

Tesis de Posgrado

Alcaloides de Cassia carnaval Speg (Leguminosa)

Lythgoe, Teodorico

1972

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lythgoe, Teodorico. (1972). Alcaloides de Cassia carnaval Speg (Leguminosa). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1437_Lythgoe.pdf

Cita tipo Chicago:

Lythgoe, Teodorico. "Alcaloides de Cassia carnaval Speg (Leguminosa)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1972.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1437_Lythgoe.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Alcaloides de *Cassia carnaval* Spag.
(Leguminosa)

1437 -◀

TEODORICO LYTHGOE
Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Química
(Orientación Química Orgánica)

1972

A mis padres

A mi familia

Deseo expresar mi agradecimiento a:

El Dr. Marcelo J. Vernengo por haberme sugerido el tema de este trabajo, por su dirección durante la realización del mismo y por su apoyo y amistad.

El Dr. Venancio Deulofeu, por sus consejos y por facilitarme la posibilidad de realizar esta tesis en el Departamento de Química Orgánica.

El Dr. Jorge F. Sproviero, quien con su entusiasmo alentó y guió mi iniciación en la investigación química orgánica.

Las Ldas. Adriana Busch y Nora Schvarzberg por haberme facilitado información sobre los trabajos complementarios de esta tesis.

Mis compañeros de trabajo en el Departamento de Química Orgánica, a los Dres. Jorge Comin y Jorge O. Deferrari por el apoyo prestado y a la Dra. Blanca B. de Deferrari por los análisis.

Los Dres. Teodoro Meyer y Enrique B. Dennler, ya fallecidos, por la colección y clasificación de la planta y por los espectros realizados, respectivamente.

En la parte experimental consta la realización de ciertas determinaciones que requirieron el uso de aparatos no disponibles en el Departamento de Química Orgánica, y por tal razón expreso mi reconocimiento a los Dres. A. Baldas, J. Romo e I. Fleming por los espectros de masa, y a los Dres. W. Klyne y P. Scopes por los espectros de dispersión óptica rotatoria, así como a los Dres. R. Goutarel y X. Monseur por adelantarme resultados de sus investigaciones.

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

El género *Cassia* es uno de los más abundantes de las Leguminosas y se destaca por haber proporcionado desde la antigüedad numerosas especies que han sido de utilidad en medicina por las propiedades terapéuticas de algunos productos metabólicos secundarios aislados principalmente de sus extractos de hojas (1).

Las especies más utilizadas se encuentran distribuidas geográficamente en las regiones cálidas de todo el mundo, hallándose en gran abundancia en nuestro continente y en especial en Sudamérica. Según Burkhart (1), la flora Argentina cuenta con unas treinta especies en las formaciones subtropicales, la Mesopotamia, zonas boscosas y hasta en la Puna y el Norte de la Patagonia. Desde el punto de vista químico no ha sido estudiado en detalle en nuestro país aunque se ha descrito su utilidad en medicina popular. Algunas especies Argentinas (por ejemplo *Cassia bicapsularis* y *C. corymbosa*) son purgantes (2, 3), mientras que en el comercio local se importan y venden frutos de *C. fistula* y hojas y frutos de *C. angustifolia* y *C. acutifolia*, las que se conocen con los nombres de sen de la India y sen de Alejandría respectivamente y se utilizan en medicina corriente como catárticos (1). Se puede mencionar el trabajo de Faura (4), quien en 1939 no encontró alcaloides en la *C.*

occidentalis (sub Cassia leptocarpa) procedente de Misiones, el de Abiusso (5) que examinó ocho especies Argentinas para determinar el contenido cuantitativo en compuestos antracénicos y antraquinonas aunque sin intentar el aislamiento de productos puros. y los recientes relevamientos de Coussio (160).

En la Argentina se cultivan algunas especies que se utilizan como plantas de adorno. Entre ellas se puede mencionar a la Cassia carnaval Speg., especie que se estudia detalladamente en esta tesis, que constituye la única especie arbórea del país y cuyas flores amarillas contribuyen a realzar el aspecto de la selva salteña y jujeña durante los meses finales del verano y comienzo del otoño, por cuya razón ha recibido el nombre vernáculo de carnaval. Esta especie ha sido cultivada en Buenos Aires (por ejemplo, se puede mencionar la existencia de un ejemplar en el Jardín Botánico Municipal) y en La Plata (en la Facultad de Agronomía y Veterinaria). Se han cultivado, asimismo, otras especies con fines medicinales y también como sustitutos del café utilizando las semillas torrefactas de C. occidentalis y C. af. Hookeriana (6). Se debe mencionar, finalmente, que algunas especies de este género merecen atención desde el punto de vista agronómico, pues las que pertenecen a la sección Chamaecrista parecen ser forrajeras aunque se han descrito especies que son tóxicas para el ganado (C. occidentalis) o que por lo menos no son utilizadas por los animales (C. tora) (1).

La importancia medicinal del género Cassia se remonta a una época anterior a su descripción botánica. Se conoce una monografía clásica sobre este género (7), en la que se transcriben recetarios médicos antiguos que se pueden remontar al siglo X (8). Algunas especies argentinas han sido empleadas en medicina indígena. Por ejemplo, la corteza y raíz de C. occidentalis fueron empleadas por los guaraníes contra la malaria (1), empleándose todavía como febrífugo en Paraguay y otras zonas tropicales.

En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones en el campo de los productos naturales aislados de este género, en particular respecto de los compuestos antracénicos que contiene, pues parece haber una evidente relación entre las propiedades catárticas y el contenido en estos compuestos (151) utilizándose preparados parcialmente purificados de los mismos en terapéutica moderna.

Esta estrecha relación entre estructura botánica y contenido de productos naturales en un género extensamente difundido en nuestro país nos ha inducido a estudiar la presencia de otros productos resultantes del metabolismo secundario en el género Cassia.

En la Tabla I.I están anotadas las especies del género Cassia que poseen alcaloides.

TABLA I/I

<u>Especie</u>	<u>Parte estudiada</u>	<u>Contenido de Alkaloides</u>	<u>Refer. Bibliog.</u>
<u>Cassia absus</u> L.	Semillas	Chaksina	9-A
<u>C. alata</u> L.	Hojas	+	9-B
<u>C. bicapsularis</u> L.	Hojas, frutos	+	9-B
<u>C. brasiliensis</u> N.	Hojas, frutos	+	9-C
<u>C. corvubosa</u> L.	Frutos	+	160-A
<u>C. emarginata</u> L.	Hojas	+	9-C
<u>C. excelsa</u> Schrad.	Frutos	+	9-E
<u>C. excelsa</u> Schrad.	Hojas	Cassina	9-C, 9-D
<u>C. hookeriana</u> Gill.	Planta sin raíz	+	160-A
<u>C. iahnii</u>	Hojas	Cassina	163
<u>C. laevigata</u> Willd.	Hojas	+	9-B
<u>C. morongii</u> Britt.	Planta sin raíz	+	160-B
<u>C. natellaria</u> DC.	Ramas	+	9-F
<u>C. siamea</u> Lam.	-	+	9-G
<u>C. siamea</u> Lam.	Hojas, ramas	+	9-F
<u>C. sophera</u> L.	Hojas, ramas, frutos	+	9-B
<u>C. spectabilis</u> DC.	Hojas, flores, frutos	+	9-E
<u>C. subulata</u> Gris.	Planta sin raíz	+	160-A
<u>C. tomentella</u> Dom.	Frutos	+	9-B
<u>Chamaecrista (cassia) cf. multipinnata</u> Pollard	Hojas, ramas, raíz	+	9-H

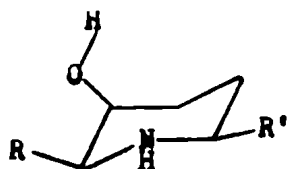
Nos ha parecido interesante estudiar el contenido en alcaloides de la Cassia Carnaval Speg., especie que según los datos suministrados por Burkhart (1), es muy cercana botánicamente a la C. excelsa Schrad. Investigadores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos establecieron inicialmente la presencia de alcaloides en esta última especie que es una leguminosa tropical (20) y Gonçalvez de Lima y sus colabo-

radores aislaron de la misma C. excelsa en Brasil un alcaloide que no fue posteriormente adecuadamente caracterizado (11). En 1964, Hight (12) aisló dos bases, una de las cuales, cassina (I), fue estudiada detalladamente por el mismo autor (13) y por Rice y Coke (14).

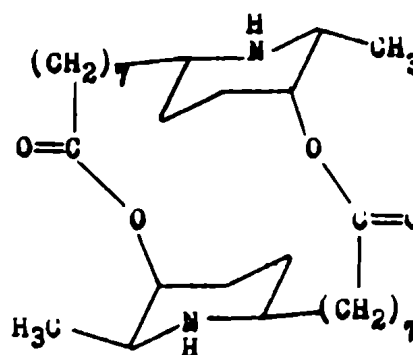
En este trabajo se describen algunas propiedades físicas de la cassina en relación a su estructura (I) pues en el curso del mismo se encontró que este alcaloide es la base principal de la Cassia carnaval Speg.

Durante el mismo trabajo se han aislado otros tres alcaloides piperidínicos. Uno de ellos fue estudiado en detalle habiéndose determinado su estructura a la que le corresponde la fórmula (II) y ha sido denominado carnavalina (15). El tercer alcaloide aislado de esta planta fue caracterizado como clorhidrato. El exámen preliminar de su estructura por métodos físicos y en especial por espectrometría de masa - método que ha sido de valor inestimable en la dilucidación de estructuras de alcaloides piperidínicos - ha permitido relacionarlo con el producto de oxidación por el método de Oppenauer de la prosopina (IIIa), un alcaloide piperidínico aislado (16) de la Prosopis africana (Guill. et Perr.) Taub., una Mimosa africana, el que ha sido estudiado farmacológicamente por Beurrinet y Quevauviller (152) juntamente con la prosopina (IIIb).

Las Prosopis son también utilizadas en medicina indígena, tanto en Africa como en Sudamérica (17). Se pudo aislar finalmente, una cuarta base cuya estructura sólo fué estudiada preliminarmente.

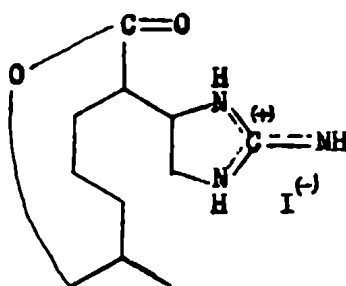


- I) $R = \text{CH}_3$; $R' = (\text{CH}_2)_{10} \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$
- II) $R = \text{CH}_3$; $R' = (\text{CH}_2)_{10} \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
- IIIa) $R = \text{CH}_2\text{OH}$; $R' = (\text{CH}_2)_{10} \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
- IIIb) $R = \text{CH}_2\text{OH}$; $R' = (\text{CH}_2)_9 \text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$

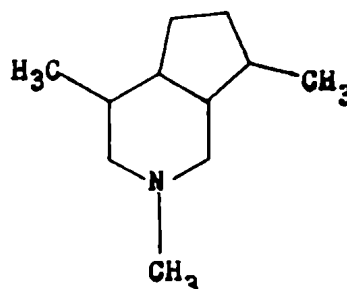


(IV)

En esta tesis se incluye un resumen de los conocimientos de la química y biosíntesis de los alcaloides piperidínicos; en especial, de aquellos como la carpaína (IV) y la pseudocarpaína, estrechamente ligados a los alcaloides de la Cassia carnaval y Cassia exelsa y el alcaloide chaksina, aislado por Siddiqui y Ahmad (18) en 1935, de las semillas de Cassia abrus Linn., que constituye el primer ejemplo de alcaloide monoterpénico (V).

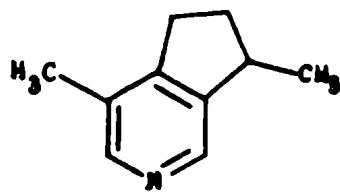


(V)

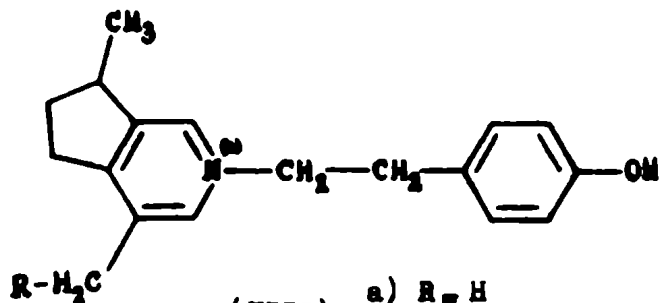


(VI)

En esta tesis se discuten los trabajos que han llevado a establecer algunas relaciones biogénicas de alcaloides piperidínicos y entre ellos de las esquitantinas (VI), alcaloides que poseen simultáneamente un núcleo piperidínico y un esqueleto carbonado monoterpénico. Estos alcaloides fueron aislados de una Apocinácea sudamericana (19 al 23,153), *Skytanthus acutus*, y se encuentran relacionadas con otro alcaloide monoterpénico y de núcleo piperidínico, la actinidina (VII) que fué aislada por Sakan y colaboradores de la *Actinidia polyzona* (24), y con los alcaloides cuaternarios (VIII), aislados de la *Valeriana officinalis* (25)



(VII)



(VIII)

- a) R = H
b) R = OH

Más recientemente se han aislado alcaloides monoterpénicos de otras especies vegetales, como el *Ligustrum nana-guineense* de la familia Oleaceae (154).

CAPITULO I

COMPUESTOS NATURALES AISLADOS DEL GENERO CASSIA

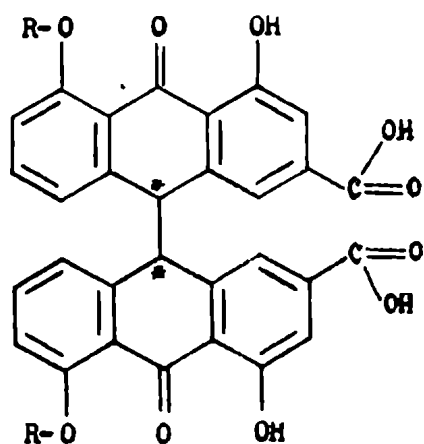
Las investigaciones iniciales de Maurin en Francia (26) revelaron que la mayoría de las especies del género Cassia poseen compuestos antracénicos y antraquinonas. En numerosos países se han realizado investigaciones tendientes a encontrar el contenido de este tipo de productos en plantas de este género, en virtud del hecho que los mismos parecen ser responsables de sus propiedades estárticas. Se deben mencionar especialmente los trabajos de Stoll y colaboradores en Suiza (27-29) y el de Fairbairn y Lou en Inglaterra (30-36).

Se comprobó que la actividad biológica del sen no correspondía al contenido total de antraquinonas y Fairbairn (30) encontró que los derivados antracénicos son muy activos bajo la forma de glucósidos, menos activos como antraoles libres y aún menos como antraquinonas libres.

Los glucósidos activos fueron descubiertos en el sen por Straub y Gerhardt (37). Según Stoll y sus colaboradores (27) la actividad de los glucósidos antracénicos contenidos en hojas y vainas de C. angustifolia Vahl y C. acutifolia Del. representan el noventa por ciento de la actividad que poseen esas partes de las plantas.

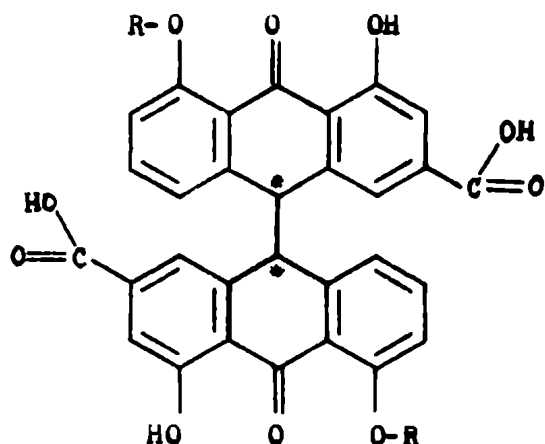
Dos glucósidos activos fueron aislados en forma cristalina por Stoll, Becker y Kussmaul (27-28). Los mismos

fueron denominados senósido A (I) y senósido B (II), respectivamente. El procedimiento de separación y purificación, extremadamente laborioso, consiste en la precipitación fraccionada como sales de calcio. El primero de los glucósidos se caracteriza por su escasa solubilidad en alcohol metílico y su resistencia a la hidrólisis ácida mientras que el senósido B es algo mas soluble y se hidroliza mas facilmente. Este procedimiento de aislamiento y purificación que todavía se utiliza en la preparación de formas farmacéuticas que contienen hasta un sesenta por ciento de sustancias activas, ha permitido que se utilice en medicina una sustancia activa relativamente pura a partir de un producto natural complejo que desde la antigüedad se ha empleado al estado crudo; según algunos autores fué descrito por Dioscorides en el año 77.



(I) R = Glucosa

(III) R = H



(II) R = Glucosa

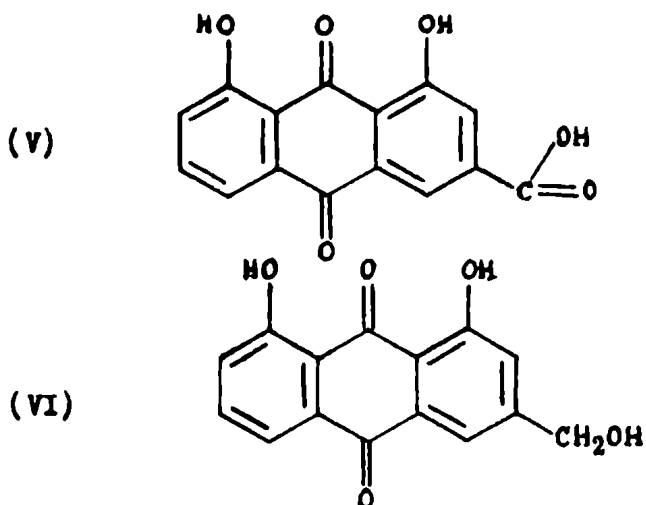
(IV) R = H

Los extensos estudios de Stoll sobre los glucósidos antraquinónicos dieron como resultado la determinación de las estructuras de los senósidos A y B descritos por las fórmulas (I) y (II). Ambos compuestos son isómeros y se diferencian solamente en su estereoquímica. Las agluconas que se obtienen por hidrólisis ácida suave han recibido los nombres de senidina A (III) y senidina B (IV), respectivamente. La primera es dextrorrotatoria y la segunda es inactiva por compensación interna.

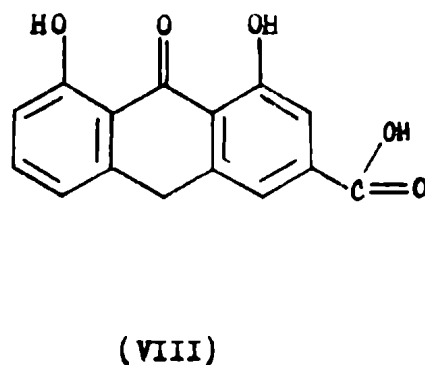
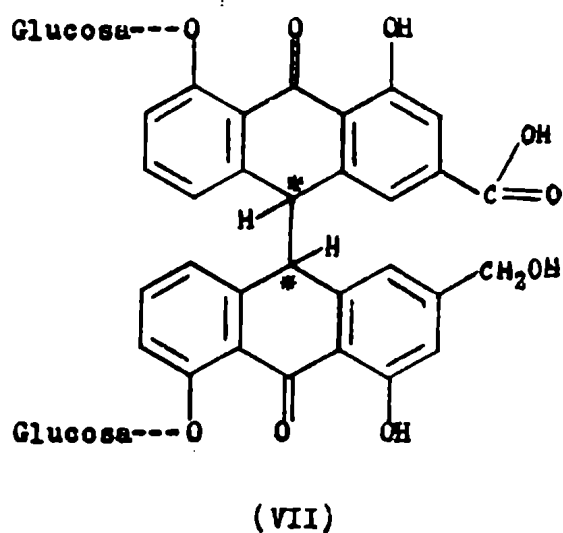
En 1951, Fairbairn y Saleh (32) aislaron un tercer glucósido que se encuentra en mucho menor proporción que los anteriores y al que no identificaron como un derivado de la reina (V). Se destaca, sin embargo, por su acción sinérgica sobre la actividad de los senósidos A y B, lo que podría explicar la mayor actividad de la droga pura en comparación con los productos aislados de la misma. Como, en 1913, Tutin (38) había encontrado que de los extractos hidrolizados de sen se podía aislar aloemodina (VI) y Fairbairn había encontrado que el tercer glucósido no contenía reina (V), se pensó que el mismo podía ser un derivado de aloemodina (VI) en lugar de reina (V). En un trabajo posterior Fairbairn y sus colaboradores (34) aislaron un glucósido de aloemodina que difería del aislado inicialmente.

En 1962, Leali (39) aisló una nueva aglucona por hidrólisis de un nuevo glucósido de la *C. acutifolia*, al que

denominó senósido C. Lemli encontró, por oxidación con cloruro férrico e identificación cromatográfica, que sus componentes eran reína (V) y aloemodina (VI).

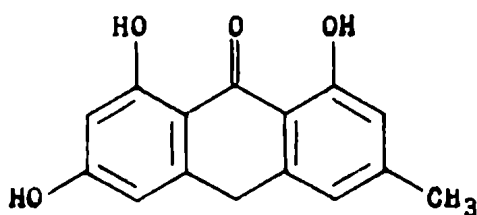


W. Schmid y E. Angliker (40) aislaron en 1965 nuevamente a este tercer glocósido de la Cassia angustifolia. Este producto condujo por hidrolisis a una aglucona que resultó ser idéntica al compuesto de Lemli. El senósido C es fuertemente levorotatorio y por hidrólisis libera un mol de senidina C y dos de glucosa.

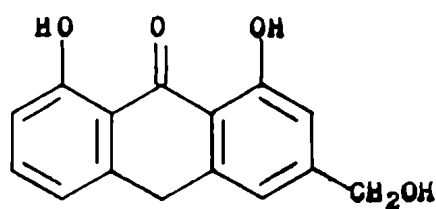


El senósido C (VII) posee la misma configuración en sus átomos asimétricos que el senósido A pues por tratamiento con permanganato de potasio se transforma en éste por oxidación del grupo alcohólico primario a carboxilo (40).

Una serie de autores han encontrado otros glucósidos en los extractos acuosos de *C. acutifolia* y *C. angustifolia*. Por ejemplo, Fairbairn y sus colaboradores han encontrado, juntamente con el glucósido de aloemodina, monoglucósidos de reína (V) y un glucósido de reinantrona (VIII), mientras que Lemli ha aislado (41) dos nuevas agluconas, la reidina A [compuesta de reinantrona (VIII) y emodinantrona (IX)] y la aloemodindiantrona [compuesta de dos unidades de aloemodinantrona (X)].

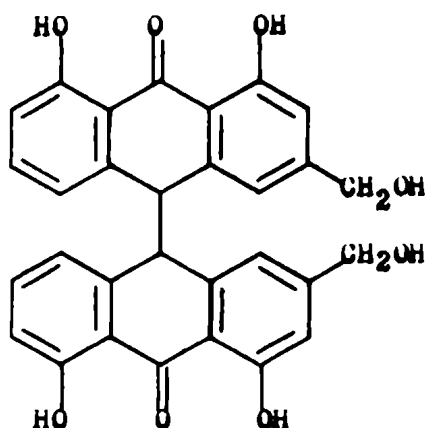


(IX)



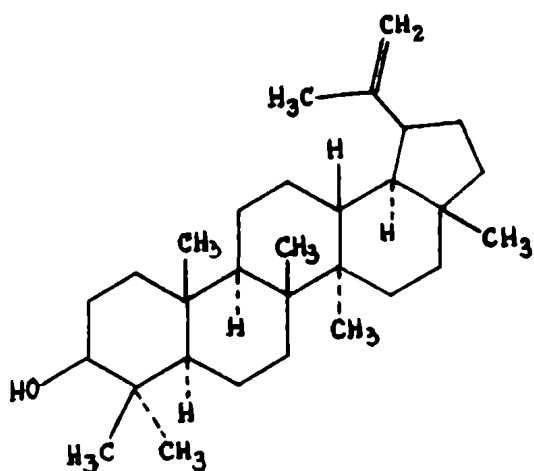
(X)

Finalmente, Moes (42) ha encontrado que por hidrólisis ácida de hojas de sena oficial, se pueden obtener reína (V), reindiantrona (Sennidina A o B), rein-aloemodindiantrona (VII) (Sennosido C), aloemodina (IV) y aloemodindiantrona (XI).

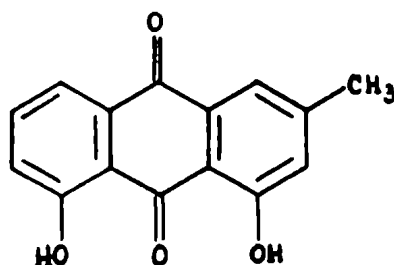


(XI)

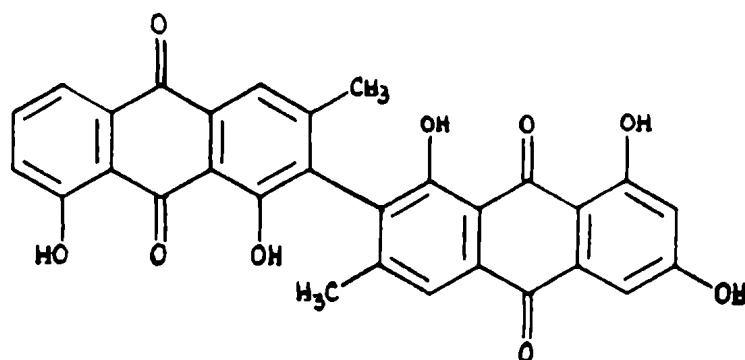
De la corteza de raíz de la *Cassia siamea* Lam. (Sinonimia *C. florida* Vahl), Venkataraman y sus colaboradores (43) han obtenido, juntamente con lupeol (XII) y crisofanol (XIII), dos nuevos pigmentos. Uno de ellos, al que dieron el nombre de cassiamina, fué estudiado en detalle proponiéndose la estructura (XIV).



(XII)

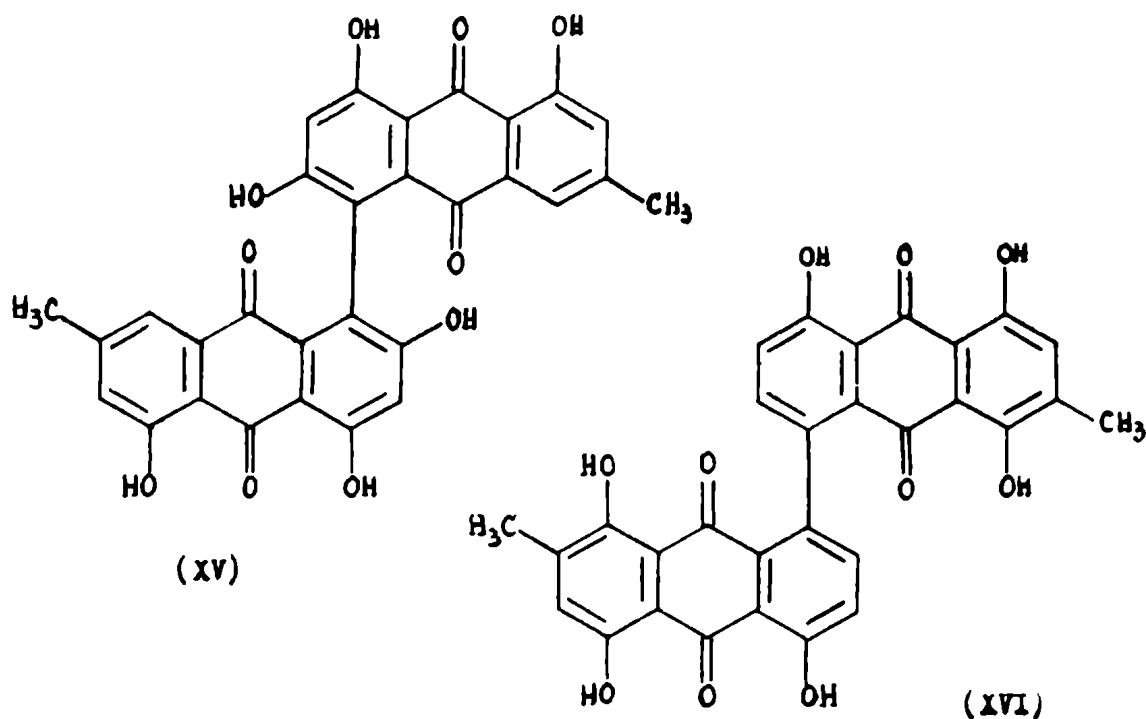


(XIII)



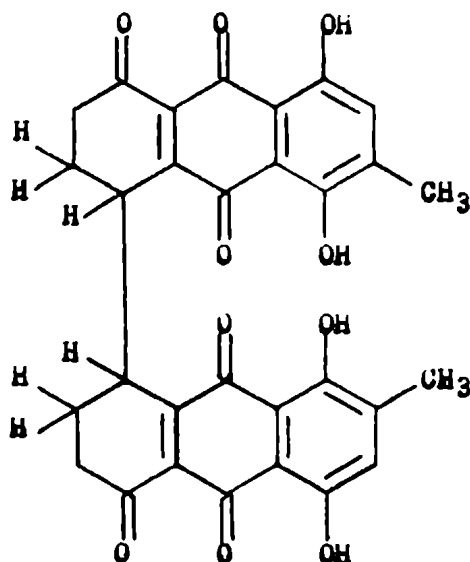
(XIV)

La cassiamina es el primer compuesto 2,2'-biantraquinónico aislado de fuentes naturales puesto que los compuestos descritos anteriormente son derivados 10-10'-biantraquinónicos. Compuestos similares [por ejemplo, skyrina (XV), iridoskyrina (XVI) y rubroskyrina (XVII)], derivados de estructuras de 1,1'-biantraquinonas fueron encontrados como metabolitos de especies de *Penicillium* (44).



(XV)

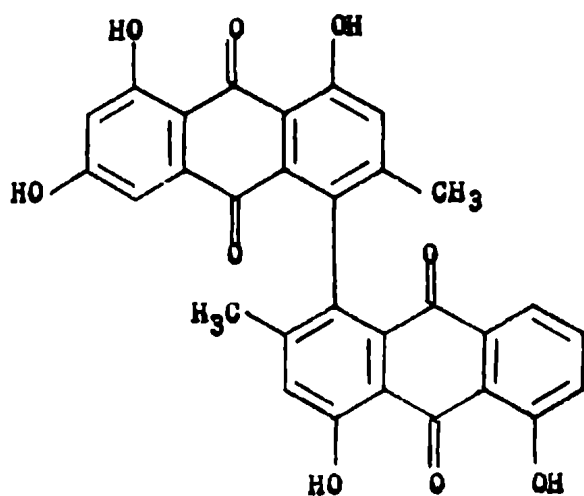
(XVI)



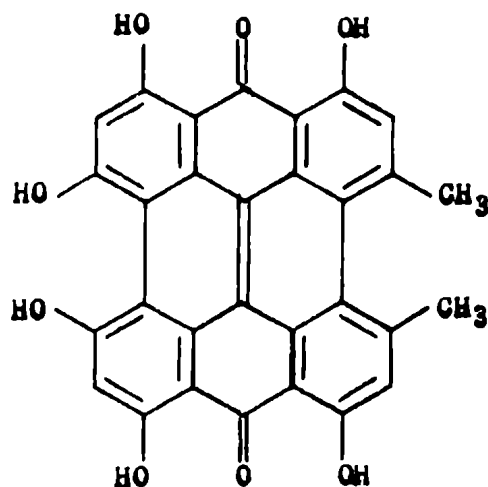
(XVII)

Un producto similar (y posiblemente idéntico) al que dieron el nombre de cassianina (XVIII) fué también aislado por Chatterjee y Bhattacharjee (45) de la corteza de tronco de la misma especie de cassia, juntamente con lupeol (XII) y otros dos compuestos que denominaron siameanina (XXI) y siameadina.

Los datos obtenidos por Chatterjee y Bhattacharjee concuerdan con los de Venkataraman (43), pero postulan una estructura en la que la unión entre los dos núcleos de antraquinona se producen en las posiciones α - α' (XVIII) basándose en que la hipericina (XIX) pudiera ser el precursor biogénico.

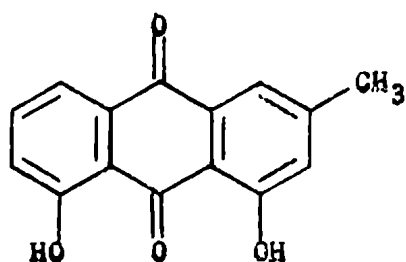


(XVIII)

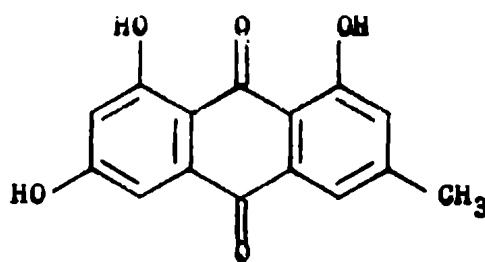


(XIX)

Ambos grupos de investigadores coinciden en que la cassiamina es una diantraquinona formada por una unidad de crisofanol (XIII) y una de emodina (XX),



(XIII)

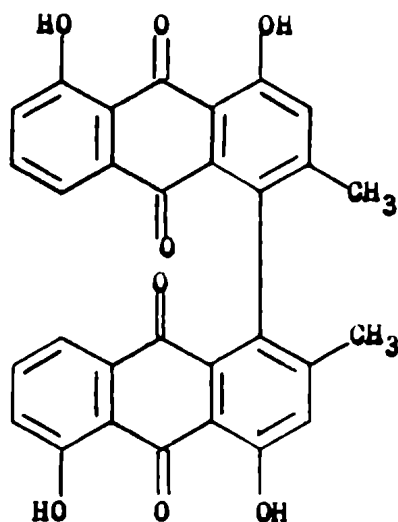


(XX)

pero la estructura mas probable es la (XIV) postulada por Venkataraman et al. que se encuentra justificada en una interpretación cuidadosa de espectros de resonancia nuclear magnética en la que determinan que hay cuatro protones α - en la molécula

de cassiamina, por lo cual la unión debe ser $\beta - \beta'$. Comparando los espectros R.N.M. del éter dimetílico del crisofanol (XIII) con el éter pentametílico de la cassiamina se comprueba en el segundo la ausencia de la señal correspondiente al proton en posición 2 del primero ($\delta = 7,1$ ppm), por lo que se supone que este debe ser el punto de unión. Además como las señales de los dos grupos metilos de la cassiamina aparecen superpuestas, como así también la de los protones α -adyacentes a los metilos, se deduce que ambos se encuentran en vecindades químicas similares, lo que está de acuerdo con la posición de unión del resto de emodina al crisofanol como en la estructura (XIV).

Chatterjee y Bhattacharjee estudiaron la siameanina y encontraron que también este era un compuesto diantraquinónico, cuya fórmula es $C_{30} H_{18} O_8$. La fisión reductiva con ditionato de sodio disectó a la molécula en dos mitades idénticas de crisofanol (XIII) lo que se encuentra confirmado por una serie de evidencias químicas. Basándose también en que el origen biogenético pudiera ser la hipericina (XIX) postularon la estructura (XXI) para la siameanina.



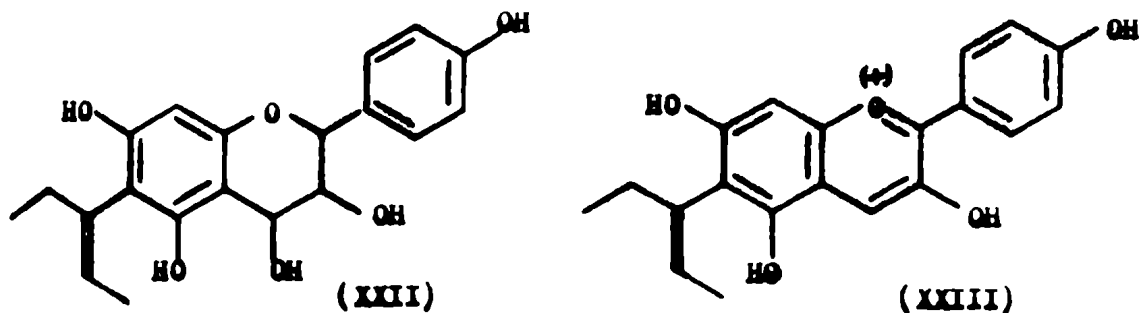
(XXI)

Esta postulación podría requerir una revisión en razón de que los datos experimentales de Venkataraman et al. para la cassiamina aportan evidencias bastante concluyentes en favor del sistema 2,2' -biantraquinónico mientras que los otros autores no indican en detalle los datos espectroscópicos que les han permitido postular las fórmulas (XVIII) y (XXI) respectivamente para la cassiamina y siameanina.

En algunos de los estudios más recientes de la Cassia tora L. (155) y de la Cassia occidentalis (157) se han identificado varios nuevos productos naturales, entre las que se encuentran dos nuevas xantonas (157,158).

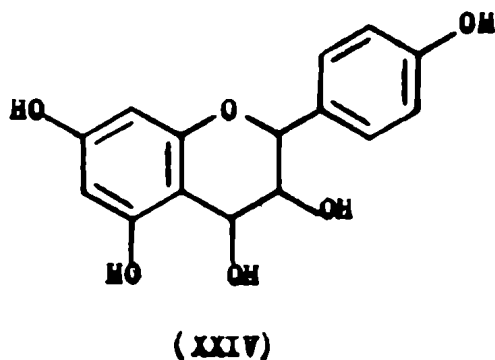
Entre los diversos productos flavonoides que se han aislado del género Cassia pueden mencionarse los encontrados en las investigaciones realizadas por Seshadri y sus colaboradores, quienes estudiando las hojas de Cassia javanica han encontrado la presencia de kampferol libre y como ramnósido, diversos de-

rivados antraquinónicos y una leucoantocianidina que no identificaron adecuadamente (46). Sin embargo, Seshadri (47) ha obtenido de las flores de *Cassia marginata* por extracción en medio débilmente ácido una nueva leucoantocianidina a la que denominaron margieassidina y atribuyeron la estructura (XXII).

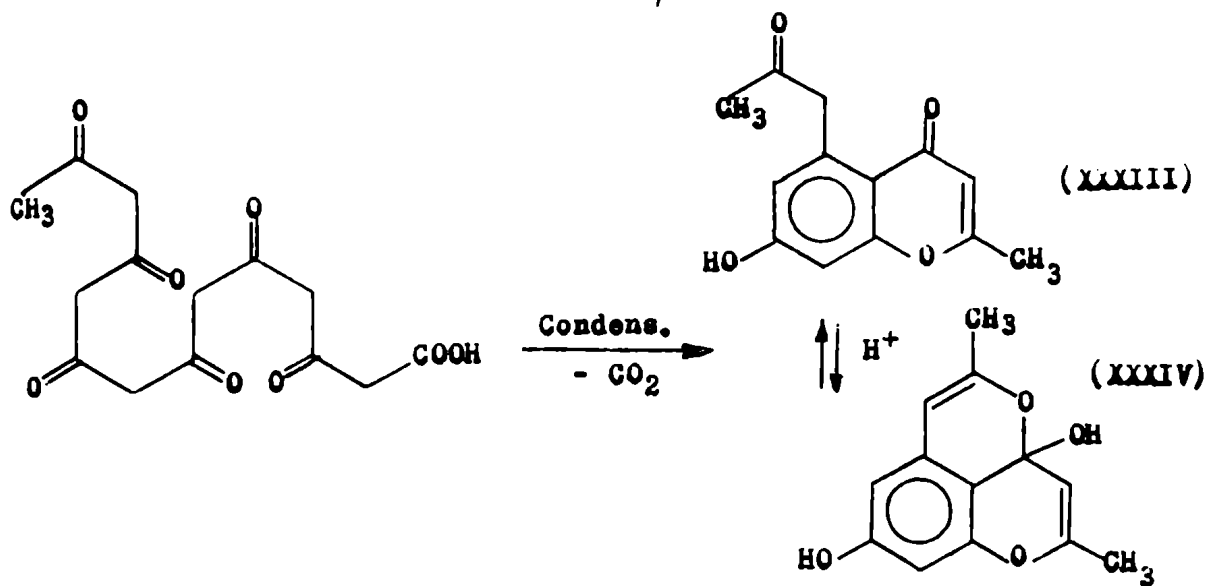


La misma por tratamiento en medio ácido alcohólico se transforma en la correspondiente antocianidina (XXIII), que también se forma por hidrólisis ácida de la antocianina que se encuentra presente en las flores de esta especie. El resto de azúcar, dos moléculas de glucosa, se encuentra en la posición 3.

