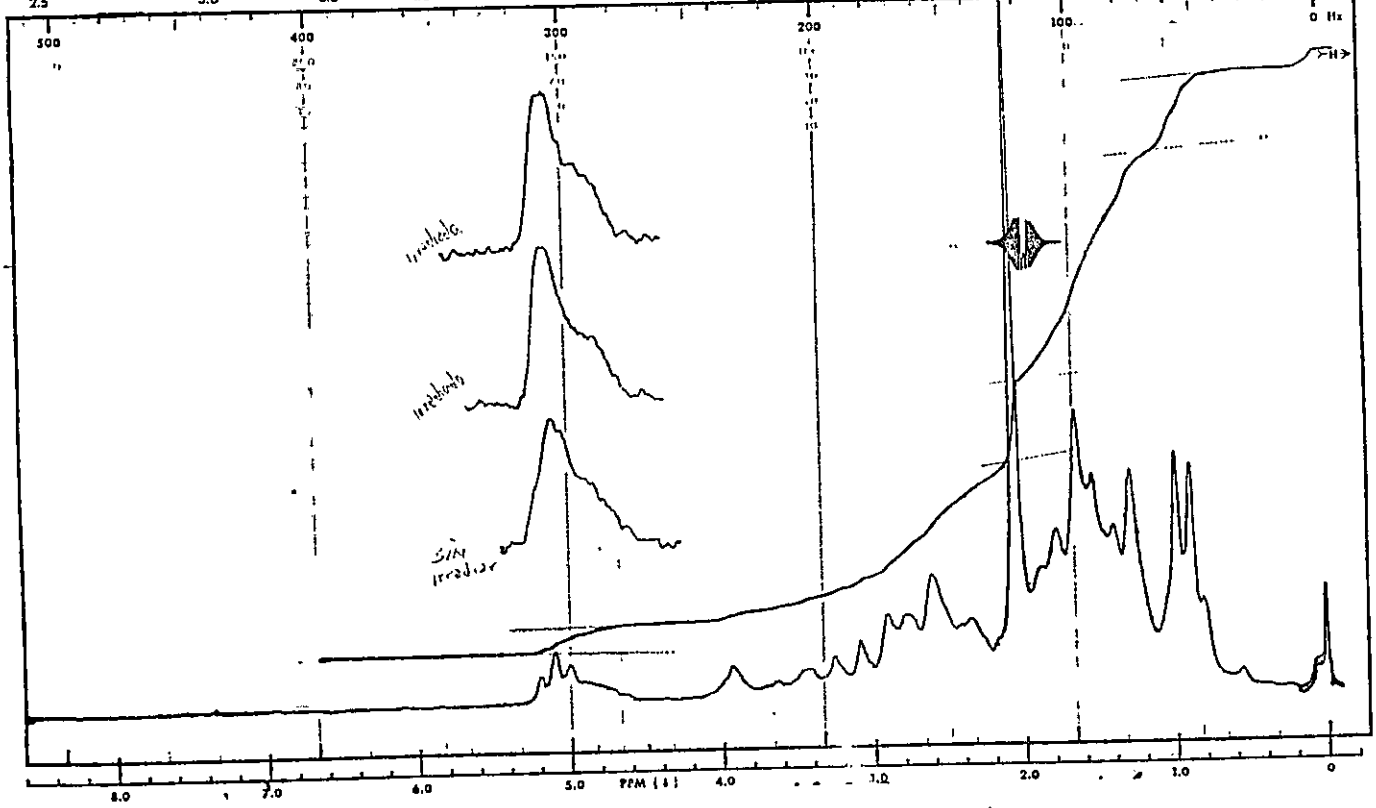
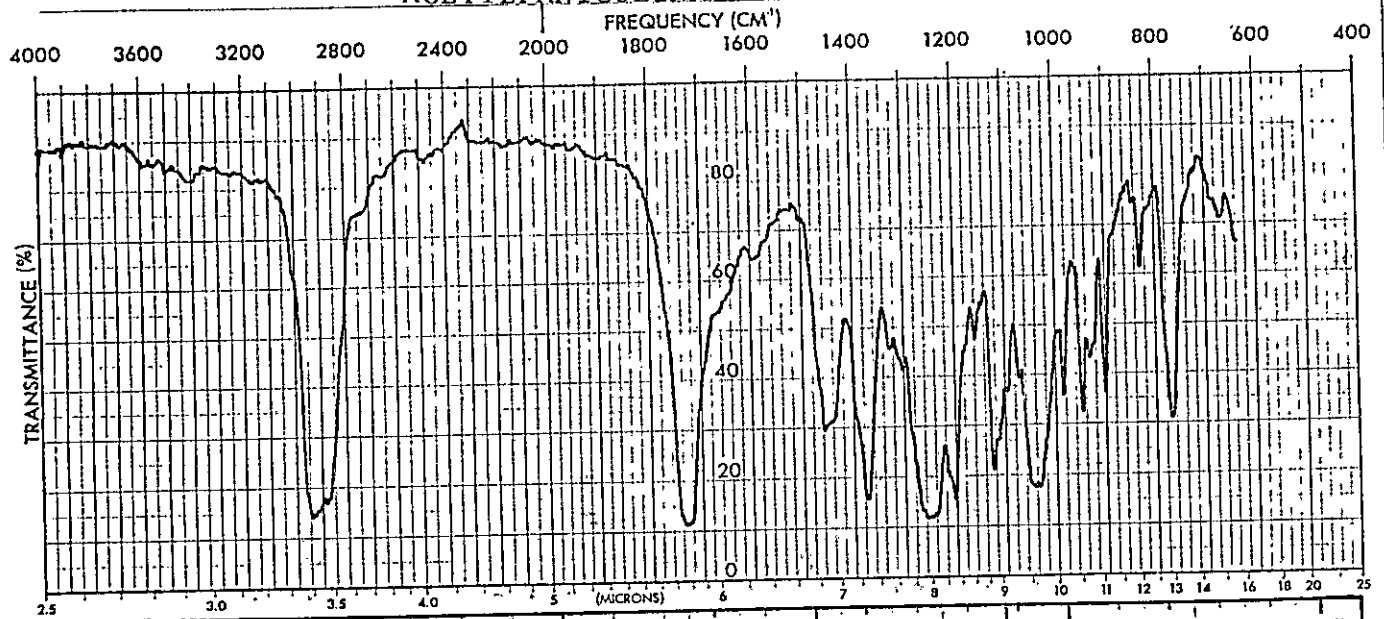


FIG. 15
ESPECTRO DE R.M.N.P. (400 M Hz) DE LC₃ - TFA.

FIG. 16

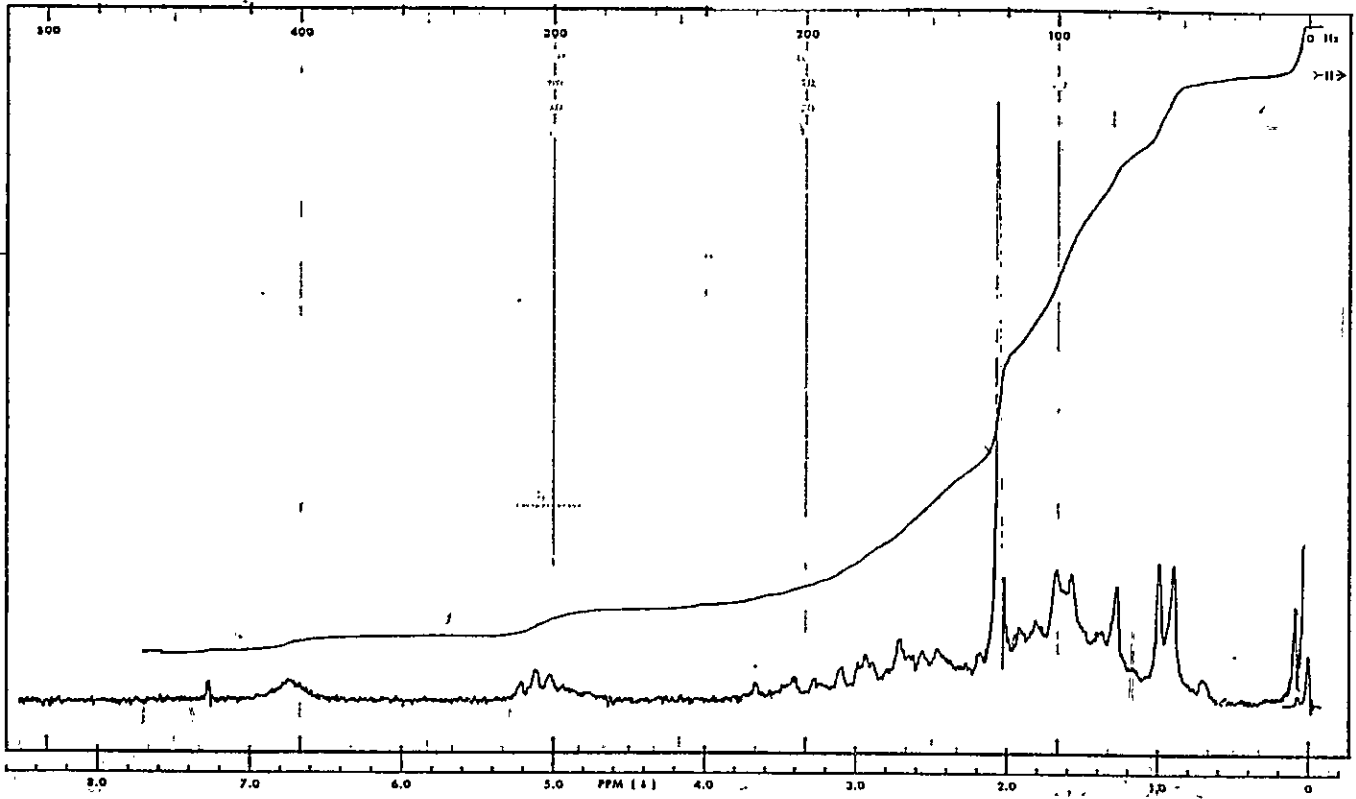
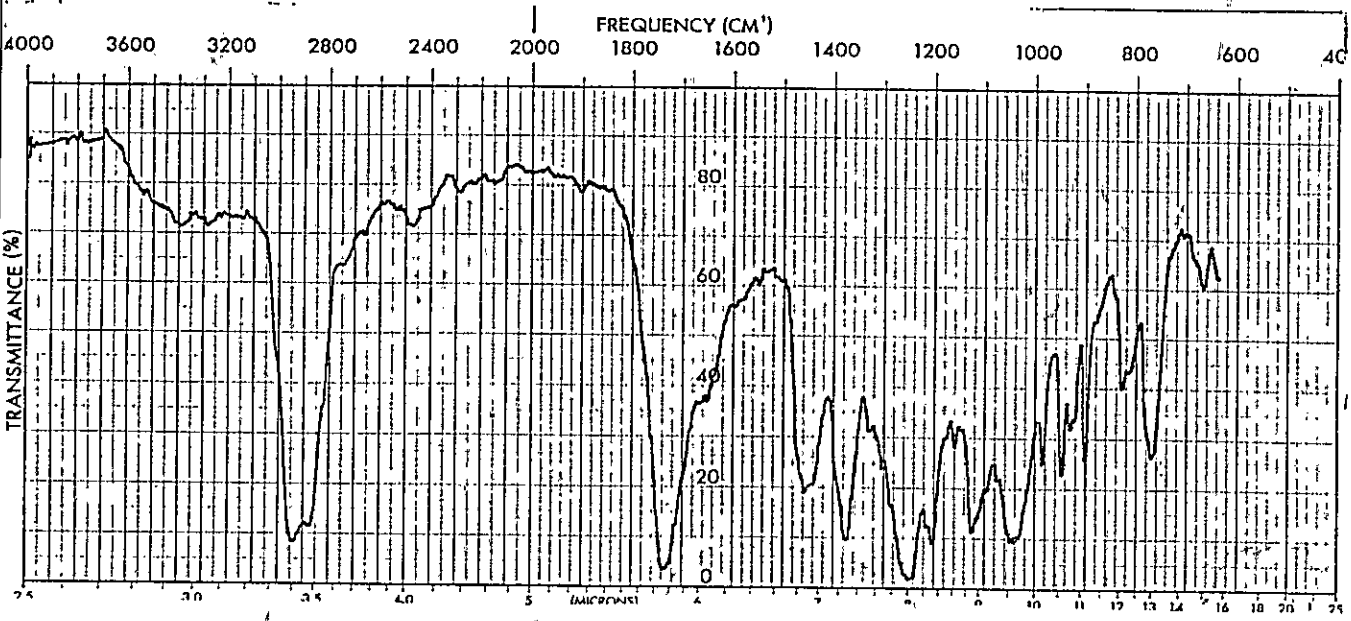
ACETILPANICULINA - PROPIEDADES ESPECTROSCOPICAS