Con anterioridad R.R.Paris y B.Cubuehu (48) obtuvieron de las hojas de *C. marginata* y de *C. goratensis*, evidencias de la presencia de leucoantocianidinas y de la última especie aislaron otra leucoantocianidina que llamaron goratensidina. La misma fué identificada como leucopelargonidina o 4',5,7-trihydroxiflavan-3,4-diol (XXIV)

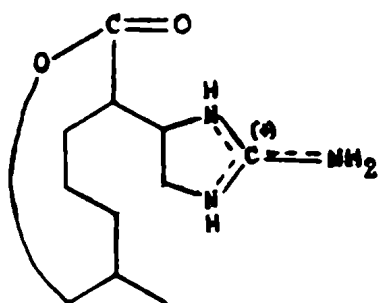


La extracción en medio neutro de las flores de *Cassia siamea* (161), dió lugar al aislamiento de una cromona de fórmula $C_{13}H_{12}O_4$ que demostró tener una considerable actividad antibiótica contra organismos gram negativos. Su investigación condujo a la fórmula estructural (XXXIII) que presenta una característica poco usual al tener una cadena lateral acetono como sustituyente en posición 5 del núcleo aromático, pues la mayoría de las cromonas sustituidas tienen generalmente un resto isopreno unido al núcleo aromático en posición 4 orto al grupo hidroxilo. Ello permitió especular con la biosíntesis vía un ácido β -cetopolimetilénico.

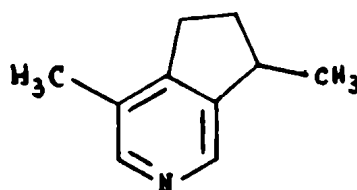


La estructura (XXXIII) quedó consustanciada por las investigaciones de Bycroft y colaboradores (162) que simultáneamente aislaron de la misma planta el compuesto (XXXIV) denominado barakol que fácilmente se transforma en la cromona (XXXIII) y vuelve a formarse por tratamiento ácido.

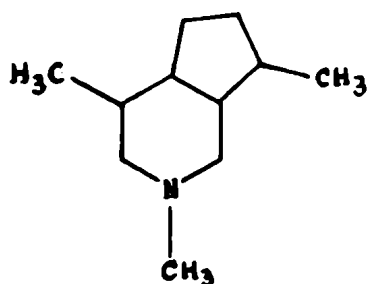
De las semillas de Cassia absus, Siddiqui y Ahmad (18) aislaron en 1935 la chaksina (XXV). Este alcaloide posee un resto guanidínico y es además la primera base que se ha descrito que posee un resto monoterpénico. Posteriormente fueron encontrados en otros géneros botánicos otros alcaloides monoterpénicos. Por ejemplo la actinidina (XXVI) y las esquitantinas (XXVII). Estos últimos alcaloides, aislados de la Apocinácea Chilena, Skytanthus acutus, se describen en más detalle en el capítulo II de esta tesis.



(XXV)



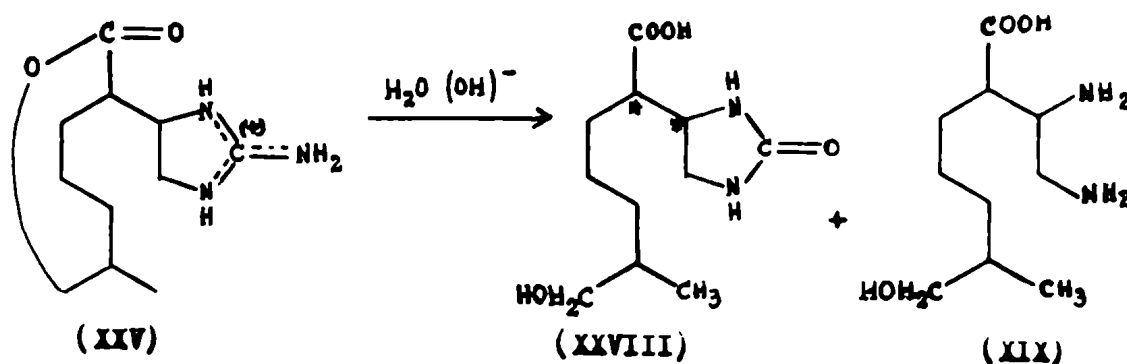
(XXVI)



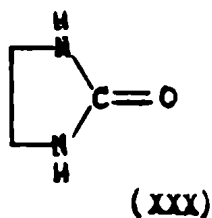
(XXVII)

La chaksina (XXV) es una base cuaternaria que se ha caracterizado como ioduro (p.f.168°), sulfato (p.f.316°) y nitrato (p.f.220°) (49). Por hidrólisis alcalina se produce la liberación de un mol de amoníaco con formación de un hidroxiaácido de fórmula $C_{11}H_{20}O_4N_2$, del que se han aislado dos

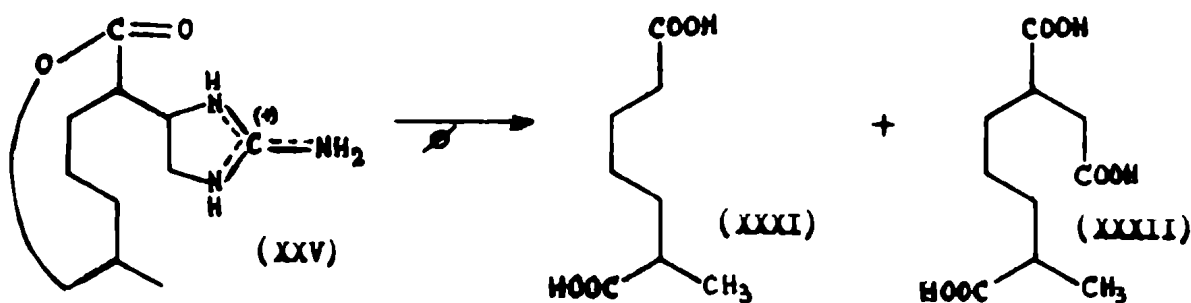
isómeros, uno de p.f.123° (50) y otro de p.f.147° (51) a los que les corresponde la fórmula (XXVIII) de acuerdo con los datos de resonancia magnética nuclear de varios derivados de este compuesto (51) y al espectro infrarrojo del ester metílico que presenta una banda a 1710 cm^{-1} que puede atribuirse a un grupo carbonilo en un ciclo ureido pentaatómico (50). En la misma reacción de hidrólisis se aísla el diamino-hidroxiácido (XXIX) (50) que se identificó como su diacetato.



Como datos comparativos para la estructura (XXVIII) del hidroxiácido se realizó un espectro infrarrojo de la 2-imidazolidona (XX) que presenta una banda a 1718 cm^{-1} y el espectro de resonancia nuclear magnética que presenta un singulete ($\delta = 5,6\text{ p.p.m.}$) debido a los protones NH, que en el isómero de p.f.147° de (XXVIII) también aparece a ($\delta = 5,6\text{ p.p.m.}$) y los protones metilénicos de la 2-imidazolidona se identifican como un singulete a ($\delta = 3,5\text{ p.p.m.}$) comparados con los de (XXVIII) que son múltiplos del CH a ($\delta = 3,99$) y de CH_2 a ($\delta = 3,39$) (51).



Por fusión alcalina, el alealoide libera amoníaco y produce ácido α -metilpimélico (XXXI) además de un ácido tri-básico (XXXII) $C_{10}H_{16}O_6$ (p.f. 147°) denominado ácido chaksínico (52) que resultó ser idéntico al ácido 1,2,6-heptantricarboxílico obtenido por síntesis (53).

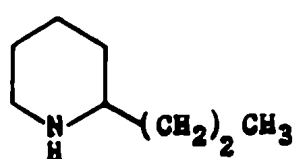


El ácido α -metilpimélico (XXXI) también se obtuvo por oxidación de la chaksina con permanganato de potasio en medio acuoso, descarboxilación y oxidación ulterior con ácido crómico (50). De la solución proveniente de la oxidación con permanganato de potasio se obtuvo una cantidad substancial de ácido oxálico.

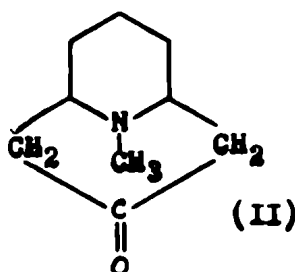
En base a estos resultados Wiesner, Valenta y sus colaboradores (50) (51) han propuesto la estructura (XXIV) para la chaksina.

CAPITULO IIALCALOIDES PIPERIDINICOS

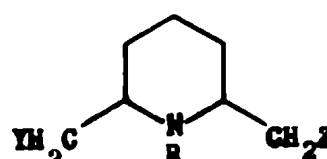
Los alcaloides que poseen como anillo básico el sistema piridínico o piperidínico constituyen una serie muy numerosa de bases naturales que van de las más simples derivadas de la piperidina, como la conina (I) y pseudopelleterina (II) y los compuestos piperidínicos bisustituídos como los alcaloides de la Lobelia cuyas estructuras son del tipo (III) a sustancias de estructuras mas complejas como los alcaloides de Lupinus (IV, V y VI) y los alcaloides del tabaco, en los que se presenta el núcleo piridínico asociado a un sistema pirrolidínico (VII) o piperidínico (VIII).



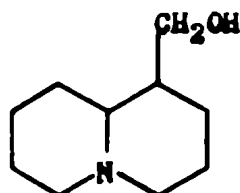
(I)



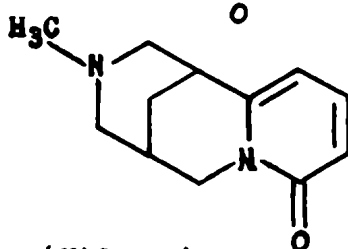
(II)



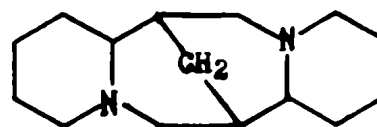
(III)



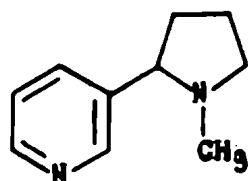
(IV) Lupinina



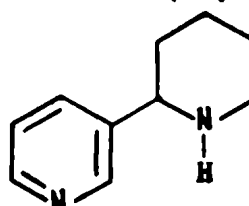
(V) Citisina



(VI) Esparteína



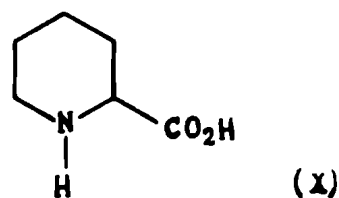
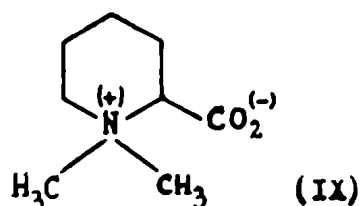
(VII) Nicotina



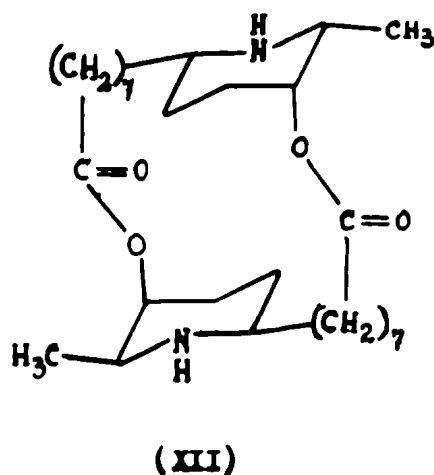
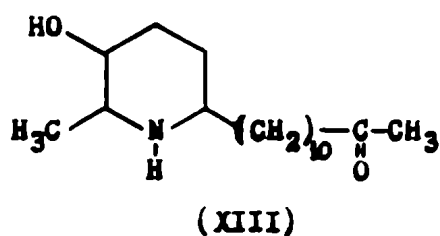
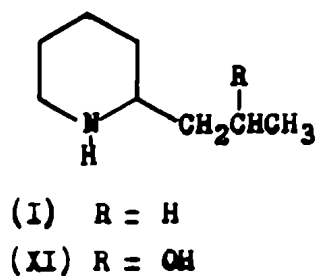
(VIII) Anabasina

En el presente capítulo se considerarán a los alcaloides piperidínicos desde el punto de vista de sus modos de for-

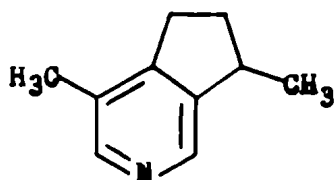
nación biológica en las plantas. Las primeras evidencias en favor de las rutas de formación del anillo piperidínico en las plantas se basa principalmente en los estudios realizados con la anabasina (VIII) producida por el tabaco (54, 55), la homotachidrina (IX) de la alfalfa (56) y del ácido piperocólico (X) en diversas plantas y microorganismos (57).



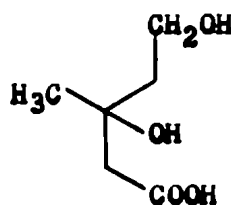
Estos alcaloides se derivan de la lisina (155), mientras que el anillo piperidínico de la conina (I) y conhidrina (XI), alcaloides de la cicuta, parece formarse por reacciones biológicas de ciclación de un ácido poli- β -cetónico derivado de cuatro unidades de acetato (58, 156). Los alcaloides que se describen en esta tesis, en especial la carpaina (XII) y la cassina (XIII) pueden formalmente derivarse de la misma vía biosintética (159, 12).



Finalmente, en este capítulo se presentarán las evidencias más recientes en favor de un tercer camino de biogénesis de alcaloides que poseen un núcleo piperidínico en el que el mismo tiene un origen isoprenoide (59). El anillo piridínico de la actinidina (24) (XIV) y el anillo piperidínico de los alcaloides aislados del Skytanthus acutus se originan en un modo de formación biológica en el que el precursor es el ácido mevalónico (XV) (60, 61).



(XIV)



(XV)

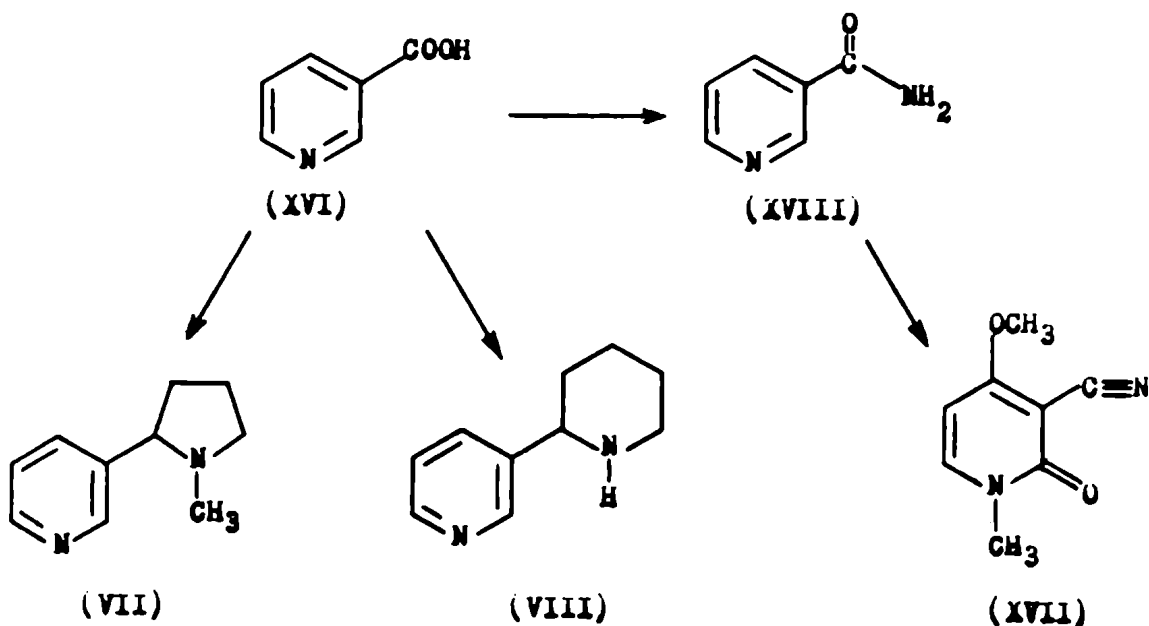
Alcaloides del Tabaco

La nicotina (VII) es el alcaloide más conocido que contiene un anillo piridínico. Se encuentra presente en la mayoría de las especies del género Nicotiana (59) aunque se ha encontrado en algunas especies no relacionadas como la Asclepias syriaca (62), Atropa belladonna (62), Equisetum arvense (63) y Lycopodium clavatum (63).

Se han realizado numerosas investigaciones sobre la biosíntesis de la nicotina (VII) y de su isómero, la anabasina (VIII), que es el alcaloide principal de la Nicotiana glauca (64). Los resultados no son susceptibles de interpretar con facilidad habiéndose originado algunas controversias con respecto al origen bioquímico de alguno de los átomos de carbono del

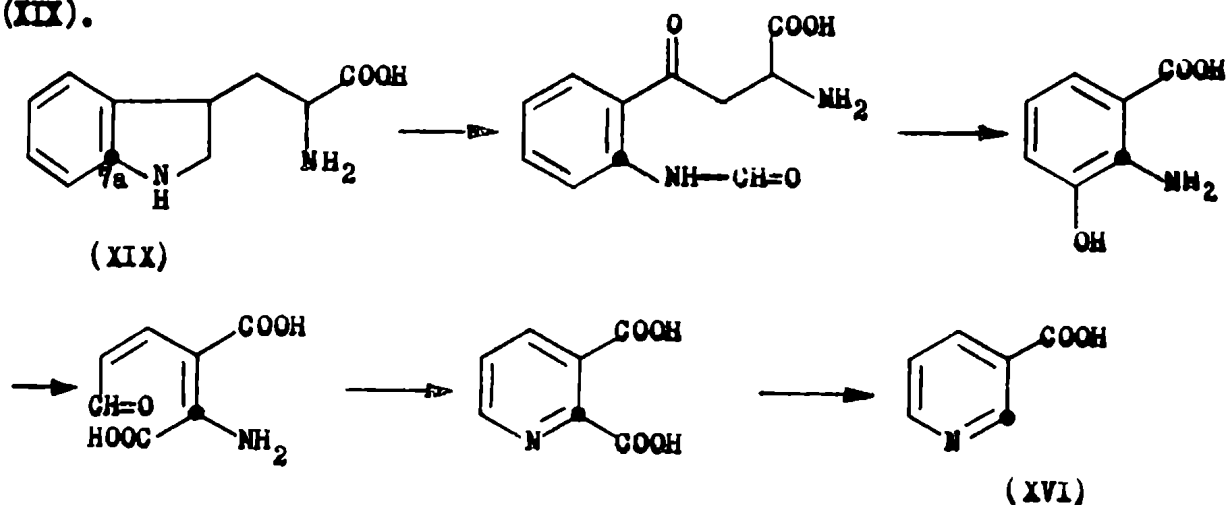
esqueleto carbonado de ambos alcaloides (65), y en torno a los métodos empleados en estas investigaciones así como con el papel que juegan los diversos precursores que habitualmente se utilizan en las experiencias (59, 66, 164).

Dawson (67) estableció en 1953 que el ácido nicotínico (XVI) es un precursor del anillo piridínico de la nicotina (VII) y anabasina (VIII), aunque en el proceso de incorporación se perdía el grupo carboxilo por lo que debía considerarse un camino biosintético en el que este se elimina en algunas de las etapas. El mismo ácido nicotínico (XVI) es un precursor eficiente de la ricinina (XVII), un alcaloide aislado del Ricinus communis (68). En este caso el grupo carboxilo del ácido (XVI) se convierte en el grupo ciano de la ricinina (XVII), siendo aparentemente la nicotinamida (XVIII) un intermediario del proceso (69).



El origen del ácido nicotínico que da lugar a la formación del núcleo aromático de la nicotina (VII) y de la anabasina (VIII) es relativamente complejo. Leste (70) ha encontrado

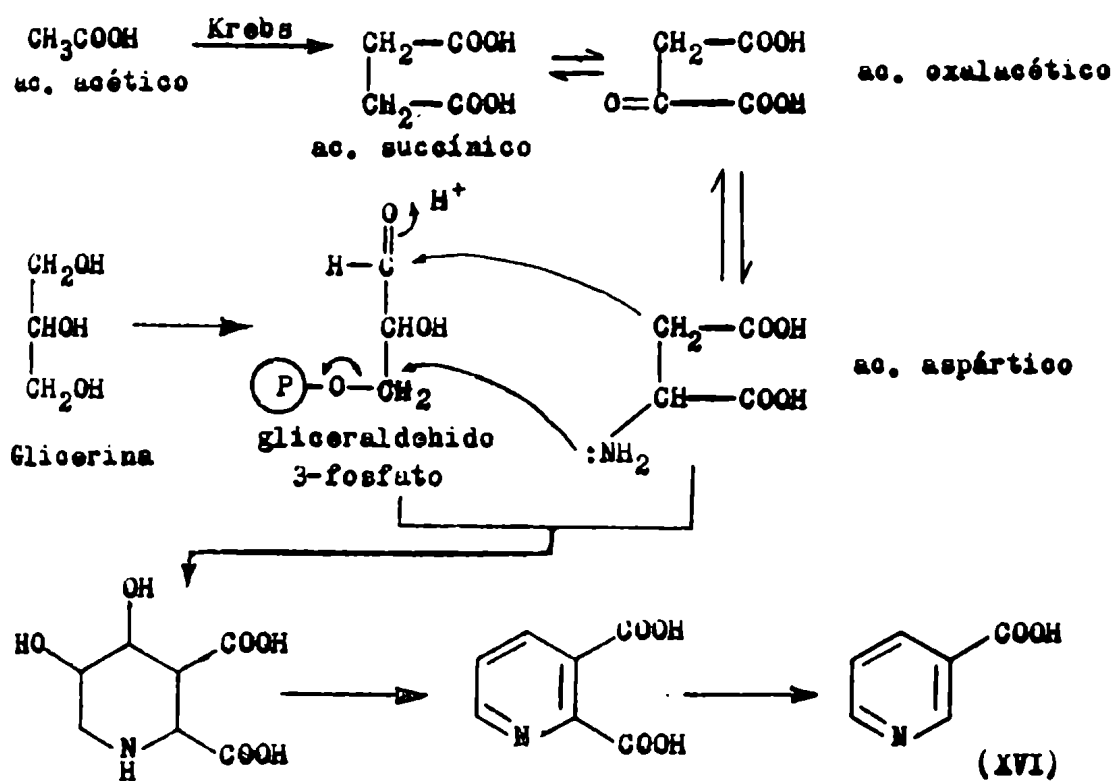
que el mismo no se forma por un proceso similar al que funciona en algunos microorganismos como, por ejemplo, la Neurospora y en algunos animales (71) donde se forma por la serie de reacciones que se ilustran a continuación, a partir del triptofano (XIX).



De ocurrir una similar secuencia en el caso de la planta del tabaco, el triptofano debería ser un buen precursor de la nicotina (VII), pero Leete (72) y Henderson et al. (73) han encontrado que el alcaloide no incorpora actividad originada en triptofano-7a-C¹⁴.

Leete propuso en 1963, un esquema para la biosíntesis del ácido nicotínico (XVI) y por ende del núcleo aromático de la nicotina (VII) y de la anabasina (VIII), basándose en la radioactividad de cada átomo de carbono del ácido nicotínico (XVI) obtenido por degradación de la anabasina (VIII) aislada de la Nicotiana Glauca que había sido alimentada con acetato - 2- C¹⁴ o con glicerol -2- C¹⁴ (71). La falta de incorporación del acetato-1-C¹⁴ al anillo piridínico de la nicotina (VII) y una serie de estudios realizados sobre la biosíntesis de la ricina (XVII) (75, 76, 77) en los cuales se demostró la incorporación de

acetato-2-C¹⁴, succinato-2,3-C¹⁴, glicerina-1-3-C¹⁴ y glicerina-2-C¹⁴ al anillo piridónico de este alcaloide concuerdan con este esquema. Los resultados indican que los átomos de carbono 4,5 y 6 del ácido nicotínico provienen de un compuesto de tres átomos de carbono muy relacionados con la glicerina, mientras que los otros átomos de carbono provienen del ácido succínico o algún compuesto muy relacionado.



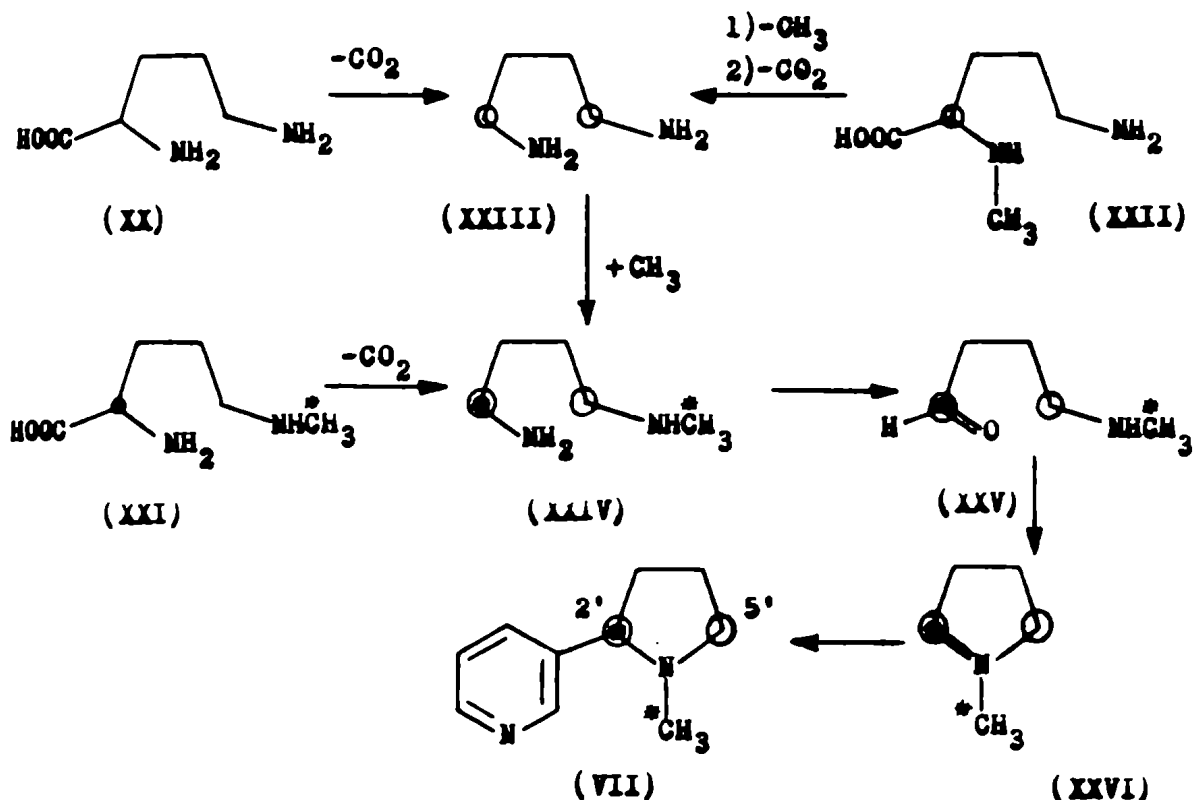
En el esquema de Leete (74) se sugiere que el anillo heterocíclico se forma por una reacción de condensación entre el 3-fosfato de gliceraldehido y ácido aspártico. El derivado piperidínico que se forma se deshidrataría y por deshidrogenación se pasaría al ácido quinolínico que por descarboxilación pasaría al ácido nicotínico (XVI).

Es sugestivo que en Escherichia coli la glicerina y

el ácido succínico son también precursores del ácido nicotínico (78), mientras que Mothes et al. (79) han encontrado que el ácido aspártico-1,4- C^{14} - N^{15} y la glicerina sirven como precursores del anillo piridínico del ácido nicotínico en el Mycobacterium tuberculosis. Dada la gran actividad metabólica de estos metabolitos es indudable que no se podrá conocer el mecanismo de formación con cierto detalle hasta que no se hayan determinado las enzimas responsables de los procesos (59).

Desde hace diez años se sabe que la ornitina -2- C^{14} (XX) se incorpora en el anillo pirrolidínico de la nicotina (VII) (80, 81); y que el nitrógeno proviene del grupo δ -amino y no del α -amino de la ornitina (82). Se ha verificado que la DL- δ -N-metil- C^{14} -ornitina -2- C^{14} (XXI) se incorpora, sin ruptura del N-metilo, a la nicotina con marcación exclusiva del átomo C-2' (83) mientras que la DL- α -N-metil- C^{14} -ornitina -2- C^{14} (XXII) se demetila y decarboxila dando putrescina (XXIII) simétrica que se incorpora dando igual radioactividad en los átomos C-2' y C-5' del anillo pirrolidínico.

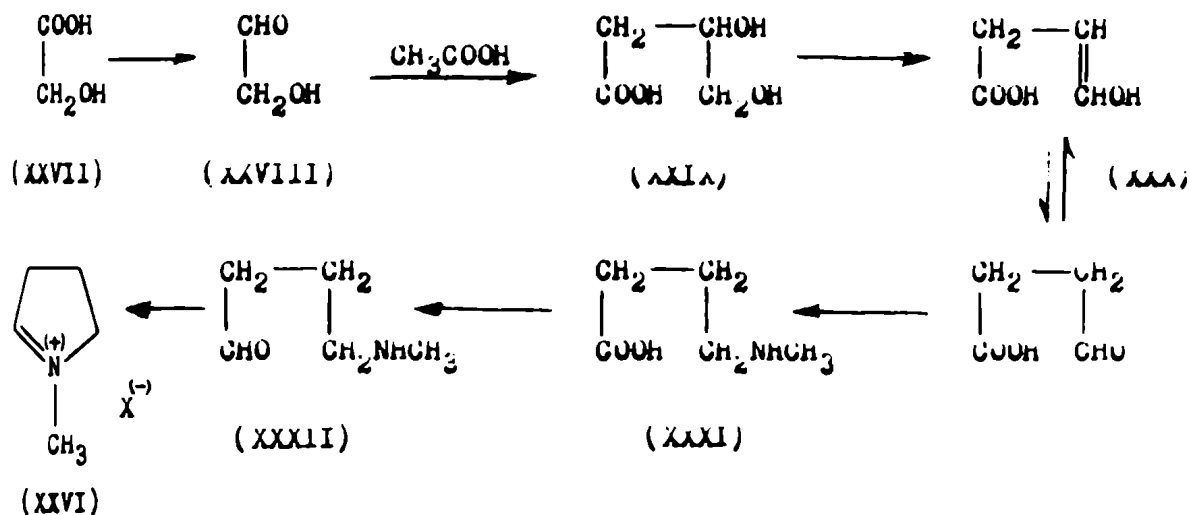
Como la N-metil putrescina (XXIV) se incorpora sin degradación al núcleo pirrolidínico de la nicotina (84) y se ha comprobado su oxidación "en vivo" (85) para dar 4-metilamino butanal (XXV), el precursor directo de la sal de N-metil- Δ^1 -pirrolinio (XXVI) que se incorpora sin tautomerización a la nicotina, Leete (86) ha propuesto el siguiente esquema de biosíntesis del núcleo pirrolidínico de la nicotina:



Liebman, Mundy y Rapoport (87) han encontrado que la incorporación de radioactividad en la nicotina (VII) en Nicotiana glutinosa por exposición de la planta a una atmósfera de ¹⁴CO₂ durante intervalos controlados de tiempo es bastante diferente de la que se produce por experiencias clásicas de alimentación con precursores del tipo de los mencionados anteriormente. De acuerdo con los autores, las condiciones de biosíntesis en atmósfera de CO₂ se acercan más a una situación de crecimiento normal por lo que es concebible que las otras experiencias se realizan a través de caminos biosintéticos aberrantes o de menor importancia.

El ¹⁴CO₂ forma ácido glicólico (XXVII) con igual marcación en ambos átomos de carbono (88). Leste ha propuesto (86) que aquél puede reducirse a aldehído glicólico (XXVIII) que por condensación con ácido acético daría ácido hidroxibutí-

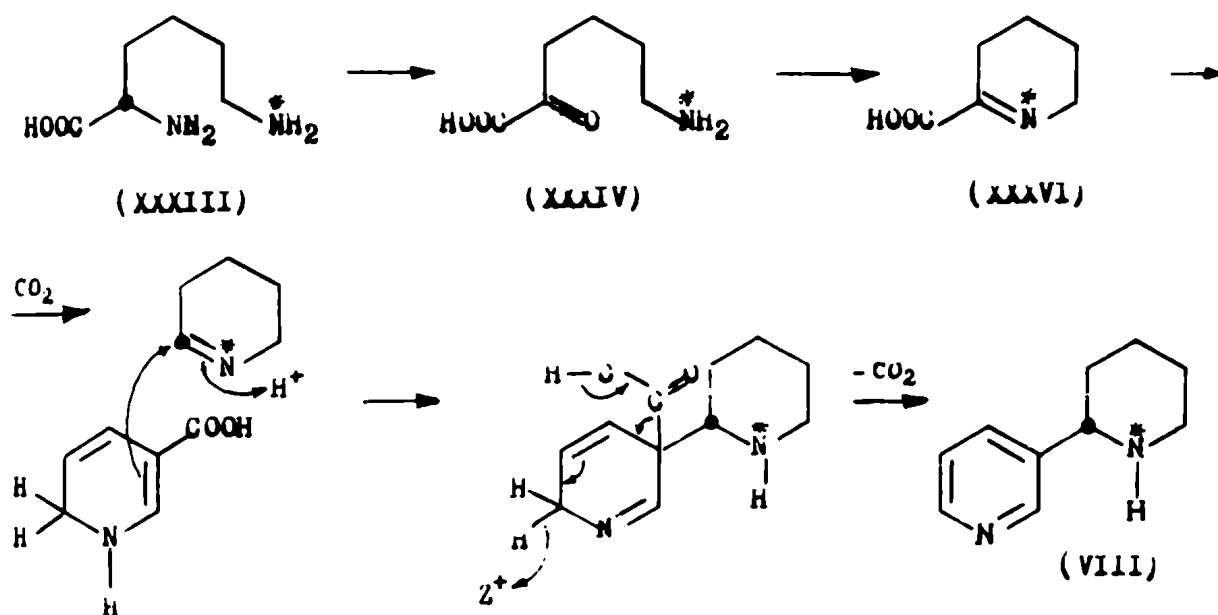
nico (XXIX). Por deshidratación se convertiría en hemialdeído succínico (XXX) que por transaminación y N-metilación formaría ácido 4-metil aminobutírico (XXXI). La reducción de este último daría el 4-metilaminobutanol (XXXII) que es el precursor de la N-metil- Δ^1 -pirrolidina (XXVI).



Este ejemplo, junto con otros que se encuentran descritos en la literatura (82-86) ilustran el hecho de que los precursores administrados en forma exógena pueden incorporarse por caminos biosintéticos distintos de modo que la ubicación de los mismos en el proceso de biogénesis real no es siempre segura y que los datos experimentales deben interpretarse con cierta precaución.

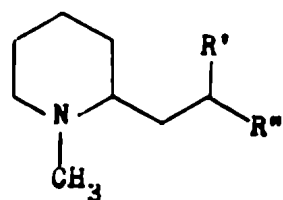
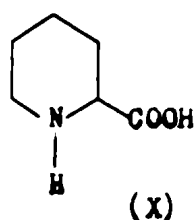
El amino ácido lisina (XXXIII) es un buen precursor del anillo piperidínico de varios alcaloides y de otros productos naturales (54). La administración de lisina-2-C¹⁴ a Nicotiana glauca produce anabasina (VIII) en la que la marcación esta limitada solamente al átomo de carbono 2' del anillo piperidínico, mientras que el átomo de nitrógeno se origina solamente en el grupo amino ϵ de lisina (55). Estos resultados

permitieron proponer un esquema de biosíntesis en el que el anillo nitrogenado reducido se forma a partir de lisina a través del ácido α -ceto- ϵ -aminocaproico (XXXIV).



ác. 1,6 -dihidronicotínico

Este parece ser además el camino principal de formación del ácido pipercolico (X) a partir de lisina en ratas y en Neurospora crassa (89,90). Sin embargo, la incorporación de lisina- C^{14} , 2-t, con la retención del tritio del C-2 (168), en la anasina, la N-metil pellerina y la sedamina, indica que el ácido Δ' -piperedein-2-carboxílico (XXXVI) no es un intermediario en estos casos, lo que nuevamente significa que los resultados de experimentos de incorporación de precursores marcados se deben interpretar con mucho cuidado.

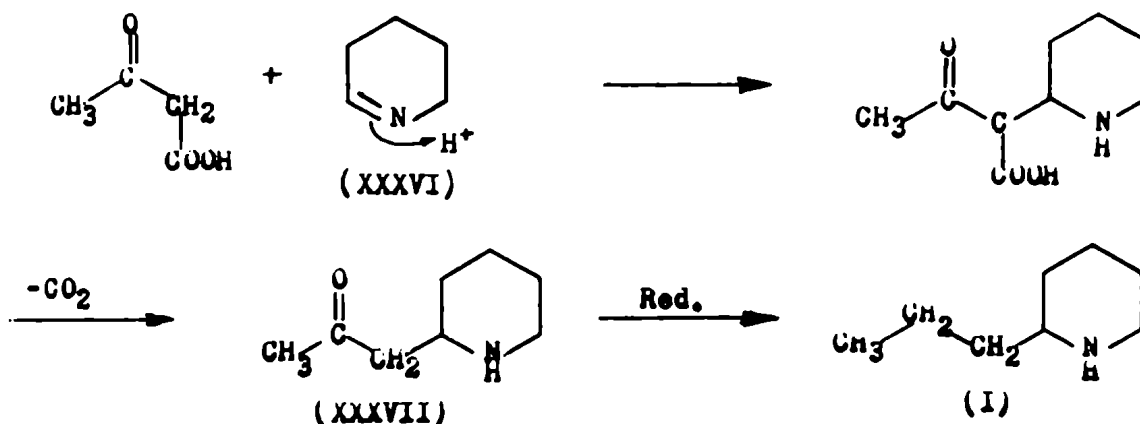


N-metilpellerina: R'=O, R''=CH₃

sedamina: R'=OH, R''=C₆H₅

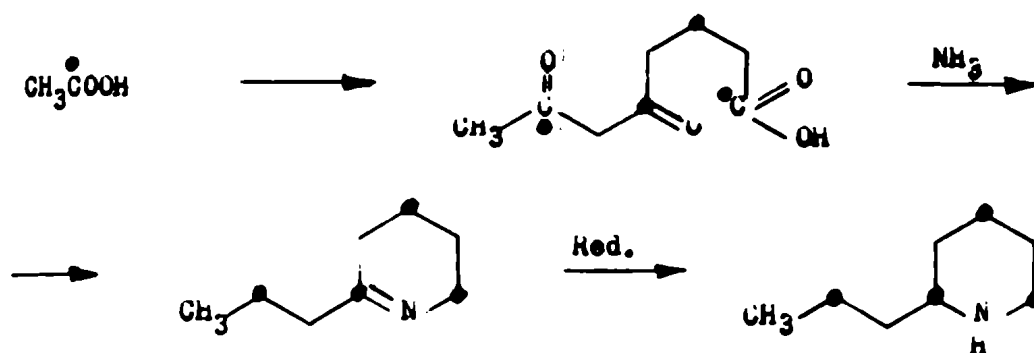
ALCALOIDES DE LA CICUTA

Los alcaloides de la cicuta (Conium maculatum) también han sido estudiados por el método de precursores marcados. Hasta hace poco (65) se aceptaba que el ciclo piperidínico de los mismos se originaba, también, a partir de la lisina (XXXIII). Robinson (91) sugirió en 1917, que la conina podía originarse por condensación de 1-piperideína (XXXVI) (originada de la lisina) con el ácido acetoacético (o mejor dicho un equivalente del mismo que a su vez se origina en el ácido acético o un equivalente). La descarboxilación del producto de condensación conduciría a la isopelleterina (XXXVII) cuya reducción permitiría pasar a la conina (I).



Por analogía con los resultados obtenidos con la anabasina, Battersby (65) consideró que esta ruta, vía lisina, (XXXIII) podría ser la más correcta. Schiedt y Hoss encontraron, en 1958 (92), que se formaba conina radioactiva cuando se suministraba lisina uniformemente marcada con C¹⁴. Estos resultados parecen ser consistentes con la hipótesis de Robinson (91), aunque no se degradó al alcaloide para determinar la distribución de la radioactividad.

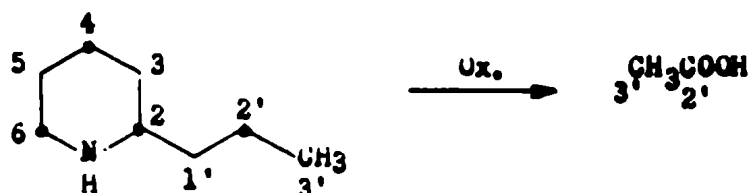
En 1957, K. Biemann, G. Buchi y B. H. Walker (93) enunciaron la posibilidad de que estos alcaloides podían originarse por vía biogénica basada en el ácido acético y el amoníaco en la que el anillo piperidínico de los mismos se forma a partir de un ácido poli- β -cetónico.



Este esquema biogénico fué considerado independientemente por Battersby (65) y por Leete (58,94,156). Este último, luego de haber encontrado que la cicuta no incorpora lisina-2- 14 (94) en el extracto crudo de sus alcaloides, halló que, en cambio, cuando se suministra acetato 1-C^{14} (58) se aísla conina radioactiva cuya actividad se encuentra localizada en las posiciones indicadas en el esquema anterior.

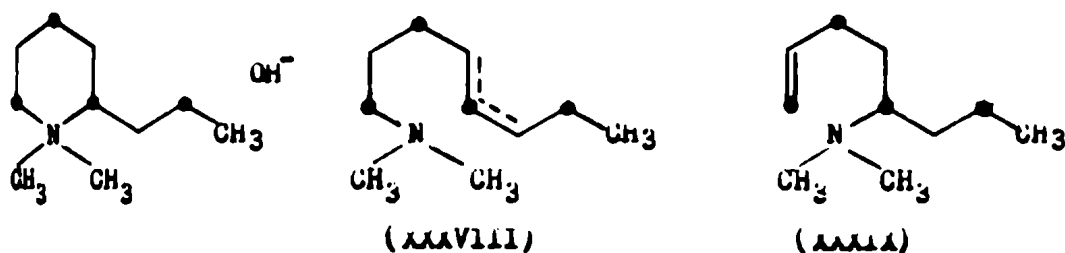
Para determinar la distribución de la radioactividad incorporada en la conina de diversos compuestos marcados, como el $6\text{-oxooctanal-6-C}^{14}$, considerado precursor inmediato (156), el alcaloide se sometió a las siguientes reacciones que ilustran el resultado de administrar acetato 1-C^{14} :

La oxidación de Khun-Roth dá ácido acético, como único producto,



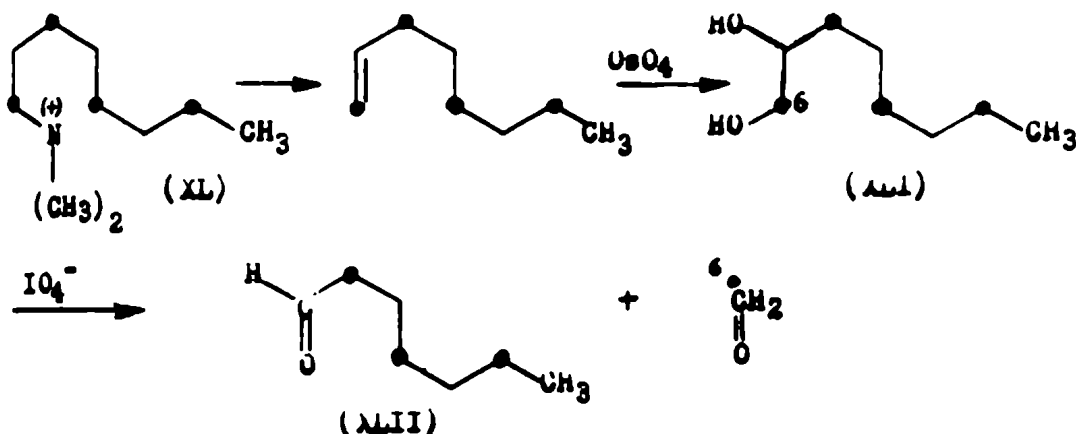
que luego sometido a una reacción de Schmidt produjo dióxido de carbono (del C-2') con cerca de 1/4 parte de la actividad del alcaloide, además de metilamina (del C-3') que solo tiene una parte mínima de la actividad.

La cuaternización de la conina seguida de una reacción de eliminación de Hofman dió una mezcla de dimetilamino-
octenos (XXXVIII) y (XXXIX)

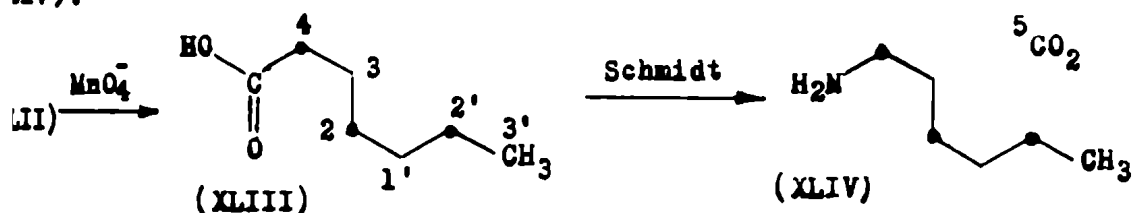


que se redujeron con hidrógeno sobre paladio. Por una nueva metilación y cuaternización se obtuvo una mezcla en proporción 3 a 1 de iodometilatos (XL) y (XLV) que se separaron por cromatografía en alúmina.

El iodometilato del 1-dimetilaminooctano (XL) se sometió a una degradación de Hofman seguida de tratamiento con tetróxido de osmio formándose un diol (XLI) que se desdobló, con metaperiodato de sodio, en formaldehido, proveniente del C-6 (con 24% de la actividad total) y heptanal (XLII) que se oxidó con permanganato de potasio dando ácido 1-heptanoico (XLIII)

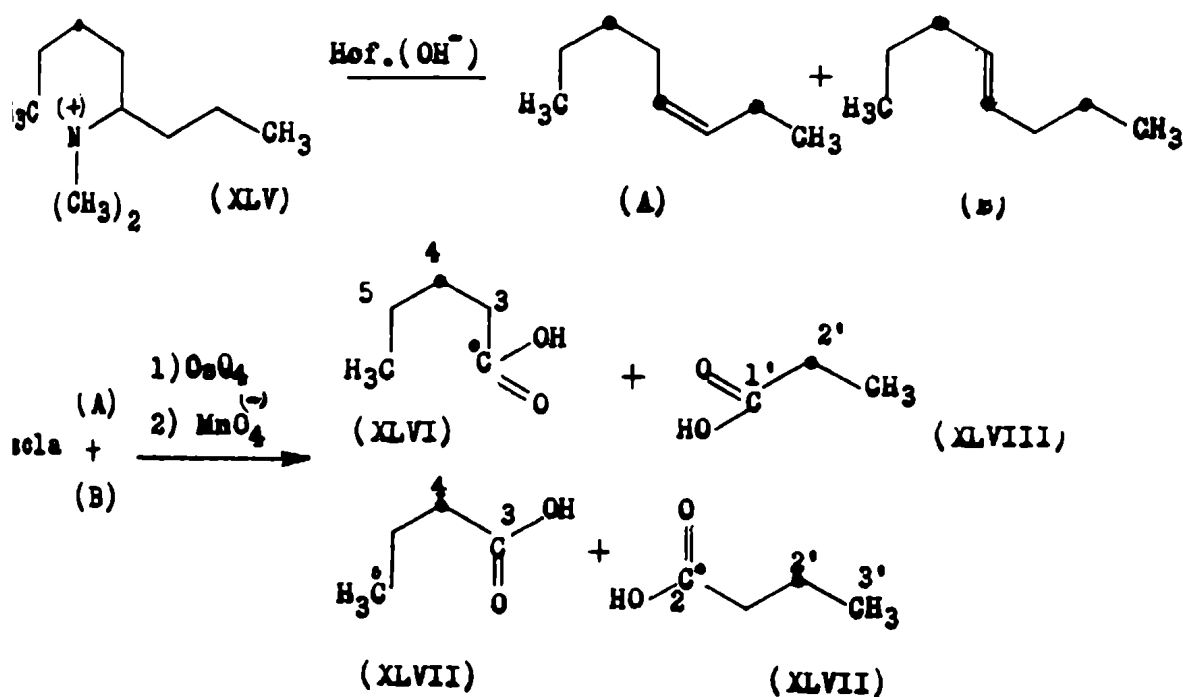


cual sometido a una reacción de Schmidt liberó dióxido de carbono proveniente del C5 (1% de la actividad) y hexilamina (IV).



La hexilamina (XLIV) se trató con ioduro de metilo formándose el iodometilato del 1-dimetilamino hexano. Este compuesto se degradó de la misma manera que el (XL) liberándose el C-4 de la coniina como formaldehído (22% de actividad) y el C-5 como dióxido de carbono (1.5% de actividad).

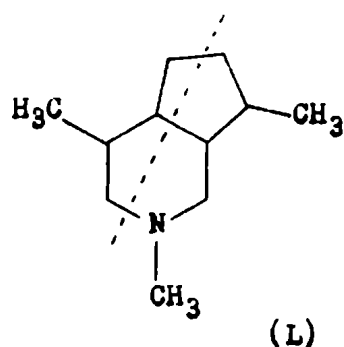
El compuesto (XLV) iodometilato de 4-dimetilamino hexano, se sometió a una reacción de eliminación de Hofmann produciéndose una mezcla de 3- y 4-octeno que se oxidó con tetroxido de osmio y luego con permanganato formándose una mezcla de ácidos valérico (XLVI), butírico (XLVII) y propiónico (XLVIII) que se separaron por cromatografía sobre columna de sílica.



Estos ácidos se sometieron a la reacción de Schmidt liberándose dióxido de carbono. Del ácido propiónico se obtuvo CO₂ proveniente del C-1' con 1.3% de actividad. El ácido alérico no se pudo degradar y del ácido butírico aislado se liberó el CO₂ proveniente de C-2 y C-3. La actividad del C-2 (26% de la actividad total) se obtuvo por diferencia, ya que de los datos anteriores se conocía la actividad en el C₃.

ESQUITANTINAS

La más reciente de las rutas biosintéticas que se refieren a alcaloides piperidínicos conciernen a los modos de formación biológica de algunos alcaloides como las esquitantinas (L) que poseen en su esqueleto carbonado, un sistema monocarpénico.

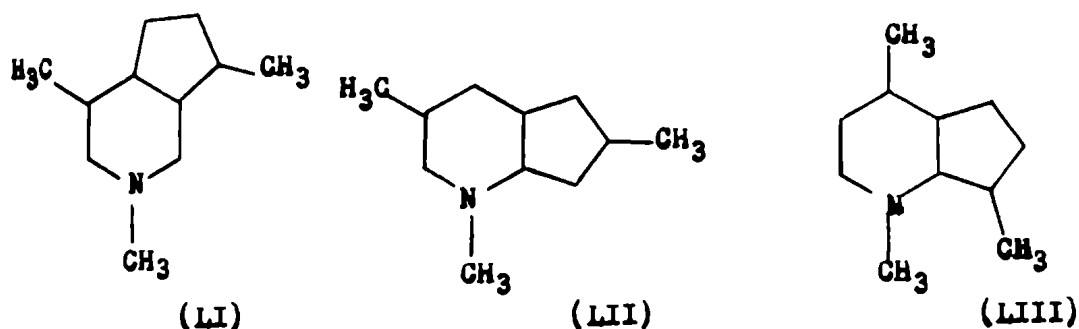


Las esquitantinas fueron estudiadas inicialmente por tres grupos de investigadores (19,21,23) que aislaron de las hojas del Skytanthus acutus Meyen, una Apocinácea de la zona de Tacama chilena que se conoce con el nombre vulgar de "cuernillo", un alcaloide volátil por extracción metanólica y posterior arrastre del extracto con vapor de agua. El alcaloide fue identificado como un líquido relativamente volátil (p.eb.62°/1.5mm) que produce algunas sales cristalinas, entre ellas un picrato (p.f.127-128) que se ha utilizado para su purificación.

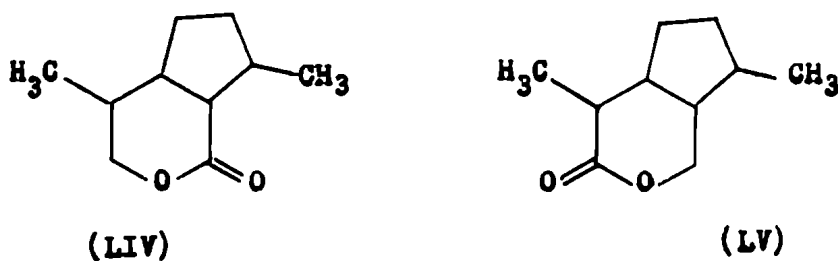
La deshidrogenación de esta base con paladiocarbón levó a obtener un compuesto piridínico polisustituído opti- mente inactivo de fórmula $C_{10}H_{13}N$.(23). Se infirió que el producto de deshidrogenación era polisustituído porque por oxidación con permanganato de potasio no se obtuvo un ácido piridinmonocarboxílico (20). De acuerdo con los resultados analíticos que permitían dar como fórmula molecular $C_{11}H_{21}N$ para la esquitantina (con un grupo N-metilo y dos C-metilo) la obtención del compuesto piridínico con retención de todos los átomos de carbono del esqueleto carbonado indicaba la presencia de un segundo ciclo (20).

Descontando los cinco átomos de carbono del ciclo piridínico y los dos que corresponden a los grupos C-metilos, determinados por el método de Kuhn y Roth, además del carbono del grupo N-metilo, quedan tres átomos de carbono disponibles para formar el segundo ciclo. Como éste sobrevive inalterado la reacción de deshidrogenación se puede adelantar la suposición que es un ciclo pentaatómico.

El hecho de que el esqueleto carbonado del alcaloide posee diez átomos de carbono con dos grupos C-metilo indujo a Urini-Bettolo y sus colaboradores (20) a suponer que pertenecía a la clase de sustancias monoterpénicas. En base a esta suposición y a la probable existencia de un ciclo pentaatómico se pueden escribir las siguientes estructuras probables:



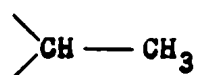
La estructura (LI) es la más probable por cuanto existen otras sustancias monoterpénicas que poseen este esqueleto, como la nepetalactona (LIV) y la iridomirmicina (LV) (20).



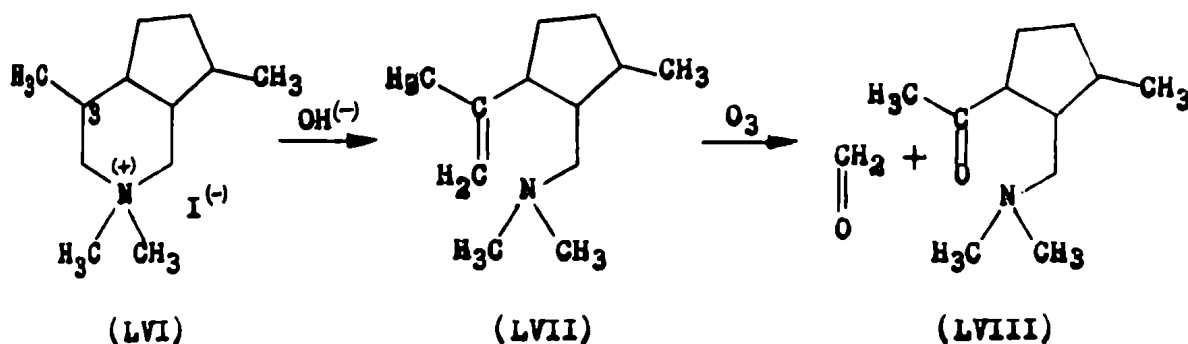
El espectro de resonancia magnética nuclear del producto de deshidrogenación, estudiado por Djerassi, Kutney, Shamma, Shoolery y Johnson (23) aportó evidencias en favor de la estructura (LI) por cuanto se revelaba la presencia de dos protones aromáticos a $\delta = 8.01$ y 8.11 , respectivamente, desplazamientos químicos que son típicos de protones situados en posiciones α de un anillo piridínico (95), al mismo tiempo que los valores ligeramente diferentes de los mismos indicaba que se tenía entre manos una piridina sustituida asimétricamente en las posiciones 3,4 y 5.

Uno de los dos grupos metilo está situado en el núcleo piridínico porque aparece desplazado a campos más bajos

($\delta = 2.18$) que el segundo ($\delta = 1.27$) cuyo desplazamiento químico indica que está más protegido electrónicamente y por ende situado sobre un átomo de carbono saturado del núcleo pentaatómico. Además este segundo grupo metilo está colocado sobre un carbono metínico por presentarse desdoblado ($J = 7$ cps.) al pertenecer a un sistema del tipo:

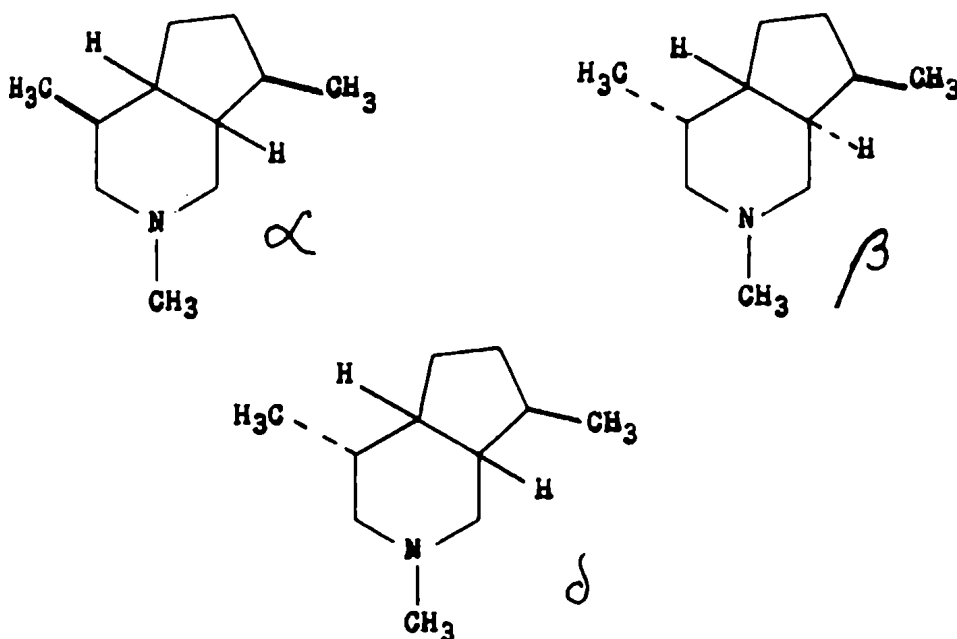


Djerassi, Kutney y Shamma (23) ubicaron al primer grupo metilo en la posición 3 del núcleo piperidínico como resultado de una degradación de Hofmann practicada sobre el iodometilato de esquitantina (LVI) que condujo via el correspondiente metino (LVII) a la metilcetona (LVIII) y formaldehído por ozonólisis.



La oxidación del compuesto (LVIII) por el método de Bayer-Villiger con ácido trifluorperoxiacético produjo el acetato (LIX) cuya saponificación y oxidación posterior con trióxido de cromo dió la cetona cíclica (LXI) cuyo espectro infrarrojo indicaba que se trataba de una ciclopentanona sustituida (1745 cm^{-1}). Como consecuencia de esta serie de reacciones debe ubicarse al grupo metilo en la posición 3 del núcleo piperidínico.

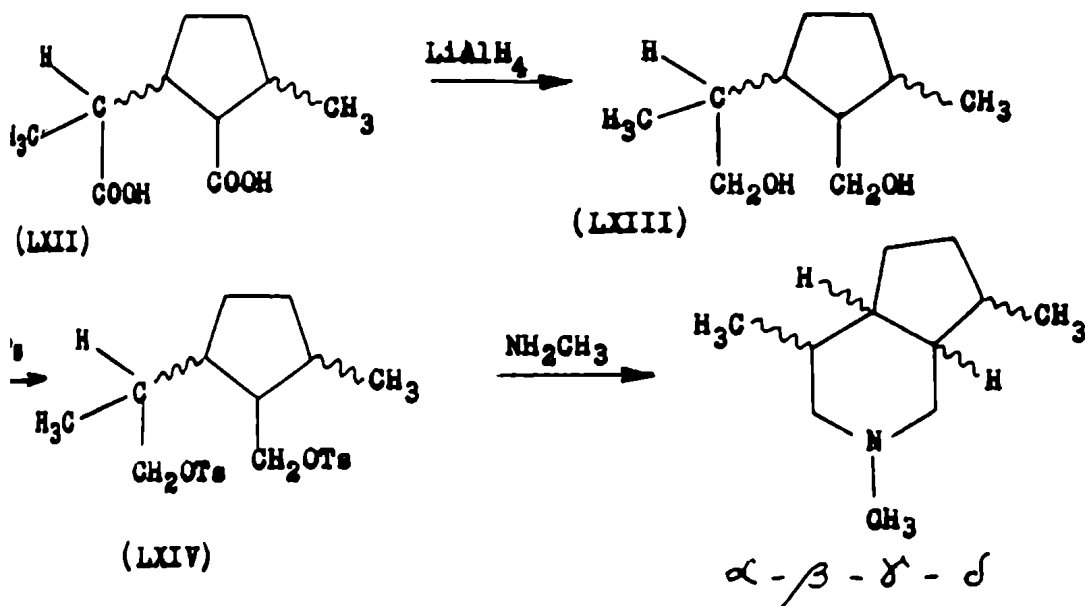
natural con características físicas ligeramente diferentes a las descriptas para el producto aislado con anterioridad. El examen del mismo por cromatografía gaseosa reveló la presencia de cuatro picos bien resueltos de los que se pudieron aislar en forma reparativa tres bases que se denominaron, respectivamente α -esquitantina, β -esquitantina y δ -esquitantina (19).



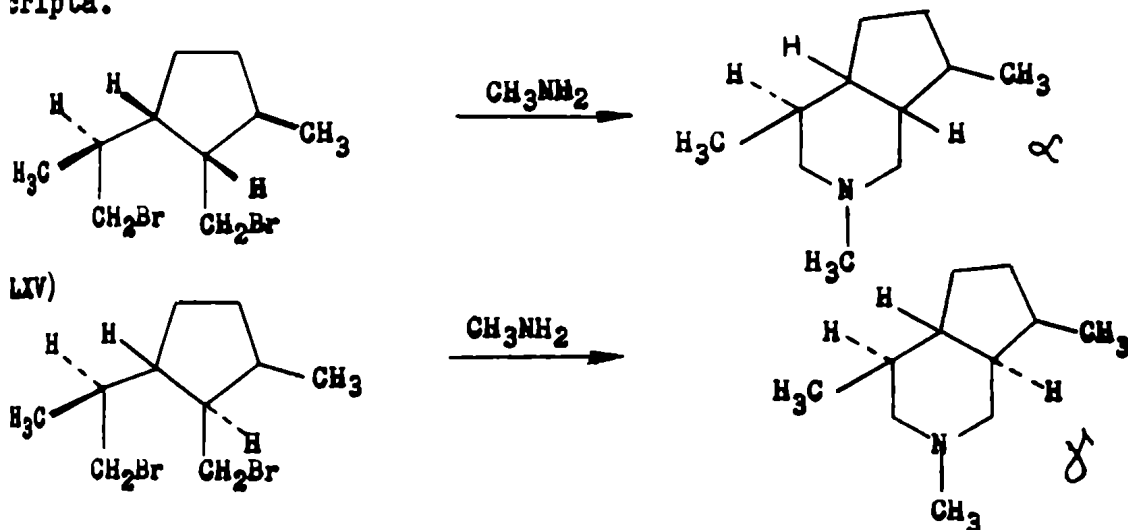
Eisenbraun, Bright y Appel demostraron, además, cuales eran las configuraciones relativas de estos tres isómeros por medio de correlaciones químicas con los correspondientes ácidos nepetalínicos (α , β , γ y δ) de configuración (96,97,98) y esteoquímica (99) conocidos, que fueron preparados de acuerdo con métodos anteriores (100).

Los ácidos nepetalínicos (LXII) fueron reducidos con hidruro de aluminio y litio a los correspondientes dioles (LXIII) los que se convirtieron en sus tosilatos (LXIV). El tratamiento de

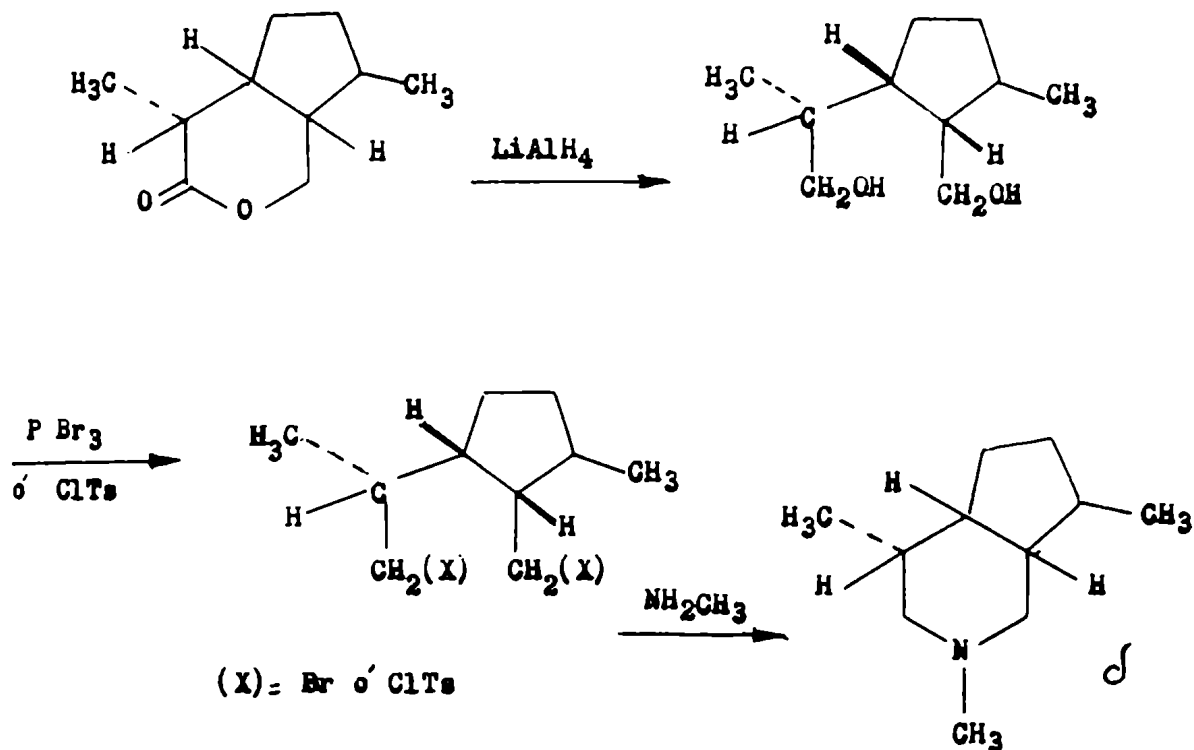
os con metilamina en reacción a temperatura y en un tubo
 rado produjo la conversión en los correspondientes este-
 isómeros de las esquitantinas.



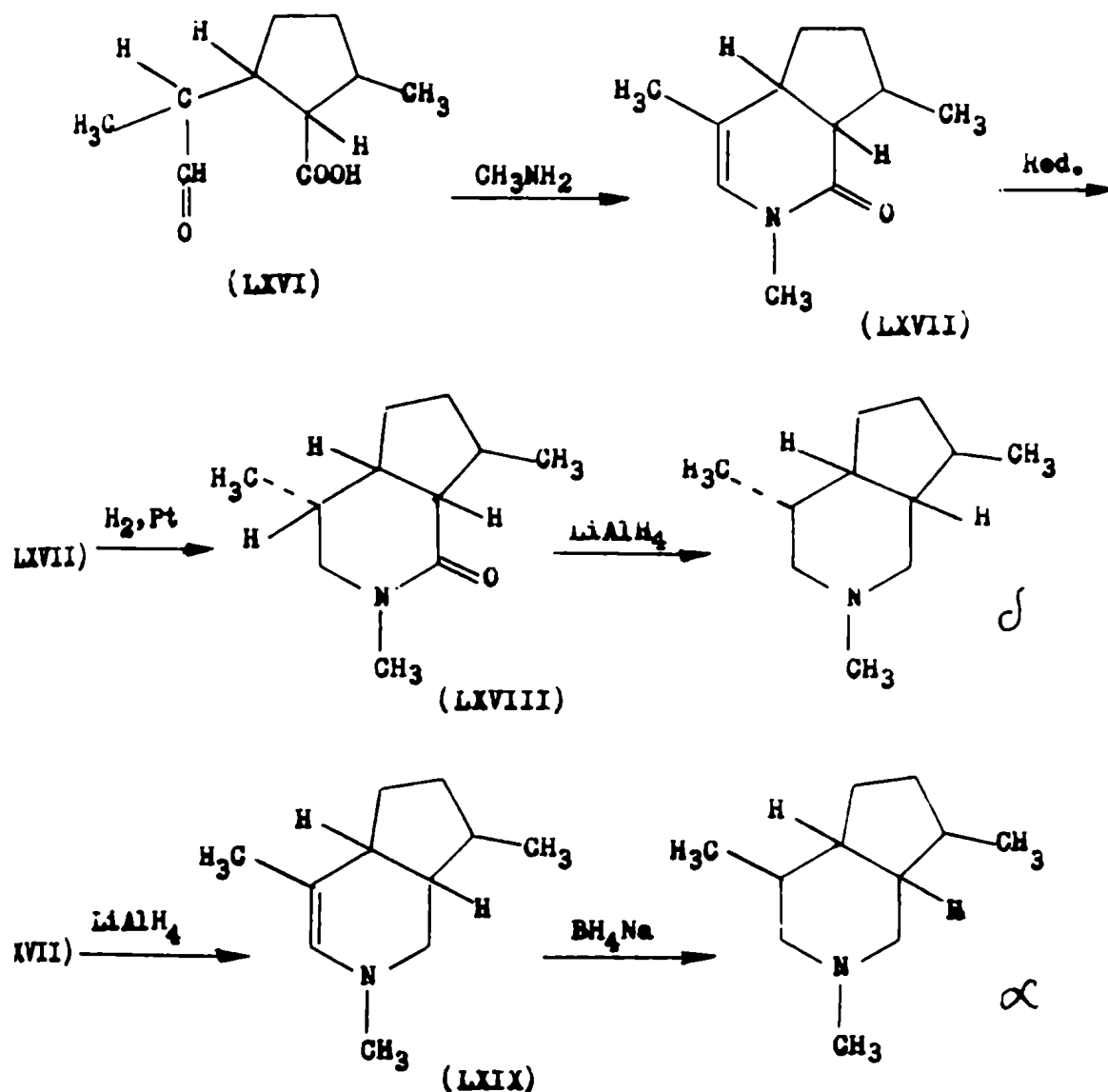
Casinovi, Delle Monache, Marini-Bettolo, Bianchi y
 barino (21) realizaron una síntesis similar de la α y δ -es-
 tantina a partir de los correspondientes ácidos nepetalíni-
 , utilizando como último paso de las series de reacciones,
 ciclación de los correspondientes dibromuros (LXV) con meti-
 lina, en condiciones similares a la síntesis anteriormente
 ripta.



Para obtener la δ -esquitantina, Marini-Bettolo y sus colaboradores (21) partieron de la iridomirmecina (LV), compuesto monoterpénico obtenido por Pavan (101). La serie de reacciones utilizadas son semejantes a las descritas anteriormente.

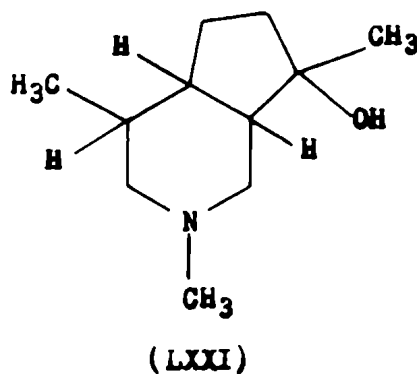
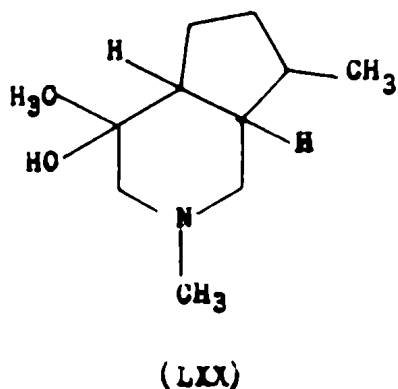


Es interesante destacar que Marini-Bettolo et al. (21) obtuvieron por tratamiento del ácido nepetálico (LXVI) con metilamina la amida (LXVII) que reducida catalíticamente con hidrógeno sobre platino condujo al compuesto (LXVIII) que por reducción con hidruro de aluminio y litio se pasó a la δ -esquitantina, mientras que la reducción inicial de la amida (LXVII) permitió obtener la deshidroesquitantina (LXIX) cuya reducción con borohidruro de sodio dió, en cambio, la α -esquitantina.



En 1963, Marini-Bettolo, Appel et al. (22) han descrito el aislamiento de un alcaloide no volátil de los extractos básicos de Skytanthus acutus. Este alcaloide fué anteriormente mencionado por Appel y Müller, en 1961 (102).

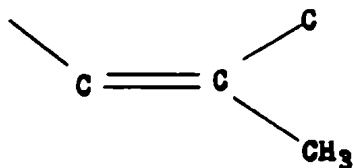
En base a la interpretación del espectro de resonancia magnética nuclear los autores (22) han atribuido las estructuras (LXX) o (LXXI) a este alcaloide, que posee un grupo hidroxilo alcohólico terciario.



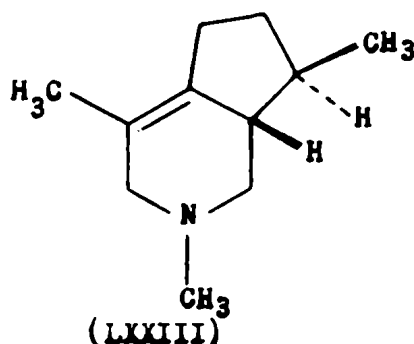
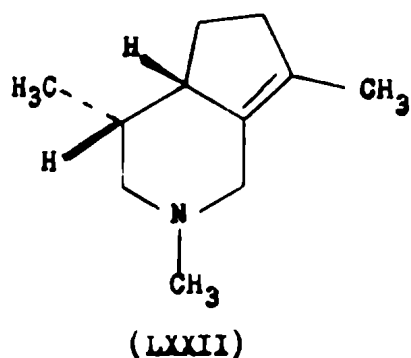
El alcaloide posee un grupo N-metilo ($\delta = 2,3$) y un grupo C-metilo que aparece en el espectro de resonancia magnética nuclear a $\delta = 0,82$ desdoblado por vecindad con un grupo metínico, mientras que el otro grupo metilo no se presenta copulado con ningún otro proton a $\delta = 1,24$.

El tratamiento de esta base con cloruro de tionilo produce la formación de una base no saturada idéntica con otro alcaloide volátil del Skytanthus acutus que fuera obtenido por Casinovi, Delle Monache y Marini-Bettolo (22) por medio de una cromatografía gaseosa preparativa.

Este alcaloide que ha sido llamado deshidroesquitantina presenta en el espectro de resonancia magnética nuclear, un singulete a $\delta = 1,50$ que puede atribuirse a una agrupación,



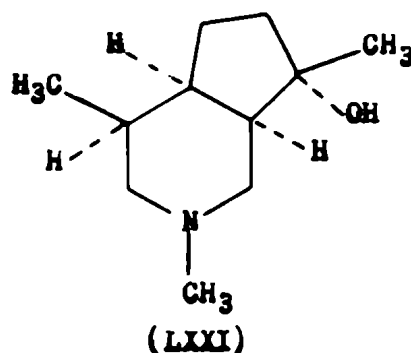
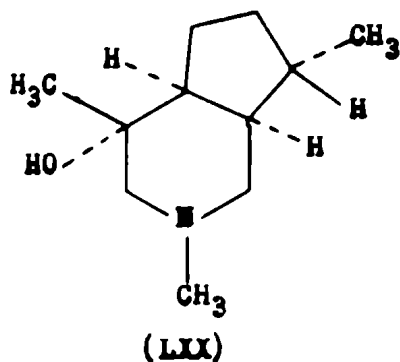
por lo que el alcaloide puede poseer las estructuras (LXXII) o (LXXIII), en concordancia con las estructuras propuestas para la hidroxiesquitantina.



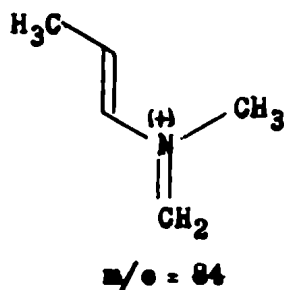
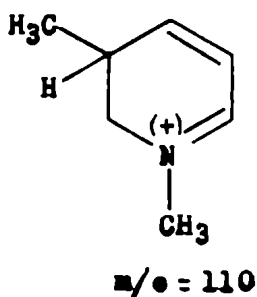
La reducción catalítica de la deshidroesquitantina (LXXIII) produce la δ -esquitantina (22).

En 1967, Adolphsen, Appel, Overton y Warnock (103) obtuvieron juntamente con la hidroxiesquitantina antes mencionada, que denominaron hidroxiesquitantina I- un segundo alcaloide dioxilado en muy pequeña cantidad - hidroxiesquitantina II -, las hojas de Skytanthus acutus. En este trabajo (103) los autores aclaran la estructura de ambos alcaloides por comparación de los datos espectroscópicos de los mismos.

Como en el espectro de r.n.m. de la N-metil piperidina se diferencian los protones ecuatoriales de los axiales, pertenecientes a los átomos de carbono en posición α - respecto del grupo N-metilo, debido a que los primeros aparecen como dobletes con campos más bajos (0,8 -1,0 p.p.m.) que los axiales (10⁴), por analogía se interpretan los espectros de r.n.m. de las dos hidroxiesquitantinas. En la HS-II las señales de los protones ecuatoriales se presentan desdoblados en mayor grado por otros protones vecinos, mientras que en la HS-I solo uno de los picos encuentra desdoblado de esta manera. Por lo tanto el grupo hidroxilo terciario se puede ubicar en el anillo piperidínico en la HS-I y en el anillo pentaatómico de la HS-II de acuerdo a las estructuras (LXX) y (LXXI) respectivamente.