16

FIG. 17

ESPECTRO IR Y DE RMNP DE DESACETILPANICULINA ACETILADA



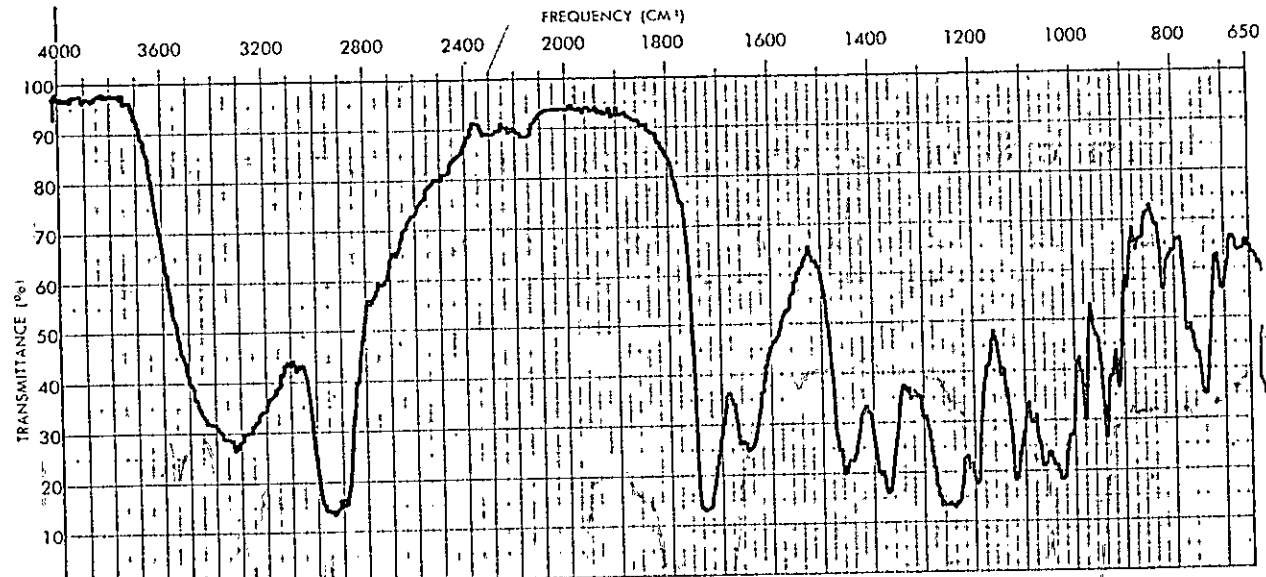


FIG. 20 a: LC₃ con dimetilsulfóxido/anhidrido trifluoacético

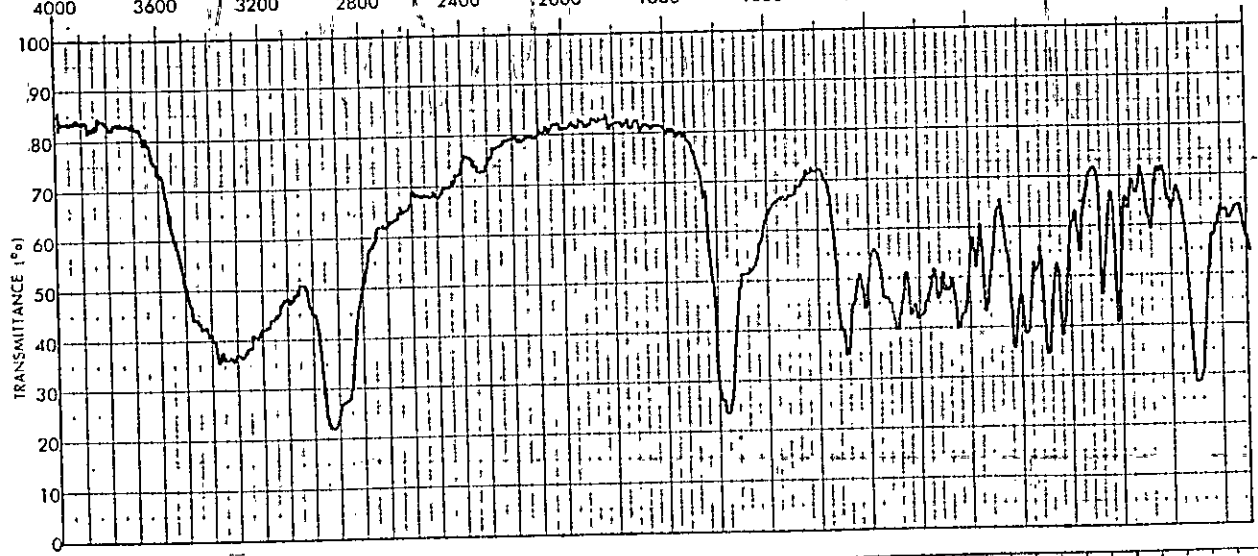
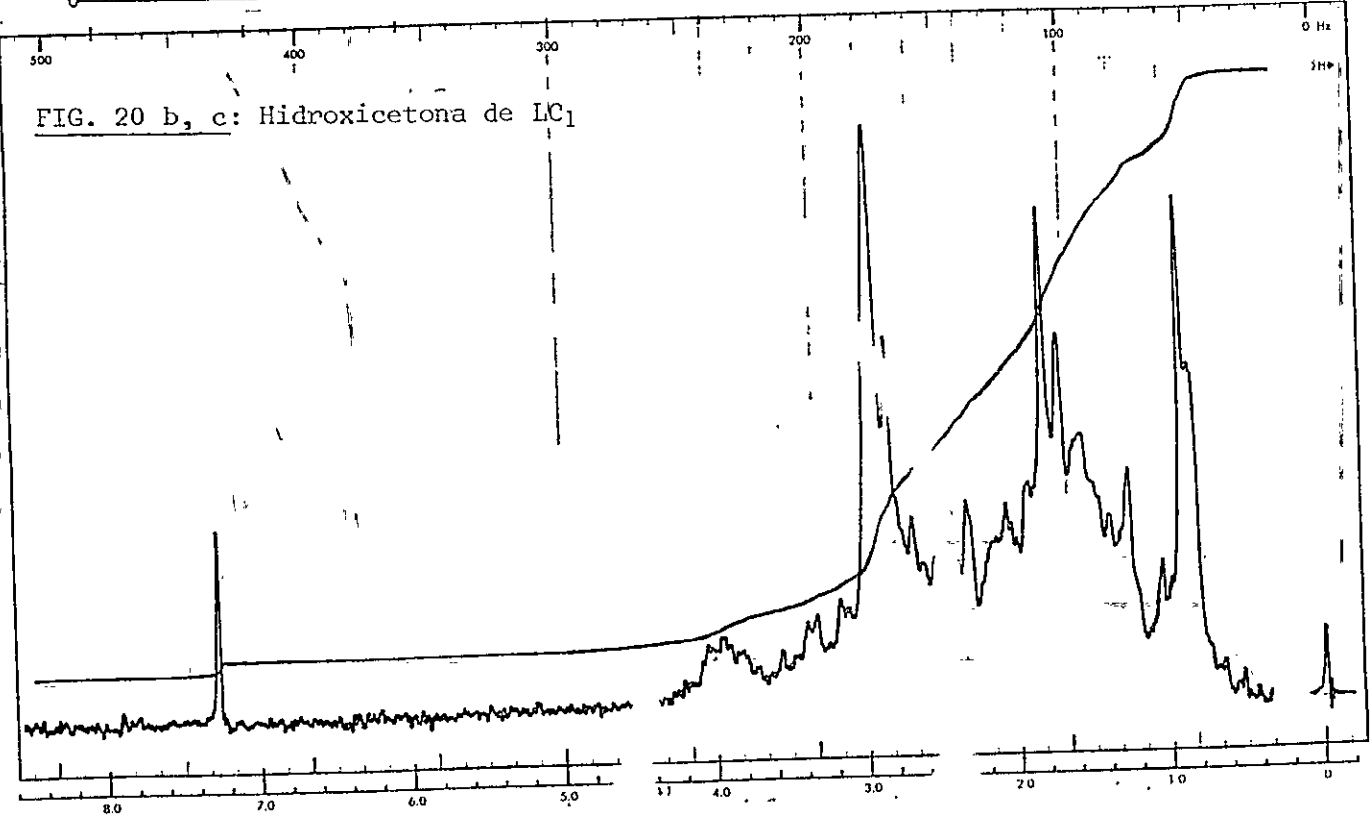


FIG. 20 b, c: Hidroxicetona de LC₁



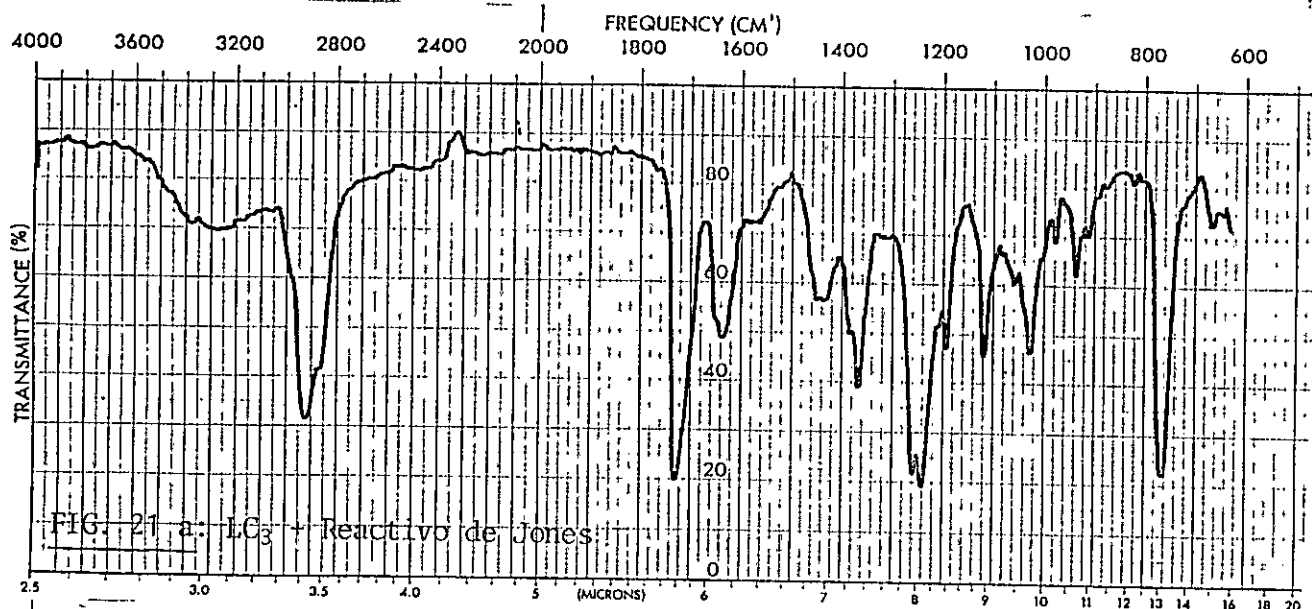


FIG. 21 a: LC_3 + Reactivo de Jones

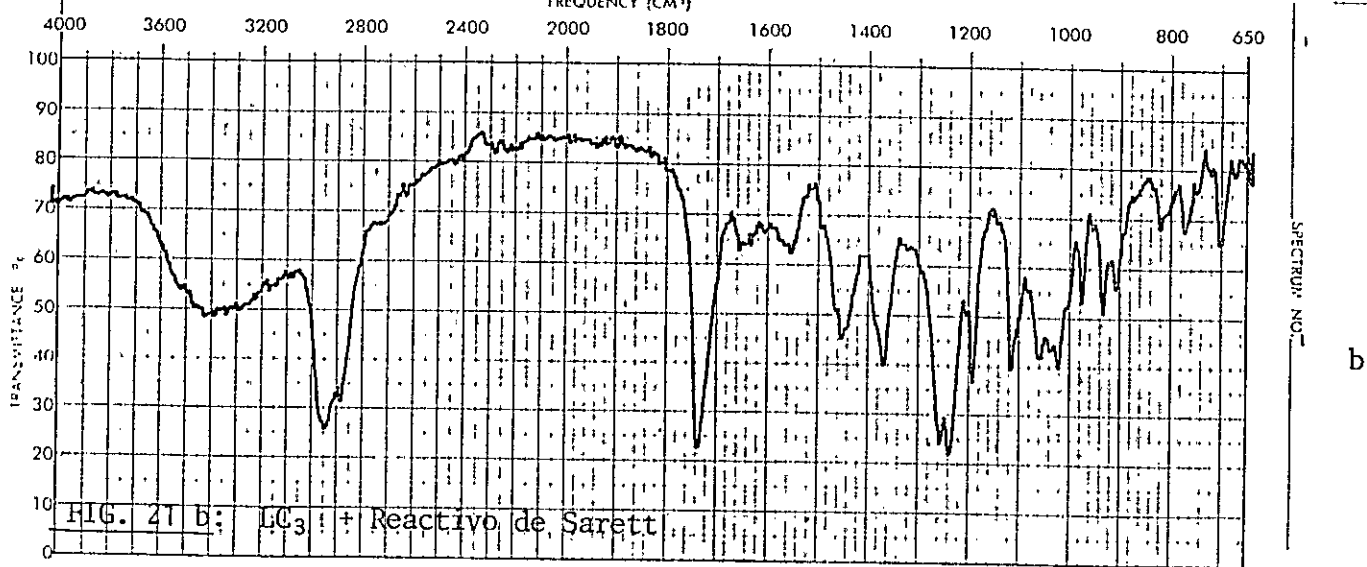


FIG. 21 b: LC_3 + Reactivo de Sarett

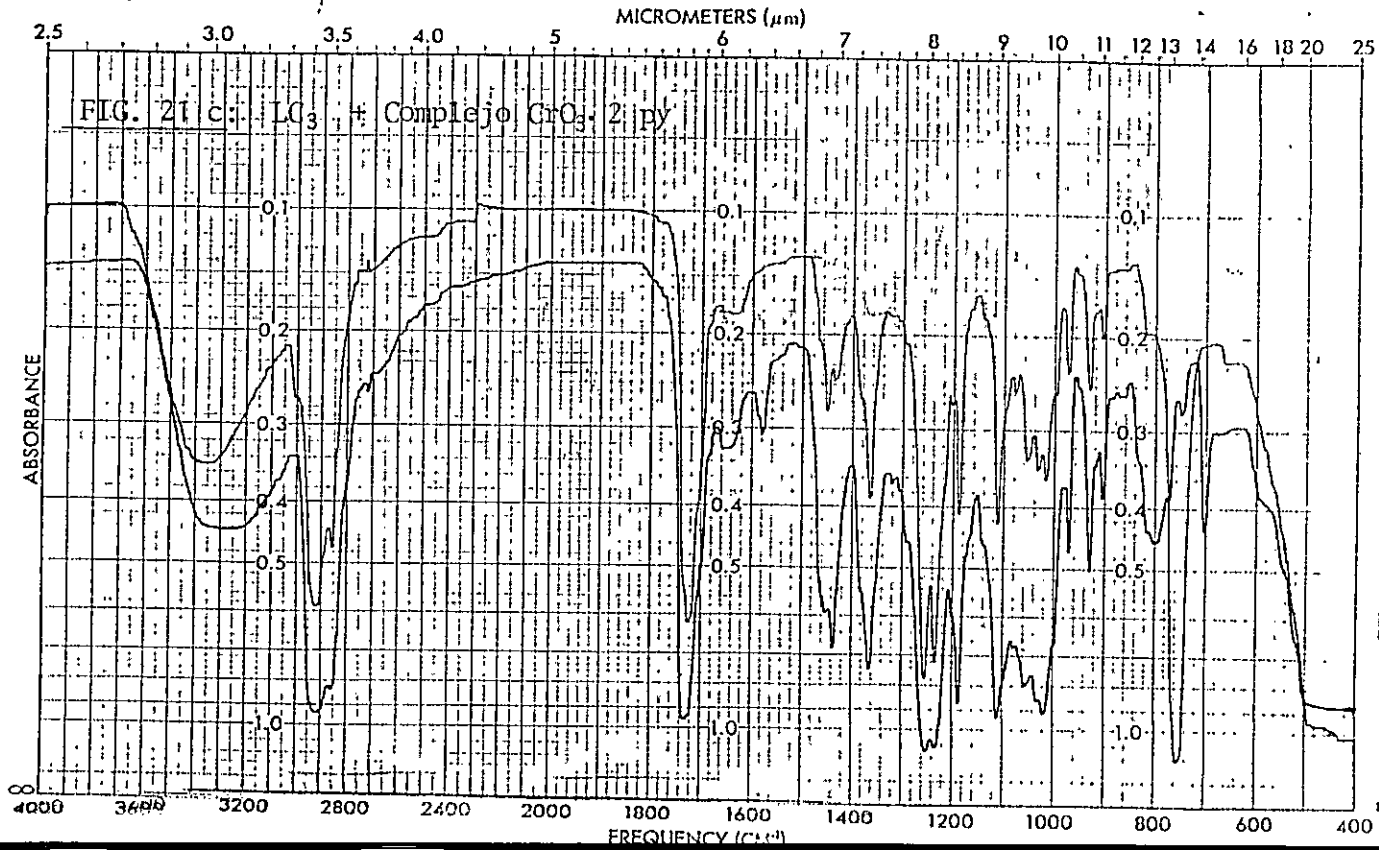


FIG. 21 c: LC_3 + Complejo $CrO_3 \cdot 2 py$

3. DISCUSION

3.1 Características generales de los alcaloides de *L. confertum*

Del procesamiento de 20.1 y 46.6 Kg de planta seca y molida de *L. confertum* (Recolección 1976 y 1978) se ha obtenido un rendimiento en alcaloides de 0.090 y 0.078% respectivamente. Considerando los antecedentes bibliográficos que existen al respecto en otros licopodios chilenos y en especies no autóctonas³⁸, estos rendimientos son relativamente bajos.

Las características de ambos "crudos" de alcaloides es la presencia de dos componentes básicos mayoritarios (LC₁ y LC₃) que en conjunto exceden al 80% de la composición de la mezcla de alcaloides, en tanto que las bases menores se caracterizan por su complejidad y baja cantidad; un hecho particularmente interesante es la presencia de acetildihidrolicopodina que en esta planta es un alcaloide minoritario, en tanto en *L. paniculatum* constituye aproximadamente el 60% de la composición total de la mezcla de alcaloides. En *L. magellanicum*, la base predominante es Fawcetina, que en *L. confertum* constituye también una base minoritaria.

3.2 Revisión de la estructura de Paniculina (LC₃)

De los extractos básicos de *L. paniculatum*, se obtuvo una serie de bases, mencionadas en la introducción de este trabajo. Uno de los alcaloides mayoritario citados, corresponde a paniculina (LC₃) cuya estructura resultó corresponder a un alcaloide no descrito en la literatura.

La obtención de mayores cantidades de este alcaloide en *L. confertum* (LC₃), permitió emprender un nuevo estudio de este compuesto, con el objeto de aclarar algunas dudas relacionadas con la interpretación detallada de su espectro de R.M.N.P. que no era consecuente con la estructura propuesta.

En la introducción de este trabajo, se hizo notar la falta de concordancia en el espectro de R.M.N.P. de acetillicoclavina (P₄) y paniculina (LC₃) particularmente en la zona entre 3 y 4 ppm que es la zona del entorno del nitrógeno, afirmándose que la falta de otros patrones de comparación impidieron racionalizar dichas discrepancias.

El contar con mayores cantidades de LC₃, permitió emprender un estudio sistemático de este alcaloide y de algunos otros estructuralmente relacionados. En este último sentido, la obtención de un espectro de R.M.N.P. de acetildihidrolicopodina 7 (400 M Hz), constituyó un importante patrón de referencia para compararlo con los espectros de paniculina 10 y derivados como así también con deacetillicoclavina¹³ (P₄). Fig. 22 ,pág. 56

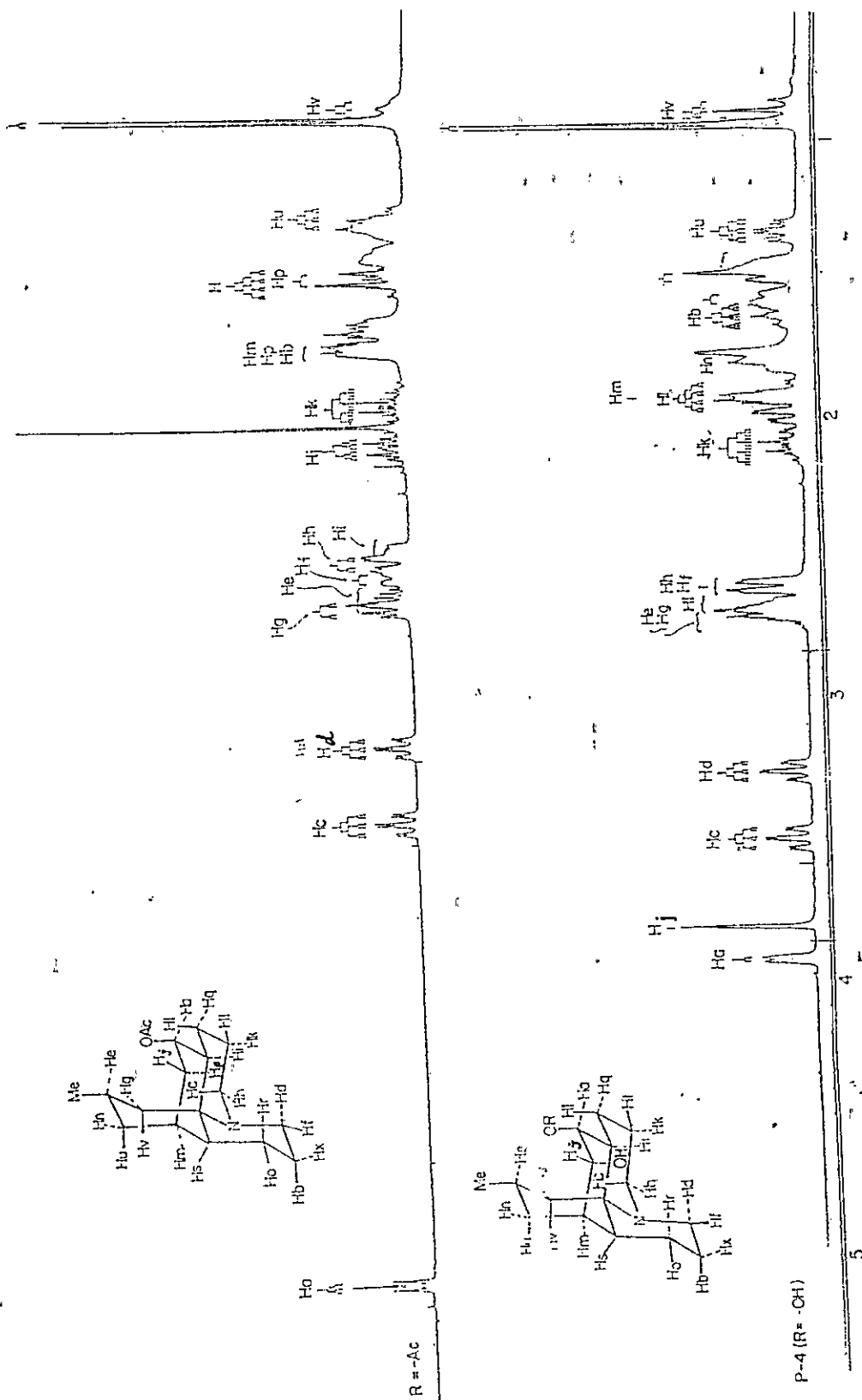
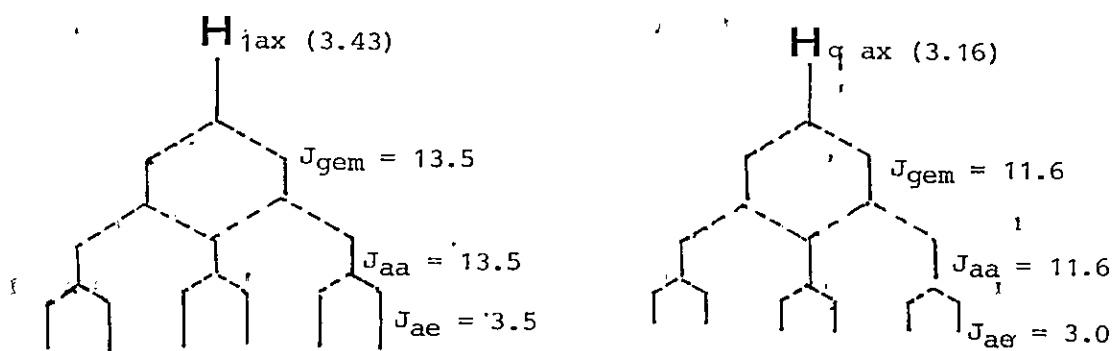


FIG. 22
 ESPECTRO DE R.M.N.P. (400 MHz) DE ACETILDIHIDROLICOPODINA Y DEACETIL
 LICOCLAVINA EN CDCl₃

El examen del espectro de R.M.N.P. de acetildihidrolicopodina (Fig.22) particularmente la zona entre 3 y 4 ppm revela con precisión el entorno del átomo de nitrógeno. En efecto, se puede apreciar la presencia de dos tripletes desdoblados a 3.43 y 3.16 ppm asignado a los dos H_{ax} de C_1 y C_9 respectivamente y su multiplicidad es el producto de los siguientes acoplamientos.



Estas mismas características, para los dos tripletes desdoblados asignado a los 2 H axiales vecinos a nitrógeno, se encuentran igualmente reproducidos en el espectro de P_4 , alcaloide que posee un entorno similar a acetildihidrolicopodina. Esto último, ha venido a confirmar las asignaciones hechas para P_4 y discutidas en la introducción de este trabajo.

La confirmación para estas asignaciones, se han corroborado con extensivas doble irradiación, demostrando la autoconsistencia de las asignaciones hechas (ver Apéndice).

Si LC_3 presenta un entorno al nitrógeno similar a acetil dihidrolicopodina y P_4 (Fig. 6.), cabría esperar entonces que LC_3 presente un modelo espectral similar a las dos bases anteriores (en particular con los H-1 y H-9 en la zona 3-4 ppm).

El examen del espectro de 400 MHz de LC_3 (Fig. 14) muestra que la señal compleja a δ 3.80, se desplaza en el derivado acetilado de LC_3 (Fig. 15 pág. 49) a casi 5.0 ppm, y debería corresponder a un H geminal a OH. Este hecho y su integración para un hidrógeno, llevó a postular la presencia de un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo secundario.

Su ubicación la hemos propuesto en el C-10 en base a las siguientes consideraciones:

La presencia de un hidrógeno geminal a OH en C-10 que absorbe a δ 3.80, presupone una serie de interacciones con respecto a los hidrógenos vecinos. Si suponemos una configuración axial para este hidrógeno, es posible racionalizar el ancho medio (40 Hz) de la señal observada a δ 3.80. Esto es consecuencia de las dos interacciones axial-axial con los H-9 y H-11 y las respectivas interacciones axial-ecuatorial con los hidrógenos de los carbonos vecinos. Fig. 23

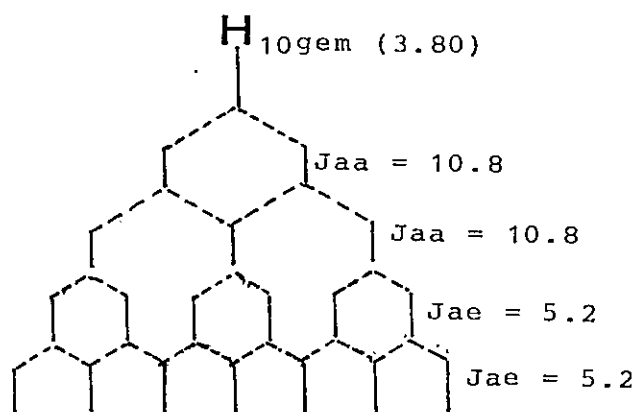


FIG. 23
Hidrógeno geminal al OH en C-10

Por otra parte, la introducción de un OH en el C-10 produce la esperada simplificación de la señal del H-9 ax de LC₃ que ahora aparece como un triplete a 2.95 ppm (y que en P₄ y acetil absorbe normalmente como un triplete desdoblado producto de su acoplamiento adicional con H-10 ax, en tanto el H-1 ax permanece inalterado, como cabría esperar, a δ 3.42. Esta es justamente la única señal que homologa a LC₃ con P₄ y acetildihidrolicopodina en la zona de 3-4 ppm. Este último hecho, nos permite descartar de inmediato, la posibilidad estructural B como otra alternativa para la estructura de LC₃ (Fig. 24).

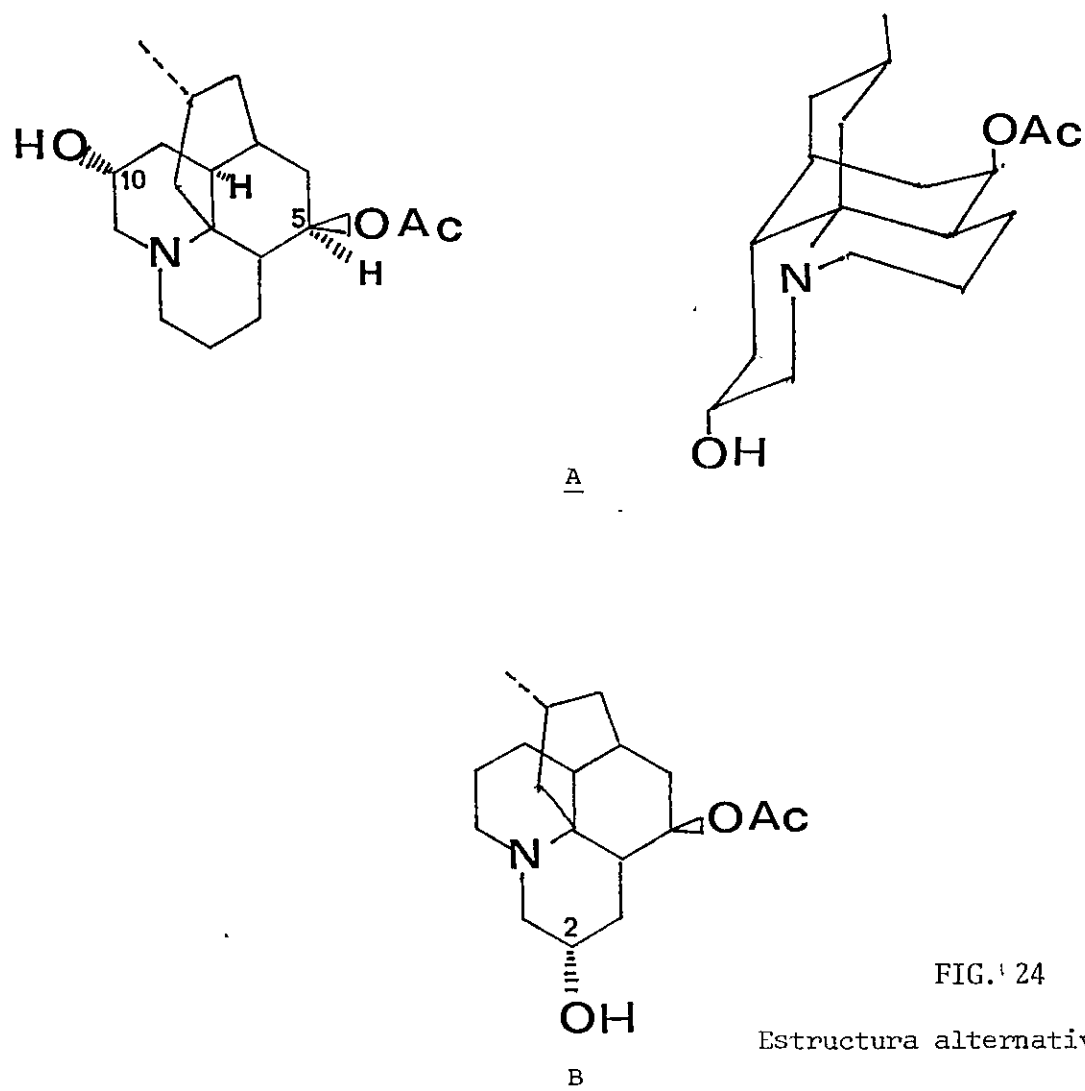


FIG. 24

Estructura alternativa para LC₃

Este multiplete a δ 3.80 desplaza aproximadamente 1 ppm cuando paniculina LC₃ se acetila (efecto anisotrópico del grupo acetilo en C-10) (Fig. 16), y puesto que la señal es bastante ancha, explica claramente por qué a 60 MHz el triplete del hidrógeno geminal al acetato no fue detectado.

Este hecho experimental no se racionalizó adecuadamente en la estructura primitiva.

La ratificación para esta nueva estructura de LC₃ se logró tratando LC₃ con anhídrido trifluoroacético (TFA) (Fig. 15).

Este procedimiento dio un solo monotrifluoroacetato, con el consiguiente desplazamiento químico de las señales de los protones vecinos al OH.

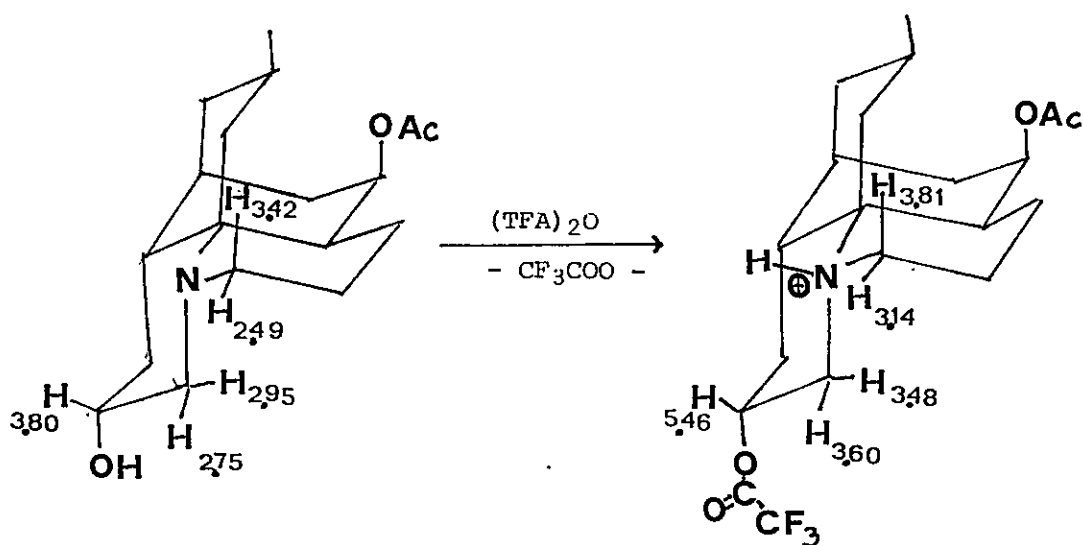


FIG. 25

LC₃ - TFA

Si comparamos los espectros de RMNP de alta resolución de LC₃ y LC₃-TFA se observa que los cambios más significativos afectan al H gem al OH, y los hidrógenos inmediatamente vecinos al nitrógeno (ver Tabla 3, Fig. 15). Conclusiones similares se logran con el bis-o-trifluoroacetato de desacetilpaniculina.

TABLA 3

Comparación de absorción LC₃ y LC₃-TFA (400 M Hz)
y LC₁ - TFA

	H-1 _{ax}	H-1 _{ec}	H-9 _{ax}	H-9 _{ec}	H-10 _{ax}
LC ₃	3.42	2.49	2.95	2.75	3.80
TFA-LC ₃	3.81	3.14	3.48	3.60	5.46
TFA-LC ₁	3.81	3.15	3.48	3.60	5.44
LC ₁	3.44	2.61	2.96	2.75	3.81

Análisis de los espectros de la pa
niculina y su trifluoroacetato (Fig.15) permite apreciar un cambio de multiplicidad en la banda de absorción del H-1_{ax} de LC₃ (ver espectro), producto de un acoplamiento adicional con el NH (J = 10.0 Hz). Mientras H-9_{ax} en LC₃ es un triplete que absorbe a 2.95 ppm (J = 10.8), en el éster LC₃-TFA, este H-9_{ax} se desplaza a más bajo campo (δ 3.48) absorbiendo como cuarteto por acoplamiento con el hidrógeno del nitrógeno cuaternario. Este acoplamiento, igualmente se presenta para el H-1_{ax}

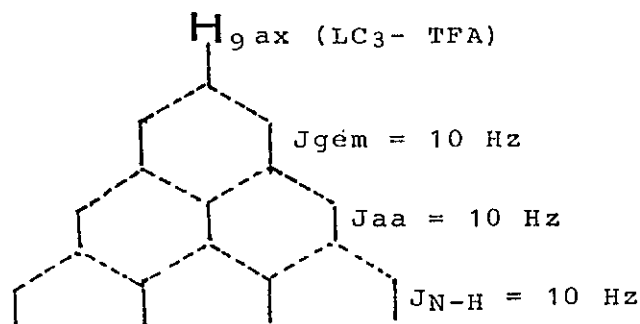


FIG. 26

Acoplamiento hidrógeno 9ax. en LC₃ -TFA

Los estudios con reactivos de desplazamiento químico (d. q.), permiten introducir importantes simplificaciones en un espectro de baja frecuencia, expandiéndolo y separando señales fuertemente acopladas y que en una primera aproximación reproducen la expansión lograda a alta frecuencia.

Los estudios realizados con reactivos de d.q. en alcaloides de licópodio⁴⁹, han revelado algunos hechos interesantes y que demuestran lo anterior. La Fig. 27 a, muestra a dihidrolicopodina 9 en ausencia del reactivo de d.q.; las únicas señales interpretables son el doblete a alto campo de los protones del metilo de C-16 acoplado con el Hax de C-15 y el triplete característico del H geminal al OH en C-5 a δ 3.95. La adición de Eu (dpm)_3 provoca el inmediato desplazamiento de las señales más cercanas al oxígeno (y por ello más cercana al Europio en el complejo) hacia más bajo campo. Por uso de extensivos experimentos con doble irradiación se muestra que las señales más intensamente desplazadas, para la relación molar mostrada en la Fig. 27 b, son H-5ec (triplete del H gem a OH) el fuerte desplazamiento del multiplete del Hax de C-15; el cuádruplete desdoblado del H-3 ax y el doblete desdoblado del H-6 ec; el H-3ec, el H-14 y 8 ec se encuentran en una zona de acoplamiento múltiple que hacen difícil intentar un análisis de primer orden.