Esto queda corroborado por la aparición de los iones (LXXIV) y (LXXV) en el espectro de masa de HS-II los que pueden



se atribuirse como provenientes de la fórmula (LXXI). En consecuencia corresponde la estructura (LXXIII) a la deshidroesquitantina.

Recientemente, H. Auda et al. (105) han encontrado por un cuidadoso análisis por cromatografía gas-líquida de las fracciones alcaloídicas volátiles de plantas de Skytanthus acutus que la β -esquitantina predomina en todos los tejidos de las plantas, mientras que la raíz contiene hasta un 5% de alcaloides totales. La β -esquitantina juntamente con el isómero α y la deshidroesquitantina constituyen cerca del 90% del contenido total en bases, mientras que el 10% restante está compuesto por δ -esquitantina y por lo menos otros cuatro alcaloides de estructura desconocida.

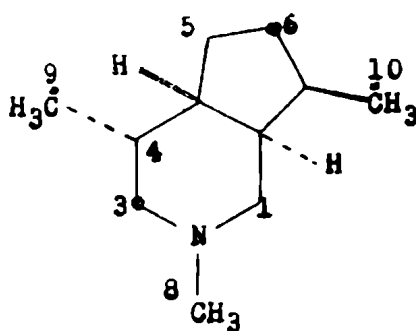
Vale la pena mencionar que no se ha encontrado al isó-
- δ como producto natural mientras que la deshidroesquitantina
se encuentra presente en todas las partes estudiadas de la
raíz. La δ -esquitantina se encuentra localizada preferente-
mente en la raíz.

La biosíntesis de los alcaloides volátiles del Skvтан-
acutus se investigó por administración de ácido DL-melavó-
-2-C¹⁴ a tallos verdes de plantas maduras en floración, pro-
duciéndose una incorporación de radioactividad, que fué negativa
cuando se intentó el mismo experimento con DL-lisina-2-C¹⁴ que,
como se ha observado ya, es un precursor eficiente de los alca-
aloides piperidínicos del tabaco y de la alfalfa (59).

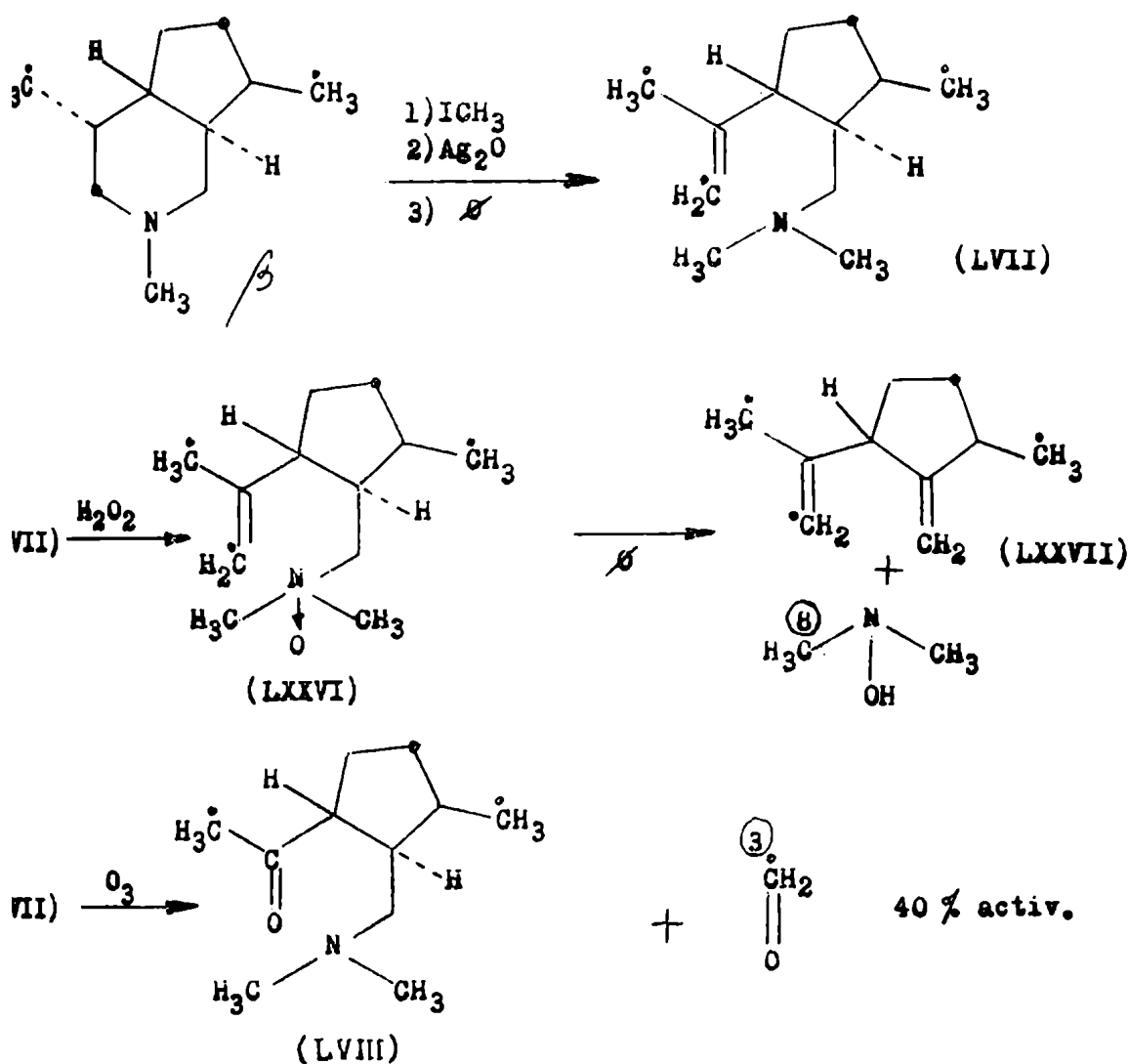
La incorporación de radioactividad del ácido melavó-
junto con la incapacidad de la lisina de actuar como pre-
cursor suministra una evidencia en favor de la teoría de que el
esqueto carbonado de las esquitantinas se origina en un pre-
cursor isoprenoide. Los resultados de H. Auda et al. (105)
afirman, en este sentido, los datos preliminares de Casinovi
rini-Bettolo (106) sobre la incorporación del mismo precur-
sor en la β -esquitantina por medio del uso de raíces estériles
de Skvтанthus acutus M.

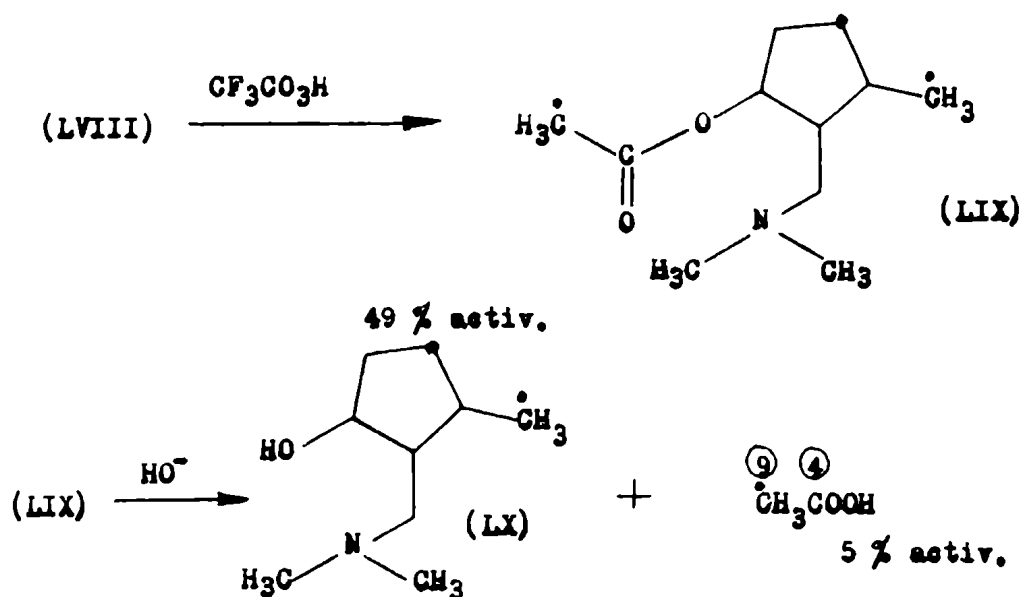
Si las esquitantinas utilizan como precursor al ácido
isovalónico-2-C¹⁴ como resulta de las experiencias de ambos
grupos de autores, la β -esquitantina aislada de los experimen-
tos debe poseer la radioactividad localizada en las posiciones
9 y 10.

DL-mevalónico, 2-C¹⁴



Con el objeto de poder determinar la radioactividad relativa en estas posiciones, H. Auda y colaboradores (105) alizaron las degradaciones químicas que se resumen en el es-
ema siguiente:





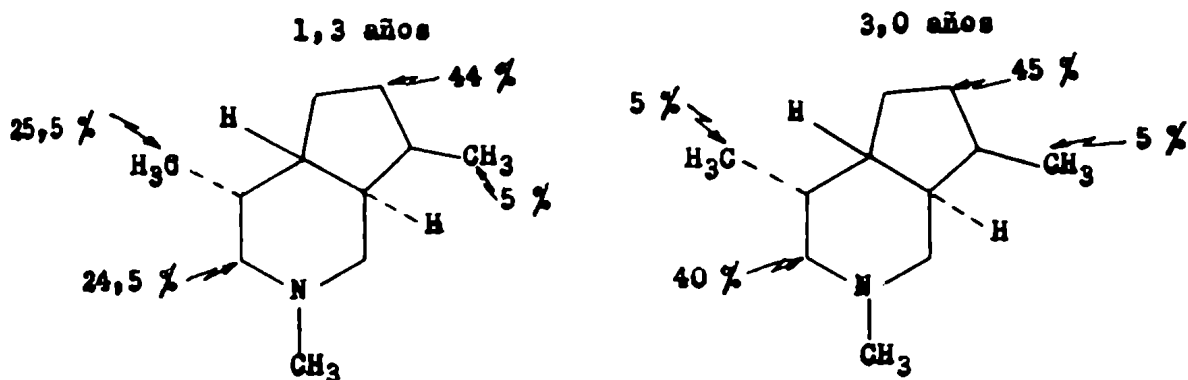
Puede observarse que algunas de estas reacciones de degradación fueron descritas previamente por Djerassi, Kutney y Shamma (23) y que permitieron a Auda et al. (105) obtener la radioactividad correspondiente a los átomos C-3 y C-4, C-9.

La determinación de la radioactividad presente en el átomo de carbono 10 se estableció por una oxidación convencional según el método de Kuhn-Roth, realizada en la β -esquitantina. De esta manera se obtiene un ácido acético cuya radioactividad corresponde a la suma de las de los átomos de carbono 7 y 10 y 4 y 9.

La transformación del metino (LVII) en el óxido de amina (LXXVI) permitió llegar al dieno (LXXVII) por una reacción de eliminación térmica de óxidos de aminas con lo que se comprobó que la actividad incorporada a la β -esquitantina de la L-metil- C^{14} -metionina se localiza totalmente en el N-metilo (C-8) ya que el dieno (LXXVII) no tiene radioactividad.

En las fórmulas que figuran a continuación se presentan los porcentajes relativos con que la radioactividad

suministrada por el precursor se ha distribuido en los diferentes átomos de carbono de la β -esquitantina, en plantas de distinta edad.



Los autores sugieren que los resultados diferentes pueden deberse a distintos tipos de control enzimático, tales como inhibidores distintos o niveles diferentes de acción enzimática, en las plantas de diferente antigüedad. No se conocen con certeza los pasos biosintéticos que llevan a los diferentes isómeros de la β -esquitantina y aunque no se sabe el significado de los resultados diferentes obtenidos con plantas de distinta edad, puede haber alguna relación entre la edad y los modos de formación de los diferentes estereoisómeros en esta planta (105).

CAPITULO III

ALCALOIDES PIPERIDINICOS RELACIONADOS CON LCS ENCONTRADOS EN LA CASSIA CARNAVAL SPEG.

INTRODUCCION.

Se detallan inicialmente en este capítulo los trabajos sobre la carpaína que tiene dos núcleos piperidínicos idénticos entre sí y a su vez con los de la cassina y de la carnalina.

Por medio del estudio de reacciones químicas, tanto de degradación como de síntesis aplicados por distintos grupos de investigadores desde el aislamiento de la carpaína en 1890 hasta fecha reciente, se logró determinar la estructura del compuesto formado en la hidrólisis de la carpaína y que corresponde a la mitad simétrica de su molécula.

Recien en los últimos años la aplicación de métodos físicos permitieron obtener la configuración absoluta y la fórmula molecular del alcaloide. Todo ello contribuyó a que estuvieran sentadas las bases para la determinación de la estructura de la cassina que se describe a continuación.

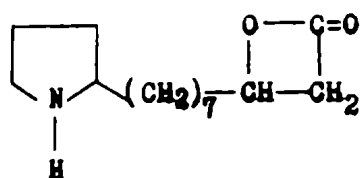
Los alcaloides aislados de la Prosopis africana presentados al final del capítulo poseen un núcleo piperidínico igual al de la Base III que se obtuvo en este trabajo por lo que se le denominó prosopinona.

ESTRUCTURA DE LA CARPAÍNA

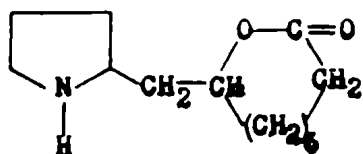
Entre los alcaloides piperidínicos que por su estrecha relación con la cassina y los otros alcaloides aislados de la C. carnavál, merecen que se mencionen en detalle, están la carpaína y la pseudocarpaína, cuyas estructuras fueron dilucidadas por una combinación de métodos químicos de degradación y síntesis y métodos físicos, especialmente por espectroscopía de masa (107).

La carpaína fué aislada por primera vez por Greshoff en 1890 (108) de extractos de hojas de Carica papaya L., una planta que se utiliza en la actualidad en la preparación de productos medicinales. El alcaloide fué investigado por Merk (109) y por van Rijn (110), quien preparó diversas sales del mismo y determinó que se comportaba como una base secundaria de fórmula $C_{14}H_{25}O_2N$. Varios años más tarde, en 1910, Barger (111) estableció que la carpaína poseía una función lactona y que no era una lactama. Por hidrólisis ácida y alcalina de la carpaína obtuvo el ácido carpámico que presenta un grupo carboxilo y un hidroxilo alcohólico libres. Barger estableció que su composición correspondía a la fórmula $C_{14}H_{27}O_3N$. Como no se podía volver a formar carpaína por deshidratación y ciclación del ácido carpámico, Barger, Girardet y Robinson (112) supusieron, en 1933, que no se trataba de una α o γ lactona sino de una β lactona o de una superior con más de siete átomos en el ciclo oxigenado. Encontraron asimismo, que la carpaína se deshidrogenaba con selenio al vacío para dar una base nombrada

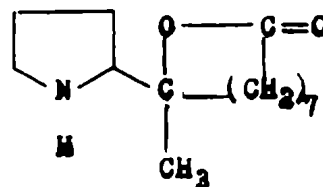
aspirina con cuatro átomos menos de hidrógeno que podía regenerar por reducción una base similar a la carpaína. La carpaína daba reacciones de pirroles. Robinson y colaboradores encontraron, también que en la oxidación de la carpaína con ácido nítrico y con permanganato de potasio en condiciones ligeramente alcalinas se producen respectivamente, los ácidos zelaico y subérico. Con estos resultados, Barger y Robinson (112) propusieron como fórmulas provisionarias para la carpaína, las estructuras (I) o (II).



(I)



(II)

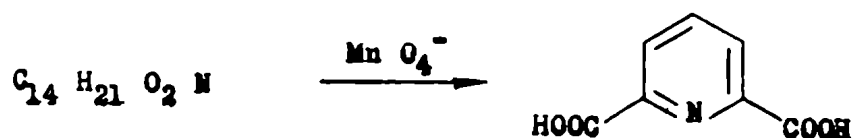


(III)

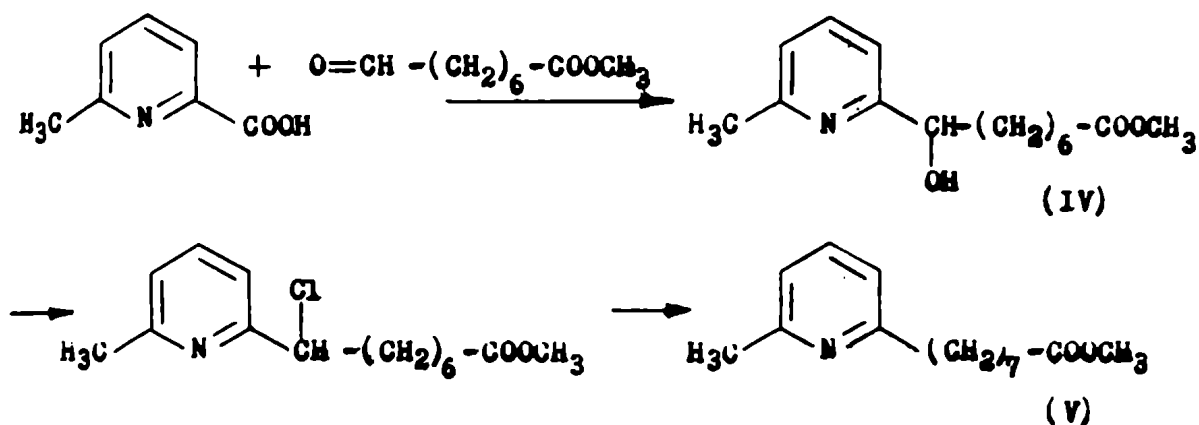
En 1937, Barger, Robinson y colaboradores (113) se pronunciaron en favor de una nueva estructura (III) al encontrar que la carpaína y algunos de sus productos de degradación tenían un grupo C-metilo de acuerdo con determinaciones por el método de Khun y Roth. Consideraron, además, que una función cetona con diez átomos en el ciclo oxigenado explicaba mejor la imposibilidad de regenerar carpaína a partir del ácido carpámico, por la dificultad de lograr una ciclación de este tipo. La formulación del ácido carpámico como alcohol terciario en lugar de secundario parecía explicar mejor otras propiedades del mismo, eliminándose de esta manera otras estructuras posibles para la carpaína.

En 1951, se reiniciaron investigaciones sobre este alcaloide piperidínico, debiendo mencionarse especialmente los trabajos de Rapoport en los Estados Unidos (114) y de Govindachari y Narasimhan en la India (115). La existencia de una cadena carbonada no ramificada de por lo menos 14 átomos de carbono en contradicción aparente con las primitivas fórmulas propuestas por Barger y Robinson e incompatibles con la formulación (III), fué demostrada por Rapoport y Baldrige (114) realizando una degradación de Hofmann que condujo luego de una serie prolongada de repeticiones del proceso con hidrogenación en cada una de las etapas a un producto libre de nitrógeno que por hidrólisis alcalina liberó ácido mirístico (C14). Combinando este resultado con el aislamiento de ácido subérico por oxidación de la carpaína (112), queda establecido que en esta cadena de 14 átomos de carbono, existen por lo menos siete grupos metilenos sucesivos sin sustituir.

Rapoport y Baldrige demostraron, asimismo, que el núcleo nitrogenado de la carpaína no es pirrolidínico sino piperidínico. Por deshidrogenación de la carpaína con paladio-carbón al 5% en p-cimeno hirviente se obtiene con pérdida de dos moles de hidrógeno el ácido desoxicarpirínico, de fórmula $C_{14}H_{21}O_2N$, que por oxidación con permanganato de potasio produce ácido 2,6-piridíndicarboxílico (116).

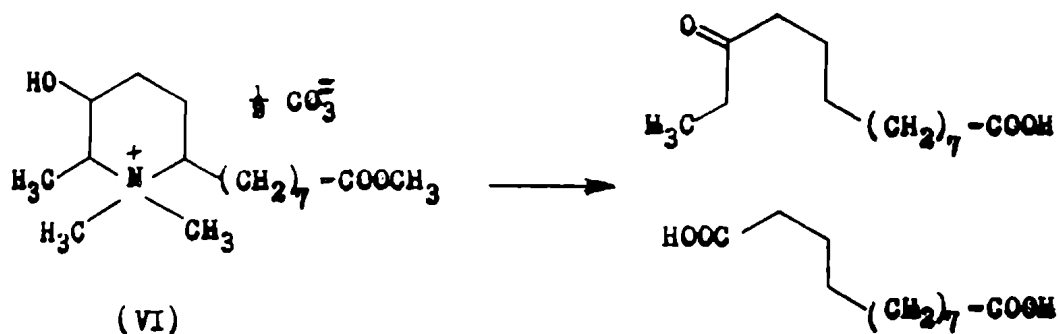


La condensación del ácido 6-metilpicolínico con el hemialdehído hemiéster del ácido subérico (7-formilheptanoato de metilo) según el procedimiento de Hammick (117) condujo al compuesto (IV) cuya función alcohol secundaria se redujo por halogenación con cloruro de tionilo y eliminación del halógeno, que queda reemplazado por un átomo de hidrógeno al reducir con zinc en ácido acético. Se obtuvo de esta manera el éster metílico del ácido 8-(6'-metil-piridín -2') octanoico (V) que resultó ser idéntico al éster metílico del ácido desoxicarpínico (118).

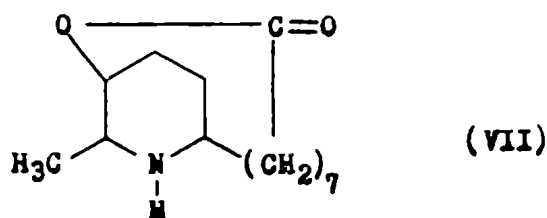


Con estos datos quedaba establecida en gran parte la estructura del ácido carpámico excepto que faltaba determinar la posición del grupo hidroxilo alcohólico del mismo que, de acuerdo con lo indicado por Barger y Robinson (112), intervenía en la formación del ciclo oxigenado de la lactona en la molécula de carpaina. Con este fin se sometió al carbonato cuaternario del éster metílico del ácido N-metilcarpámico (VI) a dos degradaciones sucesivas de Hofmann con posterior reducción, obteniéndose finalmente una mezcla de compuestos saturados no nitrogenados que se oxidaron con ácido crómico en ácido acético

glacial. Se identificaron como productos de esta serie de reacciones a los ácidos 12-cetotetradecanoico y dodecandioico (119).

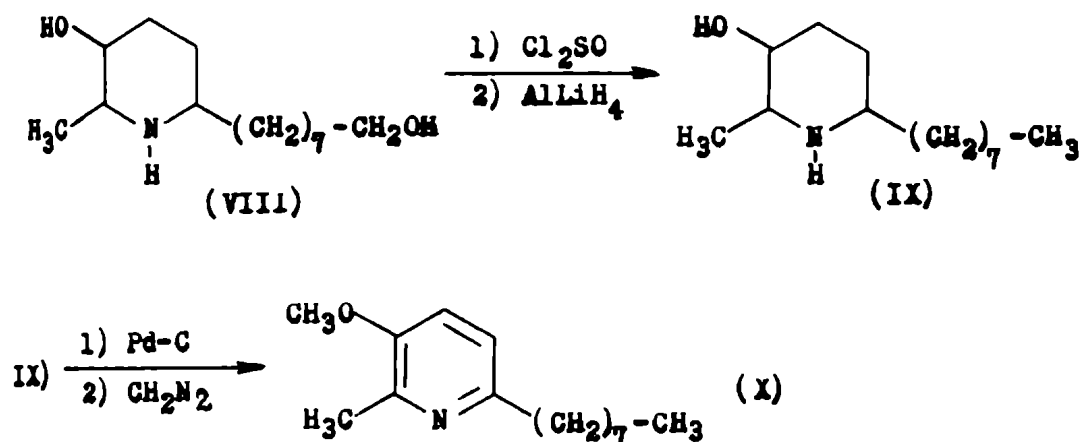


El aislamiento de un ácido carboxílico de catorce átomos de carbono con un grupo cetónico en la posición 12, es decir, separado por un átomo de carbono del grupo metilo terminal y del ácido dodecandioico establece que el grupo hidroxilo deber estar situado en la posición vecina al grupo metilo en el núcleo piperidínico por lo que la carpaína se puede representar por la fórmula (VII).

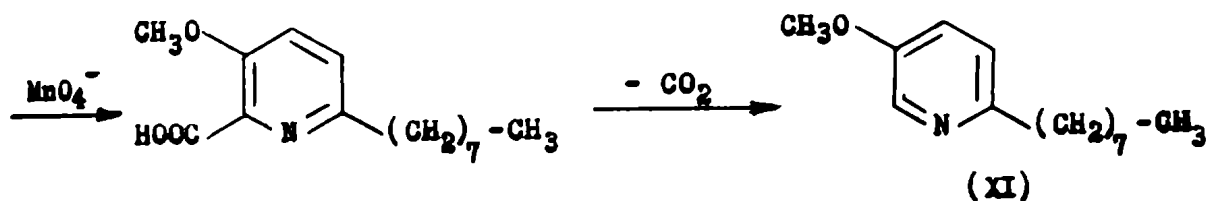


Cuando se trató carpaína con hidruro de aluminio y litio se formó un compuesto con un grupo alcohólico primario al reducirse la función lactónica, al que se denominó carpanadiol (115). El mismo se transformó en carpanol (IX) (120) por eliminación del grupo alcohólico primario. Esta eliminación se llevó a cabo por tratamiento con cloruro de tionilo y reducción del compuesto halogenado nuevamente con hidruro de aluminio y litio.

carpamol (IX) fué deshidrogenado con paladio-carbón transformándose posteriormente el grupo hidroxilo fenólico del compuesto ridínico obtenido, en su éter metílico por reacción con diazotano.



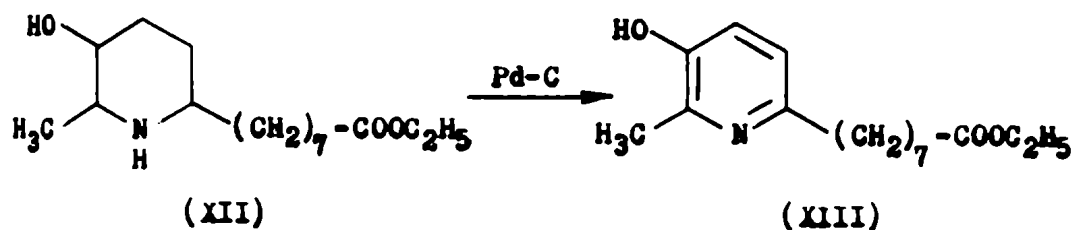
De esta manera se obtuvo el éter metílico del hexahidrocarpamol (X) que por oxidación con permanganato de potasio y posterior descarboxilación del ácido α -piridincarboxílico obtenido, condujo a la formación de 5-metoxi-2-octilpiridina (XI) que se aisló como picrato y se comparó con el mismo compuesto obtenido por síntesis (120).



Esta serie de reacciones confirmaba la ubicación del grupo hidroxilo secundario en la molécula del ácido carpámico y consiguiente en la carpaina (VII).

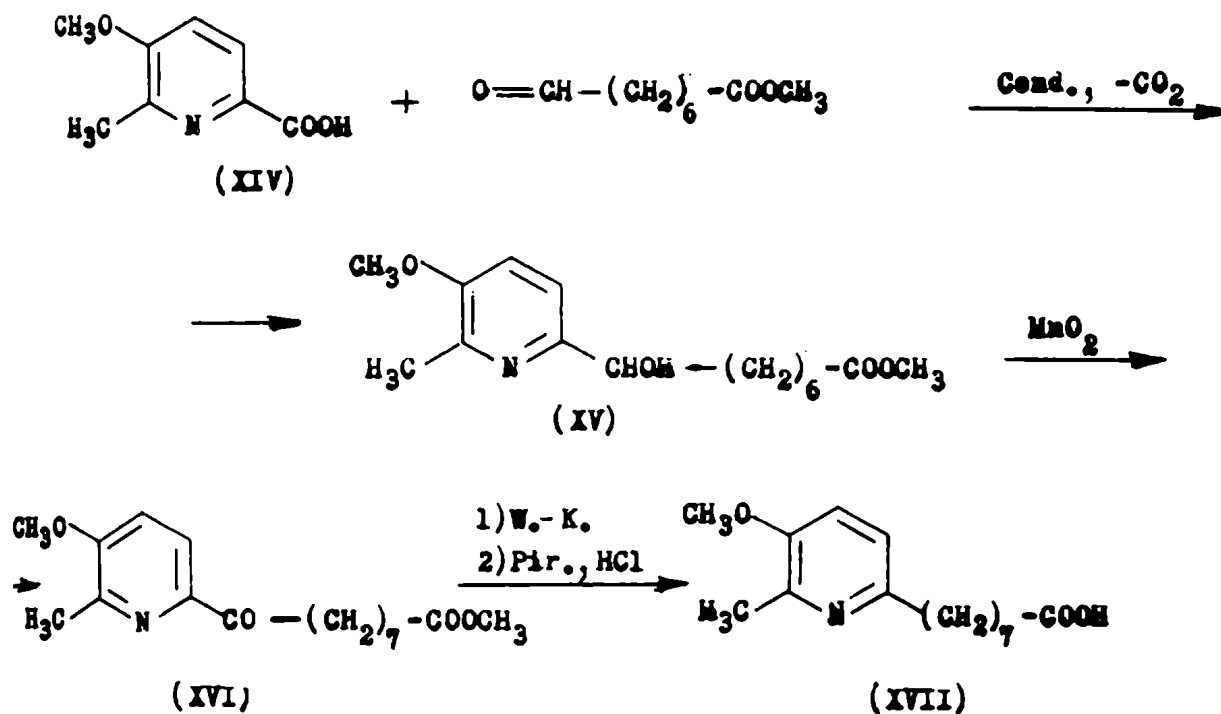
La confirmación de la estructura de la carpaina no se estableció por síntesis del alcaloide mismo, sino por la síntesis

del éster etílico del ácido carpirínico (XIII), un producto que se obtuvo por deshidrogenación del carpamato de etilo (XII) con pérdida de 3 moles de hidrógeno, en iguales condiciones que las descriptas para la deshidrogenación de la carpaina (115).

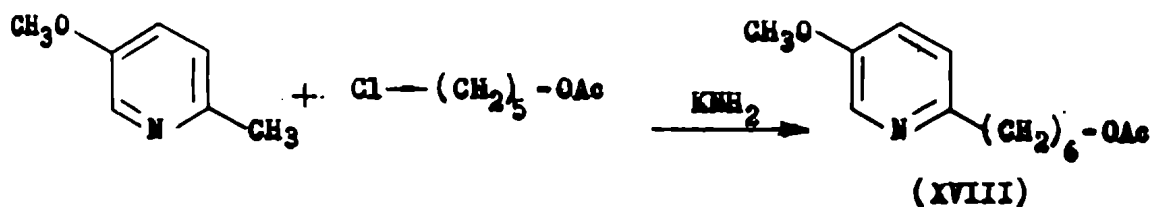


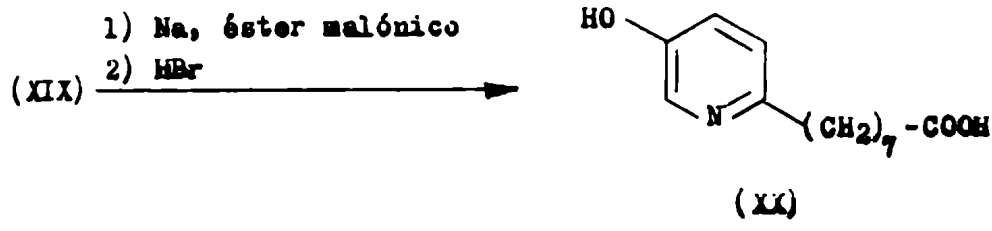
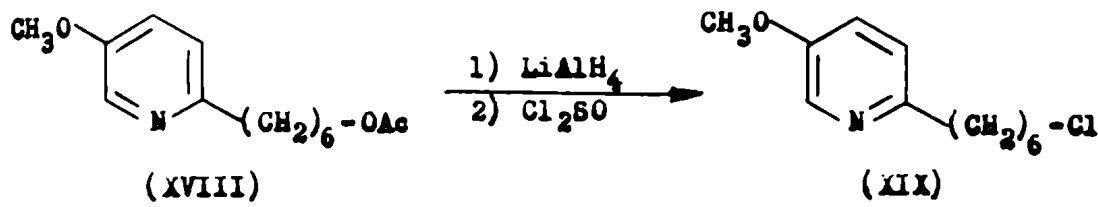
La estructura del ácido carpirínico fué establecida por tres procedimientos sintéticos distintos.

En uno de los procedimientos se utilizó nuevamente como reacción decisiva, el método de Hammick de descarboxilación de ácido α -picolínico en presencia de un compuesto carbonílico (117). Se utilizó el hemialdehído hemiéster de ácido úberico (7-formilheptanoato de metilo) que se condensó con el ácido 5-metoxi-6-metil-2-picolínico (XIV) para dar con descarboxilación simultánea el compuesto alcohólico secundario (XV). Los autores no pudieron eliminar el grupo hidroxilo por una serie de reacciones similares a las descriptas para la síntesis del ácido desoxicarpirínico (V). En cambio, el compuesto (XV) pudo transformarse en el compuesto cetónico (XVI) por oxidación con dióxido de manganeso. Una posterior reducción de Wolffishner y ruptura de la función metoxilo con clorhidrato de iridina dió el ácido carpirínico (XVII) (118).

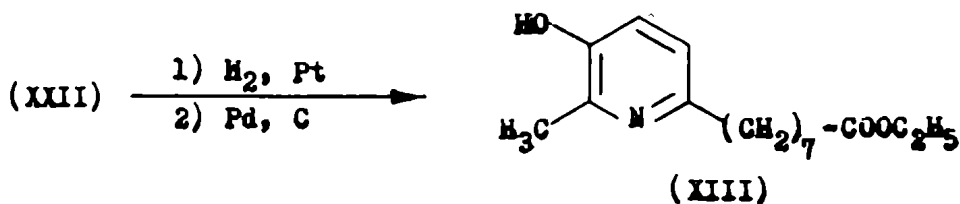
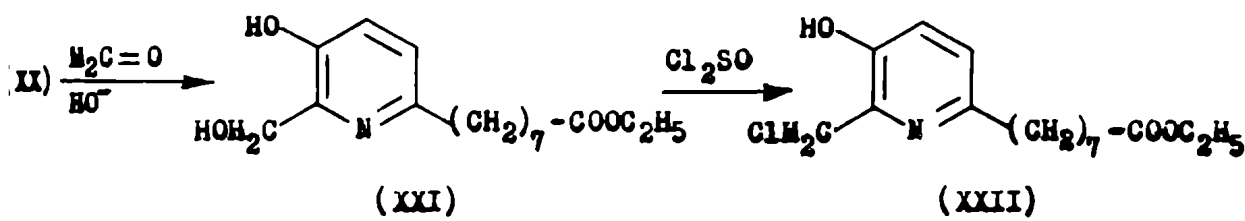


Govindachari, Narasimhan y Rajadurai (121) partieron e la 5-metoxipicolina que condensaron con el acetato del -cloropentanol y amida-potásica en amoníaco líquido obteniendo l acetato de 6-(5'-metoxi-2'-piridil)-n-hexanol (XVIII) que educido con hidruro de aluminio y litio y tratado con cloruro e tionilo dió el correspondiente compuesto halogenado (XIX). ste compuesto fué sometido a una síntesis malónica por reacción on la sal sódica del éster malónico y tratamiento posterior on ácido bromhídrico. De esta manera obtuvieron al ácido -hidroxipiridinoctanoico (XX)



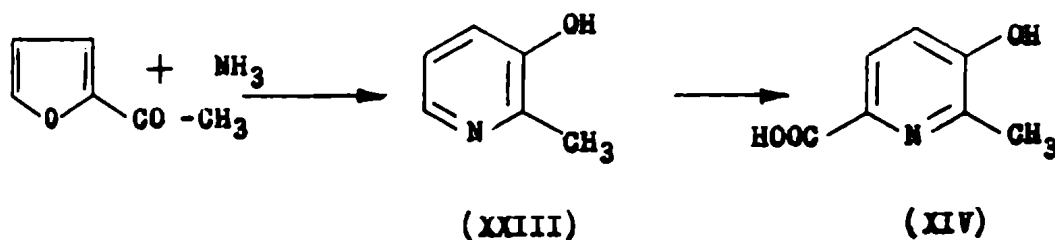


A continuaci3n, los autores introdujeron un grupo alcoh3lico primario en la posici3n α libre del n3cleo piridinico por reacci3n con formaldehido en medio b3sico y luego de esterificar trataron el compuesto alcoh3lico (XXI) sucesivamente con cloruro de tionilo, reducci3n catalitica y deshidrogenaci3n con paladio-carb3n. De esta manera consiguieron transformar el grupo alcoh3lico primario en metilo, obteniendo el carpirinato de etilo (XIII) id3ntico con el obtenido por deshidrogenaci3n del carpamato de etilo (115).

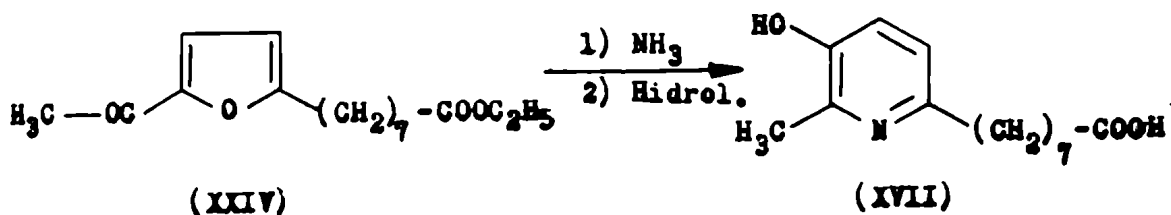


De acuerdo con los autores, la reducción catalítica del compuesto halogenado (XXII) condujo a una mezcla de estereoisómeros que deben corresponder a la estructura del éster del ácido carpámico (XII), aunque solamente describen a la mezcla obtenida como un aceite, (121).

Para obtener el ácido 5-metoxi-6-metil-2-picolínico (IV), utilizado en la síntesis del ácido carpirínico (XVII), Popport y Volchek (118) trataron el 2-acetilfurano con amoníaco. En esas condiciones se produce una reacción de ampliación del núcleo con formación de la 2-metil-3-hidroxipiridina (XXIII) que por una reacción de Kolbe-Schmidt se transforma en el compuesto (XIV).

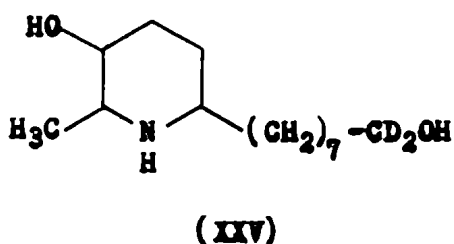
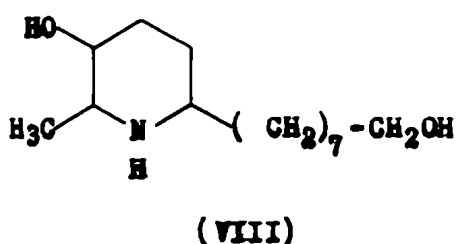


Gruber (122) utilizó esta reacción de ampliación del núcleo pentaatómico del furano para sintetizar el ácido carpirínico (XVII). Para ello trató el éster etílico del ácido -(5'-acetil-furano-2')-octanoico (XXIV) con amoníaco a 165° obteniendo directamente el éster etílico del ácido carpirínico (XIII) que por saponificación se transformó en el ácido carpirínico (XVII).

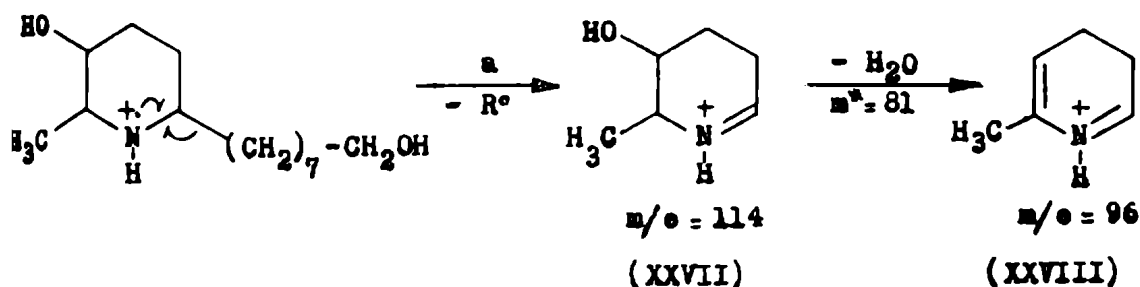


En 1956, Narasimhan (123) logró ciclar el ácido car-
pámico obteniendo carpaína. Trató el clorhidrato de la base
con cloruro de tionilo y reflujo subsiguientemente el producto
crudo de la reacción en un gran volumen de cloruro de etileno
absoluto. Las dificultades experimentadas por investigadores
anteriores (ver pág. 55) al intentar la ciclación del ácido car-
pámico para obtener su lactona (o sea la carpaína) y las condi-
ciones del experimento de Narasimhan sirvieron para justificar
la estructura (VII) propuesta inicialmente por Rapoport y cola-
boradores (119).

Recientemente, Spiteller-Friedman y Spiteller estu-
diaron el espectro de masa de la carpaína y encontraron que el
ión molecular de m/e 478 corresponde al dímero de la estructura
propuesta anteriormente. Para una mejor interpretación del
espectro de masa de la carpaína, los autores (107) estudiaron
primeramente el espectro de masa del carpamadiol (VIII) y del
dideuterocarpamadiol (XXV) que se obtiene cuando se reduce la
carpaína con tetradeuteruro de aluminio y litio (107, 115).

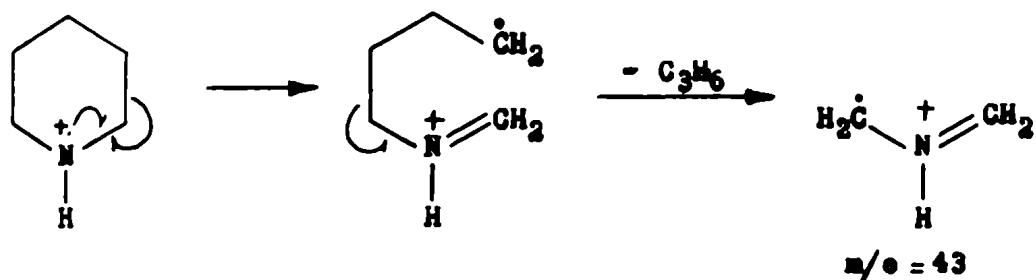


En ambos casos se obtiene un ion molecular M+ cuya masa, 243 y 245 respectivamente, corresponde a las estructuras (VIII) y (XXV). En las fórmulas que se escriben a continuación se indican los diversos tipos de fragmentación que se producen en ambas sustancias al ocurrir el bombardeo por electrones durante la determinación del espectro de masa. En ambos casos el proceso más fácil consiste en la eliminación de la cadena carbonada más larga con formación del ion base (XXVII) de m/e 114. Este proceso está indicado por la ruptura según a. El pico base puede perder agua para dar lugar al ion (XXVIII) de m/e 96. Estudiando el espectro de masa de la carnavalina, hemos encontrado que este proceso de degradación del ion de m/e 114 ocurre realmente puesto que aparece un ion metaestable de m/e 81 ($m^* = 96^2/114 = 81$).

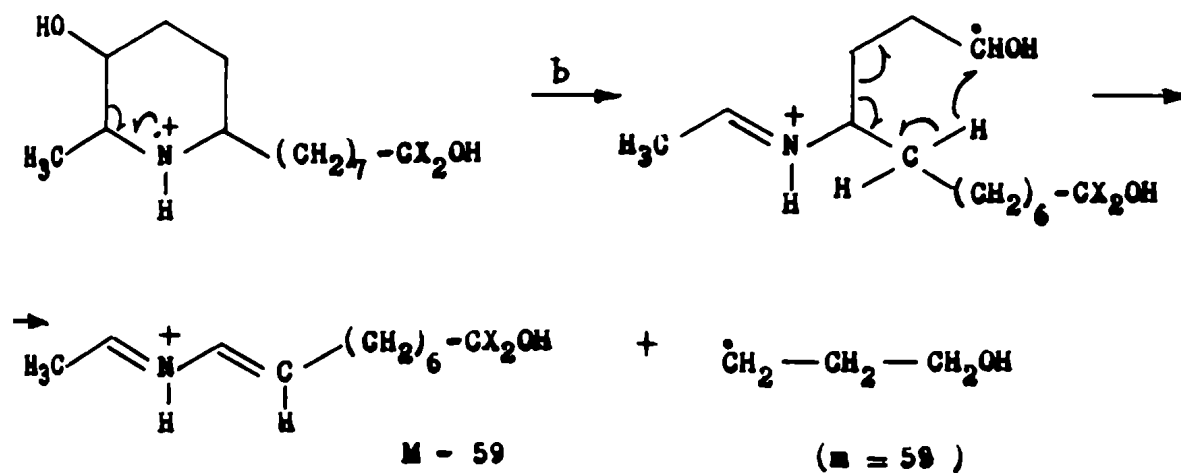


Se observa también en ambos compuestos la formación abundante de un ion de Masa M-59. El fragmento de masa 59 que se pierde en este proceso no puede estar constituido exclusivamente por carbono e hidrógeno. Existen tres fragmentos probables que deben considerarse y son: C₃H₇O, C₂H₃O₂ y C₃H₉N. Como en ambos casos, tanto para el carpamadiol y dideutero carpamadiol, se produce la pérdida del mismo fragmento de masa 59, los autores consideraron que se eliminaba el grupo C₃H₇O por un proceso similar al que conduce en la piperidina a la apari-

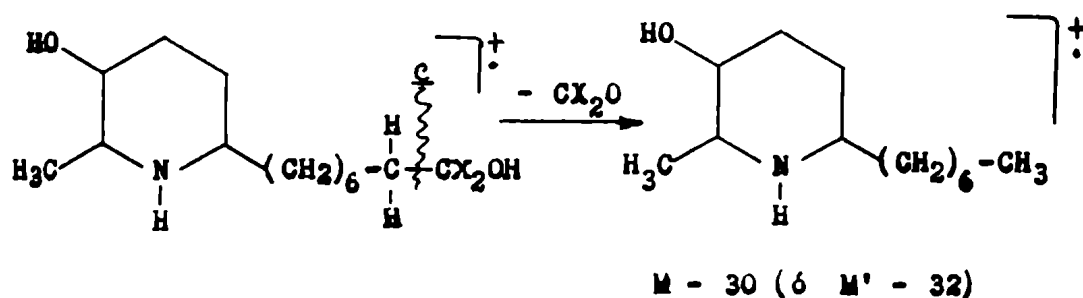
ión de un ion de m/e 43.



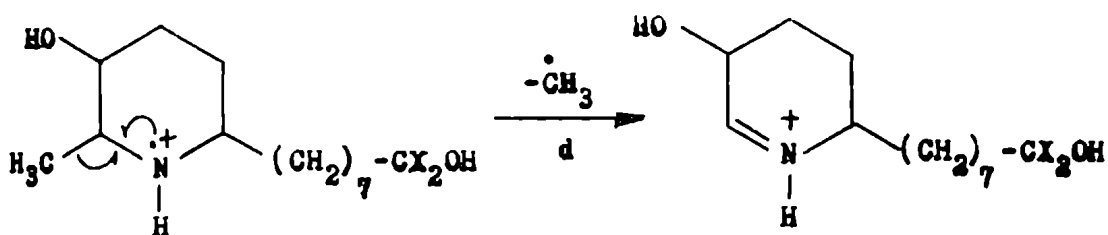
La formación del fragmento se puede explicar por medio de la ruptura b con apertura del ciclo piperidínico en la posición 2-3 y posterior eliminación del grupo atómico mencionado. Este proceso de fragmentación es similar al descrito para la formación del ión de masa 114 puesto que consiste en la ruptura de una unión en posición β respecto del nitrógeno básico.



En cambio, los procesos de ruptura c y d son secundarios y conducen a iones que se presentan con mucho menor abundancia en los espectros de masa del carpamadiol y del dideuterocarpamadiol. En el primer caso se produce la pérdida del grupo ^{16}O (o de CD_2O) con formación del ión de masa M-30 (o M'-32).

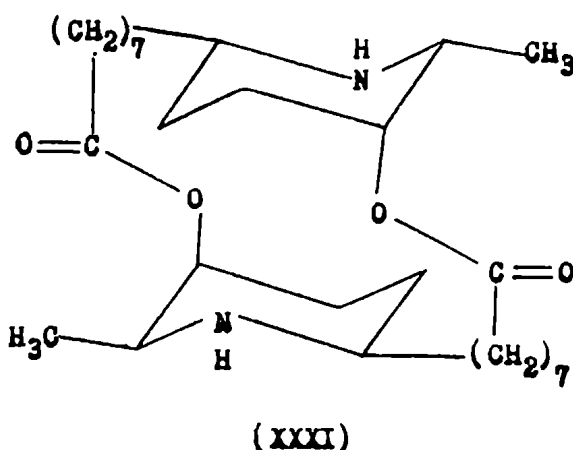


Análogamente, en el caso de la ruptura según d se produce la eliminación del grupo metilo α con formación de un ión e masa M-15 (o M'-15) de muy baja intensidad. Este proceso a sido observado en el caso de la 2,6-dimetilpiperidina, en cuyo caso se encuentra que un ión fragmentario formado en este tipo de degradación es el más abundante en desmedro de la ruptura del anillo piperidínico por procesos similares a los descritos para la piperidina y el carpamadiol (124) y que ocurre también en otros alcaloides piperidínicos (125).



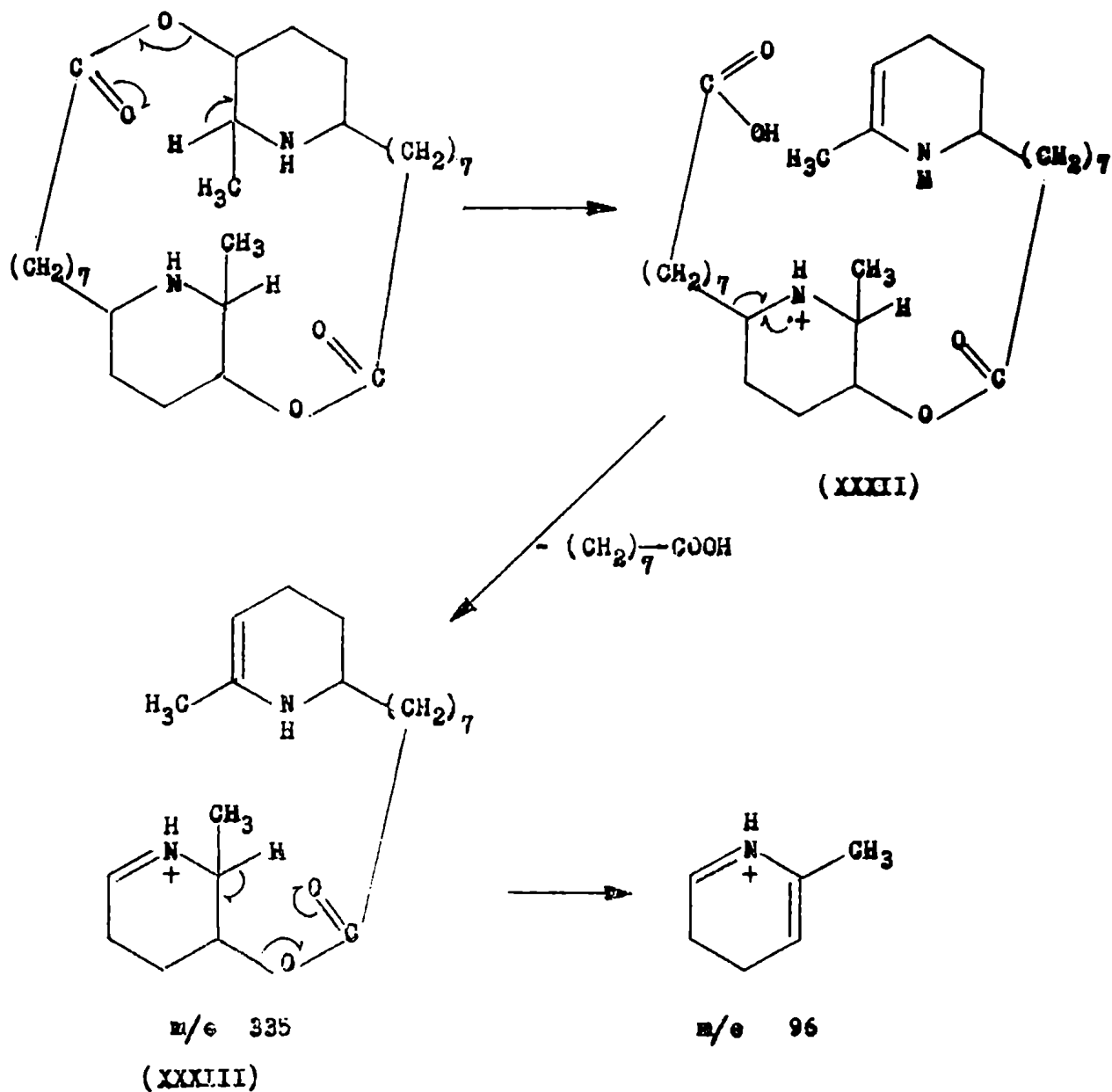
Las fragmentaciones indicadas justifican las relaciones estructurales que existen entre el carpamadiol (VIII) y su ideutero derivado (XXV). Asimismo el hecho de que en la reducción de la carpaína con hidruro de aluminio y litio (o deuteruro de aluminio y litio) se forman exclusivamente en cada caso los compuestos (VIII) y (XXV) sirve para demostrar que la estructura de la carpaína debe corresponder a un dímero de la propuesta originalmente por Rapoport (119), en la que en lugar

de haber una función lactona deben estar presentes dos funciones ésteres que vinculan a dos partes estructuralmente idénticas. De esta manera, la carpaína (XXXI) debe poseer un anillo heterocíclico de veintiseis miembros lo que explica también las dificultades en obtenerla por ciclación o dimerización del ácido carpámico (112, 119).

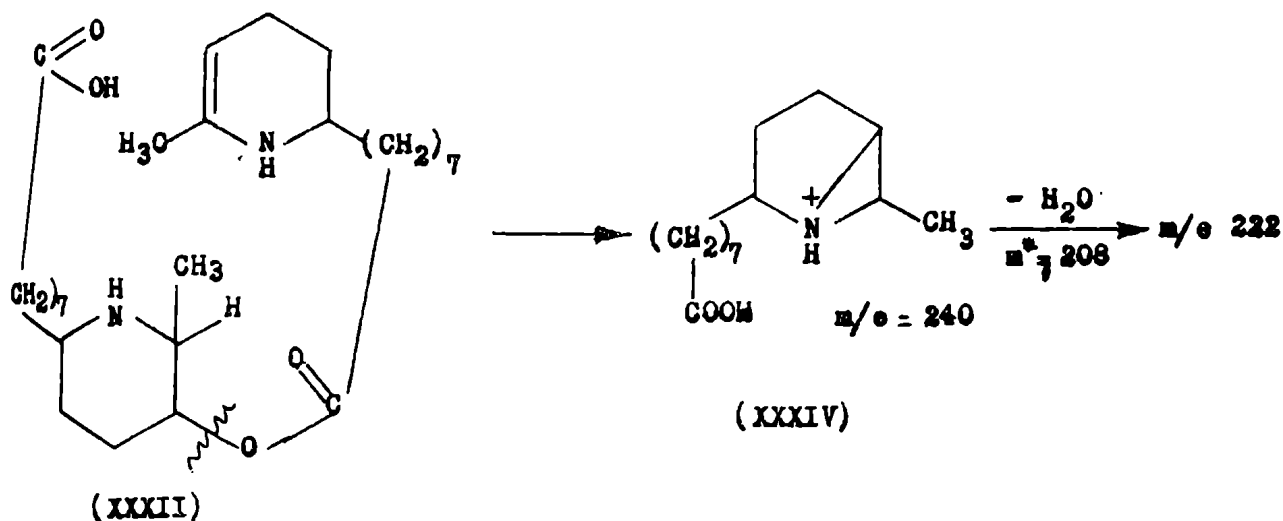


El espectro de masa de la carpaína (107) confirma esta estructura pues con excepción de la formación de iones fragmentarios debidos a la pérdida de átomos de hidrógeno y a la eliminación de los grupos metilos situados en las posiciones α respecto de los dos átomos de nitrógeno, se pueden formar solamente iones positivos por eliminación de las cadenas laterales o ruptura de las uniones ésteres.

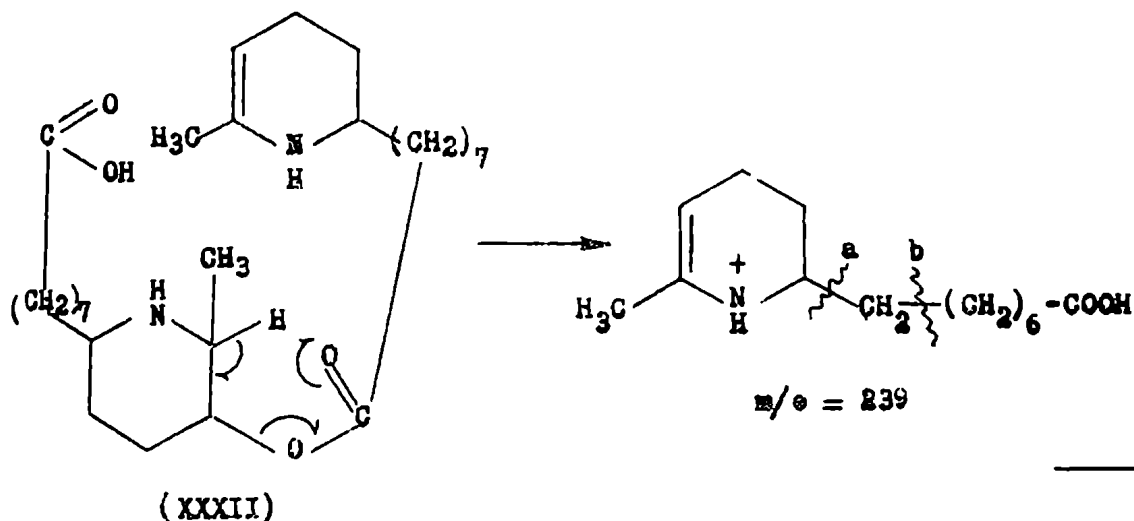
La apertura del ciclo de 26 átomos de la carpaína puede producirse por una trasposición de McLafferty (126) que conduce por intermedio de la participación principal de un átomo de hidrógeno α , al catión (XXXIII) de masa 335 con eliminación del grupo $(\text{CH}_2)_7\text{-CO}_2\text{H}$. Una nueva trasposición de McLafferty lleva al ión de masa 96 que se ha mencionado anteriormente al describir el espectro del carpamadiol.

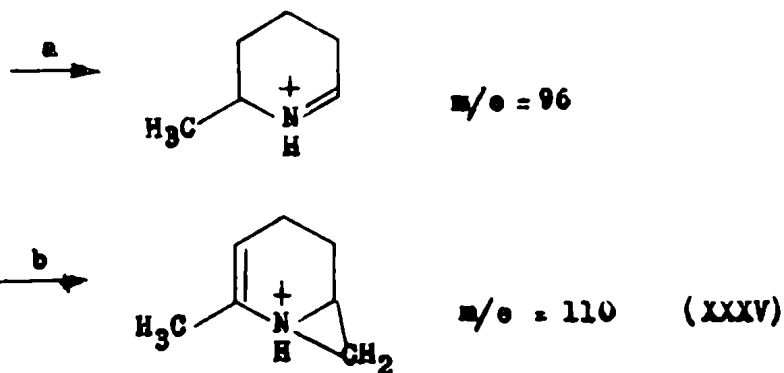


El ión XXXII puede degradarse también por ruptura de la unión entre el átomo de carbono β y el átomo de oxígeno etéreo formándose el ión fragmentario de m/e 240 al que debe corresponderle la estructura XXXIV. Este ión es el pico base del espectro que origina por pérdida de una molécula de agua el ión de masa 222. Este último proceso queda demostrado por la aparición de un pico metaestable de m/e 208.



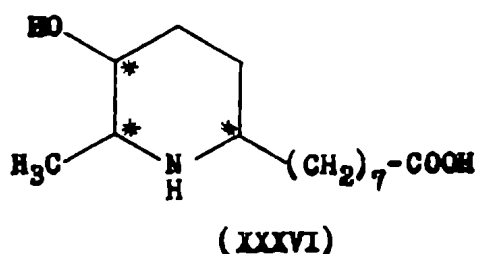
Una segunda trasposición de McLafferty del producto inicial de ruptura del ión molecular produce un ión de masa 239 (que es el segundo en intensidad en el espectro). Este ión puede fragmentarse de dos modos, formándose de esta manera nuevamente el ión de masa 96 y un ión de m/e 110 para el que los autores han propuesto la fórmula XXV que es en cierta manera similar a un ión positivo de masa 110 que se presenta en el espectro de la δ -coniceína (125).



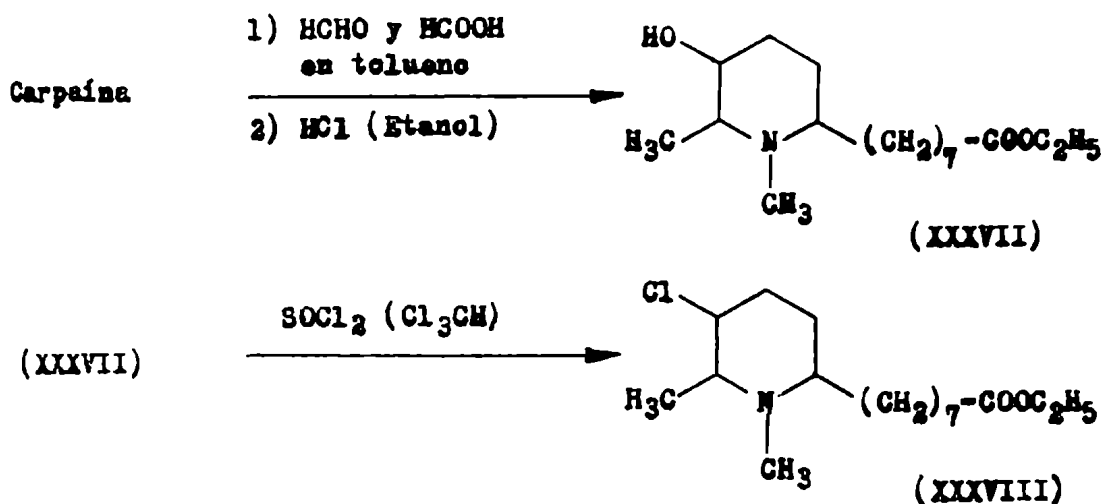


CONFIGURACION DE LA CARPAINA

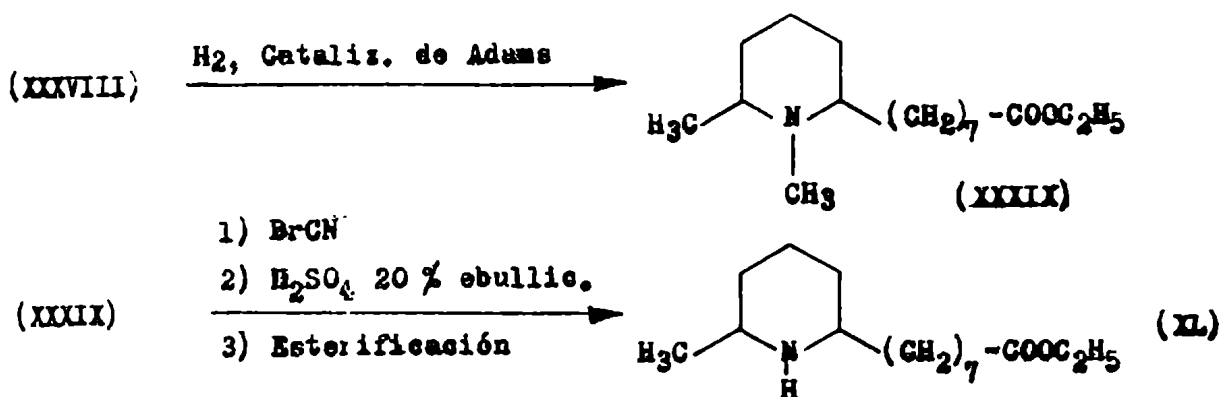
El ácido carpámico (XXXVI), producto de hidrólisis de la carpaina, posee tres átomos asimétricos de carbono.



Para determinar la configuración absoluta de los carbonos asimétricos 2 y 6 del núcleo piperidínico, Govindachari y Narasimhan (127) convirtieron a la carpaina en ácido desoxicarpámico (XL) obtenido como su éster etílico por una serie de reacciones que no alteraron la configuración de estos dos centros asimétricos al mismo tiempo que se produjo la eliminación de la asimetría del átomo de carbono asimétrico β que se encuentra sustituido por un grupo alcohólico. Aunque el carpamato de etilo no reacciona con el cloruro de tionilo después de un prolongado tratamiento, los autores encontraron que el éster etílico del ácido N-metilcarpámico (XXXVII) se convierte por acción del mismo en clorodesoxi-N-metilcarpamato de etilo (XXXVIII).

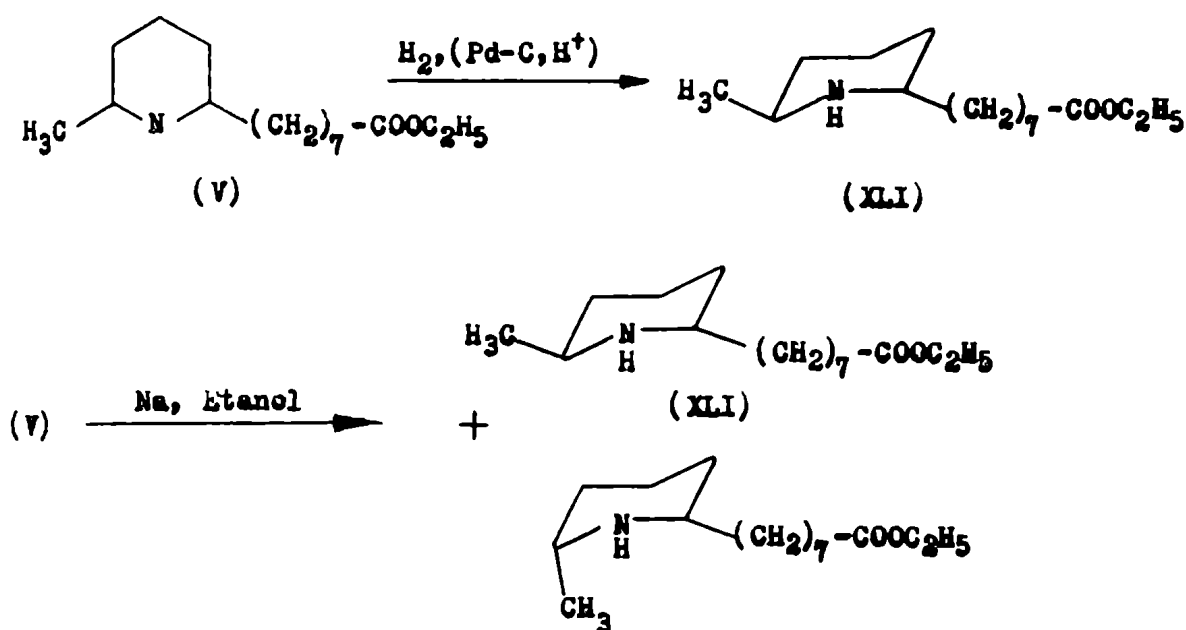


A su vez, el compuesto (XXXVII) se obtiene por N-metilación por el método de Eschweiler-Clark en tolueno. La sustancia (XXXVIII) se reduce catalíticamente con eliminación del halógeno y se obtiene desoxi-N-metilcarpamato de etilo (XXXIX), que puede desmetilarse por reacción con bromuro de cianógeno para dar el (-)-desoxicarpamato de etilo (XL) que fué aislado y caracterizado como clorhidrato.



Cuando los mismo autores redujeron el éster del ácido desoxicarpirínico (V), a su vez obtenido por deshidrogenación de la carpaína (116), catalíticamente en medio ácido, obtuvieron un único producto (XLI), al que asignaron configuración sis para los sustituyentes en las posiciones 2 y 6 de acuerdo con lo encontrado por Scheuing y Winterhalder (128) en reducciones similares de piridinas disustituídas en esas posiciones.

Esta asignación queda corroborada por el hecho que la reducción del mismo compuesto (V) con sodio en etanol conduce, en cambio, a la formación de dos productos, de los cuales el principal es idéntico al obtenido en la reducción catalítica. En su vez la identidad del producto (XL) ópticamente activo obtenido como se ha descrito arriba por degradación del éster cíclico del ácido N-metil-carpámico (XXXVII) con conservación de la configuración en los carbonos 2 y 6 con el producto racémico (XLI) obtenido en la reducción catalítica del ácido mesoxicarpirínico (V) permitió establecer la configuración cis de ambos sustituyentes.

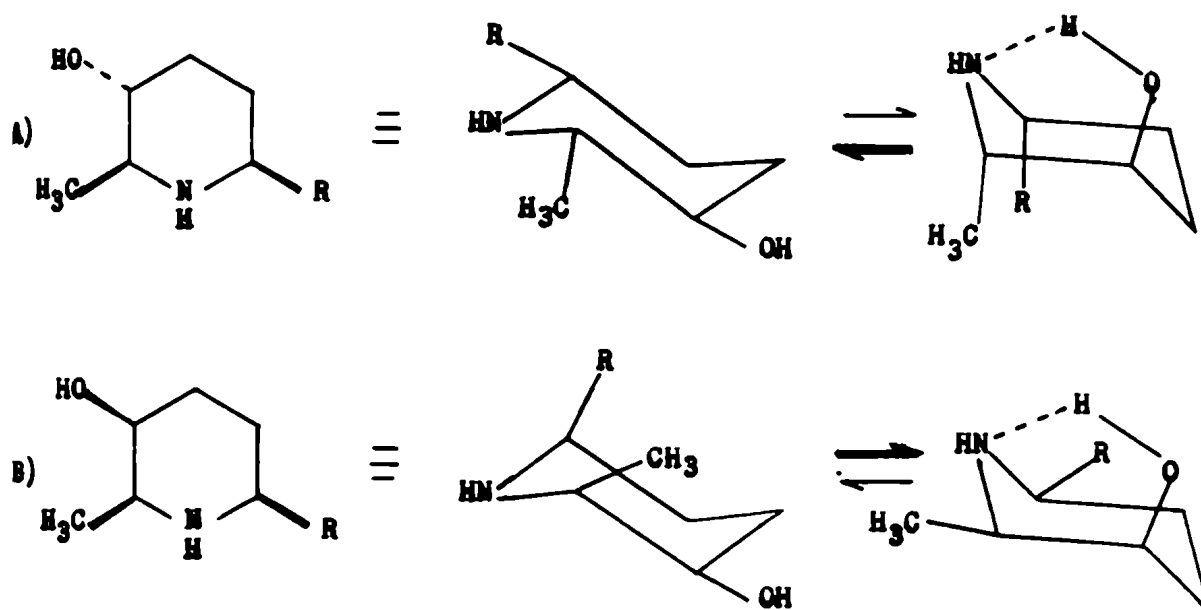


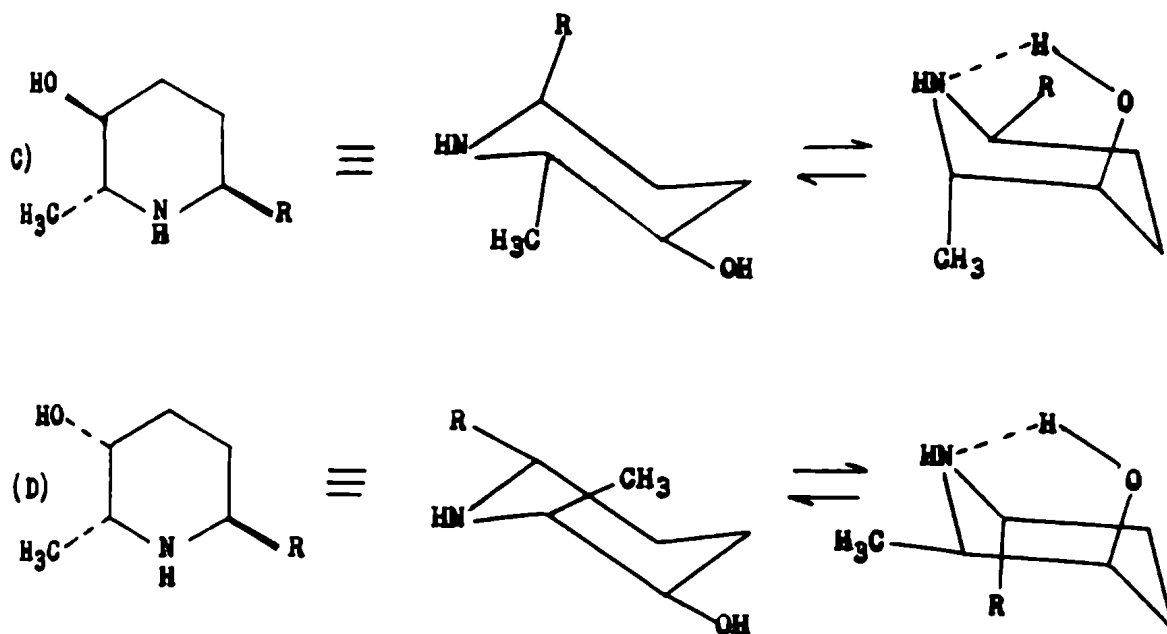
Govindachari y Narasimhan infirieron, también, que el grupo hidroxilo alcohólico situado en el carbono 3 del ciclo trogenado del ácido carpámico debía ser ecuatorial en virtud de la resistencia a la deshidratación exhibida por el ácido carpámico (113), la imposibilidad de epimerizar al carpanato de

etilo por prolongado tratamiento en medio alcalino (127) y al fácil reemplazo del mismo por cloro, aunque esto parece estar en contradicción con sus propias experiencias.

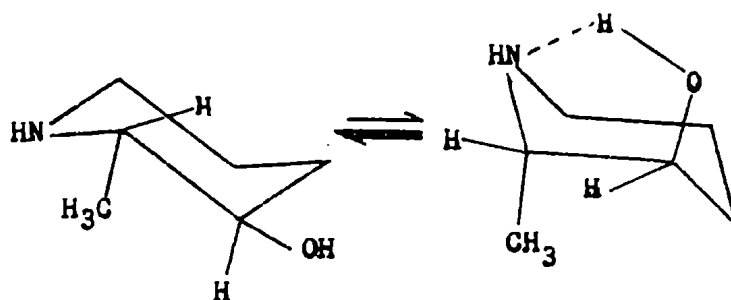
Sin embargo, Tichy y Sicher (129) establecieron en 1962, en base a consideraciones sobre el espectro infrarrojo del carpamato de metilo y su comparación con algunos compuestos piperidínicos, que el grupo hidroxilo alcohólico se encuentra orientado axialmente.

A priori, son posibles en el carpamato de metilo cuatro configuraciones distintas que en el esquema que figura a continuación se representan con las letras (A), (B), (C) y (D), juntamente con sus respectivas representaciones conformacionales en las que figuran las relaciones espaciales que vinculan al mencionado grupo funcional con el grupo N→H. De esta manera se indica en cada caso la posibilidad de que se establezcan puentes hidrógenos entre estos grupos en cada una de las conformaciones indicadas.

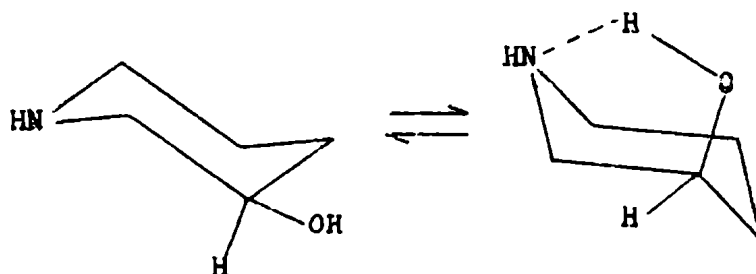




Se puede observar que si son válidas las conclusiones configuracionales establecidas por Govindachari y Narasimhan en 1955, para el carpamato de metilo, los sustituyentes en las posiciones 2 y 6 deben estar orientados ecuatorialmente en la conformación más estable del núcleo piperidínico. Para que sea posible la existencia de una unión hidrógeno estable en la configuración (A), el núcleo piperidínico debe adoptar la conformación menos estable en la que estos sustituyentes están orientados axialmente. Sin embargo, como la conformación con los tres sustituyentes ecuatoriales es mucho más estable no debería observarse en el espectro infrarrojo ninguna banda que pudiera asignarse a un grupo hidroxilo ligado, tal como se observa en el caso de la trans-2-metil-3-hidroxipiperidina (129).



En las configuraciones (C) y (D), los sustituyentes en 2 y 6 se encuentran en relación trans y por lo tanto los efectos conformacionales de ambos se cancelan entre sí, no pudiéndose a priori establecer cuál de las conformaciones será la preferida. Los espectros infrarrojos de las configuraciones (C) y (D) deberían presentar bandas de hidroxilo ligado y de hidroxilo libre de aproximadamente igual intensidad. En el caso de la 3-hidroxipiperidina la relación de intensidades es igual a 0.8 (129).



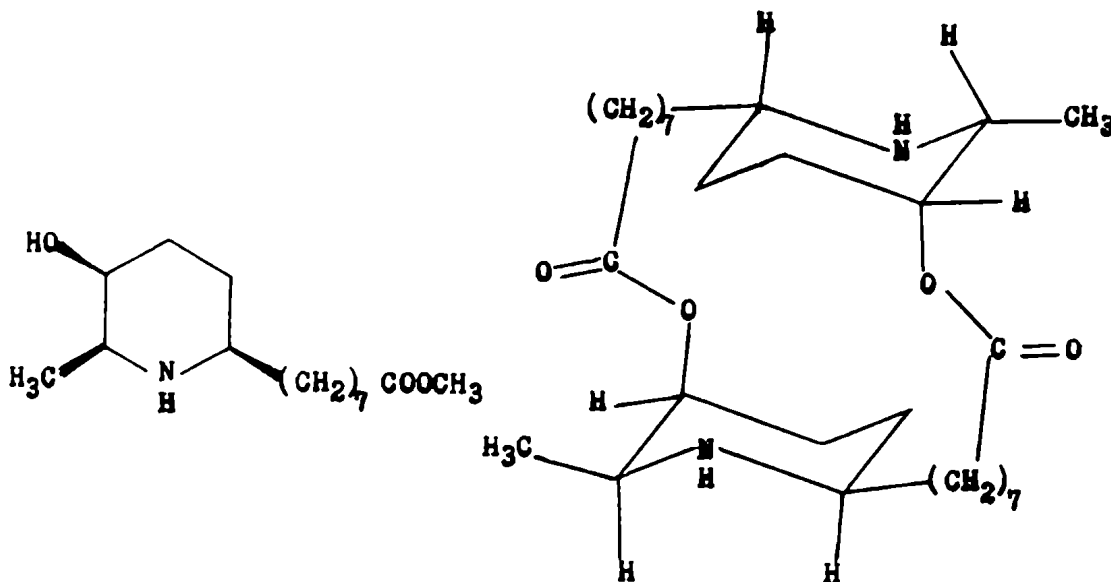
Finalmente, nos queda por considerar la configuración B) en la que los tres sustituyentes están orientados en cis y de manera tal que si los grupos metilo y la cadena alifática larga se orientan ecuatorialmente en las posiciones 2 y 6, el hidroxilo de la posición 5 debe ubicarse axialmente favoreciendo de esta manera la formación de un puente hidrógeno con el grupo amino secundario.