El uso de dihidrolicopodina deuterado (27 c) confirma por ejemplo la asignación hecha para el H-3ax en el que se aprecia ahora un triplete desdoblado, en lugar del cuádruplete desdoblado primitivo, en tanto desaparece la señal de los H-6ax, 6ec y 5 ec y se clarifican las señales de los H-8ec, H-14ax y H-3ec.

Fawcetina (21; $R_3 = \alpha\text{-OH}$) otra base que presenta grupos funcionales similares a LC₃, presenta un espectro de R.M.N.P. a 60 MHz complejo y similar a 9; Fig. 28 a, pág. 66, solo es interpretable en forma rápida el triplete deformado del Hgem al acetato y el doblete característico a alto campo. El agregado de Eu (dpm)₃ en la razón molar mostrada en la Fig. 28 b, señala el corrimiento esperado, tanto para las posiciones vecinas al OH de C-8 como también en las vecindades del Hgem al acetato de C-5, según se desprende del análisis del espectro 28 b.

A bajo campo se observa el desplazamiento del Hgem al OH en C-8, el multiplete del Hax de C-15 y el dramático desplazamiento del H-6ec, desplazado por la doble acción del Eu (dpm)₃ de C-8 y C-5; en tanto a δ 8.8 se encuentra el triplete clarificado de H-5ec e inmediatamente vecino a éste el multiplete de H-7ec. Al mismo tiempo se observa el d.q. sufrido por el doblete del metilo de C-6 (δ 5.95) desplazado aún a más bajo campo que el singlete del acetato (4.3 ppm).

FIG. 27 a. Espectro de RMNP
(60 M Hz) de dihidrolicopodina

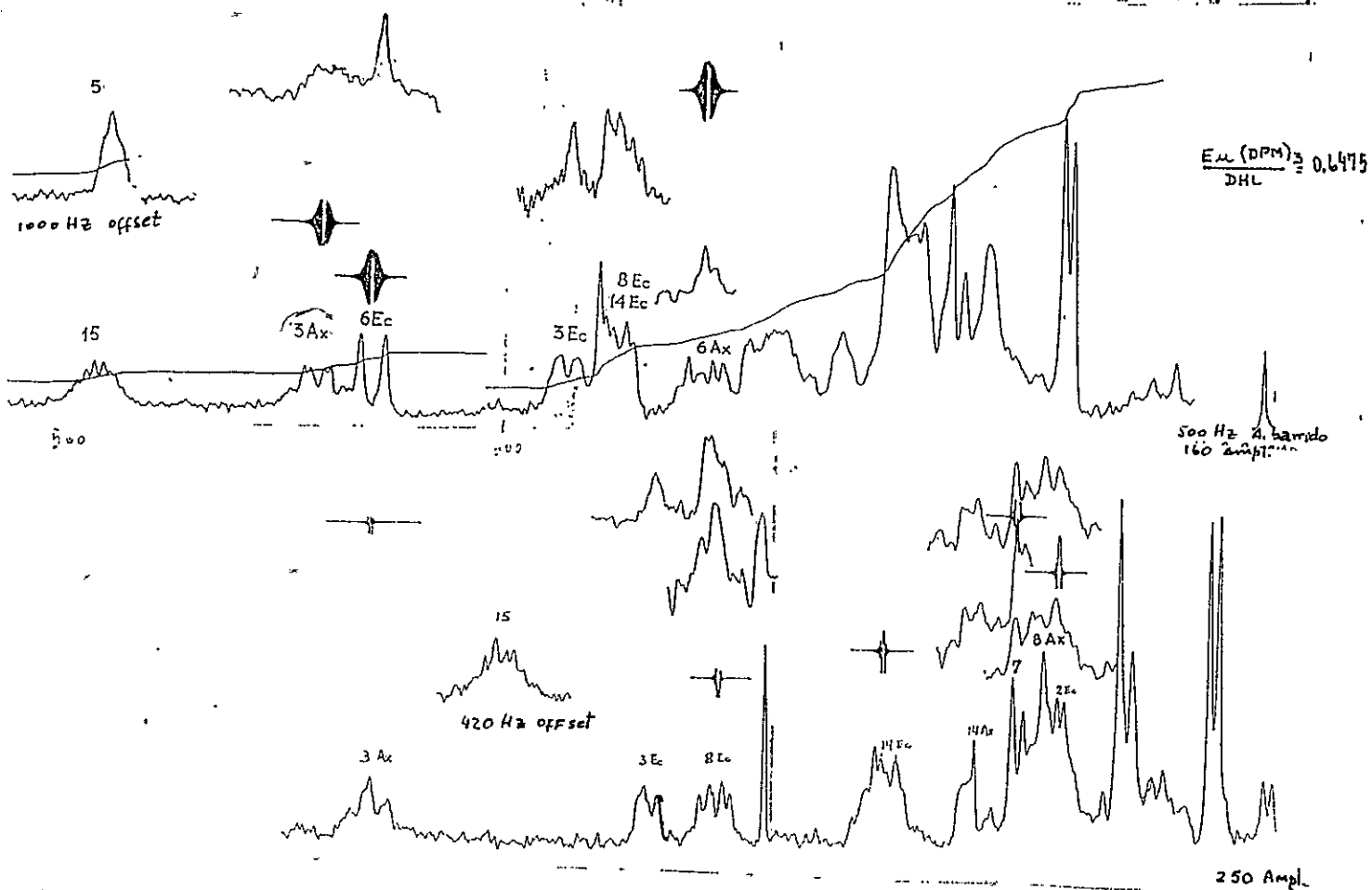
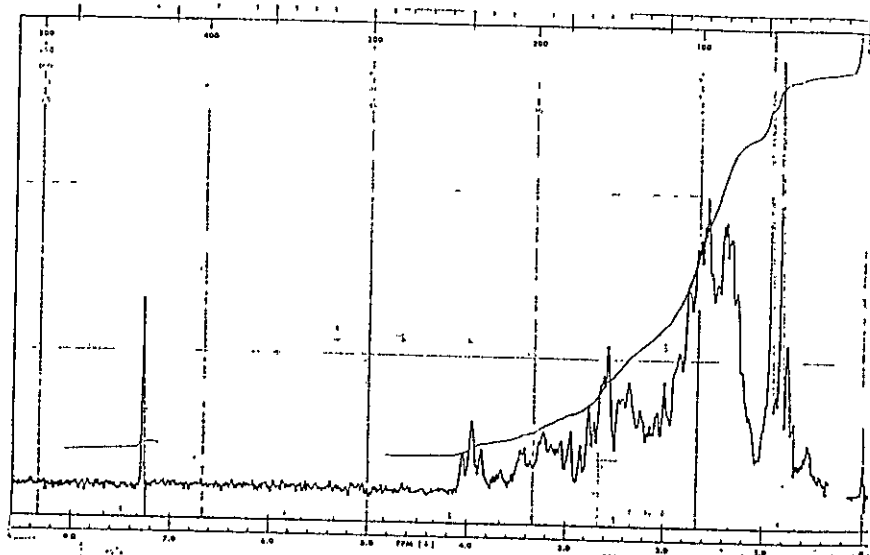


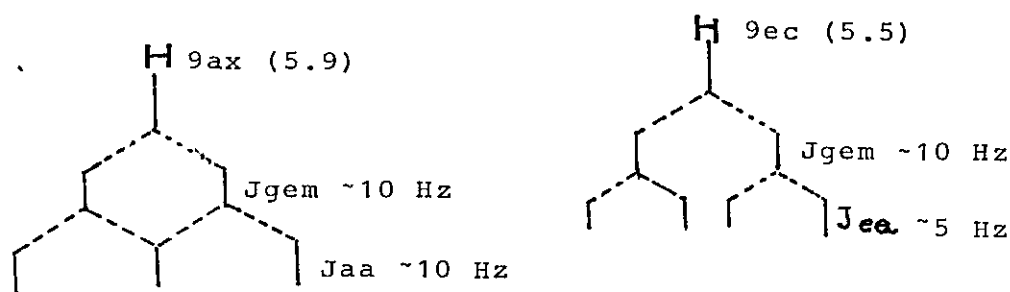
FIG. 27 b: Dihidrolicopodina con $\text{Eu}(\text{dpm})_3$

27 c: Espectros de 4,5,6,6,9,9,10,10-octadeuterodihidrolicopodina

Por otra parte, se ha demostrado que la adición de $\text{Eu}(\text{dpm})_3$ sobre licopodina 8 no muestra cambios notables en el espectro de R.M.N.P. de 60 M Hz, por lo que hemos concluido que el reactivo no se fija ni sobre nitrógeno ni sobre carbonilos .

El tratamiento de la hidroxicetona de LC_1 con $\text{Eu}(\text{dpm})_3$ permitió visualizar claramente 3 grupos de señales acopladas entre sí (a 60 M Hz) (Fig. 29 , pág. 68). Si suponemos que el reactivo de desplazamiento químico, se coordina con el oxígeno del OH, los hidrógenos que experimentan las mayores interacciones deberían ser el H-10_{Ax}, H-9 ax, H-11ax y H-9ec.

En efecto, el multiplete a 3.8 ppm y que no se detecta bien a 60 M Hz, por agregado del reactivo, experimenta un fuerte corrimiento a bajo campo (8.1 ppm); las dos señales que se aprecian a continuación (un triplete y un doblete de formado) y que por doble irradiación muestran estar acopladas al multiplete, se pueden racionalizar como H-9ax y el H-9ec. Este último presenta una deformación similar al espectro expandido en LC_3 a 400 M Hz.



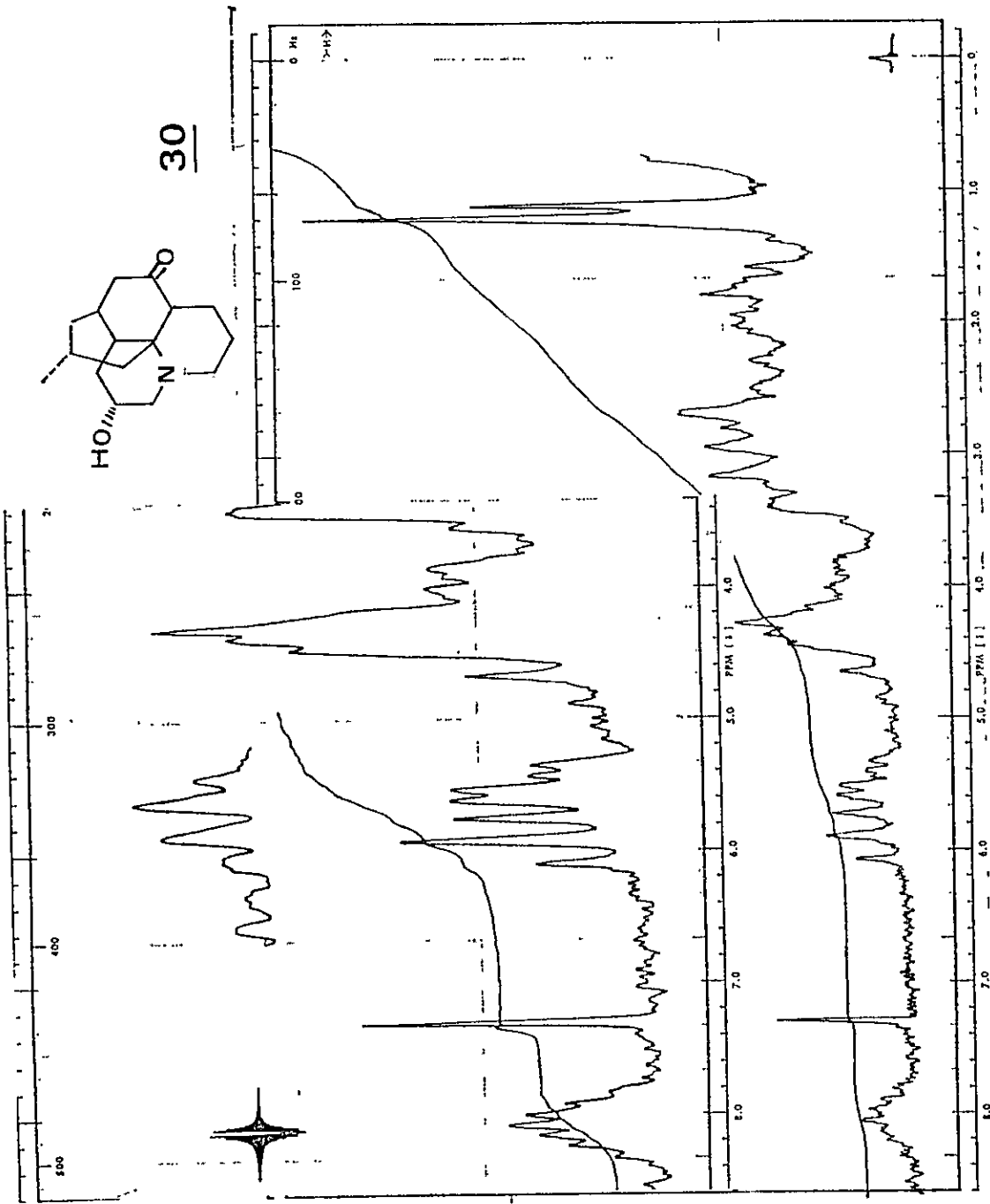


FIG. 29

ESPECTRO RMNP A 60 MHZ DE LA HIDROXICETONA DE DESACETILPaniculina
 CON Eu (dpm)₃

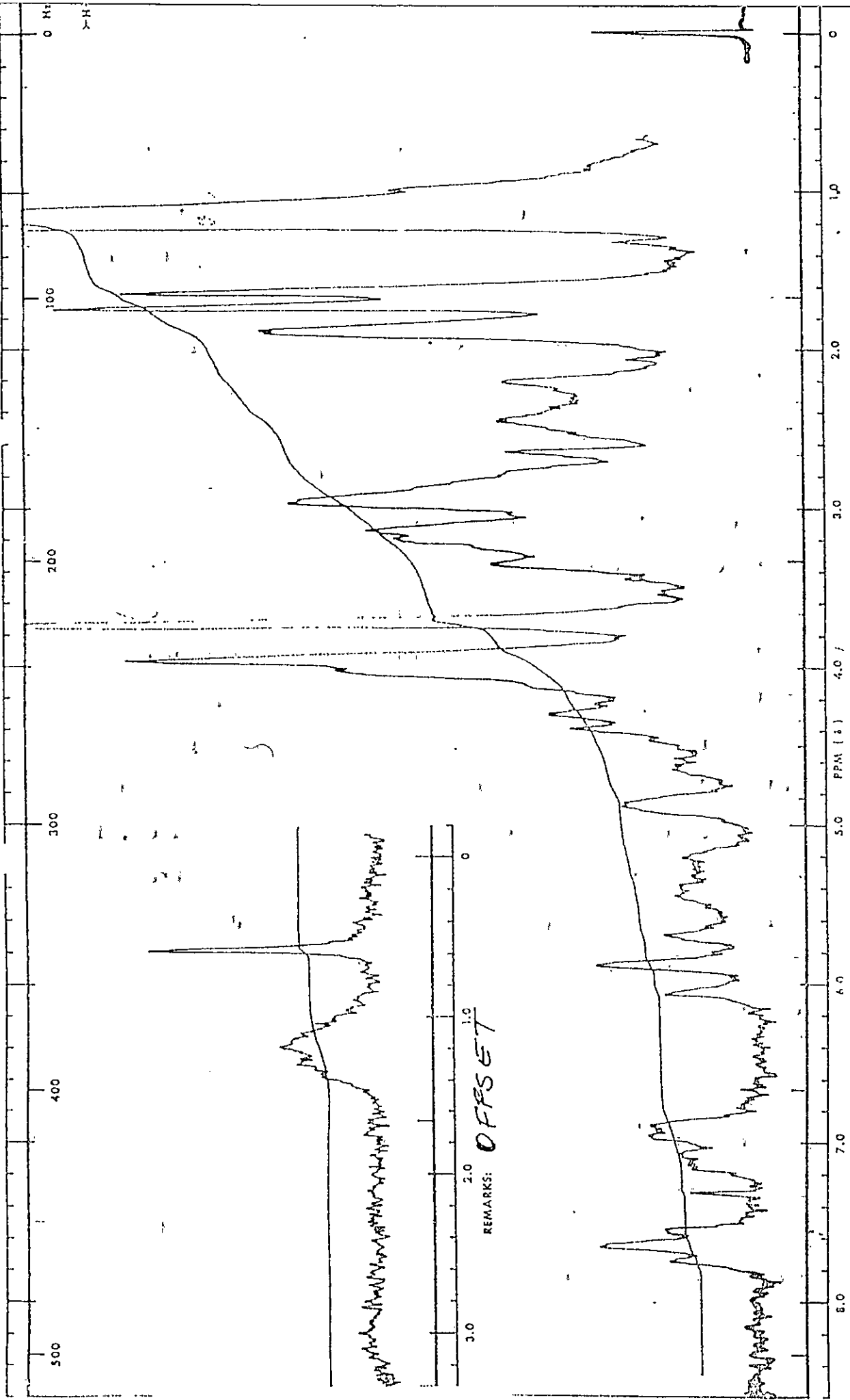


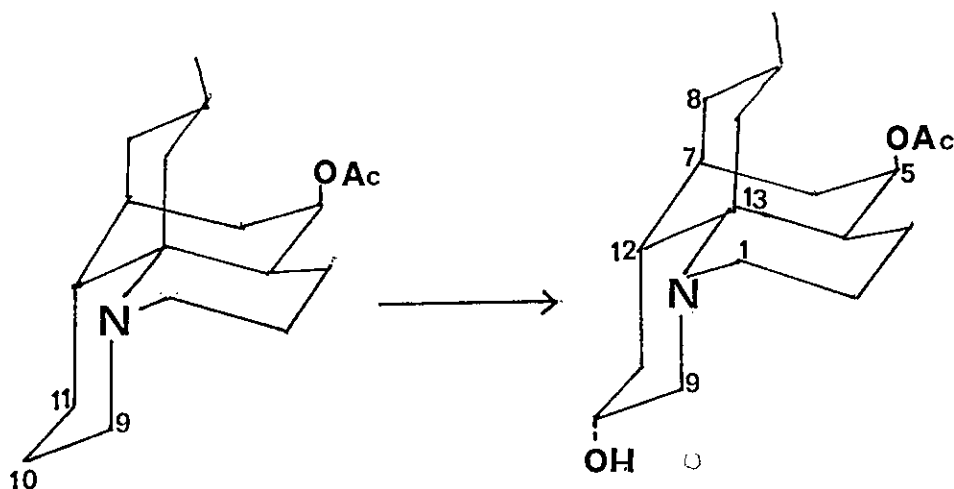
FIG. 30
ESPECTRO DE RMNP A 60 MHZ DE LA PANICULINA CON Eu (dpm)₃

El agregado de $\text{Eu}(\text{dpm})_3$ en LC_3 provoca efectos diferentes al de la hidroxiketona, ya que en este caso al igual que sucede con Fawcetina, el reactivo de desplazamiento químico no solo se fija al oxígeno del hidroxilo, sino también se coordina al acetato del C-5, ya que esta última señal se desplaza a δ 7.65, en tanto el multiplete del H-9ec se corre a 7 ppm y el H-9ax a δ 5.85. El resto de las señales no son fácilmente interpretables. Fig. 30, pág. 69.