Es decir que si la configuración del ácido carpámico es la representada por (B) y la conformación preferida es aquella en la que sus dos sustituyentes más voluminosos se ubican en posiciones ecuatoriales, el hidroxilo alcohólico deberá orientarse exclusivamente en posición axial. En esta posición se encontrará favorablemente situado para formar un puente hidrógeno con el grupo amino básico. Una situación de este tipo deberá reflejarse en la aparición en el espectro infrarrojo de una banda muy intensa de hidroxilo ligado y una mucho más débil de hidroxilo libre. Esta es la situación que se presenta en los espectros de la cis-2-metil-3-hidroxi-piperidina (129) y de la cis,cis-2,6-dimetil-3-hidroxi-piperidina en las que las relaciones de intensidad llegan, respectivamente, a valores de 1,9 y 3,1.



El espectro del carpamato de metilo presenta ambas bandas, siendo la de hidroxilo unido por puentes de hidrógeno 1,6 veces más intensa que la correspondiente al hidroxilo libre. Esto, juntamente con el hecho que el espectro infrarrojo es similar al de la cis-2-metil-3-hidroxi-piperidina y la cis,cis-2,6-dimetil-3-hidroxi-piperidina y completamente diferente al de la trans-2-metil-3-hidroxi-piperidina, establece claramente que la configuración que corresponde al carpamato de

metilo es la (B) y como el ácido carpámico puede reconvertirse en carpaina (123), determina asimismo la configuración del alcaloide como el isómero totalmente cis.



El espectro de resonancia magnética nuclear realizado por Govindachari (130) et al. en 1965 aporta nuevas evidencias en favor de la estructura y de las relaciones espaciales de los sustituyentes tal como aparecen en las fórmulas anteriores.

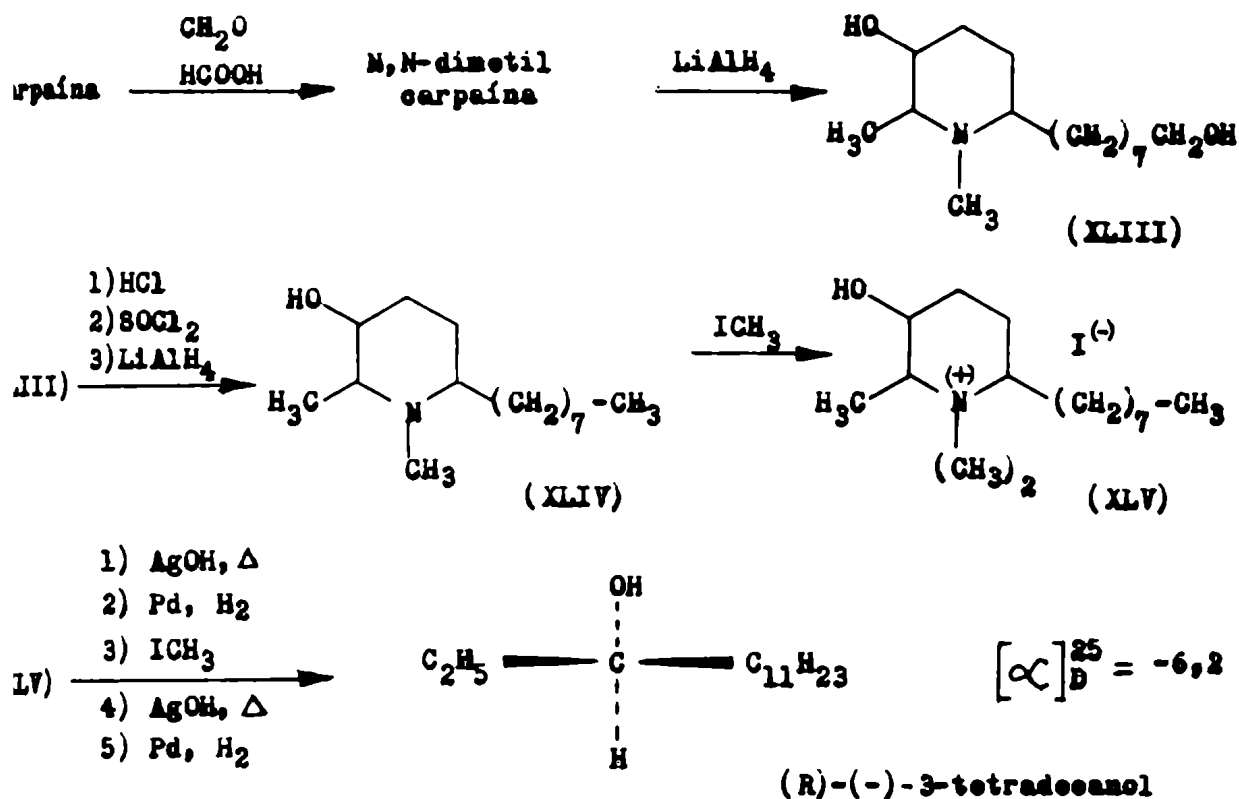
Los grupos metilo situados en los carbonos C-2 y C-2' se presentan como un doblete a $\delta = 1,02$ con una constante de acoplamiento de $J = 7$ cps, mientras que los protones ubicados en esas mismas posiciones aparecen como un cuarteto ensanchado y no bien separado con una constante de acoplamiento $J_{2,3} = 1,2$ cps. Los protones de los carbonos C-3 y C-3' son también equivalentes y se presentan como un singulete no resuelto a $\delta = 4,75$ con un ancho a media altura equivalente a 5-6 cps. El valor del desplazamiento químico observado para estos protones está de acuerdo con el descrito en la literatura para un átomo de

hidrógeno de un átomo de carbono carbinólico ubicado en un ciclo alifático de seis átomos que posee el grupo hidroxilo esterificado y se encuentra orientado axialmente (131). De estar estos protones orientados axialmente y por consiguiente los grupos hidroxilo orientados ecuatorialmente sus señales deberían ser más anchas o aparecer desdobladas por acoplamiento con los protones vecinos axiales situados en los carbonos C-2 y C-4 y el protón ecuatorial del C-4. Por lo tanto, de acuerdo con los datos del espectro de resonancia magnética nuclear los grupos hidroxilo esterificados de la carpaína se encuentran orientados axialmente en la conformación más estable del núcleo piperidínico.

La nitidez de las señales de los grupos metilo en C-2 y C-2' indica que el proceso de inversión conformacional que conduciría a la conformación menos estable B' es un proceso poco probable que ocurre con lentitud.

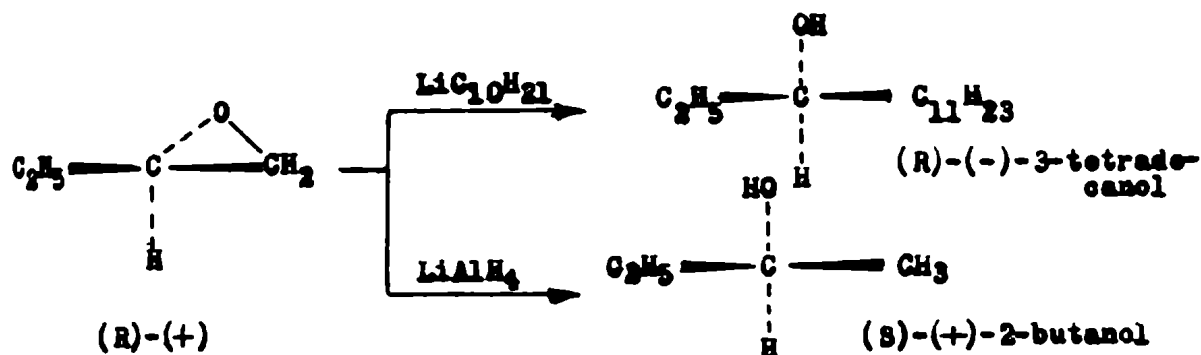
Para poder llegar a la configuración absoluta de la carpaína hacía falta solamente determinar la configuración absoluta de uno de los centros asimétricos puesto que las experiencias de Tichy y Sicher (129) y de Govindachari y colaboradores (127) permitían conocer las interrelaciones configuracionales de los tres centros asimétricos en cada uno de los núcleos piperidínicos del alcaloide.

Rice y Coke (132) transformaron a la carpaína en (-)-3-tetradecanol cuya configuración absoluta fué determinada por correlación química con el (S)- (+)-2-butanol, por la serie de reacciones que se detallan a continuación:



La N,N'-dimetilcarpaína fué preparada por tratamiento con formaldehído-ácido fórmico de la carpaína. La reducción con hidruro de aluminio y litio produjo el N-metilcarpamidol (XLIII) que por sucesivo tratamiento con ácido clorhídrico, cloruro de tionilo y reducción con hidruro de aluminio y litio se convirtió en N-metilcarpamol (XLIV), procedimiento que con anterioridad había utilizado Govindachari para obtener el carpamol (ver página 59). El N-metilcarpamol fué sometido a una degradación de Hofmann, previo tratamiento con ioduro de metilo para obtener la sal cuaternaria. Después de realizada la degradación por calentamiento con óxido de plata húmedo el producto fué reducido catalíticamente, nuevamente transformado en la cuaternaria por tratamiento con ioduro de metilo y sometido

tra vez a una degradación de Hofmann con óxido de plata húmedo reducción catalítica con hidrógeno sobre paladio. De esta manera Rice y Coke (132) obtuvieron el 3-tetradecanol levorotatorio $[\alpha]_D^{25} = -6,2^\circ$ que resultó ser idéntico al (R)-3-tetradecanol de configuración absoluta conocida preparado por reacción del (R)-(+)-1,2-epoxibutano con n-decillitio.

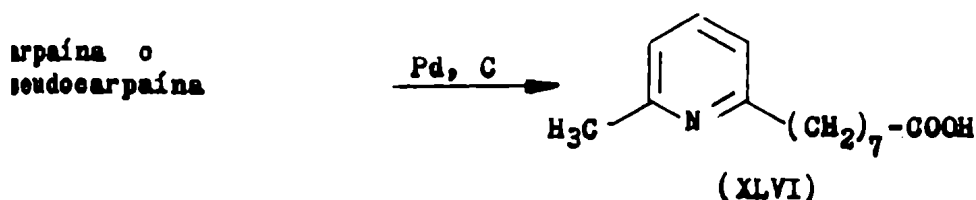
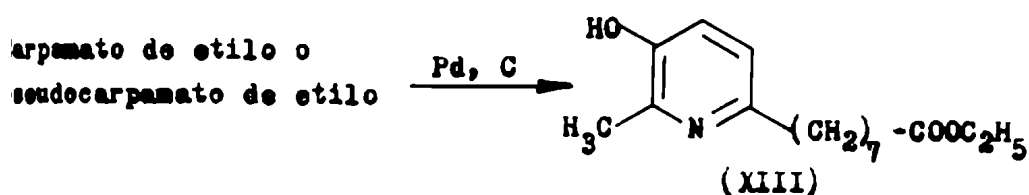
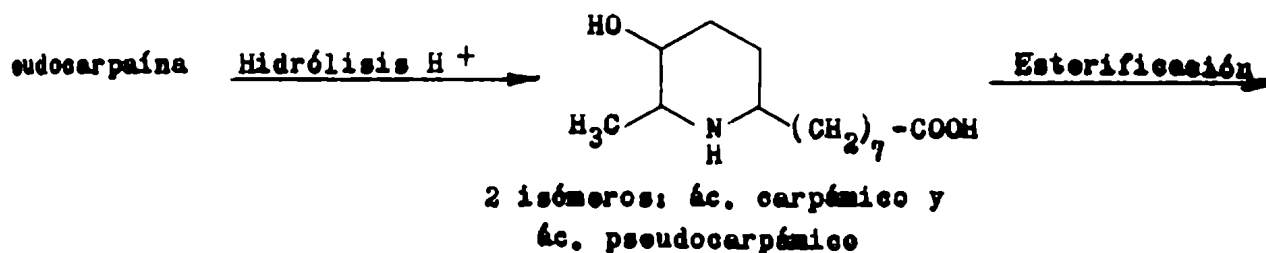


Así, la estructura y configuración absoluta del núcleo de la carpaína queda descrita por el siguiente nombre sistemático: 2-(R)-metil-3-(R)-hidroxi-6-(S)-octanoilpiperidina.

Pseudocarpaína

La pseudocarpaína es una base isómera de la carpaína y se aísla también de los extractos de Carica papaya L. (133).

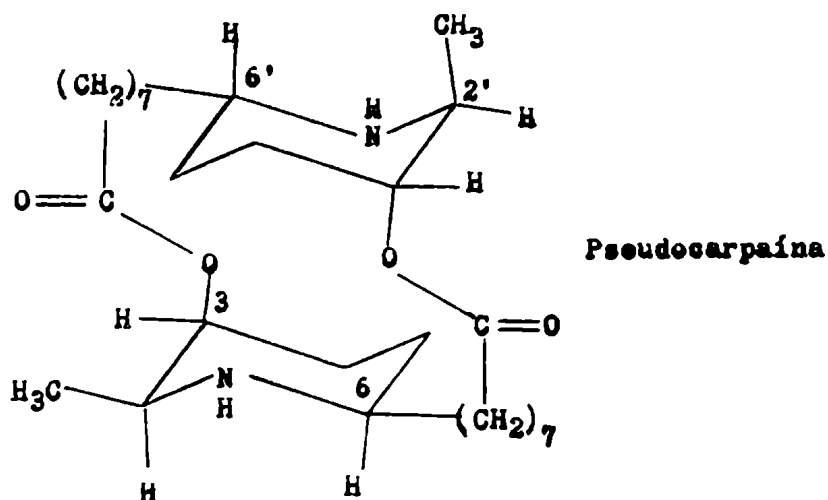
La hidrólisis ácida de este alcaloide conduce a la formación de un mol de ácido carpámico y de un mol de un ácido isómero al que se le ha denominado ácido pseudocarpámico (133). Por deshidrogenación catalítica de ambos ácidos bajo la forma de ésteres etílicos se obtiene un único compuesto, el éster etílico del ácido carpirínico (XIII).



Como ocurre con la carpaína por deshidrogenación con radio se forma ácido desoxicarpipirínico (XLVI). Por reducción la base con hidruro de aluminio y litio se obtienen dos productos isómeros, el carpamadiol y el pseudocarpamadiol. Esto muestra que la pseudocarpaína posee una estructura dímera similar a la carpaína en la que las dos porciones de la molécula difieren en la estereoquímica de por lo menos uno de los sustituyentes. Esta suposición queda corroborada por el hecho de que en el espectro de masa de la pseudocarpaína aparece el ión molecular a m/e 478 como en el caso de la carpaína. El diagrama de fragmentación es muy similar, lo que revela la similitud del esqueleto de ambos alcaloides puesto que el espectro de masa no puede revelar diferencias estereoquímicas.

Govindachari aclaró la estructura y estereoquímica de la pseudocarpaína al observar el espectro de resonancia magnética

ica nuclear. A diferencia de lo que ocurre en la carpaína, los grupos metilos situados en los carbonos C-2 y C-2' se presentan como dos dobletes a $\delta = 1,02$ y a $\delta = 1,07$ con constantes de acoplamiento idénticas ($J = 7$ cps.). De manera idéntica y corroborando que los dos núcleos piperidínicos difieren en la configuración del átomo de carbono C-2' que soporta a uno de los grupos metilo, Govindachari y colaboradores (130) encontraron que el protón situado sobre el C-2' aparece como un multiplete a $\delta = 3,15$ mientras que el protón del C-2 aparece como en la carpaína como un cuarteto a $\delta = 2,86$. Las señales que corresponden a los protones de los C-3 y C-3' se presentan sobrepuestas a $\delta = 4,8$ como un singulete no resuelto y un multiplete, respectivamente.



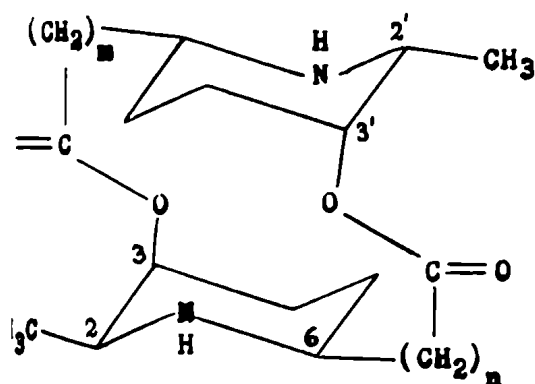
En el espectro realizado a 100 Mc. se observa que la señal del protón del C-2' se presenta como un octeto a $\delta = 3,16$ con constantes de acoplamiento $J_1 = 7$ cps. y $J_2 = 3$ cps. Este acoplamiento se observa también en el multiplete que corresponde al protón del C-3' que aparece a $\delta = 4,83$.

Que los dos protones en C-3 y C-3' presenten aproximadamente el mismo desplazamiento químico sugiere que ambos

tén orientados ecuatorialmente como se estableció para la carpaina, mientras que la pequeña diferencia de los desplazamientos químicos de los grupos metilos en C-2 y C-2' y las diferencias que presentan los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno unidos directamente a esos átomos de carbono indican que la carpaina y la pseudocarpaina difieren en la estequiometría de los grupos metilo.

Alcaloides piperidínicos dimeros de Azima Tetracantha Lam.

Una muy pequeña proporción de carpaina (XXXI) fué encontrada en las hojas de A. Tetracantha en 1967 (169) y separada de otras dos bases dimeras, la azimina (XC) que es el componente principal de p.f. 112-113°C y la azcarpina (XCI), presentes en cantidades menores, que no se pudo cristalizar. Los datos conocidos de la carpaina, indicados precedentemente en esta tesis, y la información espectroscópica obtenida para estos dos nuevos alcaloides, constituyeron la base para la determinación de sus estructuras.



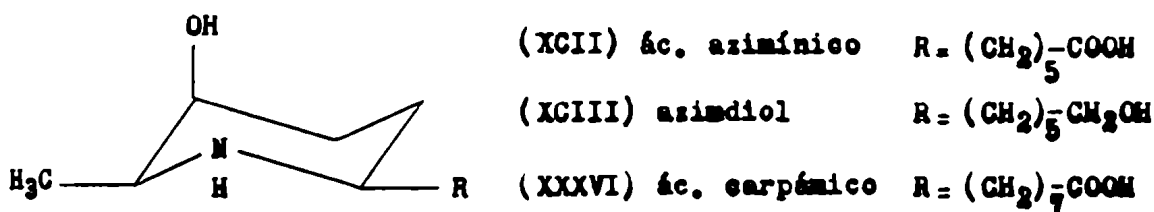
(XXXI) Carpaina n = 7 ; m = 7

(XC) Azimina n = 5 ; m = 5

(XCI) Azcarpina n = 5 ; m = 7

El espectro de masa de la azimina (XC) presentó un ión molecular de m/e 422 correspondiente a la fórmula $C_{24}H_{42}N_2O_4$ y un diagrama de fragmentación similar al de la carpaina, diferenciándose por ser indicativo de un ciclo de 22 átomos en vez del de 26 átomos de la carpaina.

La azimina por hidrólisis da como único producto el ácido azimínico (XCII) que fué aislado y caracterizado como ester metílico y la reducción de la base natural con hidruro de litio y aluminio solo produjo azimidíol (XCIII) con lo cual se estableció rigurosamente la simetría del ciclo dilactónico.



El espectro de r.m.n. de azimina presenta un solo doblete para los grupos metilos sustituyentes del C-2 y del C-2', mientras que las señales asignadas a los protones de estos átomos del núcleo son dobletes ($J = 7$ cps) partidos por acoplamiento spin débil ($J = 2$ cps) con los protones de C3 y C3', lo cual indica una relación 2,3-cis para los grupos metilos y las funciones lactona, además de la similitud conformacional en los 2 núcleos piperidínicos. Suponiendo una relación ecuatorial cis entre los sustituyentes en α al átomo de nitrógeno, como en la carpaina, los autores (169) consideran que los sustituyentes oxigenados en C3 y C3' deben estar orientados axialmente.

La medición precisa del ión molecular de la ascarpina (ICI) ($M^+ = 450,346$) indicó la fórmula $C_{26}H_{46}N_2O_4$ y el diagrama

La fragmentación resulta ser una mezcla de los espectros de masa de carpaína (XXI) y azimina (XC). El espectro de r.m.n. solo presenta diferencias menores con el de la azimina y la suposición de que la azcarpina (XCI) es una dilactona asimétrica compuesta por los ácidos azimínico (XCII) y carpámico (XXXVI) fué confirmada por hidrólisis del alcaloide.

El tercer alcaloide fué identificado como carpaína por: punto de fusión mixto, el espectro de masa y comportamiento cromatográfico.

cassina

Estructura del núcleo piperidínico: De los extractos sicos de la Cassia excelsa Schrad, R. J. Highet (12) logró separar una fracción de alcaloides solubles en n-hexano caliente. Los alcaloides cristalizaron como una mezcla de clorhidratos.

Por repetidas cromatografías de las bases libres en columnas de sílica gel se separaron dos alcaloides, a los que el autor denominó cassina y casselsina. Este último no fué estudiado y no se ha descrito con posterioridad. La casselsina puede guardar alguna relación con el alcaloide que Gonçalves de Lima y sus colaboradores (11) aislaron de la misma especie en Brasil y que denominaron cassilisina aunque Highet establece en su trabajo que no pudo obtenerlo.

La cassina es, en cambio, el alcaloide presente en mayor cantidad en los extractos de C. excelsa y el que puede obtenerse con mayor facilidad al estado cristalino tanto como se libre o como sales aún en casos en que se encuentre en mezclas con otros alcaloides piperidínicos. Por esta razón Highet realizó un estudio detallado de su estructura,

Los datos del análisis elemental de la cassina son algo contradictorios puesto que Highet estableció en su primer trabajo que correspondía la fórmula $C_{19}H_{37}NO_2$ no obstante que el examen preliminar del espectro de masa indicaba un grupo metileno.

Los primeros estudios de Highet permitieron aclarar convenientemente los grupos funcionales presentes en la molécula de la estructura del núcleo piperidínico. El espectro infrarrojo del alcaloide indica la presencia de un grupo carbonilo con absorción a 1720 cm^{-1} lo que corresponde a una cetona alifática. Aparece, también, un pico (3530 cm^{-1}) en la zona de estiramiento de las uniones O-H y N-H, mientras que en las zonas de estiramiento de las uniones C-H solo aparecen bandas que corresponden a uniones alifáticas. Estas características alifáticas se confirman en el espectro ultravioleta puesto que el alcaloide es relativamente transparente con excepción del hecho de que en el caso del clorhidrato se encontró un máximo de muy pequeña intensidad ($\epsilon = 33$) a $276\text{ m}\mu$ que puede atribuirse a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del grupo carbonilo.

La acetilación de la base produjo un derivado O,N-diacetilado con absorción en el infrarrojo a 1725 cm^{-1} y 1630 cm^{-1} . El último pico corresponde a la banda amida formada por acetilación de un grupo amino secundario. El compuesto diacetilado presenta absorción en la región de estiramiento O-H y N-H. Highet obtuvo también por reducción con borohidruro de sodio un alcohol derivado formado por reducción del grupo carbonilo a alcohol secundario. Esta sustancia no fué estudiada más. En esta

tesis se describe su aislamiento como una base natural aislada en los extractos alcalinos de la C. carnaval Speg. y al que se ha dado el nombre de carnavalina (15).

Los datos anteriores indicaban, por lo tanto, que la cassina posee un grupo amino secundario, un hidroxilo alcohólico y una función cetona.

El carácter saturado de la molécula se confirma por el hecho de que no absorbe hidrógeno en presencia de un catalizador mientras que el compuesto diacetilado queda inalterado al tratarlo con permanganato de potasio en acetona. Se infiere además que no se encuentra presente una doble ligadura por lo que el alcaloide debe poseer un sistema cíclico.

La deshidrogenación de la cassina por tratamiento a 220°C con paladio-carbón en atmósfera de nitrógeno suministra un compuesto ópticamente inactivo, la deshidrocassina, que presenta un espectro ultravioleta característico de una 3-hidroxipiridina tanto en solución ácida como en medio básico o neutro.

Las 3-hidroxipiridinas se caracterizan por producir desplazamientos batocrómicos al pasar de un medio neutro a un medio ácido o básico, según se observa en la Tabla adjunta conjuntamente con los valores encontrados para el producto de deshidrogenación de la cassina. Las 2- y las 4-hidroxipiridinas por el contrario no presentan desplazamientos fenólicos significantes porque adoptan la forma tautomérica preferida de piridona.

TABLA

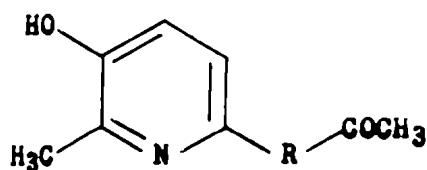
Compuesto	Solución neutra		Solución alcalina		Solución ácida	
	λ_{\max} m μ	log ϵ_m	λ_{\max} m μ	log ϵ_m	λ_{\max} m μ	log ϵ_m
hidrocassina	288	3,85	311	3,93	301	4,01
	224	3,96	245	4,10	230	3,87
hidroxipiridina	278	3,60	304	3,83	284	3,81
					238	4,00
hidroxipiridina	297	3,80	295	3,80	295	3,76
	227	4,00	230	4,00	225	3,84
idina	257	3,44				

El espectro infrarrojo de la deshidrocassina retiene absorción del grupo carbonilo que de acuerdo con el espectro resonancia magnética nuclear de esta sustancia así como el de cassina, pertenece a una metilcetona. Esto se confirma por hecho de que la cassina da una reacción positiva haloformica aislamiento de iodoformo.

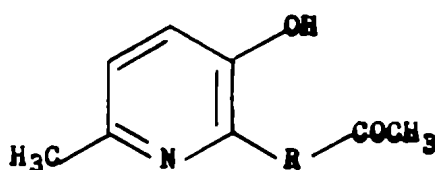
Al comparar los espectros de resonancia magnética nuclear de la deshidrocassina y de la cassina que observa que la al correspondiente a un grupo metilo a $\delta = 1,02$ (desdoblada copulación con grupo CH vecino) en la cassina se corre a 2,50, en concordancia con la suposición de que durante el ceso de deshidrogenación se ha producido la aromatización núcleo heterocíclico. Se ha pasado así de una metilpiperi- a a una metilpiridina. Esta suposición queda confirmada esto que se encuentra que en el espectro de resonancia magnética nuclear de la deshidrocassina aparece en la zona de absor-

in de protones aromáticos un cuarteto que corresponde a dos protones situados en las posiciones β y δ de un núcleo piperídico.

Conforme a los resultados anteriores se pueden postular dos fórmulas probables para la deshidrocassina (XLVII ó III) y para la cassina:

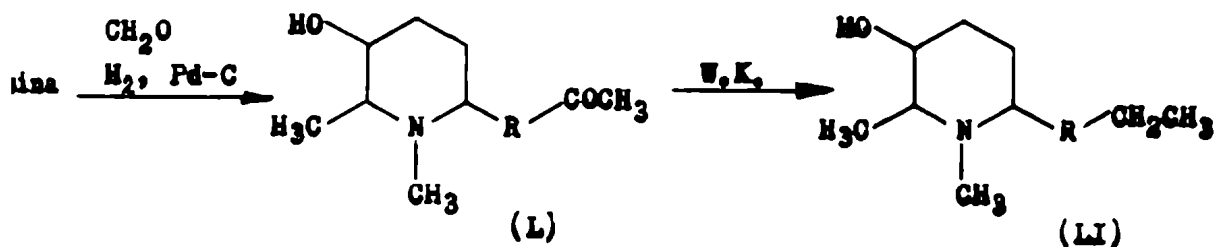


(XLVII)

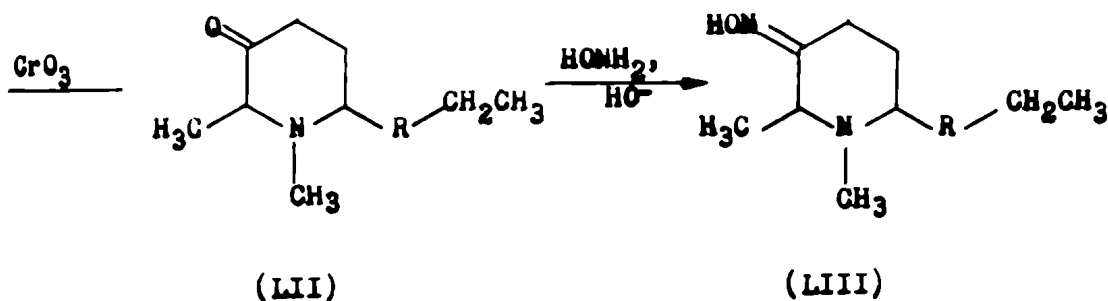


(XLVIII)

Para decidir entre estas dos alternativas, o sea para establecer cuál es el sustituyente situado en la posición α del núcleo piperídico entre el grupo hidróxilo alcohólico y el grupo de nitrógeno básico, Hight procedió (12) a convertir la cassina en N-metilcassina (L) por tratamiento con formaldehído y reacción con hidrógeno sobre paladio-carbón. El grupo carbonilo de la N-metilcassina (L) fué reducido a metileno según el método de Wolff-Kishner con hidracina en etilenglicol obteniéndose etildesoxicassina (LI).

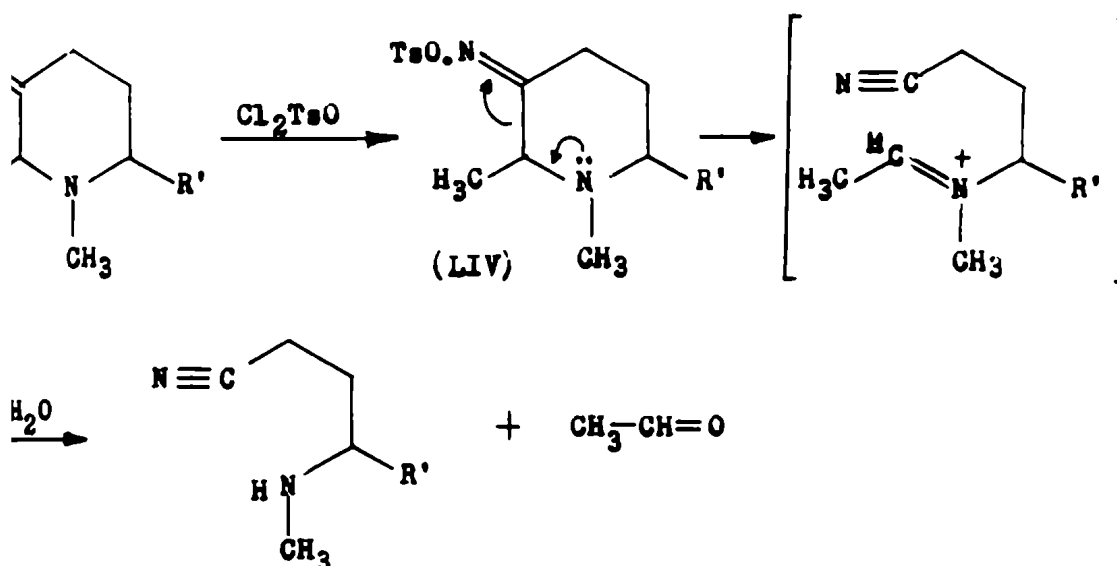


Por oxidación con ácido crómico se pasa al compuesto en el que el grupo hidroxilo secundario se ha convertido grupo cetónico que a su vez se ha transformado en la pendiente oxima (LIII).

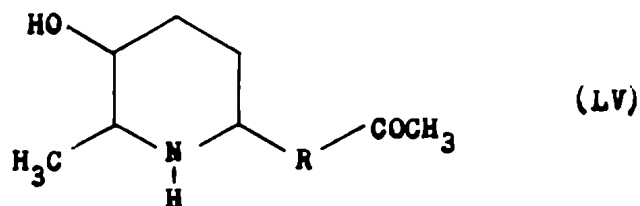


Se ha encontrado recientemente que la reacción de Beckmann aplicada a α -aminooximas resulta efectiva para producir el clivaje o ruptura de las mismas (134).

Hight (12) sometió al producto (LIII) a las condiciones reacción de Beckmann previa transformación del mismo en el pendiente tosilato (LIV), se pudo detectar como producto reacción al acetaldehído que fué identificado como su nitrofenilhidrazona por cromatografía sobre papel.



La formación de acetaldehído como consecuencia de es-
 serie de reacciones demuestra que en la posición α -vecina al
 droxilo se encuentra como sustituyente un grupo metilo, por lo
 e se infiere que la estructura más probable para la cassina es
 siguiente (LV):

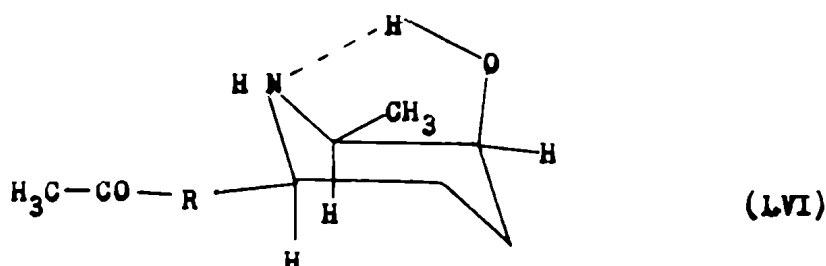


Para establecer la configuración relativa de los sus-
 tuyentes del núcleo piperidínico, Highet (12) utilizó los da-
 s suministrados por Tichy y Sicher (129) para determinar la
 tereoquímica del núcleo de la carpaína, que se han comentado
 anteriormente (pag. 75). La posición relativa de los sustitu-
 yentes en un sistema 2,6-dialquil-3-hidroxipiperidínico se re-
 flecta en la frecuencia de estiramiento de la unión O-H observada
 en los espectros infrarrojos como consecuencia de la posibilidad
 o imposibilidad de formación de uniones hidrógeno. En una con-
 figuración cis, en la que los sustituyentes más voluminosos es-
 tán orientados ecuatorialmente, el grupo hidroxilo en la posi-
 ción 3 ocupa una posición axial lo que facilita la formación de
 un puente hidrógeno con el grupo amino secundario del núcleo.
 Por los factores, el de volumen de los sustituyentes alquílicos y
 la energía suministrada por la formación de la unión hidrógeno,
 se favorecen como conformación más estable a la que presenta al
 grupo hidroxilo con orientación axial.

Tanto en la N-metilcassina (L) como en el compuesto

se observa que el grupo hidroxilo absorbe a 3530 y a 3535 respectivamente, por debajo de la zona que corresponde al ramamiento de la unión O-H de grupos hidroxilos secundarios (3.630 cm^{-1}).

Por lo tanto, a la cassina le corresponde la siguiente estructura parcial, en la que se indican las relaciones conformationales de los sustituyentes.



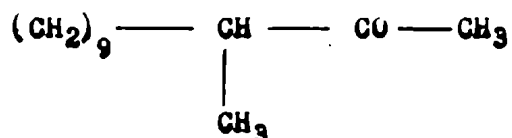
La fórmula (LVI) representa a la conformación más estable del núcleo piperidínico de la cassina.

ESTRUCTURA DE LA CADENA LATERAL DE LA CASSINA

La presencia de un grupo carbonilo evidenciada por la absorción en el infrarrojo a 1720 cm^{-1} se confirmaba por la aparición en el espectro de resonancia magnética nuclear de un pico a $2,05$ que puede atribuirse a un grupo metilo unido a un carbono carbonílico. Desde un punto de vista químico, esta evidencia se confirmó por la formación de iodoformo en la reacción de la cassina con hipiodito de sodio. De esta manera quedaba establecida que la cadena lateral larga terminaba en un función cetona.

Hight (12) estableció inicialmente que la estructura de la cadena debía corresponder a la que se presenta en la estructura (LVII) por cuanto al reaccionar el alcaloide con benzaldehído a 120° y en medio ácido se obtuvo una sustancia (o mezcla de sustancias) cuyo espectro ultravioleta presentaba una absorción en el ultravioleta típica de un derivado monobencilidénico mientras que no había evidencias de la formación de un compuesto dibencilidénico. Esto indicaba que en las posiciones α respecto del grupo carbonilo sólo existía un grupo apto para reaccionar con el benzaldehído. Tomando este dato en conjunción con la existencia del grupo metilo en α evidenciada por la reacción positiva de haloformo, se infería que en la otra posición α debía ocurrir una ramificación de la cadena.

Estas evidencias quedaron aparentemente confirmadas como resultado de una experiencia de equilibración del alcaloide en deuterometanol en medio alcalino, puesto que se encontró que intercambiaban 3,7 átomos de hidrógeno, un resultado bastante consistente con la postulación de una ramificación en la posición α y una estructura del tipo

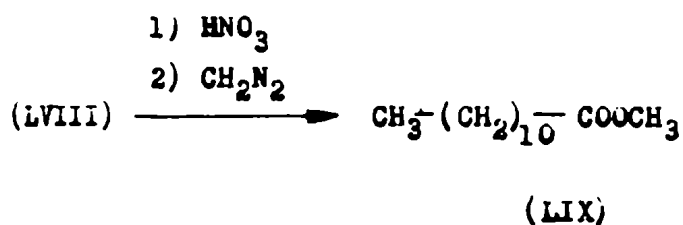
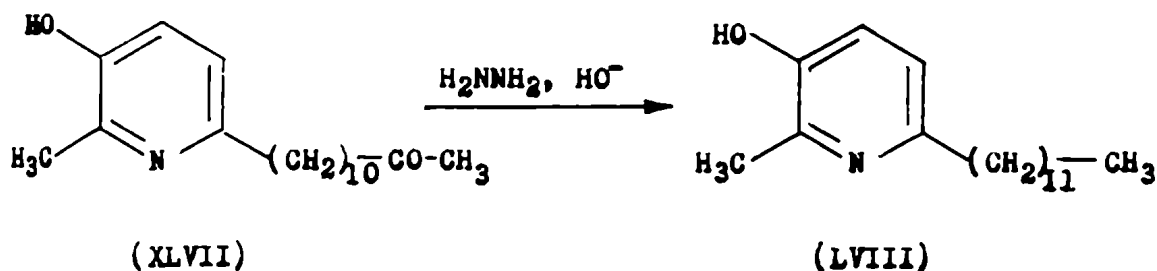


Sin embargo, un examen detallado de los resultados experimentales realizados por Hight y de las experiencias complementarias que se describen en esta tesis, llevó a una reconsideración independiente de la estructura de la cadena lateral de la cassina.

La reacción de la cassina con el benzaldehído realizada en condiciones idénticas a las descritas por Highet (12) reveló que la reacción es suficientemente compleja como para no poder inferir resultados y conclusiones definitivas respecto de la estructura en las vecindades del grupo carbonilo.