La confirmación para la nueva estructura de LC_3 se logró mediante Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C , por correlación con los espectros de ^{13}C de otras bases relacionadas.

La gran sensibilidad de ^{13}C a los parámetros dependientes de ligeras alteraciones geométricas y la rigidez de esqueleto de las bases de licopodio, que excluye las posibles complicaciones de interconversiones conformacionales, favorecen el estudio de las influencias de rasgos estructurales sobre propiedades espectroscópicas, estereoquímicas y de reactividad química, ya que los d.q. inducidos sobre los átomos de carbono por sustitución son aproximadamente aditivos.

Eligiendo acetildihidrolipodina como "compuesto modelo", podemos examinar los efectos de corrimiento químico que experimenta esta base por introducción de un sustituyente OH, en los carbonos α , β , γ y δ . Esta situación es la que justamente muestra paniculin (LC_3) es decir, el modelo es esqueleto de acetildihidrolipodina, con un hidroxilo en C-10.



Acetildihidrolicopodina

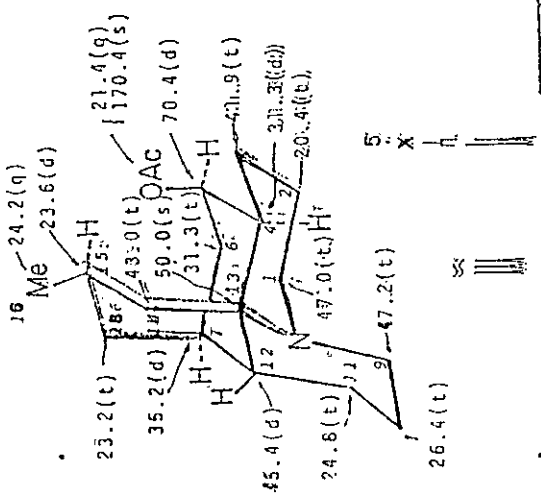
Paniculina (LC₃)

La introducción de un OH en posición α en el C-10 de acetildihidrolicopodina, produce el esperado corrimiento a bajo campo del carbono α (Fig. 31, 32). (Efecto α) desde 26.4 a 68.5 ppm. Igualmente (efecto β) se desplazan los C-11 y C-9; en tanto que por efecto γ se produce el esperado d.q. a alto campo para el C-12.

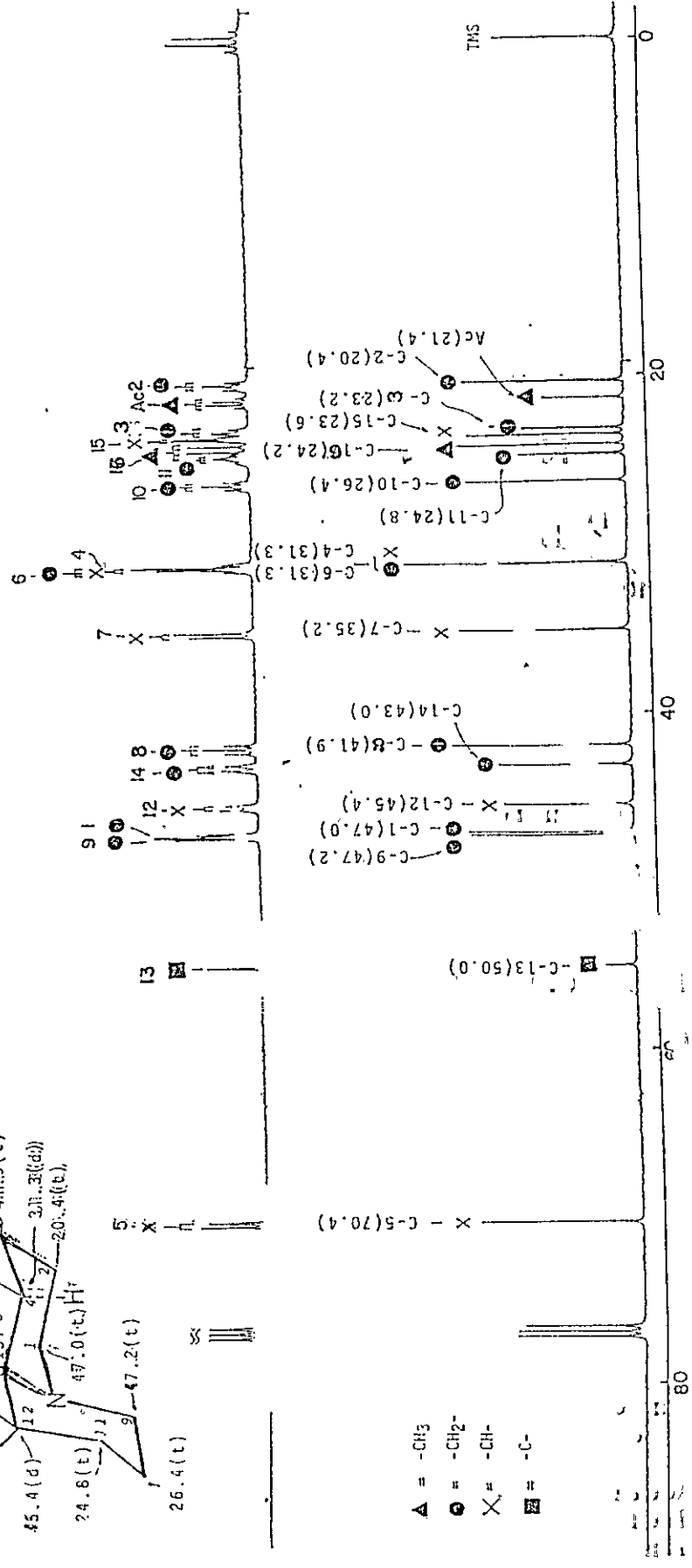
TABLA 4

RMN C-13 para LC₃, y acetildihidrolicopodina

Carbonos	C-1	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12
Paniculina (LC ₃)	47.0	70.2	31.2	35.0	41.8	54.7	68.5	34.4	43.5
Acetildihidrolicopodina	47.0	70.4	31.3	35.2	41.9	47.9	26.4	26.8	45.4



- ▲ = -CH₃
- = -CH₂-
- X = -CH-
- = -C-



ESPECTRO DE RMN ¹³C DE ACETILDIDHIDROLICOPODINA

Fig. 31

100MHz CNR de LC-3 en CDCl3

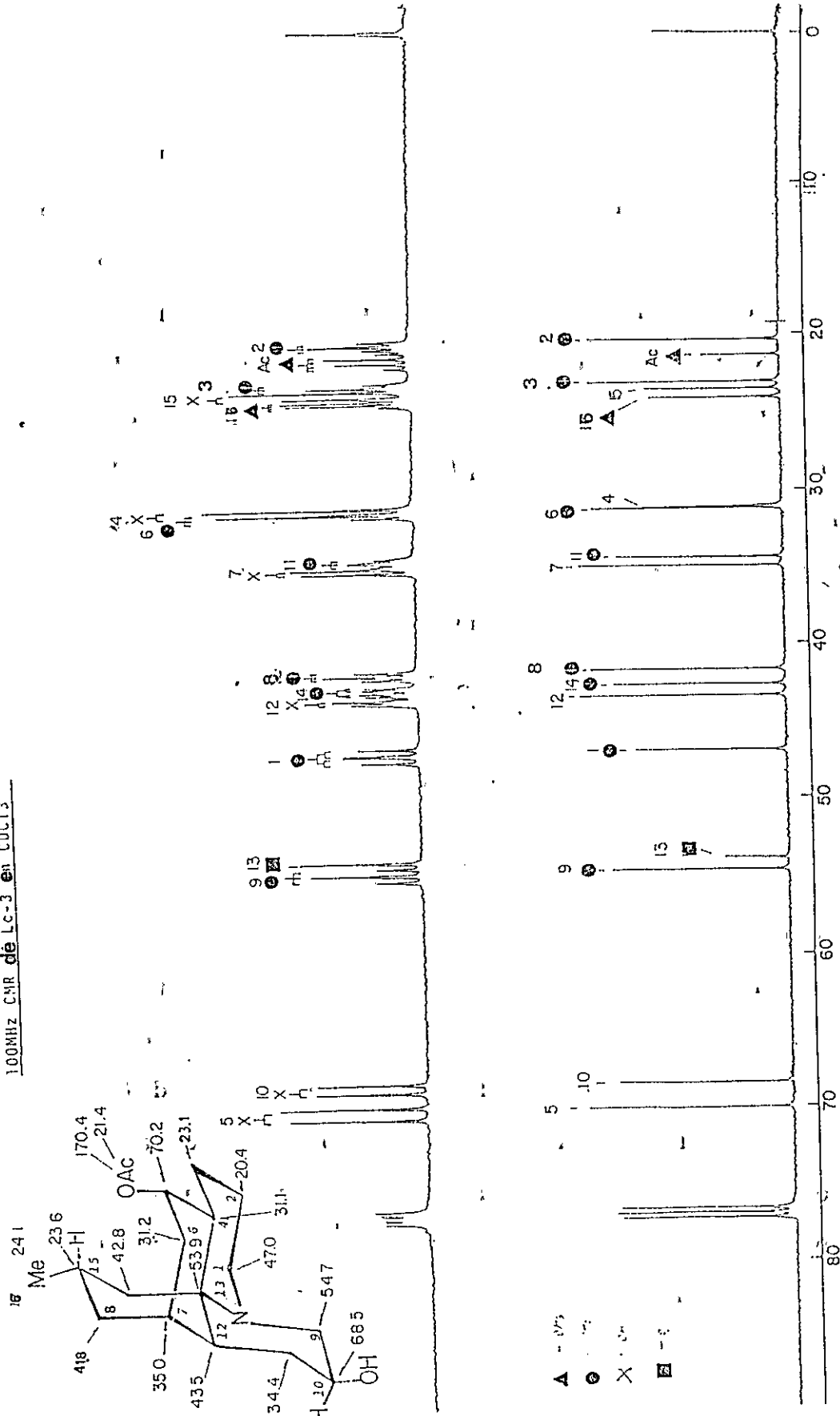


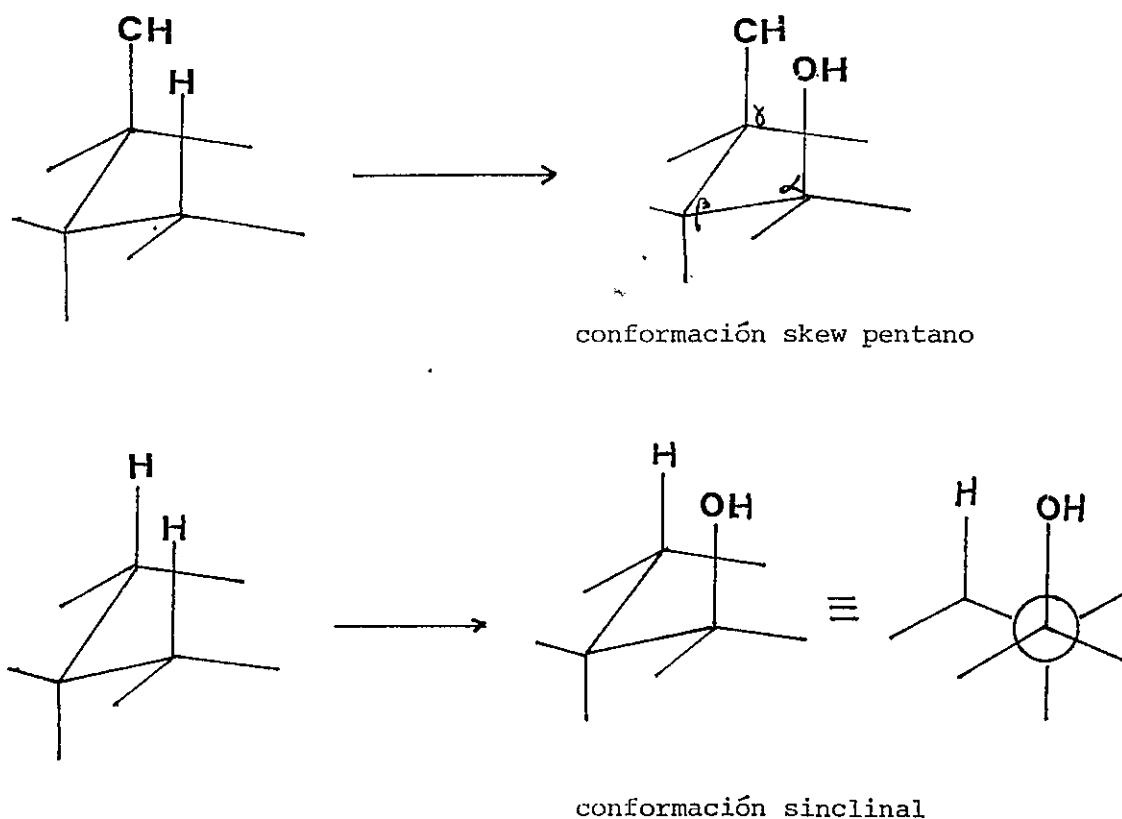
FIG. 32
ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DE PANICULINA

Los espectros acoplados, muestran claramente la naturaleza de cada carbono. En acetildihidrolipodina, el triplete del C-10 que absorbe a alto campo a 26.4 ppm, por la presencia del OH se transforma ahora (LC₃) en un doblete desplazado a 68.5 ppm (efecto α). Los carbonos 9 y 11 en LC₃, a su vez, por efecto β , desplazan su absorción a bajo campo, absorbiendo cada uno como triplete. Por su parte, el único carbono cuaternario (C-13), se puede reconocer por su característica bajo intensidad y ningún acoplamiento.

Djerassi³⁹, y más tarde Schwenzer⁴⁰, han estudiado los espectros de ¹³C de esteroides monohidroxilados, como igualmente sus derivados acetilados y han racionalizado sus d.q. en términos de efecto de sustituyentes en posiciones α , β , γ , δ y ϵ . La variación de estos efectos se ha discutido en función de interacciones estéricas y distorsiones geométricas, derivando una serie de expresiones semi-empíricas que permiten la predicción de corrimientos químicos por entrada de un OH, carbonilos y/o acetatos a variadas posiciones de la molécula. Considerando que las moléculas esteroidales derivadas del esqueleto androstano son también moléculas rígidas sobre el cual existen expresiones predictivas para calcular d.q., nosotros las hemos usado como modelos para calcular los d.q. por entrada de un sustituyente en la molécula del alcaloide.

Los parámetros estructurales considerados por Djerassi³⁹ para la explicación de un corrimiento α ($\Delta\alpha$) son: n = número de átomos de carbono en conformación sinclinal, que poseen átomos de hidrógenos capaces de interactuar con los OH y p el número de interacciones "skew" pentano*, (de estos hidroxilos con otros átomos de carbono). Así,

$$\Delta\alpha(\text{ppm}) = 45 + 3.5 p - 3.5 n$$



.. FIG. 33

Skew pentano y conformación sinclinal

* Skew pentano: no existe una traducción que exprese claramente la idea, pero se refiere a una interacción 1,3-diaxial espacial entre 2 grupos paralelos.