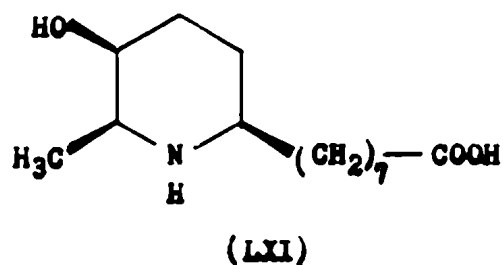
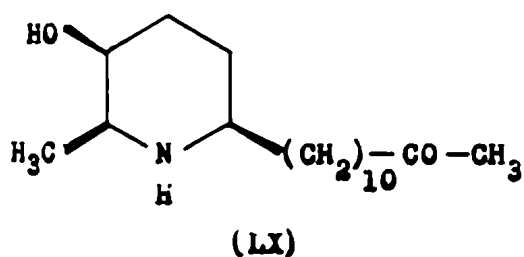
Highet (12) realizó un estudio muy preliminar del espectro de masa del alcaloide, encontrando que el pico correspondiente al ión molecular se presenta a m/e 297 lo que lleva a corregir la fórmula propuesta de la cassina a $C_{18}H_{35}NO_2$. La interpretación detallada del espectro de masa - tal como se describe en el capítulo IV de esta tesis - revela que la suposición de una cadena lateral ramificada es incorrecta, mientras que la determinación de la curva de dispersión rotatoria no presenta evidencias de la existencia de un centro asimétrico en las cercanías del grupo carbonilo (pag. 121).

Con posterioridad a su primera publicación, Highet (13) corrigió la estructura inicialmente propuesta a una en la que la cadena lateral larga es totalmente lineal. Para ello sometió a la deshidrocassina (XLVII) (pag. 90) a una reducción de Wolff-Kishner, con desaparición del grupo carbonilo, obteniendo un compuesto al que correspondía la fórmula molecular $C_{18}H_{31}NO$ (LVIII) que por oxidación con ácido nítrico produjo una pequeña cantidad de un ácido carboxílico que por esterificación con diazometano fue identificado por medio de una cromatografía gaseosa como laureato de metilo (LIX). La identificación fue confirmada por medio de un espectro de masa.



CONFIGURACION ABSOLUTA DE LA CASSINA

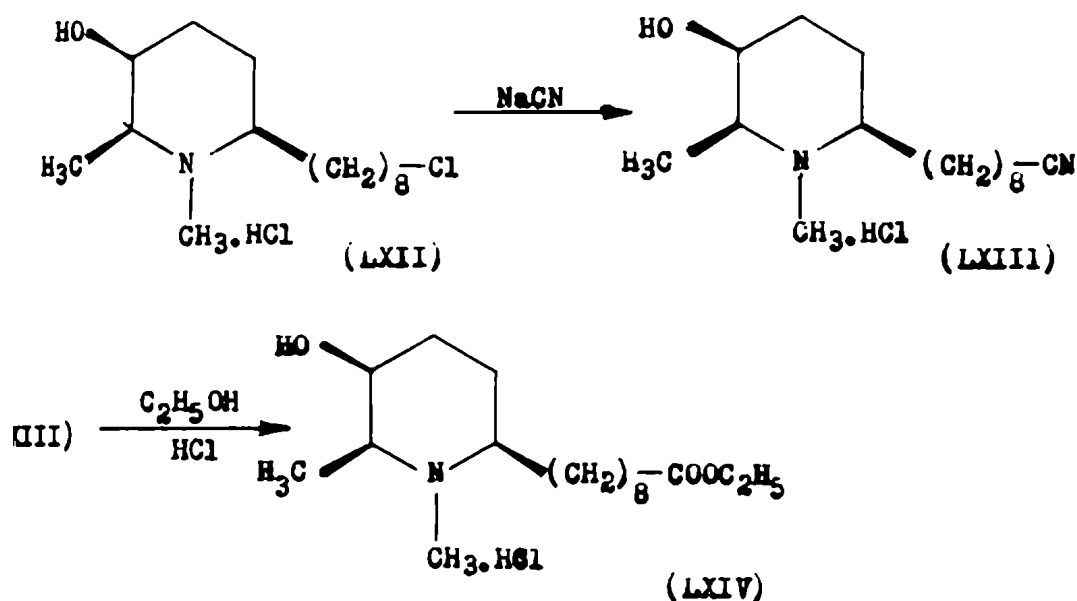
La estrecha relación estructural y la similar configuración relativa de los sustituyentes de la cassina y de la carpaina, como puede observarse en las fórmulas conformacionales adjuntas,



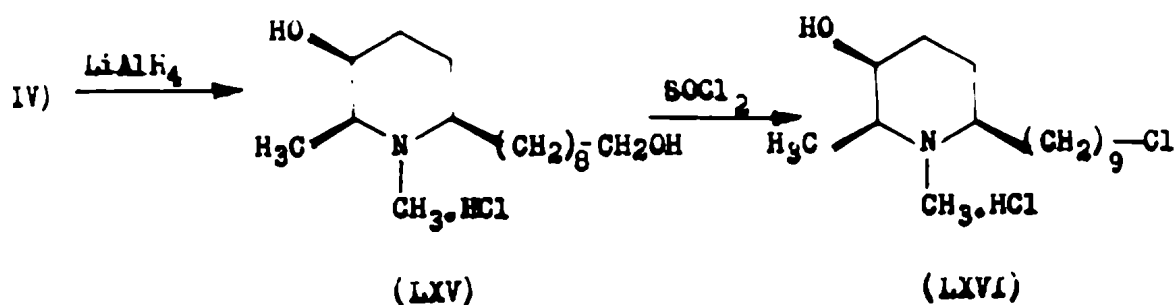
Llevó a Rice y Coke (14) a estudiar la determinación de la configuración absoluta de la cassina como continuación de los trabajos ya mencionados que condujeron al establecimiento de la misma para la carpaina (LXI).

Para ello partieron del compuesto (LXII) previamente preparado durante el curso del trabajo anterior (pag. 81) y cuyo nombre sería cloruro de N-metil carpamilo. Por reacción con cianuro de sodio en dimetilsulfóxido se pasa al correspon-

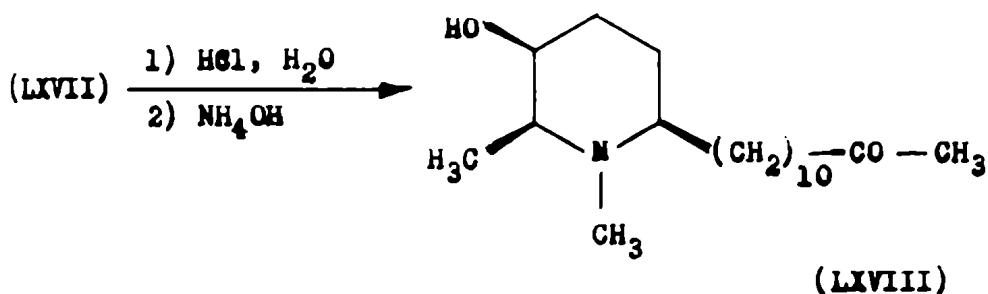
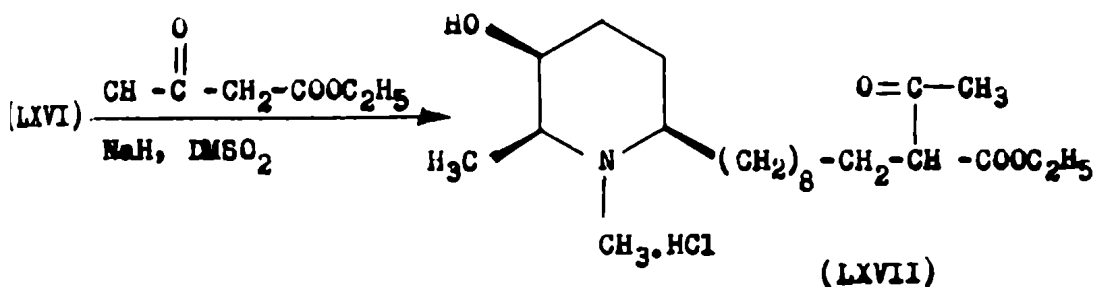
lente nitrilo (LXIII) que se transforma en el éster (LXIV) por alcoholisis en medio ácido con etanol absoluto.



El éster se redujo con hidruro de aluminio y litio, teniéndose el correspondiente alcohol (LXV), compuesto homólogo del N-metil carpanadiol descrito anteriormente (pag. 81). sustitución del hidróxilo alcohólico por cloro, por reacción con cloruro de tionilo, permitió pasar al correspondiente logenuro (LXVI).

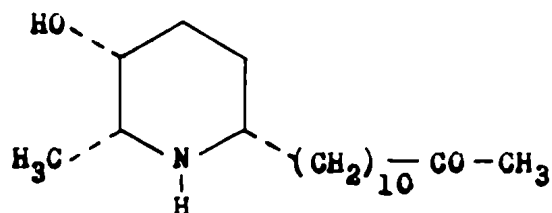


Para obtener la N-metilcassina (LXVIII) de configuración absoluta conocida, los autores sometieron al compuesto (LXVI) a una reacción con el éster acetilacético en medio de dimetilsulfóxido utilizando como catalizador ácido para la reacción de condensación al hidruro de sodio. El producto de condensación (LXVII) fué hidrolizado y descarboxilado por el procedimiento usual.



El espectro de resonancia magnética nuclear de la N-metilcassina (LXVIII) obtenida de esta manera es bastante similar al espectro de la cassina (LX). Aparece un pico correspondiente al grupo N-metilo extra a $\delta = 2,10$ en lugar del correspondiente al grupo N-H, mientras que el doblete originado por el grupo metilo α del núcleo piperidínico se encuentra corrido a campos más ($\delta = 1,13$) bajos que en la cassina ($\delta = 1,02$).

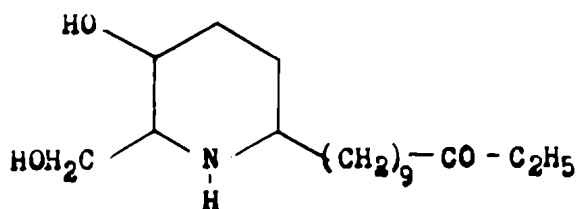
El compuesto de síntesis (LXVIII) de configuración absoluta conocida por su correlación con la carpaína (LXI) y con el (R)-3-tetradecanol, fué comparado con la N-metilcassina preparada por N-metilación de la cassina natural (LX), utilizando para ello el clorhidrato y su iodometilato. Los espectros infrarrojos son superponibles y las bases libres presentan los mismos tiempos de retención en cromatografía en fase gaseosa, pero los mismos son enantiómeros por cuanto presentan un poder rotatorio casi idéntico pero de signo opuesto. Por consiguiente, la N-metilcassina y por lo mismo la cassina (LX) deben representarse por la imagen especular del compuesto sintético relacionado con la carpaína correspondiéndole a la cassina la siguiente fórmula configuracional (LXIX):



(LXIX) 2-(R)-metil-3-(R)-hidroxi-6-(S)-(11-oxododecil)piperidina

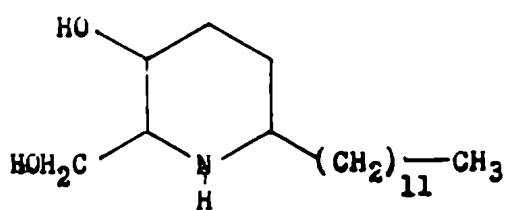
ALCALOIDES DEL GENERO PROSOPIS

El género Prosopis es utilizado en medicina indígena. Cercos (17) ha examinado en la Argentina algunas especies como la Prosopis ruscifolia Griseb. que posee entre los indios la reputación de curar ciertas enfermedades de la vista, lo que podría

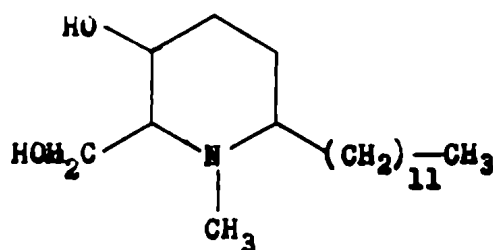


(LXXII)

La reducción de la función cetona de la prosopina (LXXII) de acuerdo con el procedimiento de Wolff-Kishner conduce a la desoxoprosopina (LXXIII) que puede obtenerse también por reducción de la cetona isómera (LXXI). Finalmente, Goutarel (16) obtuvo por metilación, con formaldehído en medio catalítico, a la desoxoprosopina, la N-metil-desoxoprosopina (LXXIV).



(LXXIII)



(LXXIV)

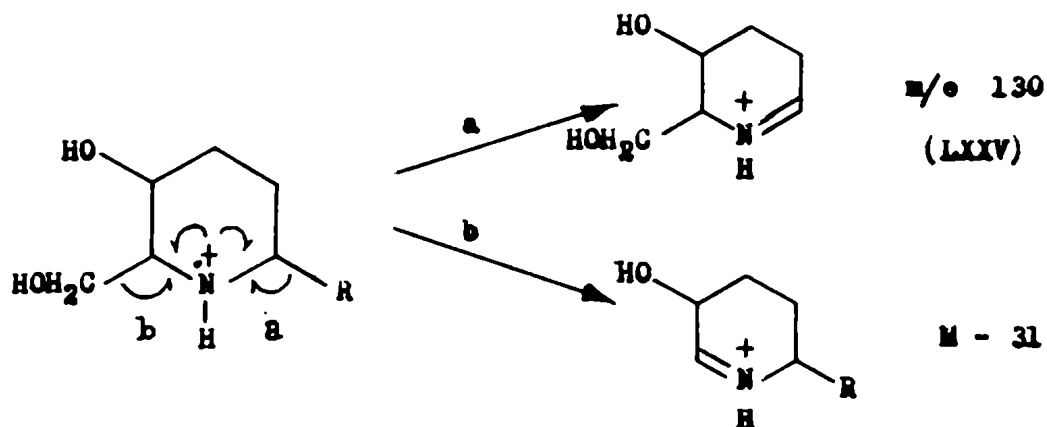
La ausencia de dobles ligaduras y los resultados de los análisis elementales de esta serie de compuestos indica que los mismos poseen solamente un ciclo.

La demostración de que este ciclo es derivado de la piperidina se realizó por un procedimiento análogo al utilizado en la carpaína y con la cassina. La deshidrogenación de la prosopina (LXXII) con carbón-paladio a 220° permitió producir un compuesto de deshidrogenación cuyo espectro ultravioleta

Indicaba que se trataba de una 3-hidroxipiridina sustituida (137), puesto que se producían los mismos desplazamientos batocrómicos en medio ácido o alcalino.

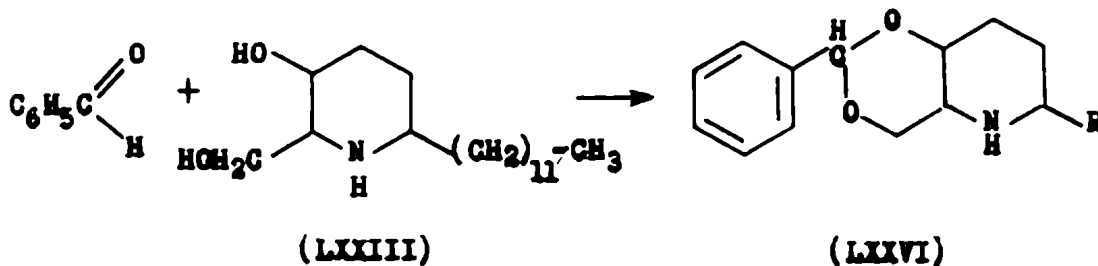
Compuesto	Solución neutra		Solución alcalina		Solución ácida	
	λ_{\max} m μ	log ϵ_m	λ_{\max} m μ	log ϵ_m	λ_{\max} m μ	log ϵ_m
Deshidroprosepinina	288	3,83	302	4,02	311	3,90
	224	4,0	229	3,89	244	4,18
3-hidroxipiridina	278	3,60	304	3,63	284	3,81
					238	4,00
2-hidroxipiridina	297	3,80	295	3,80	295	3,76
	227	4,00	230	4,00	225	3,84

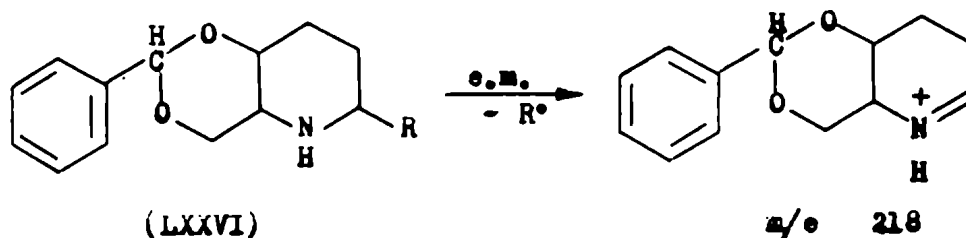
Los espectros de masa de los compuestos descriptos (LXX) a (LXXIV) indican que en las posiciones 2 y 6 están ubicados sustituyentes alquílicos, puesto que se observa la presencia de dos iones importantes: uno a m/e 130 cuya fórmula bruta determinada por alta resolución corresponde a $C_6H_{12}O_2N$ que se deslaza a m/e 144 en el compuesto (LXXIV). La diferencia corresponde a 14 unidades de masa, es decir a un grupo metileno como consecuencia de la presencia de un grupo N-metilo en lugar del grupo amino secundario. Se ha observado con anterioridad (125) que uno de los procesos más probables de fragmentación de piperidinas consiste en la eliminación de sustituyentes alquílicos en la posición α , vecina al nitrógeno básico. Por consiguiente la estructura más probable del ión de masa 130 es (LXXIV).



El segundo ión corresponde a un proceso de fragmentación enteramente similar en el que se aleja el grupo hidroximetílico situado en la posición α' con formación de un fragmento de Masa M-31. De lo anterior se deduce que en la cadena lateral de la prosopina (LXX) existe una función alcohol secundaria mientras que la preprosopina (LXXII) posee una función cetona.

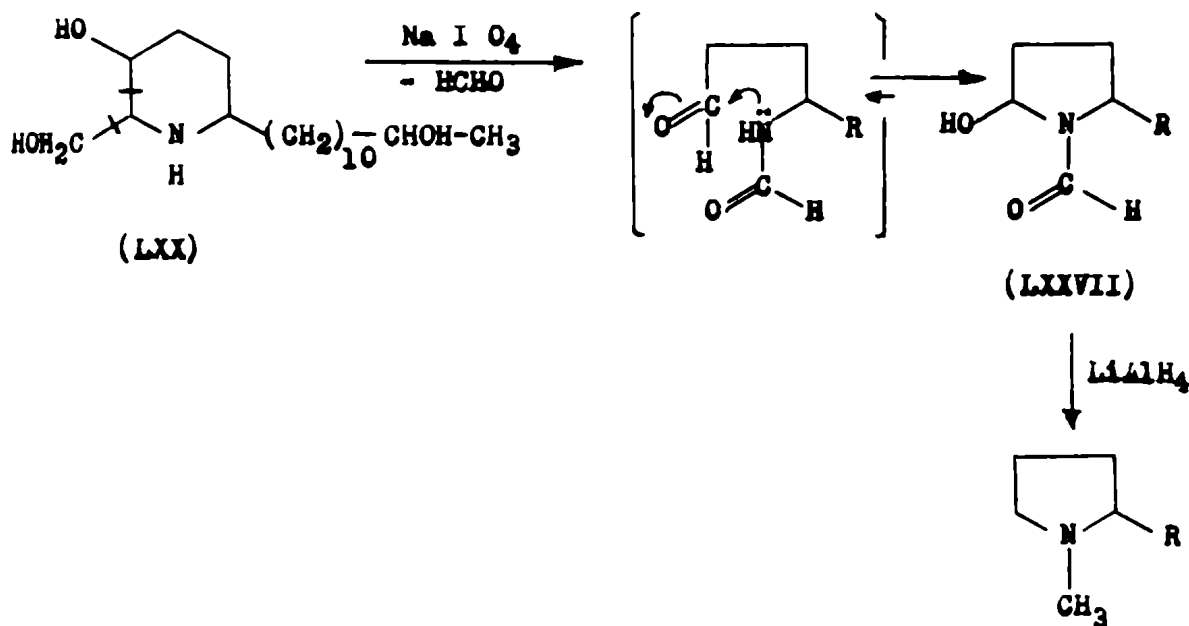
Los autores confirmaron la ubicación de la función alcohólica secundaria, situada en la posición 3 del núcleo heterocíclico, por medio de una reacción del aldehído benzóico con la desoxeprosopina (LXXIII) en la que intervienen los dos grupos hidroxilos de la misma para dar un compuesto cíclico (LXXVI). El espectro de masa de este derivado presenta un pico base a m/e 218 que se forma por el proceso habitual de fragmentación y eliminación de la cadena lateral más larga.





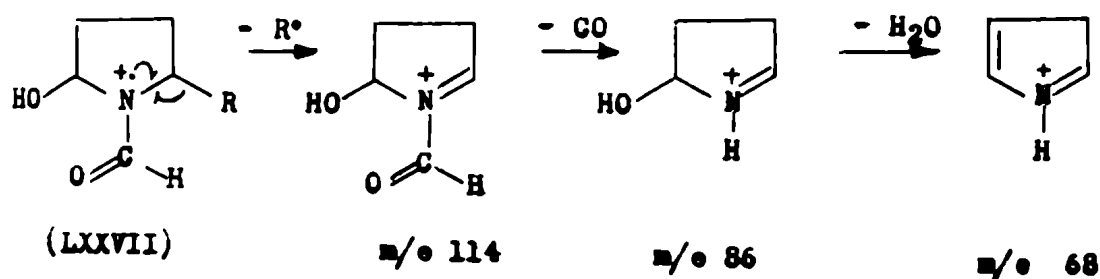
Este resultado indica además que el grupo alcohólico primario y el hidroxilo secundario están colocados probablemente en configuración relativa cis.

La oxidación de la prosopina (LXX) con periodato produce la ruptura de las uniones C-C situadas entre la función amina y las funciones alcohólicas. Goutarel et al. (16) han aislado un producto (LXXVII) que se forma por ciclación del intermediario formado en la reacción de apertura del ciclo piperidínico, además de formaldehído. La reacción puede interpretarse de la siguiente manera:



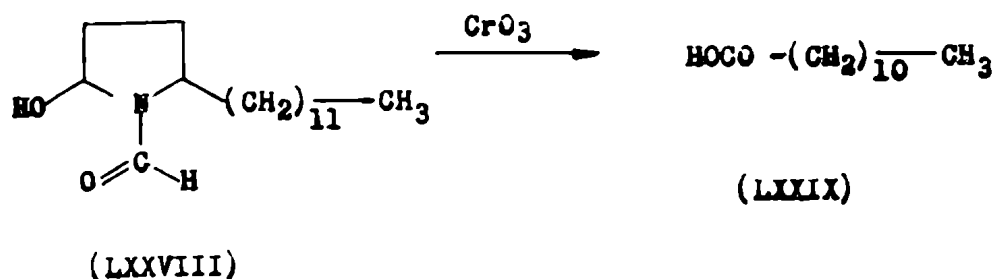
La proso-pinamida (LXXVII) presenta un espectro infrarrojo caracterizado por la presencia de una banda de amida terciaria a 1656 cm^{-1} mientras que en el espectro de resonancia magnética nuclear aparecen dos señales a $\delta = 8.43$ y 8.25 que corresponden a los dos rotámeros de la formamida (138). La reacción de (LXXVII) con hidruro de aluminio y litio produce un derivado N-metílico, que presenta un pico a $\delta = 2.29$ en el espectro r.m.n.

Goutarel ha examinado, también, el espectro de masa del compuesto (LXXVII) encontrando un ión de $m/e\ 114$ que se produce por eliminación de la cadena lateral y dos iones de $m/e\ 86$ y 68 que se forman sucesivamente a partir del anterior por eliminación de monóxido de carbono y agua.

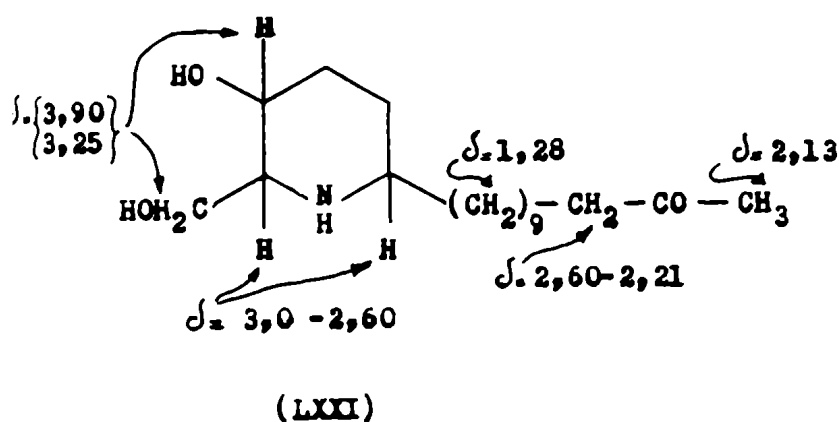


Si bien los ensayos precedentes ponen en evidencia la formación de la pirrolidina (LXXVII) resultante de la oxidación de la proso-pina con periodato, los autores no pudieron caracterizar al compuesto (LXXVII) ya sea por la formación de su correspondiente hidrazona, ni por reducción aplicando el método de Wolff-Kishner.

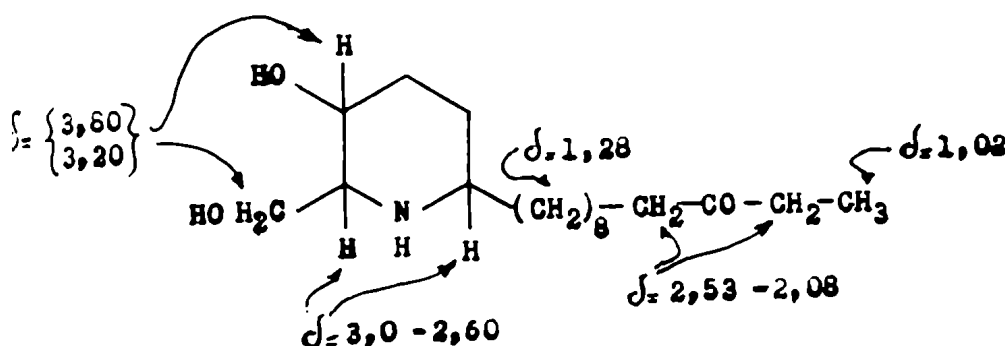
La confirmación de que la cadena lateral no es ramificada fué realizada por un procedimiento similar al utilizado por Highet e Highet (13) con la cassina. La oxidación crómica del compuesto (LXXVIII), obtenido a partir de la desoxoprosopinina (LXXIII) produjo ácido laúrico, $C_{12}H_{24}O_2$ (LXXIX).



La aparición de un pico a $\delta = 2.13$ en el espectro de resonancia magnética nuclear de la prosopinona (LXXI) establece la ubicación del grupo alcohólico secundario de la prosopina (LXX) puesto que esta señal corresponde a un grupo metilo de una metil cetona ($-CO-CH_3$). Como el grupo cetónico se originó por oxidación de la función alcohólica, esta última debe ubicarse en el carbono 11' de la cadena lateral. Corroborando este hecho se detecta la presencia de un solo grupo metileno en posición α respecto del carbonilo, el que aparece en el espectro entre $\delta = .60$ y 2.21.

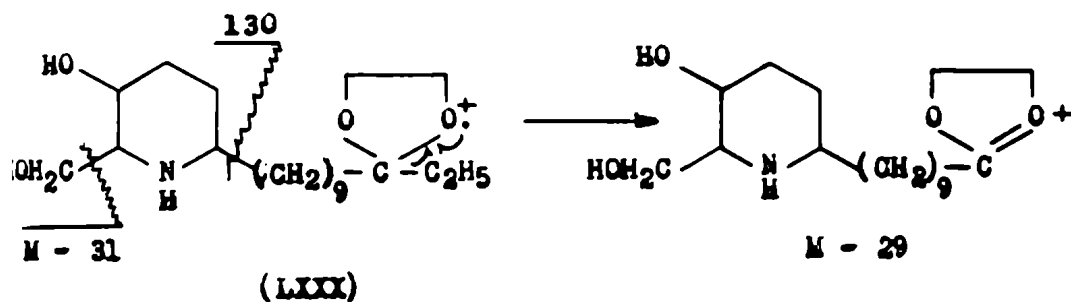


En el espectro de la prosopinina (LXXII) se observa que el grupo metilo terminal aparece bajo la forma de un triplete $\delta = 1.02$ con una constante de acoplamiento de 7 cps, juntamente con las señales que corresponden a dos grupos metileno en posición α del carbonilo ($\delta = 2.53-2.08$). Esto significa que en la terminación de la cadena lateral se encuentra un grupo etilo vecino a un grupo carbonilo situado en la posición 10'.

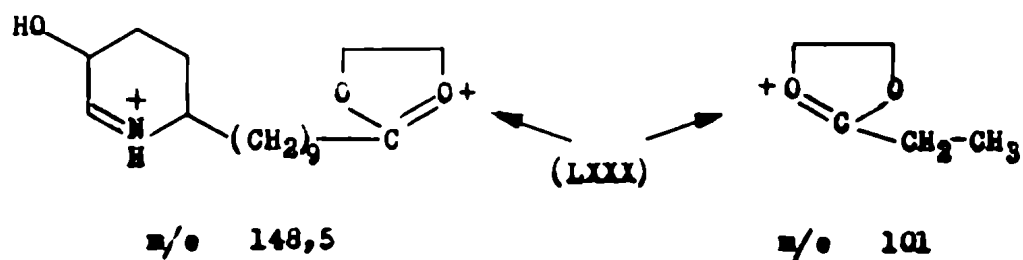


(LXXII)

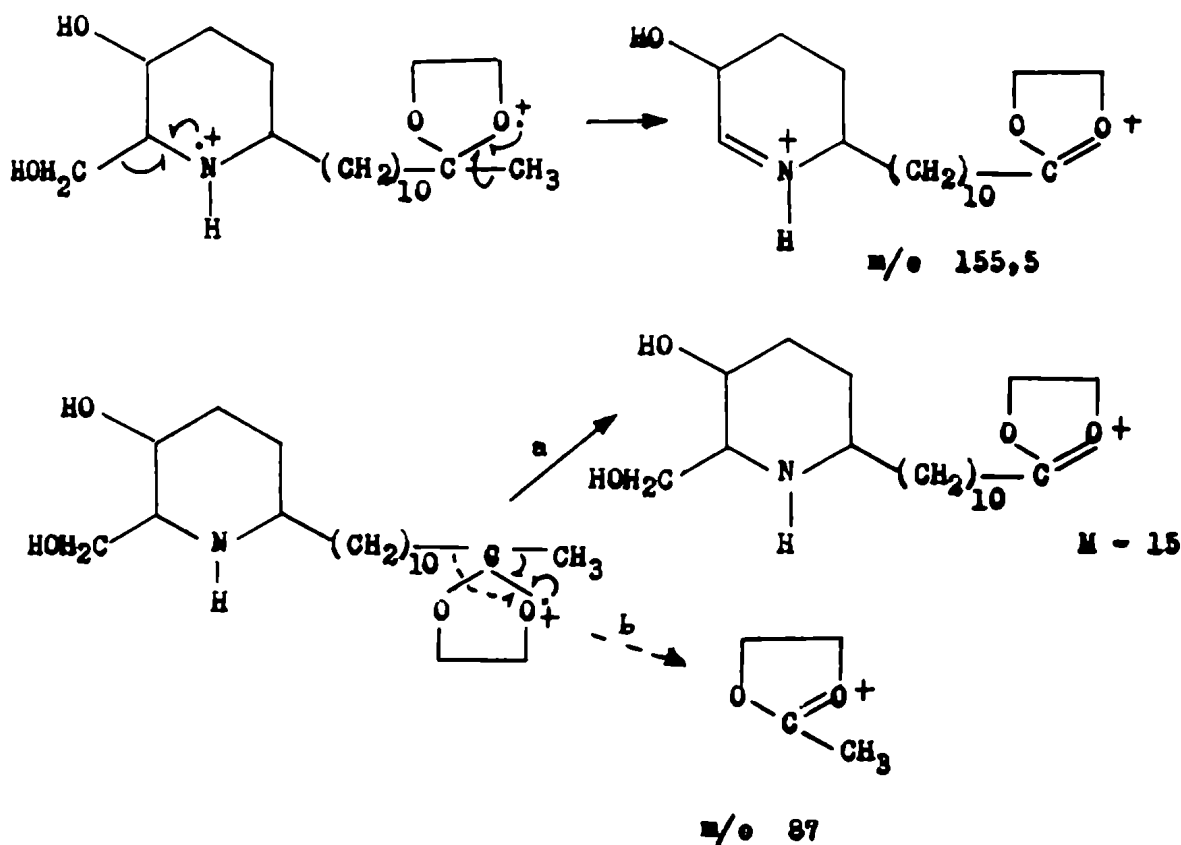
La aparición en el espectro de masa del acetal cíclico (LXXX) correspondiente a la prosopinina (LXXII) de iones positivos de masa $M - 29$ y m/e 101 y de un ión de doble carga positiva masa 148.5 establece que el grupo carbonilo de (LXXII) se encuentra ubicado en esa posición.



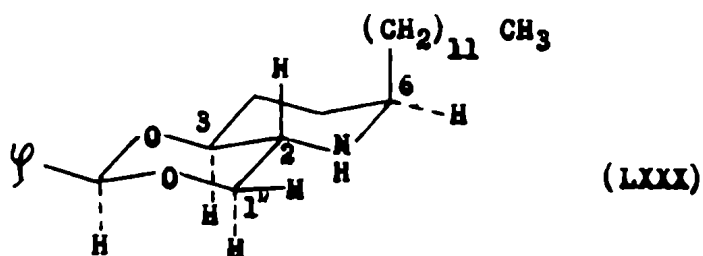
(LXXX)



En el espectro de masa del correspondiente acetal de la prosopinona (LXXI), sustancia que es isómera del alcaloide natural prosopinina, los mismos iones aparecen con masas $M-15$, m/e 87 y m/e 155.5, confirmando que la posición de la función alcohólica de la prosopina (LXX) es el C-11'.



Goutarel y colaboradores (170) establecieron la configuración relativa de la prosopina y de la prosopinina estudiando el espectro de R.M.N. a 220 MHz de la 0,0'-bencilidendesoxoprosopina (LXXX) que obtuvieron por ciclación del benzaldehído con la desoxoprosopinina que es el producto de la reducción de las funciones oxigenadas de las cadenas laterales de las bases mencionadas. En el sistema bicíclico formado (LXXX) con una configuración doble silla estable, se identificaron las señales y la orientación de los tres protones de los átomos de carbono sustituidos del núcleo piperidínico, que resultaron ser H2 axial, H3 axial y H6 ecuatorial.

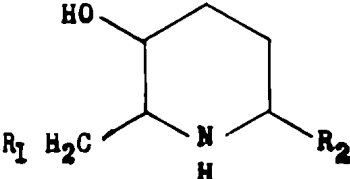


Protón	ppm	señal	acoplamiento con:
Ha -2	2,88	sextuplete	Ha -3 (J=10 Hz); Ha -1'' (J=10 Hz); Me -1'' (J=5 Hz)
Ha -3	3,30	sextuplete	Ha -2 (J=10 Hz); Ha -4 (J=10 Hz); Me -4 (J=5 Hz)
Me -6	2,78	maciso	ancho de media altura 18 Hz, orientación ecuat.

La unión trans de los ciclos y la orientación axial de la cadena lateral es indicativa de la conformación 2,3-trans y 1,2-anti, que es distinta a la de la cassina totalmente cis (14). La aplicación del método de desdoblamiento parcial de Horeau (171) a la función alcohólica secundaria del C3 de la prosopina y prosopinina y a la misma función del C11' de la 0-0'-bencilidenprosopina definió las respectivas conformaciones absolutas, 3S y 11'S,

por lo que la prosopina ha sido identificada como 2-(R)-hidroximetil-3-(S)-hidroxi-6-(R)-(11'-hidroxidodecil) piperidina y la prosopinina es 2-(R)-hidroximetil-3-(S)-hidroxi-6-(R)-(10'-ceto-dodecil)piperidina.

Continuando los estudios realizados con los alcaloides de Prosopis africana Guill. et Perr. Goutarel y colaboradores han aislado otros cinco nuevos alcaloides piperidínicos (172) las isoprosopininas A (LXXXI) y B (LXXXII) de la corteza y la prosopifillina (LXXXIII), la prosaffina (LXXXIV) y la prosafrinina (LXXXV) de las hojas de esta planta.

	R ₁	R ₂
	(LXXXI) OH	(CH ₂) ₆ -CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃
	(LXXXII) OH	(CH ₂) ₇ -CO-(CH ₂) ₃ -CH ₃
	(LXXXIII) OH	(CH ₂) ₉ -CO-CH ₂ -CH ₃
	(LXXXIV) H	(CH ₂) ₉ -CHOH-CH ₂ -CH ₃
	(LXXXV) H	(CH ₂) ₉ -CO-CH ₂ -CH ₃

Las estructuras de estos compuestos fueron establecidas (171) utilizando métodos espectroscópicos y reacciones similares a las indicadas para las dos bases inicialmente obtenidas de la Prosopis.

Las isoprosopininas A (LXXXI) y B (LXXXII) forman una mezcla homogénea que no pudo ser separada. A similitud con la prosopinina presentan en el espectro I.R. señales a 3400 cm⁻¹ (O-H, N-H) y a 1720 cm⁻¹ (C=O).

La reducción de la mezcla por el método de Wolff-Kishner conduce a un solo producto de fórmula C₁₈H₃₅O₂N idéntica a la

desoxoprosopinina con la misma configuración absoluta (2R,3S,6R). La posición del grupo carbonilo en las cadenas laterales fué determinada por la oxidación de Bayer-Villiger de la mezcla e identificando los dos ácidos volátiles producidos, el n-valérico y el caproico, por cromatografía gaseosa.

El espectro de masa de la prosofilina (LXXXIII) confirma que el compuesto de fórmula $C_{18}H_{31}O_3N$, ($M^+=313$) es una 2-hidroximetil piperidina, ($M-31$) y ($M-183=m/e 130$). La posición de la función cetona en C-10' evidente en el espectro i.r. a 1720 cm^{-1} , fué determinada a través del espectro de r.m.n. por la presencia del triplete del metilo terminal a $\delta = 1,07\text{ ppm}$ indicativo de la agrupación $CO-CH_2CH_3$.

La prosofilina fué sometida a las reacciones indicadas anteriormente para la prosopina y prosopinina y los resultados concuerdan con la estructura propuesta. Este alcaloide no presenta poder rotatorio a diferentes longitudes de onda y los estudios realizados para determinar su configuración absoluta indican que es un racémico.

La prosafrinina (LXXXV) es una 2-metil, 3-hidroxipiperidina que solo se diferencia de la cassina por la posición de la función cetona en la cadena lateral. El espectro de r.m.n. de la prosafrinina presenta el mismo triplete del metilo terminal a $\delta = 1,05$ que la prosofilina indicativo de la agrupación $CO-CH_2CH_3$ por lo que la oxidación se ubica en el C-10', mientras que en la cassina está ubicada en el C-11'.

La prosafrina (LXXXIV) también es una 2-metil-3hidroxipiperidina y se diferencia de la carnabalina por tener un grupo

hidroxilo secundario de la cadena lateral ubicado en el C-10' en
el C-11' lo cual quedó confirmado al obtener prosafrinina
por oxidación de la prosafrina.

La aplicación del método de Horeau (171) y las correla-
ciones establecidas entre los alcaloides de la Prosopis como así
también con la cassina, de configuración absoluta reconocida (14)
permitieron establecer las siguientes configuraciones absolutas
de estas bases:

Isoprosopinina A : 2-(R)-hidroximetil -3-(S)-hidroxi-6-(R)-
(7'-cetododecil) piperidina.

Isoprosopinina B : 2-(R)-hidroximetil -3-(S)-hidroxi-6-(R)-
(8'-cetododecil) piperidina.

Prosofillina : dl-2-hidroximetil -3-hidroxi -6-(10'-
cetododecil) piperidina.

Prosafrina : 2-(R)-metil -3-(R)-hidroxi -6-(S)-(10'-
hidroxidodecil) piperidina.

Prosafrinina : 2-(R)-metil -3-(R)-hidroxi -6-(S)-(10'-
cetododecil) piperidina.