La magnitud del efecto β ($\Delta\beta$) se predice en término de q , número de interacciones sinclinales de los OH con los átomos de carbono conectados al carbono β que se considera

$$\Delta\beta(\text{ppm}) = 9.3 - 2.4 q$$

Con respecto a los d.q. en C γ las formulaciones no son tan definibles, por cuanto este tipo de interacción es muy dependiente de la orientación relativa del sustituyente; experimentalmente en esteroides, se ha observado

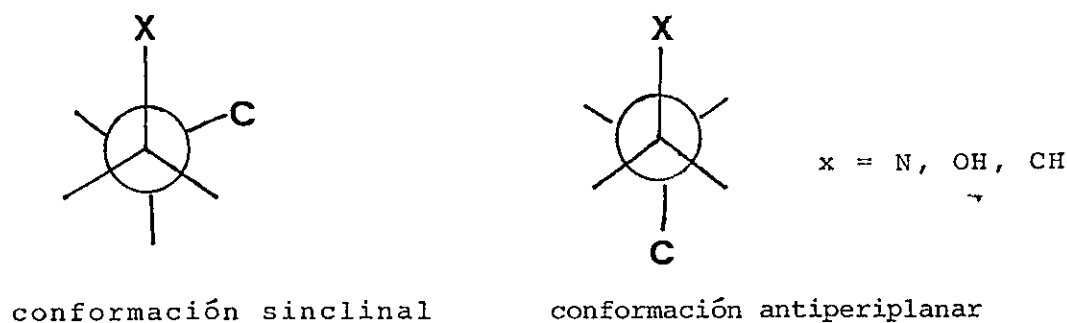


FIG. 34

CONFORMACIONES γ

que los mayores d.q. se observan en carbonos con conformación sinclinal (5-8 ppm) y son bastantes menores para las conformaciones antiperiplanar (± 2 ppm) (Fig. 34). Además, la magnitud de estos efectos son también dependientes de si el carbono γ es 2° ó 3°. Los valores promediados dados por Djerassi (con -6.5 ppm para carbonos metilénicos y -7.8 ppm para carbonos metinos, en tanto que el d.q. de un carbono cuaternario ubicado sinclinalmente (sigue)

OH, generalmente está en el rango ± 1 ppm.

Con respecto a los d.q. en δ por entrada de un sustituyente, existe la generalización de que se produce un efecto contrario al d.q. en δ , pero no es posible hacer una predicción exacta ni menos formular alguna relación numérica que lo calcule; sin embargo, el efecto es bastante pronunciado cuando la orientación del OH es sin-axial respecto al C- $\delta^{41,42}$. En este caso, nosotros no hemos usado esta interacción por no aplicarse en los compuestos discutidos.

Utilizando las relaciones anteriores, los valores calculados para LC₃ a partir de acetildihidrolicopodina son los siguientes:

TABLA 5

Valores de ^{13}C experimental y calculado para acetildihidrolicopodina y LC₃

Carbono	Acetildih. Experimental	LC ₃ Exp.	LC ₃ Calculado	$\Delta\delta$ (cálcl.-Exp.)
5	70.4	70.2	*	
9	47.2	54.7	56.5 (β)	1.8
10	26.4	68.5	71.4 (α)	2.9
11	24.8	34.4	34.1 (β)	- 0.3
12	45.4	43.5	44.5 (γ)	1.0

* El modelo elegido para este carbono es dihidrolicopodina 9:d.q. 68.5 ppm. Sustitución de un OH por un acetato, según Djerassi, en carbono 2° produce un d.q. a bajo campo, entre 1-4 ppm. Los d.q. para C β son a alto campo, en un rango entre 1-5 ppm.

Este análisis del espectro de R.M.N. de ^{13}C no es aplicable a la estructura propuesta anteriormente para paniculina.

Las evidencias presentadas en esta discusión muestran la consistencia de esta nueva estructura para LC_3 , paniculina y por tanto la naturaleza secundaria del OH. Tratando de demostrar esto último, nosotros iniciamos un estudio sistemático de algunos métodos de oxidación reportados por la literatura, a fin de lograr una explicación a la anormal resistencia de un OH secundario a su oxidación.

Tabla 6
Reacciones de oxidación de LC_3

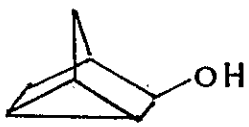
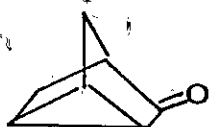
Reactivos	Condiciones experimentales	% Rend. Prod.transf.	%base recuperada
1. $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$	25°C ; 2 hrs	59.6 (lactama)	
2. $\text{CrO}_3/\text{piridina}$	25°C ; 72 hrs	-	77.1
	$30-40^\circ$; 8 hrs	-	-
3. $\text{CrO}_3/(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_2$	25° ; 25 min		72.0
4. $\text{DMSO}/(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$	65° ; 20 min	49.26 (lactama)	27.5
5. $\text{RuO}_4/\text{CCl}_4$	0° ; 8 hrs	91.2 (lactama)	
6. $t\text{-buOK}/(\text{Ph})_2\text{CO}/\text{C}_6\text{H}_6$	reflujo; 20 hrs	37.64 (hidroxi-cetona)	18.2

La repetición de la oxidación de LC_3 con el reactivo de Jones, permitió la obtención de un producto que sin duda señala una transformación. Sin embargo, los valores de R_f en distintos sistemas de solventes y por c.g. no muestran que este producto de transformación sea muy diferente con el compuesto de

partida. El método de oxidación de Jones, tiene algunos limitantes experimentales que hacen que los rendimientos obtenidos no sean siempre altos (particularmente por la precipitación de los complejos coloidales de Cromo (III) con el solvente orgánico).

Tabla 7

Reacciones de oxidación con R. de Jones

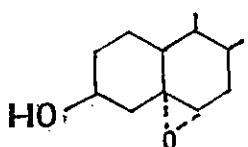
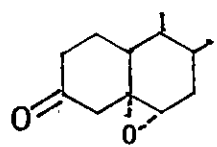
<u>Alcohol</u>	<u>Producto</u>	<u>% rendimiento (Ref)</u>
Desoxopaniculatina	Desoxopaniculatinona	58.5 ⁽¹⁰⁾
Desacetillicoclavina	diosfenol	50.0 ⁽¹⁰⁾
Dihidromagellanina	Dihidro Megellaninona	61.3 ⁽²⁴⁾
Magellanina	Magellaninona	80.0 ⁽²⁴⁾
		79.0 ⁽⁴³⁾
Dihidroliscopodina	Liscopodina	74.3
Desacetilpaniculina	Hidroxicetona	73.3

Análisis espectroscópico del compuesto de transformación permite apreciar algunos cambios espectrales en el IR, particularmente la banda centrada a 1650 cm^{-1} , que es una absorción característica para una lactama; aunque en este caso de baja intensidad.

El reactivo de Sarett^{31,32}, utilizado para sistemas sensibles a los ácidos, también es reportado como método de oxidación de altos rendimientos en compuestos orgánicos de estructuras relativamente complejas.

TABLA 8

Oxidación de OH (2°) con R. de Sarett

<u>Alcohol</u>	<u>Producto</u>	<u>% rendimiento</u> (Ref)
Paniculatina	Paniculatinona	40 ⁽¹⁰⁾
Deacetyllicoclavina	L-20	11.8 ⁽¹⁰⁾
		60 ⁽¹⁰⁾

Sin embargo, el método también tiene limitantes experimentales debido a la formación de sales básicas de cromo que interactúan con el sustrato orgánico formando un sistema coloidal. Los métodos alternativos para eliminar este problema⁴⁵ no siempre funcionan en alcaloides por cuanto parte de la mezcla de reacción queda retenida por el complejo piridina-cromo.

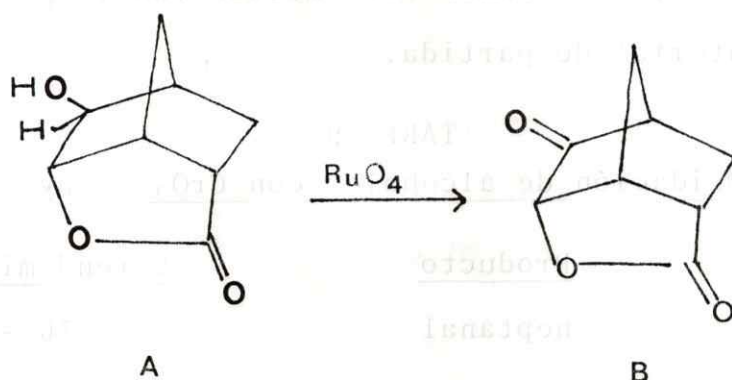
El reactivo de Sarett consiste en un complejo de CrO_3 -piridina no aislable^{32,33}; sin embargo, si el CrO_3 se agrega a una solución de piridina de diclorometano y luego se añade el alcohol a la solución, se obtienen conversiones que mejoran los rendimientos obtenidos por Sarett, por la conformación del complejo³² *in situ*. Con la esperanza de lograr nueva oxidación, utilizamos este método con la paniculina reaisando el material de partida.

TABLA 9
Oxidación de alcoholes con $\text{CrO}_3 - 2\text{py}$

<u>Alcohol</u>	<u>Producto</u>	<u>% rendimiento (Ref)</u>
1-heptanol	heptanal	70 - 80 ⁴⁷
ciclohexanol	ciclohexanona	98 ⁴⁶
alcohol-3-hidro xibenzílico	3-hidroxibenzal- dehido	87 ³²

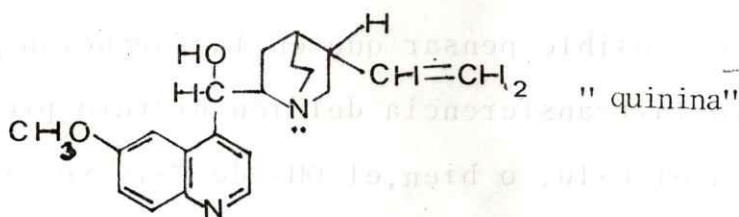
El sistema DMSO-anh. trifluoroacético está citado como un reactivo adecuado para la oxidación de alcoholes estéricamente impedidos³⁴. A pesar que LC_3 no pertenece a esta categoría, probamos el método con LC_1 (desacetilpaniculina) y LC_3 . En este último caso, el análisis IR, permite apreciar de nuevo una banda intensa centrada a 1650 cm^{-1} típica de lactama, es decir, se obtuvo un resultado similar al método de oxidación de Jones (Fig. 21a).

Las oxidaciones con tetróxido de rutenio han sido descritas como excelente método de oxidación para alcoholes secundarios en medio neutro y básico^{35,36}. La literatura resalta especialmente el caso de la oxidación de A a B, logrado exitosamente después de probar más de quince sistemas de oxidación⁴⁸.



En nuestro caso, el oxidante se probó primeramente con dihidrolicopodina; pese a las experiencias publicadas, no se logró la esperada conversión a la cetona correspondiente (licopodina 8) sino que obtuvimos primeramente la formación de la lactama de dihidrolicopodina, mezclada con licopodina; esta situación vuelve a repetirse en LC₃.

La quinina, es un alcaloide aislado de varias especies de cinchona que tiene un rasgo estructural muy similar a LC₃, es decir, se trata de un β -hidroxi-amino derivado:



Su oxidación no pudo ser lograda con los métodos descritos en la época de su aislación³⁷. Sin embargo, Woodward logró su conversión casi cuantitativa utilizando una modificación del método de oxidación de Oppenauer³⁷. Para tal efecto, utilizó terbutóxido de potasio y benzofenona en benceno a reflujo.

Nuestro intento de lograr la conversión del alcohol mediante este método, condujo a la hidroxicetona de deacetylpaniculina, es decir, las condiciones de base fuerte, desacetilaron el oxígeno unido al carbono-5 y posteriormente al alcaloide se oxidó en esa posición, dejando el OH del C-10 sin modificar.

No tenemos hasta ahora una explicación clara del porqué específicamente este OH' no sufra oxidación. Análisis de modelos moleculares no muestran un impedimento estérico en esa posición, y por ello es que se acetila con facilidad y sin embargo, sí lo tendría el C-5, que a su vez es fácilmente oxidable. Algunas explicaciones posibles a este hecho, pueden ser la competencia oxidativa del metileno vecino al nitrógeno (C-9), ó bien, la formación simultánea cetona-lactama.

Otra hipótesis es que el OH de C-10 sea en verdad oxidable, pero es posible pensar que en la formación del éster intermediario la transferencia del ión hidruro proceda con dificultad en el C-10, o bien, el OH- de C-10 se oxida en parte y posteriormente se degrada hasta dar productos menores que hacen bajar el rendimiento total de la base recuperada ó bien, que el producto oxidado en C-5 ejerza control cinético sobre el OH- del C-10 y por ello ésta oxidación no se aprecia.

Creemos que la síntesis de este alcaloide como así también su análisis por difracción de rayos X, debería dar la información que racionalice este problema.

CONCLUSIONES

Este trabajo ha permitido corregir la estructura química propuesta para paniculina, aislada previamente de *L. paniculatum*. La nueva estructura propuesta se basa en un extenso estudio espectroscópico en particular RMN protónica y de ^{13}C de alta frecuencia de éste y otros alcaloides estructuralmente relacionados. A nuestro juicio, estas evidencias con concluyentes y la paniculina es, entonces, la 10 α -hidroxiacetildihidrolipodina. La confirmación definitiva de éstos resultados puede lograrse a través de la síntesis de este compuesto y/o de un análisis de difracción de Rayos-X. Ambos trabajos están actualmente en desarrollo.

Un aspecto de la química de paniculina y derivados no ha sido aún aclarado satisfactoriamente: nos referimos a la inercia demostrada por el grupo hidroxilo en C-10 a su oxidación. Se describió una serie de experiencias destinadas a lograr la conversión de este grupo hidroxilo en la correspondiente cetona mediante la acción de una variedad de agentes oxidantes. Los resultados en todos los casos fueron negativos, lo que es sorprendente en un grupo alcohol secundario considerando la naturaleza altamente reactiva de algunos de los agentes oxidantes empleados. No acertamos a encontrar una racionalización de estos resultados, ya sea considerando factores de reactividad química - impedimentos estéricos o efectos electrónicos - como tampoco en términos de estabilidad relativa de reactante

y producto. Es indudable que este problema merece un estudio más detallado. En este contexto será de interés verificar la reactividad química del epímero de paniculina en el C-10, derivado que podría obtenerse en los esquemas de síntesis en estudio.

A nuestro juicio, éstos resultados negativos constituyen uno de los aportes que cabe destacar en este trabajo: hemos demostrado que la usual inferencia acerca de la naturaleza secundaria o terciaria de los grupos hidroxilo que se extrae de los datos espectroscópicos (NMR) como por ejemplo que la evidencia de RMN de ^1H y de ^{13}C indican claramente el carácter secundario de la función alcohol, ó por su fácil conversión (o no conversión) en una cetona, debe manejarse con precaución. Por otra parte, nuestros resultados indican que la oxidación de un alcohol secundario parece estar sujeto a factores que no han sido debidamente evaluados y que se manifiestan en este caso, debido tal vez, al particular entorno estructural presente en este alcaloide.

La información espectroscópica obtenida en este trabajo también constituye un aporte de interés tanto específico (en la resolución de otros problemas estructurales de alcaloides de este tipo) como general, ya que ha permitido detectar efectos de resonancia nuclear protónica contrarios a los habitualmente conocidos (e.g. desplazamientos químicos de protones vecinos a nitrógeno), o bien que la RMN de ^{13}C podría servir como

punto de partida de trabajo de correlación análogos a los de Djerassi, pero para compuestos nitrogenados en vez de esteroides. Nuevamente, estas observaciones han sido posible da da la conjunción de efectos derivados de la especial estructura de estos compuestos.

[The remainder of the page contains extremely faint and illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document.]

BIBLIOGRAFIA

1. Miller, N., Hootel , C. y Braekman, J.C. (1973)
Phytochem., 12, 1759.
2. Ayer, A.W., Browne, L.M., Nakahara, Y., Tori, M. y Delbaere,
L.T. (1979). Can. J. Chem., 57, 1105.
3. Nyembo, L., Goffin, A., Hootel , C. y Braekman, J.C. (1978)
Can. J. Chem., 56, 851.
4. Braekman, J.C., Hootel , C., Miller, N., Deckercq, J.,
Germain, G. y Meerssche, M. (1979)
Can. J. Chem., 57, 1691.
5. Castillo, M., Morales, G., Loyola, L.A., Singh, I., Calvo,
C., Holland, H.L. y MacLean, D.B. (1976)
Can. J. Chem., 54, 2900.
6. Castillo, M., Loyola, L.A., Morales, G., Singh, I., Calvo,
C., Holland, H.L. y MacLean, D.B. (1976)
Can. J. Chem., 54, 2893

7. Loyola, L.A., Morales, G. y Castillo, M. (1979)
Phytochem., 18, 1721.
8. Morales, G., Loyola, L.A. y Castillo, M. (1979)
Phytochem., 18, 1719.
9. Ayer, W.A., (1977) en "The Alkaloids", The Chemical
Society. Londres vol. 8, pág. 216.
10. Morales, G. (1978)
Tesis doctoral Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
11. MacLean, D.B. (1963)
Can. J. Chem., 41, 2654.
12. Ref. 10, pág. 202
13. Ref. 10, pág. 111
14. Ref. 10, pág. 247
15. Ref. 10, pág. 217
16. Halls, P.J., Jones, R.A., Katritzky, A.R., Snarey, M., y
Trepanier, D.L. (1971). J. Chem. Soc. (B), 1320 y refe-
rencias mencionadas.
17. Abraham, R.J. y Loftus, P. (1978)
"Proton and Carbon-13 NMR Spectroscopy". Heyden & Sons
pág.16.

18. Vierhapper, F.W. y Eliel, E.L. (1979)
J. Org. Chem., 44, 1081
19. Lambert, J.B. y Keske, R.G. (1969)
Tetrahedron Lett., 2023
20. Lambert, J.B., Schurvell, H.F., Verbit, L., Cooks, R.G. y Stout, G.H. (1976) "Organic Structural Analysis".
MacMillan Publ. pág. 39.
21. Böhlmann, F., Schumann, D. y Schultz, H. (1965)
Tetrahedron Lett., 173.
22. Booth, H. (1966)
Tetrahedron, 22, 615.
23. Chivers, P.J. y Crabb, T.A. (1970)
Tetrahedron, 26, 3389.
24. Ref. 10, pág. 245.
25. Looser, G. (1961)
"Los Pteridófitos o helechos de Chile". Rev. Universita
ria, U. Católica de Chile. pág. 213.

26. Loyola, L.A. (1978)
Tesis doctoral Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
27. Valdéz, P. (1976)
Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
28. Abraham, R.J. y Loftus, P. (1978)
"Proton and Carbon-13 NMR Spectroscopy". Heyden & Sons
pág. 182.
29. Sievers, E.R. (1973)
Nuclear Magnetic Resonance. Shift Reagents. Academic
Press, pág. 99.
30. Monson, R.S. (1971)
Advanced Organic Synthesis. Academic Press.
pág. 3.
31. Hollum, J.R. (1961)
J. Org. Chem., 26, 4814.
32. Ratcliffe, R. y Rodehurst, R. (1970)
J. Org. Chem., 35, 4001.

33. Dauben, W.G., Lorber, M. y Fullerton, D.S. (1969)
J. Org. Chem., 34, 3587.

34. Huang, S.L., Omura, K. y Snern, D. (1976).
J. Org. Chem., 41, 3329.

35. House, H.O. y Tefertiller, B.A. (1966)
J. Org. Chem., 31, 11068.

36. Moriarty, R.M., Gopal, H. y Adams, T. (1970)
Tetrahedron Lett., 4003.

37. Woodward, R.B., Wendler, N.L. y Brutschy, F.J. (1945)
J. Am. Chem. Soc., 67, 1425.

38. Ref. 24, pág. 86.

39. Eggert, H., VanAntwerp, C.L., Bhacca, N.S. y Djerassi, C.
(1976) J. Org. Chem., 41, 71.

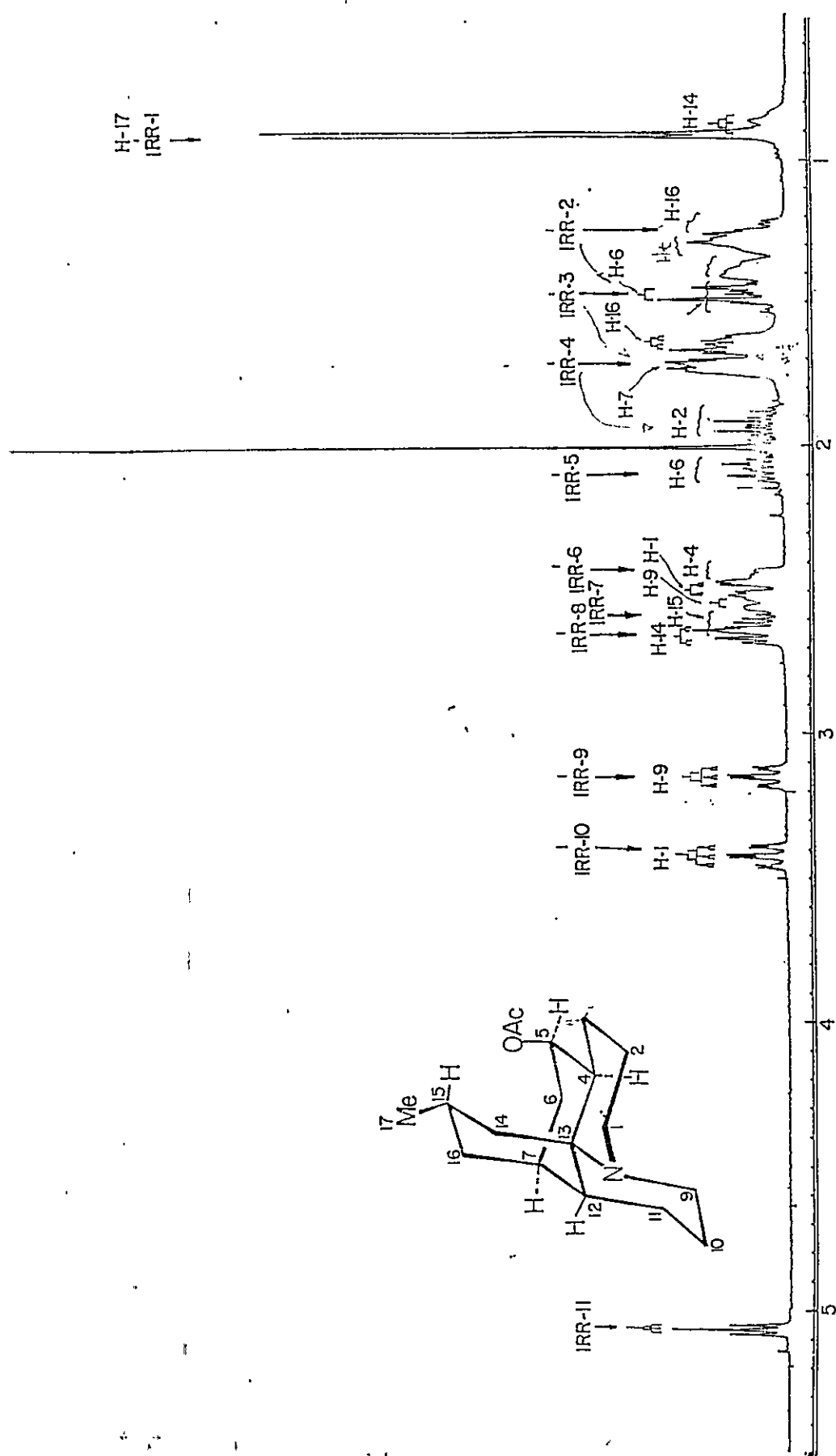
40. Schwenzer, G.M. (1978)
J. Org. Chem., 43, 1079.

41. Nakashima, T.T., Singer, P.P., Browne, L.M. y Ayer, W.S.
(1975). Can. J. Chem., 53, 1936.

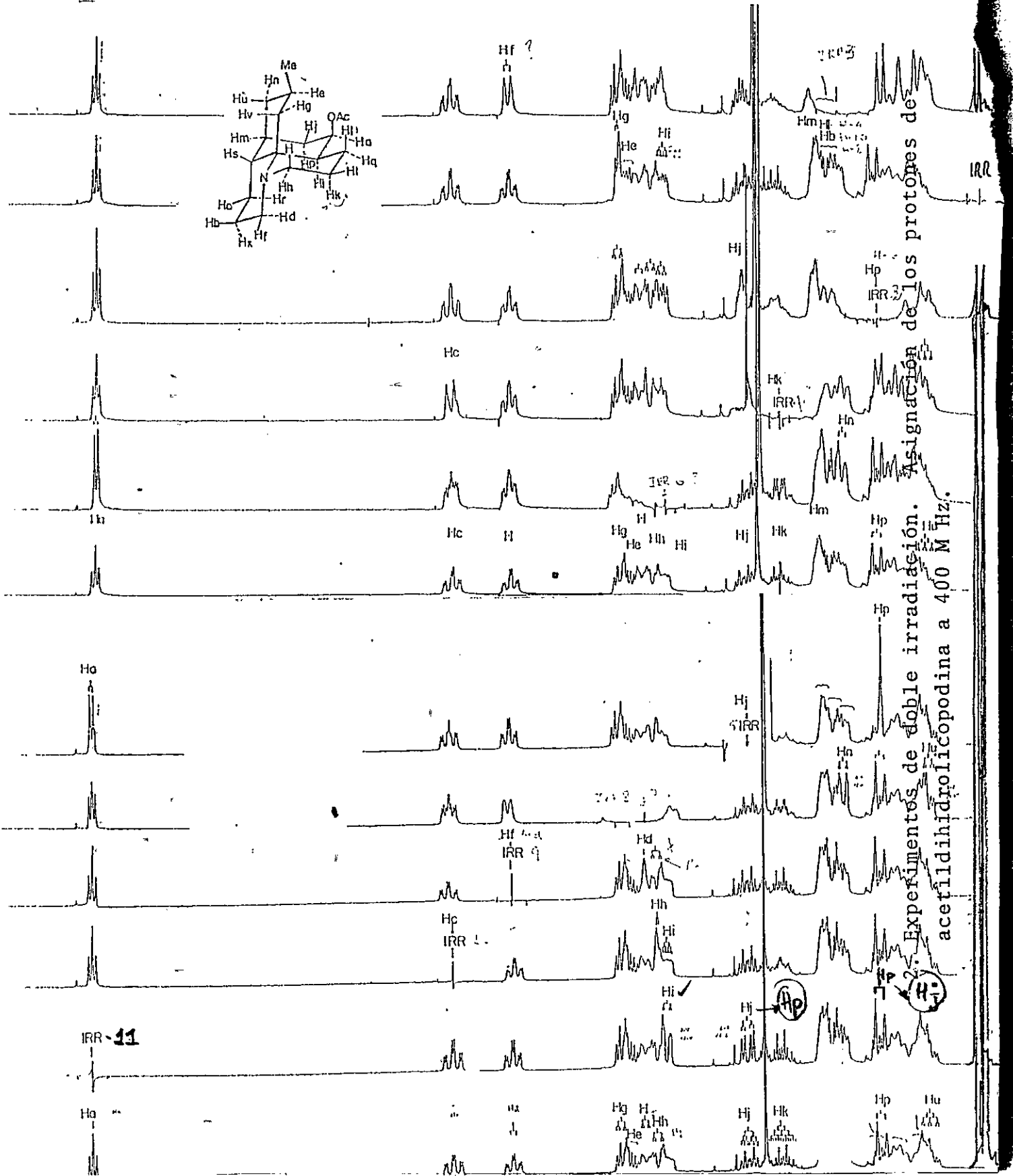
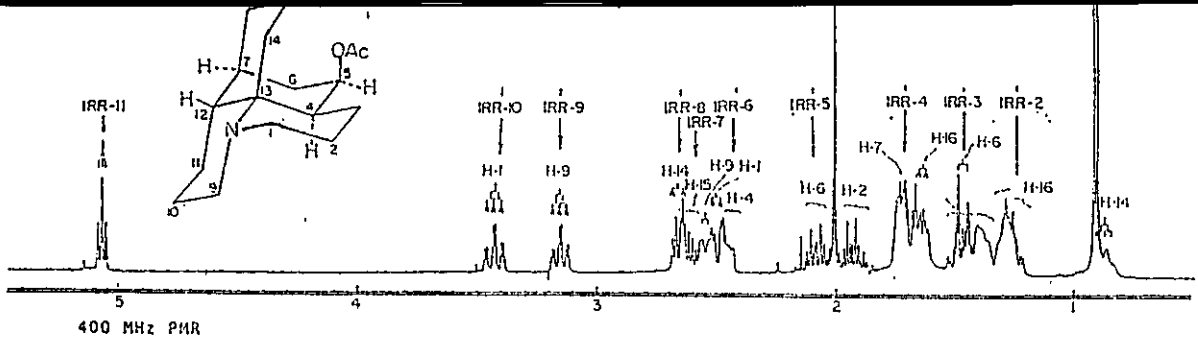
42. Grober, S.H. y Stothers, J.B. (1974)
Can. J. Chem., 52, 870.
43. Meinwald, J., Crandall, J. y Hymans, W. (1965)
Org. Synth., 45, 77.
44. Fieser, L.F. y Fieser, M. (1967)
Reagents for Org. Synth., 1, 146. John Wiley & Sons.
45. House, H.O. (1972)
"Modern Synthetic Reactions". W.A. Benjamin
pág. 264 (2a. Ed.).
46. Carey, F.A. y Sundberg, R.J. (1977)
Advanced Organic Chemistry. Part B". Plenum Press.
pág. 355.
47. Ref. 30, pág. 6.
48. Crundwell, E. y Templeton, W. (1964)
J. Chem. Soc., 1400.
49. Rivera, P., Muñoz, O., Alegría, S. y Castillo, M. (1980).
X Jornadas Chilenas de Química. Valdivia, Chile.

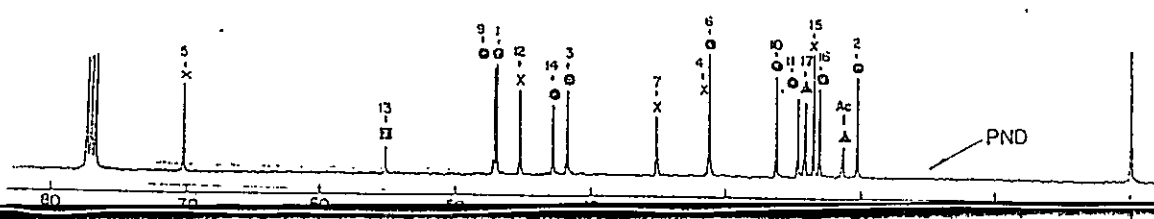
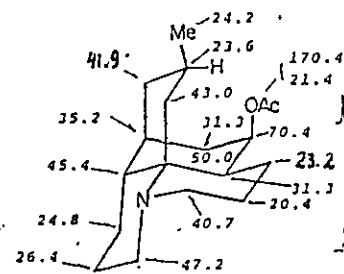
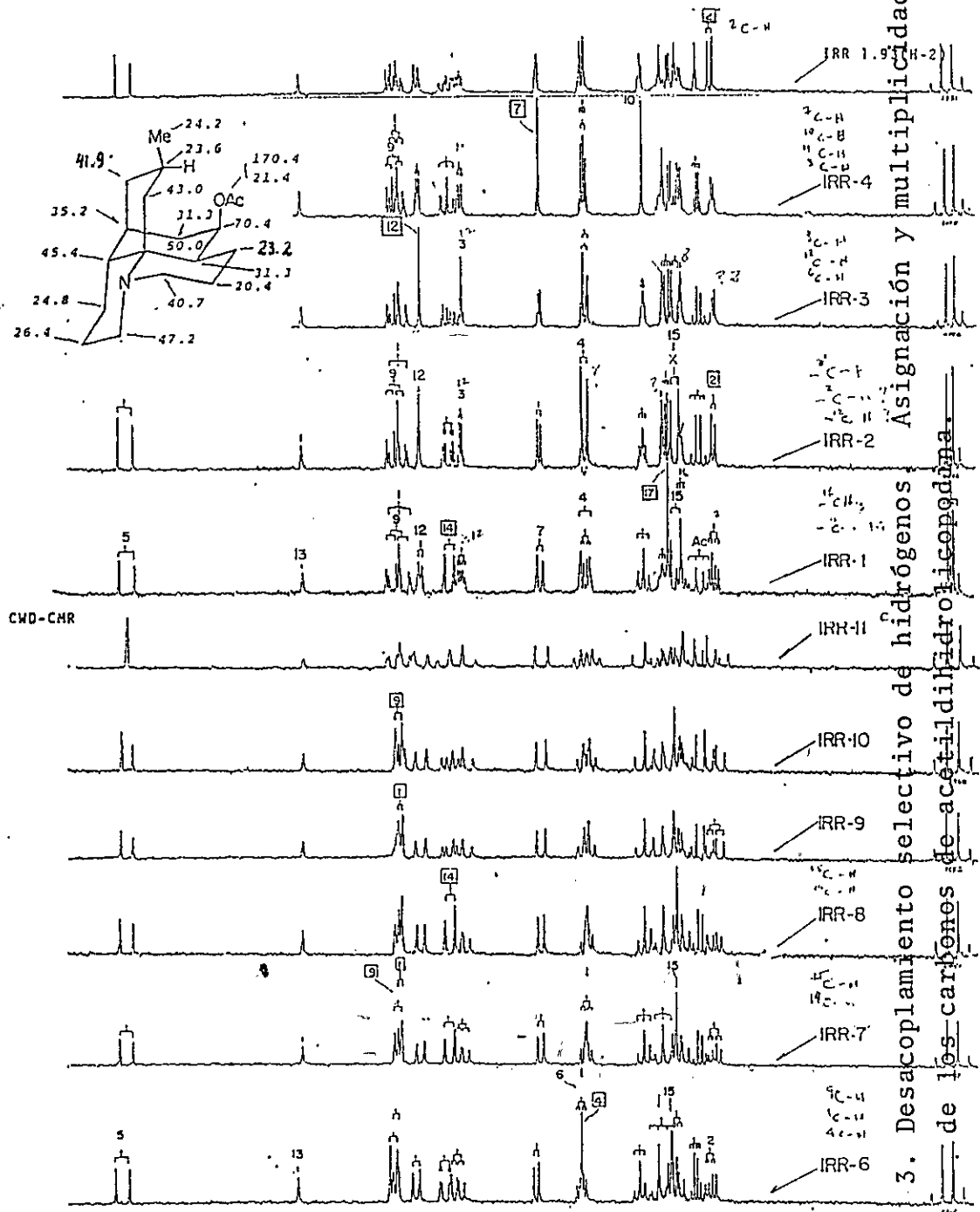
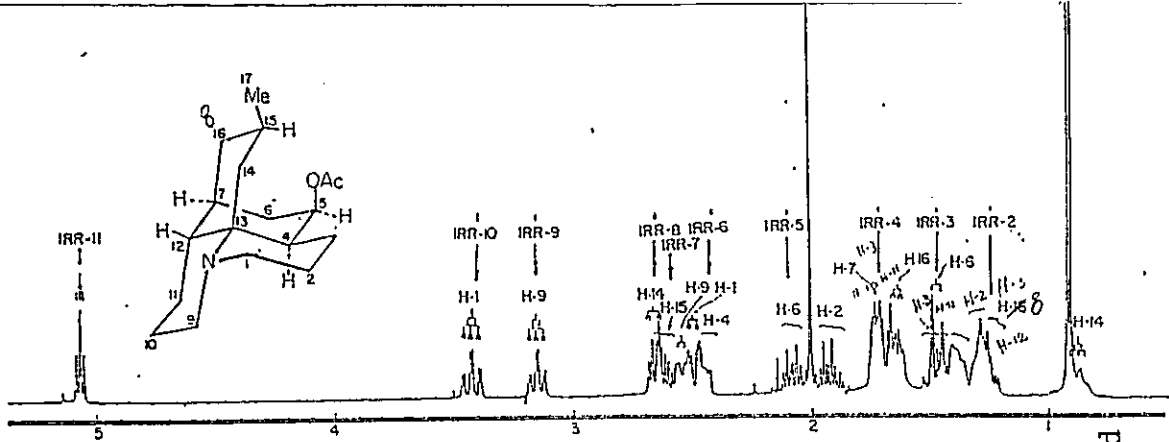
()) APENDICE 12 , . . . , . . .))

1. Experimentos de RMN de ^1H con doble irradiación. Asignación de las resonancias de los protones de la acetildihidrolicopodina a 400 MHz
2. Experimentos de RMN de ^1H con doble irradiación. Asignación de las resonancias de los protones de la acetildihidrolicopodina a 400 MHz.-
3. Desacoplamiento selectivo de hidrógenos en espectros de RMN de ^{13}C . Asignación y multiplicidad de las señales de los carbonos de la acetildihidrolicopodina.
4. Resumen de absorción en el espectro de RMNP de la desacetillicoclavina.
5. Resumen de absorciones en el espectro de RMNP de la acetildihidrolicopodina.
6. Resumen de absorciones en el espectro de RMNP de la desacetilpaniculina.
7. Resumen de absorciones en el espectro de RMNP de la paniculina.
8. Resumen de absorciones en el espectro de RMNP de la O-TFA-paniculina protonada.



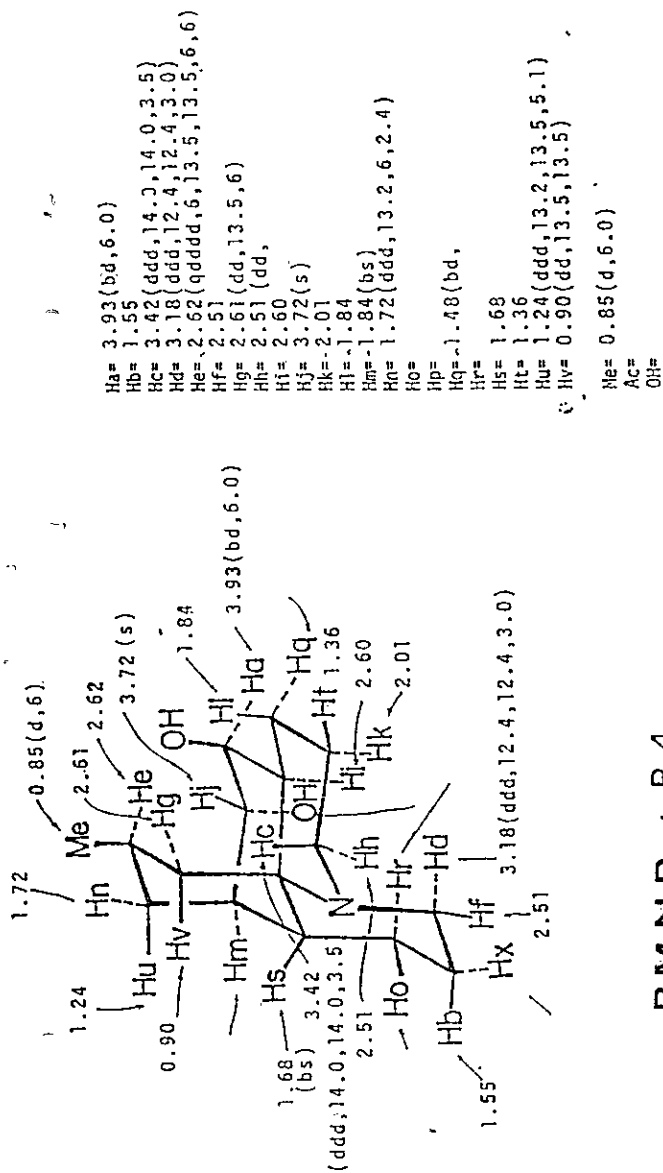
1. Experimentos con doble irradiación. Asignación de los protones de acetildihidroclopodina a 400 M Hz.





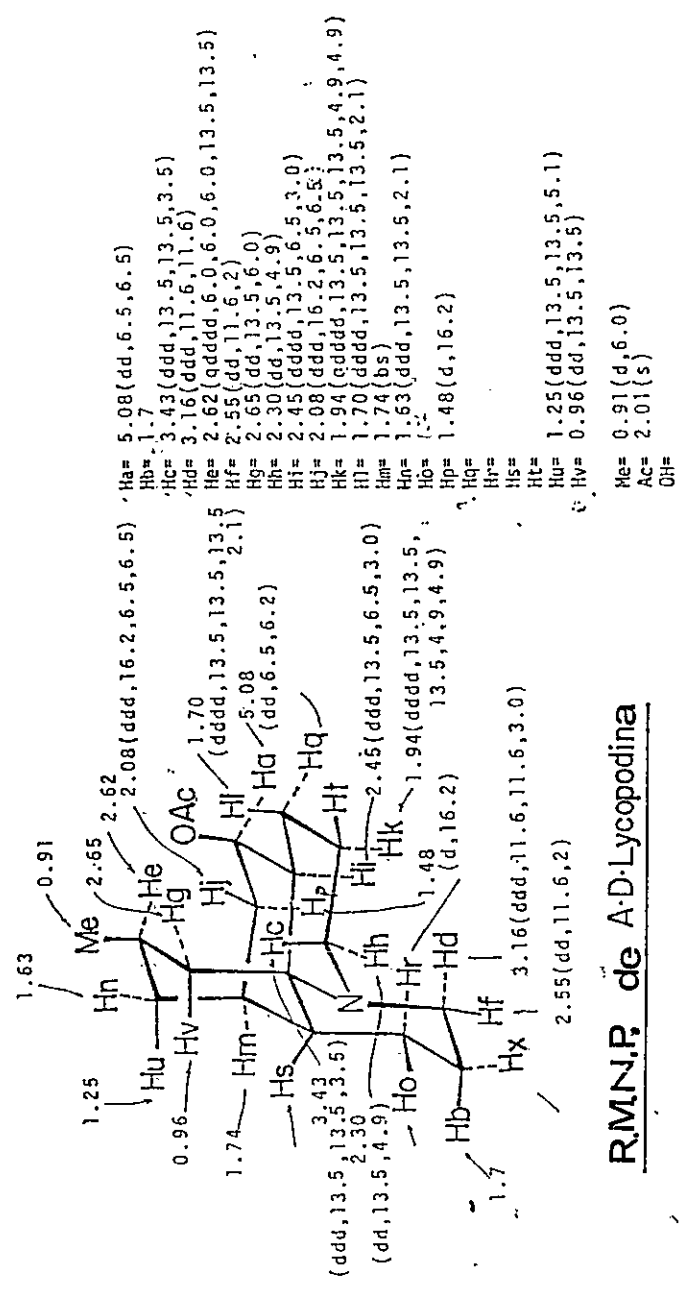
Asignación y multiplicidad de hidrógenos de acetildilidrolidina.

3. Desacoplamiento selectivo de hidrógenos de los carbonos de acetildilidrolidina.



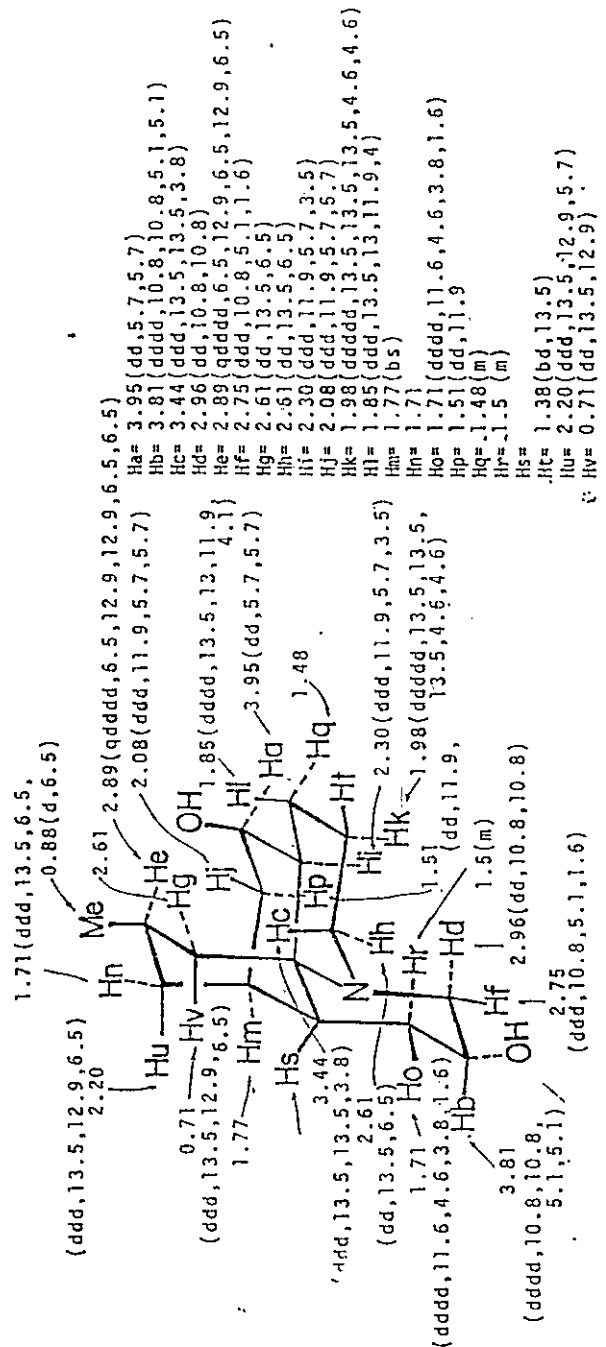
R.M.N.P. de P-4

4. Resumen absorción espectro de R.M.N.P. de deacetillicoclavina



R.M.N.P. de A-D-Lycopodina

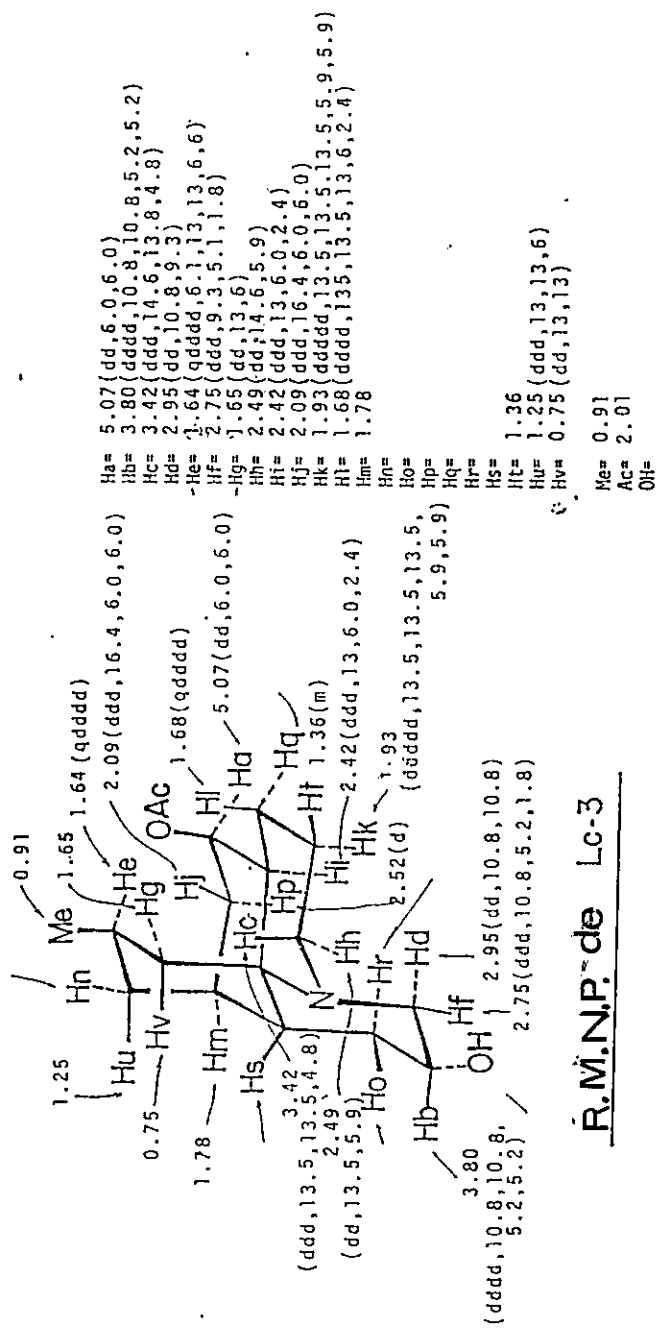
5. Resumen absorción espectro de R.M.N.P. de acetildihidroliscopodina



R.M.N.P. de LC-I

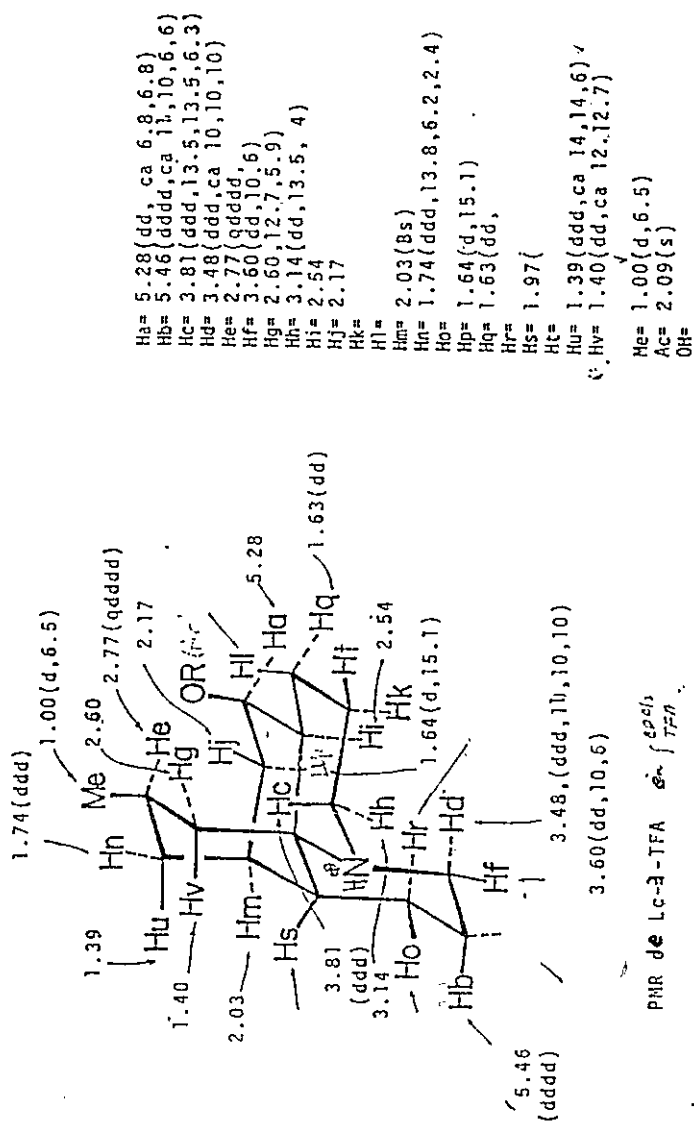
6. Resumen absorción espectro R.M.N.P. de LC1

Me= 0.88(d, 6.5)
 Ac=
 OH=



R.M.N.P. de Lc-3

7. Resumen absorción espectro de R.M.N.P. de Lc3



8. Resumen absorción espectro de R.M.N.P. de LC₃ - TFA