CAPITULO IV

ALCALOIDES DE LA CASSIA CARNAVAL SPEG.

INTRODUCCION

La Cassia carnaval es la única especie arborecente de este género que se encuentra en la Argentina. Fué estudiada por N. G. Abiusso (5) conjuntamente con otras siete especies de nuestro país con el objeto de determinar el contenido de compuestos antracénicos y de antraquinonas en las mismas con vista a su utilización comercial. El carnaval solo presentó un pequeño porcentaje de estos compuestos en las distintas partes analizadas.

Un estudio preliminar realizado sobre muestras de cortezas de raíz y de tronco y hojas de Cassia carnaval recogidas en el mes de diciembre de 1964 en las cercanías de Río Blanco, Departamento de Orán, en la Provincia de Salta, permitió detectar, en el extracto de componentes básicos de las mismas, la presencia de alcaloides por medio de las reacciones típicas de caracterización (Reacción positiva con los reactivos de Mayer, Dragendorff, ácidos pícrico y silicotúngstico). Estos extractos básicos fueron obtenidos de acuerdo con las técnicas establecidas en: "Investigación Química de Vegetales" (142).

Dado que existía poco conocimiento con respecto al tipo de alcaloides presentes en el género Cassia y a que Hight (12) había aislado dos alcaloides, cassina y casselsina, de estructuras parcialmente establecidas, de la Cassia excelsa Schrad,

una planta estrechamente relacionada con la Cassia Carnaval Speg (1) se inició este trabajo con el objeto de aislar y estudiar los alcaloides de la segunda de las especies desde el punto de vista de su determinación estructural.

SEPARACION Y AISLAMIENTO DE LAS BASES

La obtención de los extractos básicos de las muestras arriba mencionadas se detalla en la parte experimental de este trabajo y se puede esquematizar generalizando de acuerdo con la siguiente secuencia:

Extracción de la muestra seca y molida con metanol — concentración de la solución metanólica — disolución acuosa ácida del concentrado — liberación de las bases por alcalinización — extracción de las bases con cloroformo — lavado y concentración del extracto clorofórmico por destilación del solvente.

Por cromatografía en placa delgada sobre sílica gel se encontró que la corteza de raíz y la corteza de tronco contienen una mezcla idéntica de alcaloides en proporciones bastante similares. El contenido en alcaloides brutos fué aproximadamente de 0,5% en peso sobre muestra seca y el alcaloide que se encontró en mayor abundancia fué la sagina que se halla acompañado de pequeñas cantidades de otros cinco o seis alcaloides. Las hojas presentan una mezcla de bases similar a las encontradas en las cortezas de tronco y de raíz, siendo también la sagina el componente principal y se diferencia de aquellas por tener una proporción apreciable de una nueva base piperidínica, a la que se le dió el nombre de carnavalina.

El procedimiento de purificación del extracto básico y de separación de sus componentes demandó una serie prolongada de cromatografías en columna de sílica gel, las cuales se describen en la parte experimental.

Las características de las bases determinaron que las mismas no pudieran ser cristalizadas de ningún solvente. Su purificación se logró por cristalización como sales (clorhidratos) y/o por destilación a alto vacío.

El alcaloide principal de la Cassia carnaval Speg se identificó como cassina, por comparación de los datos obtenidos al estudiar este compuesto con aquellos publicados por Hight(12), quien encontró este alcaloide en la Cassia excelsa Schrad. El clorhidrato cristaliza de isopropanol y se puede purificar por sublimación al vacío; tiene un p.f. de 169,5 - 170,5 °C.

La base libre destila al vacío dando un sólido blanco de p.f. 55 - 57 °C.

La carnavalina fué aislada bajo la forma de clorhidrato de p.f. 154 - 155 °C. La base liberada por alcalinización resultó ser una sustancia relativamente volátil, que por destilación al vacío dió un sólido blanco de p.f.: 60,5 - 61 °C.

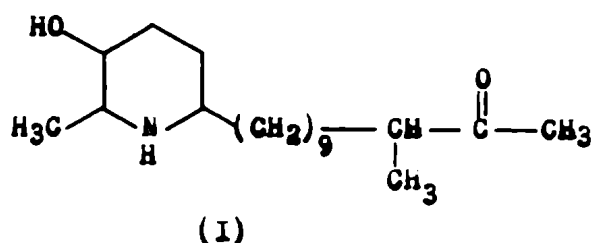
Al realizar la separación de las bases por cromatografía en sílica gel (Columna), se obtuvo una fracción que contenía una mezcla de tres bases y de la cual se precipitó el clorhidrato de un alcaloide que se denominó Base III, p.f. 139,5 - 141 °C, para la cual se postula la estructura que corresponde a la prosonina, producto que Goutarel y sus colaboradores obtuvieron por oxidación de la prosonina (16), alcaloide que aislaron de la Prosonia africana.

Se encontraron trazas de homólogos de carnavalina y de Base III.

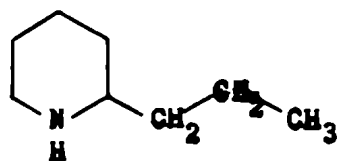
Finalmente se aisló un cuarto alcaloide, Base IV, por repetidas cromatografías en columna y aunque se obtuvo como un compuesto cromatográficamente puro (placa delgada) no se pudo cristalizar. De esta base se estudiaron sus características espectroscópicas tal como se describe mas adelante en este mismo capítulo.

ESTUDIOS REALIZADOS CON LA CASSINA

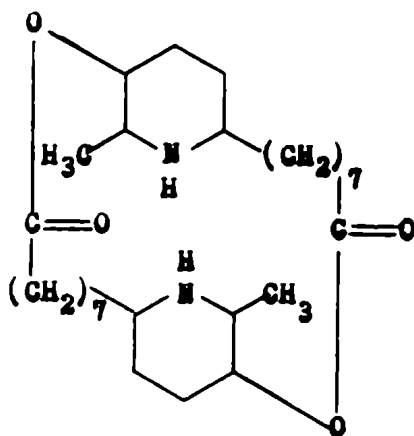
La abundancia relativa de cassina en las hojas de Cassia carnaval Speg. indujo a examinar sus propiedades en función de la estructura inicialmente propuesta por Highet (12). En especial, se decidió estudiar a la base por métodos físicos tanto más que Highet describió en su trabajo original (12) la determinación de un espectro de masa que no correspondía con la fórmula molecular propuesta (I).



En esta estructura se presenta una sola ramificación en una cadena carbonada de 13 átomos de carbono. Se ha descrito en el Capítulo II de esta tesis los tres caminos mas importantes de biogénesis de alcaloides piperidínicos. La estrecha relación estructural que guardan los alcaloides de la cicuta (por ejemplo, conhidrina (II)) y la carnalina (III) con la fórmula de Highet para la cassina (I) induce a pensar que el modo de formación en las plantas puede ser similar para estos tres alcaloides.



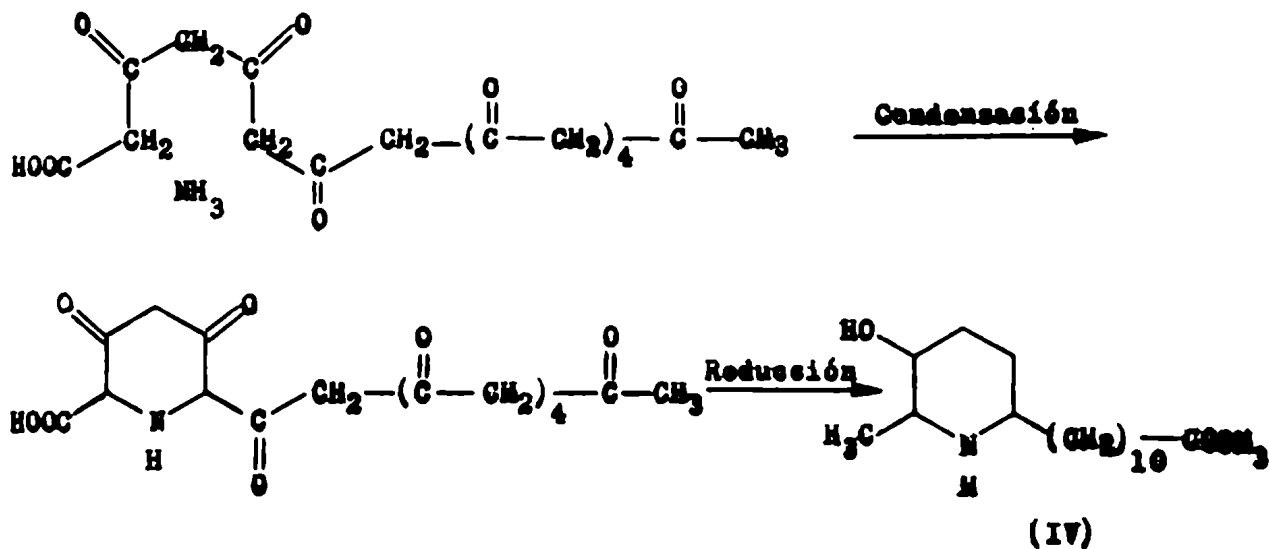
(II)



(III)

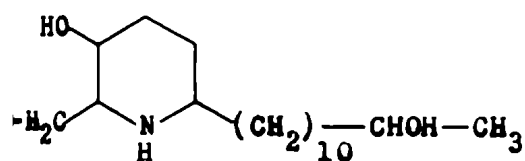
Aunque la aparición de una única ramificación en la cadena carbonada de la cassina (I) puede deberse a la intervención de una molécula de ácido mevalónico o sus equivalentes en el proceso de biogénesis e la participación en el mismo de un agente metilante, los datos químicos de Highet en apoyo de la estructura anterior no eran suficientemente concluyentes.

Parece más probable que la biogénesis de la cassina sea más simple y corresponda a la ciclación de un ácido poli-β-aminónico con una molécula de amoníaco o sus equivalentes.

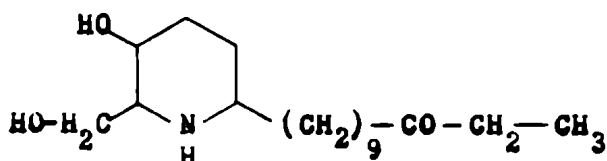


(IV)

Este esquema pone en evidencia la estrecha relación de la cassina (IV) con las bases aisladas por Goutarel y colaboradores (16) de la Prosonis africana de donde se ha obtenido también cassina (139). En la prosonina (V) y prosonina (VI) parece un grupo hidroximetílico en la posición 2 lo que podría estar de acuerdo con el mecanismo de biogénesis a partir de un ácido poli- β -cetónico. Una evidencia de tipo similar sirve para proponer más adelante en esta tesis una estructura probable para la Base III aislada de Cassia carnaval.



(V)



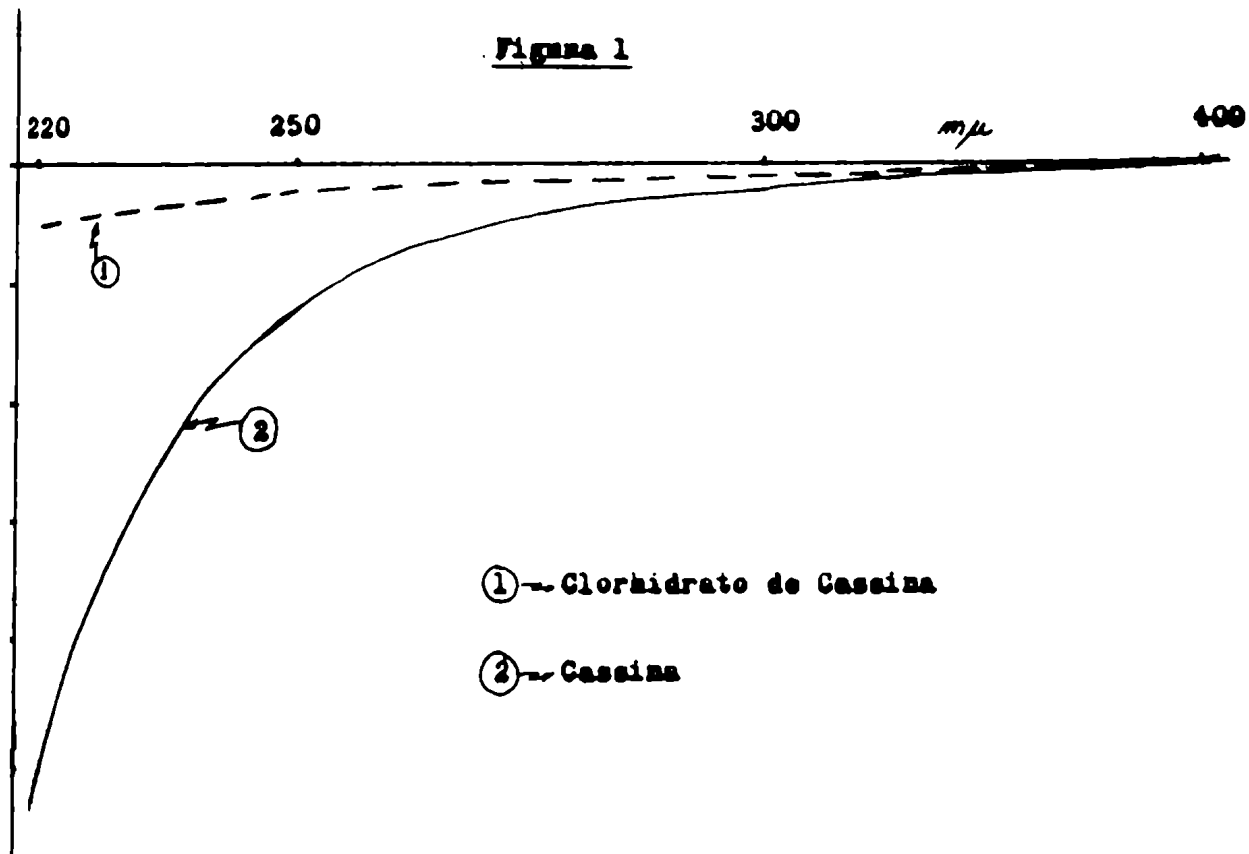
(VI)

En base a lo arriba expuesto y a los datos experimentales que se presentan a continuación se propuso (15) la fórmula V) que representa más adecuadamente la estructura de la cassina, en forma independiente de los trabajos de Highet y Highet (13) y de Rice y Coke (14) que se describen en el capítulo III de esta disertación.

En primer lugar se estudió la curva de dispersión rotatoria de la cassina puesto que la presencia de un centro asimétrico en la vecindad de un cromóforo ópticamente inactivo - como el carbonilo - podía inducir la aparición de efectos anómalos en la misma.

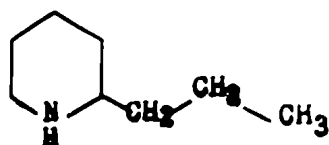
Djerassi y colaboradores (140) han encontrado que la forma de las curvas de dispersión rotatoria de compuestos carbonos alifáticos depende de la distancia del centro asimétrico al grupo cetónico. En los mismos las curvas tienden a adquirir un carácter crecientemente normal o simple sin ningún efecto apreciable cuando la distancia que separa a ambos grupos es por lo menos dos átomos de carbono.

Hight encontró originalmente que el clorhidrato de Cassina presenta en el espectro ultravioleta un máximo muy débil a $212\text{ m}\mu$ (12) que debe corresponder a la transición $n \rightarrow \pi^*$ emitida del carbonilo. No obstante este dato la curva de dispersión rotatoria (Fig. 1) de la cassina es simple y de signo

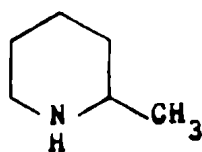


tivo descendiendo en forma acentuada por debajo de los 250 $m\mu$.
) significa que la transición electrónica del carbonilo a
 $m\mu$ no es ópticamente activa; por carecer el grupo cetónico
 de una vecindad asimétrica muy próxima como para inducir la apa-
 rición de un efecto Cotton. Por lo tanto, la curva representa-
 da en la Fig. 1 constituye una evidencia en favor de la estruc-
 tura no ramificada (IV), de la cadena lateral.

Los centros asimétricos de la molécula se hallan en
 la vecindad del grupo amino, segundo cromóforo importante en la
 estructura. Craig (141) ha publicado datos de dispersión rota-
 toria de algunos alcaloides piperidínicos monosustituídos y ha
 observado en el caso de la D-conina (VII) y 2-metilpiperidina
 (VIII) que el máximo incipiente que se observa por debajo de
 250 $m\mu$ puede asociarse con la banda de absorción próxima a 200 $m\mu$
 atribuible a una transición del par de electrones no compartidos
 del átomo de nitrógeno. Esto queda corroborado en la curva de
 dispersión rotatoria del alohidrato de cassina que se presenta
 una curva muy plana (Fig. 1) lo que demuestra además la inacti-
 vidad óptica de la transición $n \rightarrow \pi^*$ del carbonilo que no puede
 estar enmascarada en este caso por la segunda transición indi-



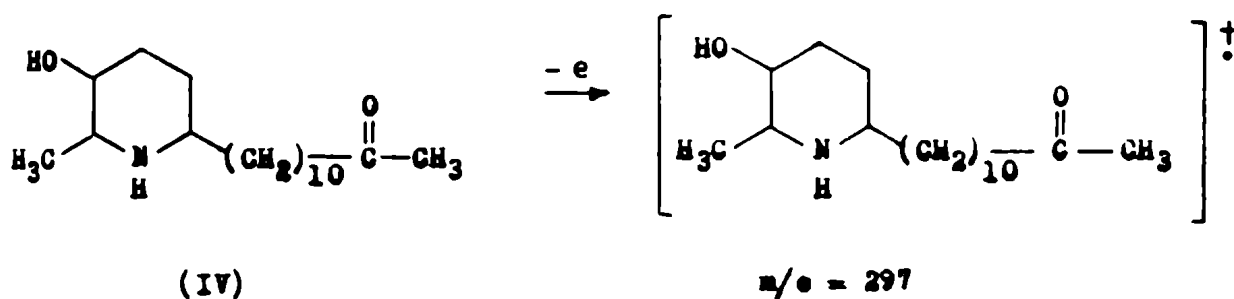
(VII)



(VIII)

La espectrometría de masa ha sido de gran utilidad en la elucidación de las estructuras de los alcaloides del carnaval debido a la volatilidad satisfactoria de las bases libres.

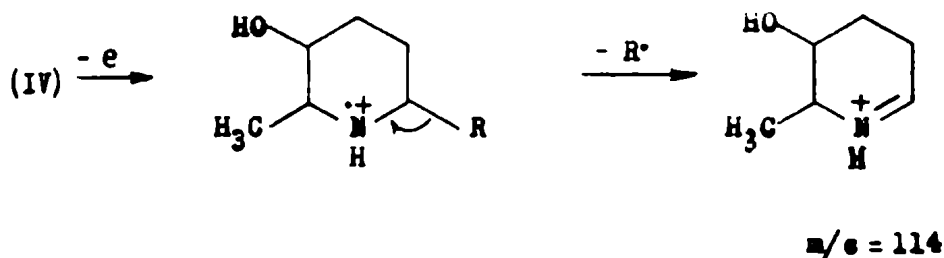
El espectro de masa de la cassina (IV) se aprecia como ión molecular al pico de m/e 297, que aparece con una intensidad relativa, respecto del ión base de m/e 114, de aproximadamente 2% y que corresponde a la fórmula molecular correcta $C_{18}H_{35}NO_2$.



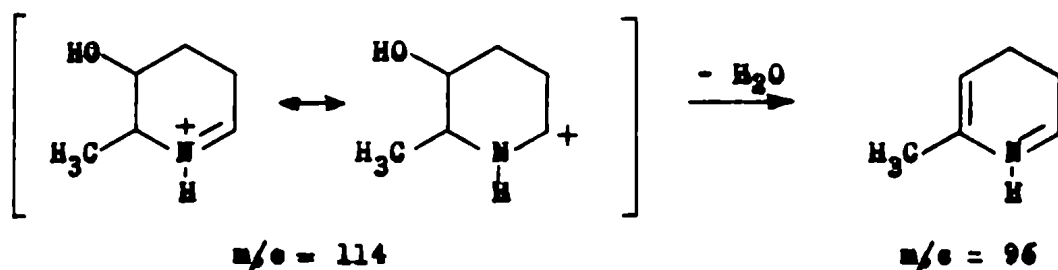
El ión molecular se forma durante el bombardeo electrónico de la molécula por pérdida de un electrón. En la cassina hay tres heteroátomos que pueden estabilizar fácilmente la carga positiva y de ellos el átomo de nitrógeno es el que le puede hacer mas eficientemente (143). De ahí que las características principales del espectro de masa se encuentran determinadas por los modos de estabilización de la carga positiva del átomo de nitrógeno.

La ruptura hemolítica de una unión α/β con respecto al átomo de nitrógeno es el camino favorecido que permite la estabilización de la carga positiva, con la consecuente separación de un radical libre. Se ha encontrado que prevalece en estos casos la separación del radical más grande (143, 147).

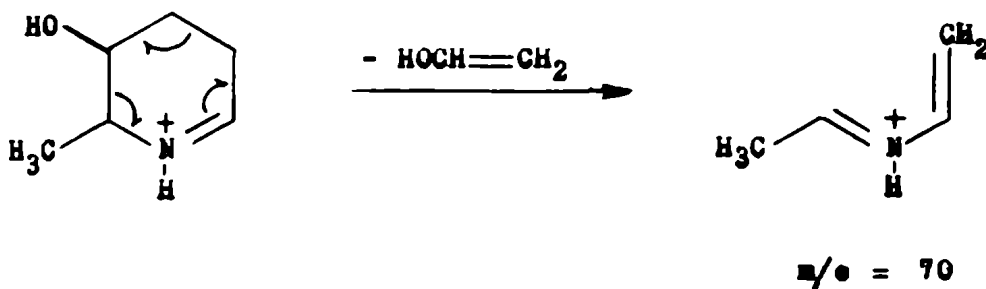
En el espectro de masa de la cassina se verifican estas hipótesis como se ve en el siguiente esquema de formación del ión base del espectro de m/e 114.



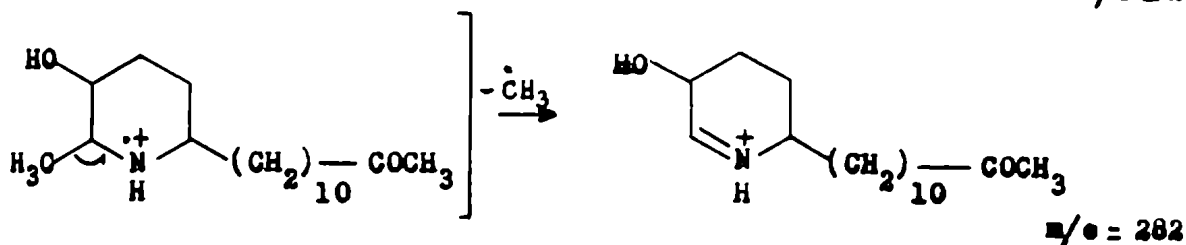
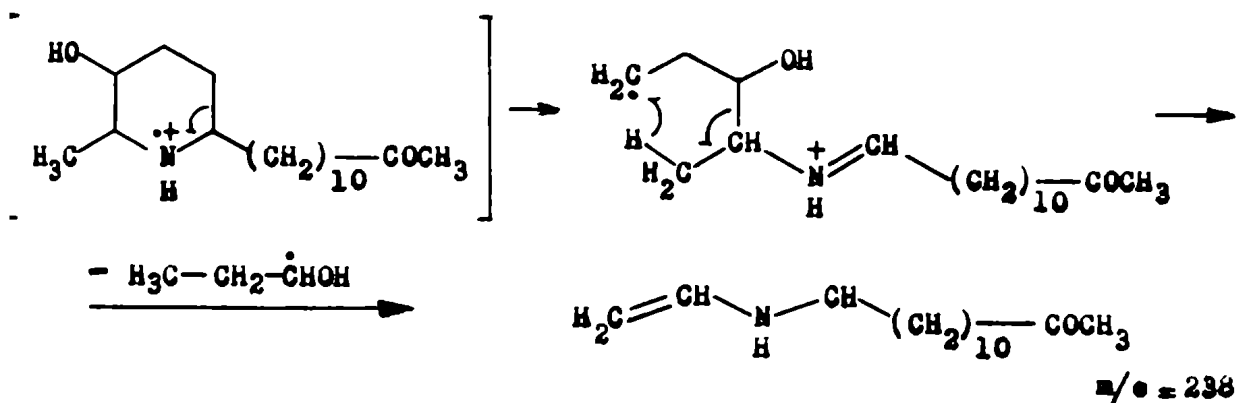
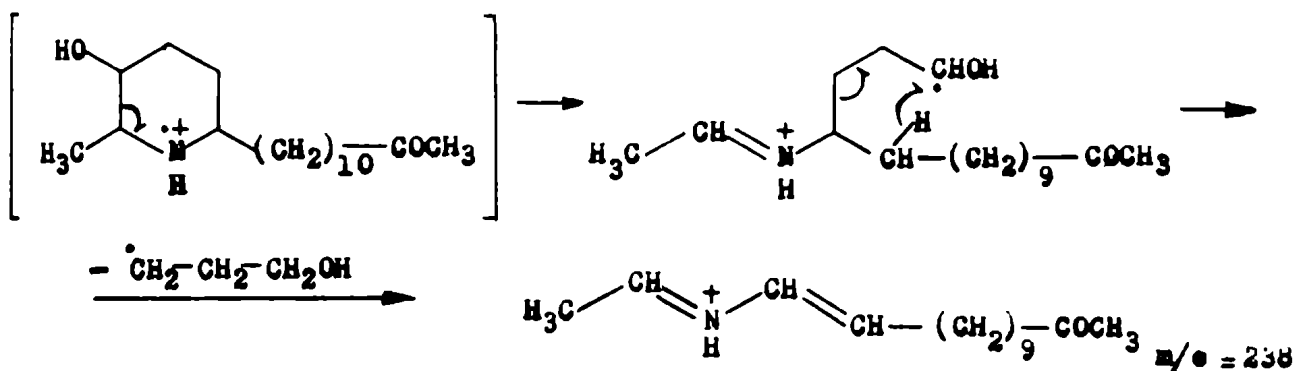
Este ión ha sido descrito en el espectro de masa del arpanodiol por Spiteller (107) quien atribuyó su intensidad a la posibilidad de distribuir la carga en dos estructuras mesómeras. Este ión a su vez pierde agua para formar un ión de masa 96, con una intensidad de 7.4%, lo cual queda confirmado en el espectro de masa de la cassina por la presencia de un pico metastable a $m/e = 80,7$ ($m^* = 96^2/114$).



El ión base de m/e 114 también puede dar origen a un ión de masa 70 que aparece con una abundancia considerable, 6,3%. Este mismo ión se forma en el espectro de masa de la 2,6-dimetilperidina a partir de un ión análogo al de m/e 114, habiéndose postulado un mecanismo de fragmentación retro-Diels-Alder (143, 7).

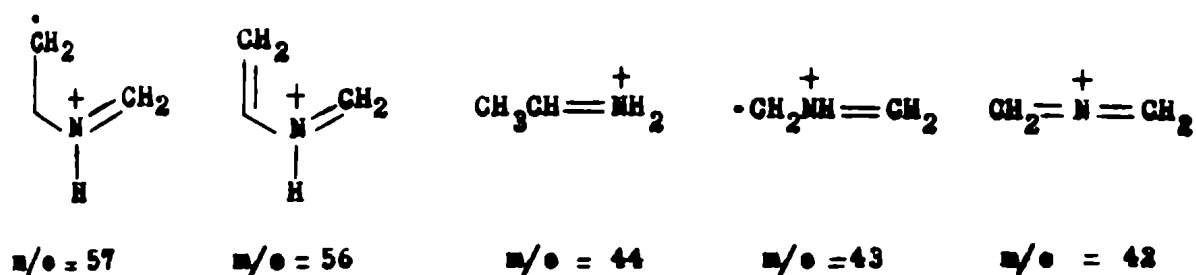


La ruptura de las restantes uniones carbono-carbono en posición α - β con respecto al átomo de nitrógeno, son en cambio menos favorables o probables y por esto aparecen con poca intensidad los iones de m/e 238 y $M-15$ (m/e 282); 2,46%, y 1,8% respectivamente.



El mecanismo de la formación del ión de m/e 238 fué postulado por Spitteller (107) para explicar la aparición de un ión análogo en el espectro del carpamodiol.

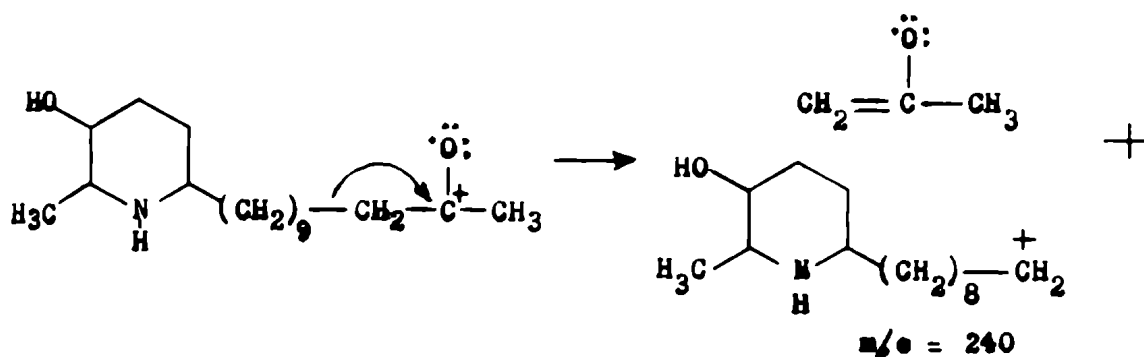
Otros iones nitrogenados que son característicos de la fragmentación de un núcleo piperidínico y que se presentan en el espectro de la sassina son los siguientes:



Los datos de espectrometría de masa presentados hasta el momento corroboran la información química que obtuvo Hight (12) en cuanto a que la sassina consta de un núcleo piperidínico, sustituido en tres posiciones, por un grupo alcoholico, un grupo etilo y un tercer sustituyente en posición α con respecto al átomo de nitrógeno. Además, establecen que el peso molecular del alcaloide que es 297 y que el tercer sustituyente tiene 183 unidades de masa.

Las características alifáticas de la molécula de la sassina evidenciadas en los espectros de infrarrojo y de resonancia nuclear magnética como así también la presencia del tercer grupo funcional, caracterizado como metil-cetona por espectroscopía (r.n.m.) y químicamente (12), se aclaran y ordenan en la molécula por la interpretación de los picos significativos en la zona de masas mayores del espectro de masa.

El ión de masa 240 aparece con una intensidad 8,14 % por lo que se destaca de todos los otros picos en esta zona del espectro y se forma por pérdida de un fragmento de 57 unidades de masa a partir del ión molecular, (M-57). Considerando la fórmula (IV) de la cassina se puede interpretar la formación del ión M-57 debido a la fragmentación de un ión molecular producido por eliminación de un electrón π del grupo carbonilo.

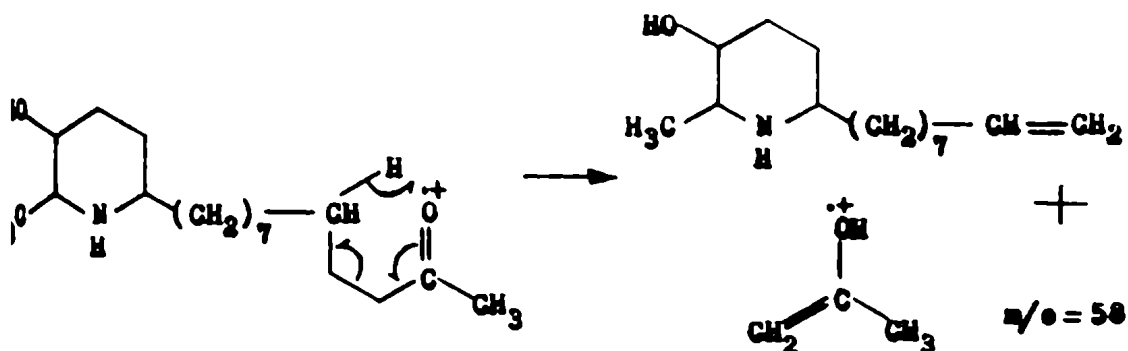


Esta reacción no ha sido descrita en la fragmentación de compuestos cetónicos, pero el mecanismo descrito ha sido utilizado para explicar la aparición y abundancia del ión M-43 en aldehídos alifáticos (143). La dificultad con que se tropieza en nuestro caso es explicar la estabilidad del ión formado utilizando los conceptos de mesomería o resonancia. En casos similares se ha postulado que la interacción a través del espacio de la carga formada con otros grupos funcionales puede explicar la formación y estabilidad de un ión como el de m/e 240 que posee la carga positiva sobre un carbono terminal de una cadena alifática (147).

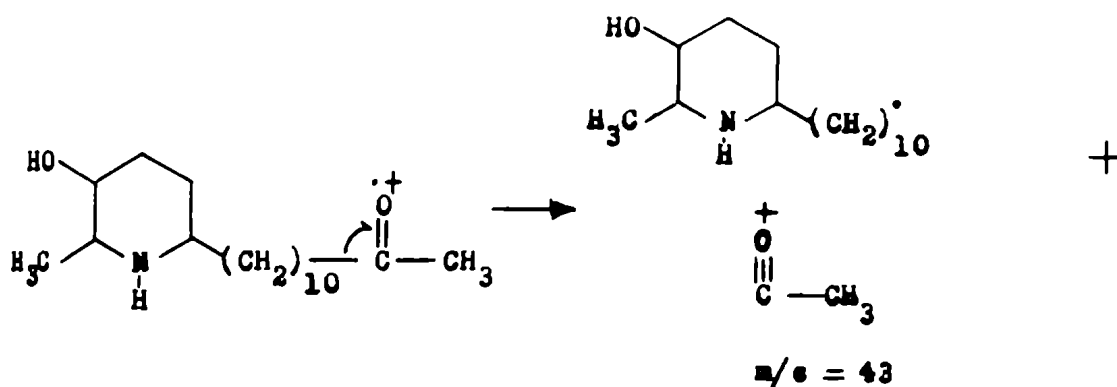
La separación del fragmento de masa 57 se debe exclusivamente a la presencia del grupo carbonilo en la molécula, ya

la reducción del grupo cetónico a un grupo alcohólico determina un cambio marcado en el espectro de masa, según se verá en la descripción del espectro de masa de la carnavalina. Esta hipótesis ha sido también confirmada por Highet al estudiar los espectros de masa de una serie de compuestos aislados de la *C. glauca* o de derivados de éstos (148).

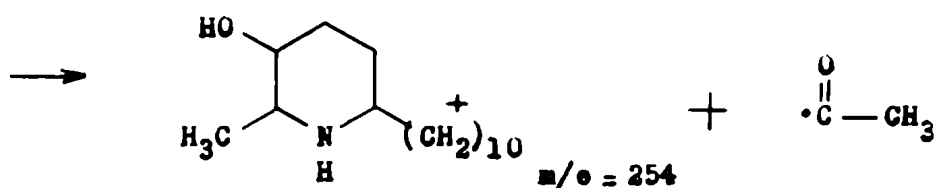
La fragmentación típica de las cetonas alifáticas se produce, cuando es posible por ruptura de la unión α/β con respecto al átomo de carbono carbonílico con la transposición de un átomo de hidrógeno de la posición γ . Esta transposición que se conoce como transposición de Mc Lafferty, ocurre en la cassina dando un ión de masa 58, que aparece con una intensidad de 100 respecto del ión base.



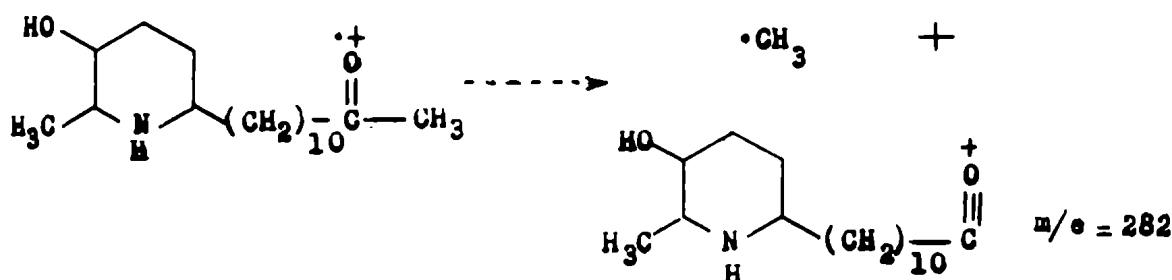
La ruptura α de los compuestos cetónicos se produce de manera que se separa un radical, preferiblemente el más grande, quedando el ión oxigenado con la carga positiva. De esta manera se forma un ión de apreciable intensidad a m/e 43, aunque no se puede establecer el porcentaje con exactitud debido a la presencia de iones nitrogenados de igual masa.



La fragmentación anterior se puede producir también de manera que la carga positiva quede sobre la cadena alifática, según se aprecia en el espectro de masa de la cassina por presencia de un ión de masa 254 (M-43) con una intensidad de 0,85%.

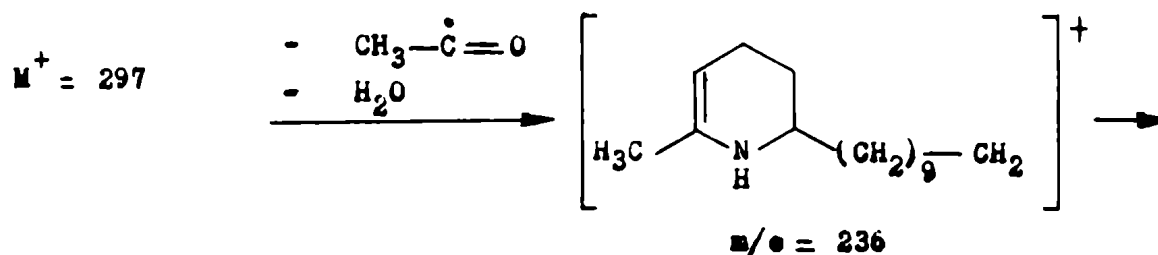


La ruptura de la otra unión α respecto del carbonilo es muy poco probable, y daría origen a un ión M-15 por pérdida de un radical metilo. En el espectro de la cassina aparece, como se ha mencionado arriba, el ión M-15 a m/e 282, pero se puede demostrar por comparación con los espectros de otros alcaloides que se describen más adelante, que la pérdida de metilo del núcleo es el principal contribuyente al ión M-15.

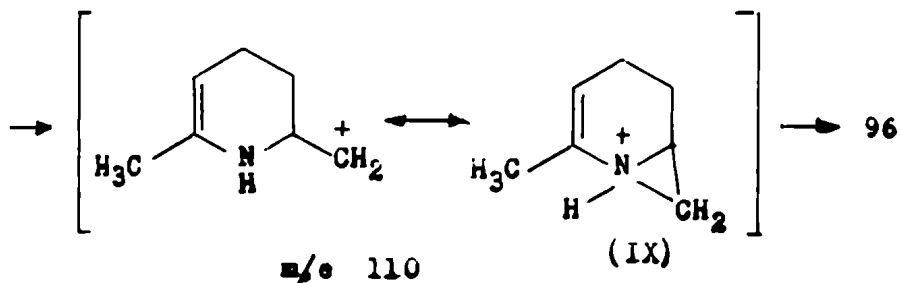


De acuerdo con lo expuesto, los picos de masa 240 y 58 contradicen la posibilidad de una ramificación de la cadena lateral de la cassina en posición α con respecto al grupo carbonilo, como se sugería en la fórmula originalmente propuesta para este alcaloide (I). Una ramificación como la indicada daría origen a picos de abundancia significativa a m/e 226 y 72, que no aparecen en el espectro de la cassina.

La cadena lineal de metilenos se pone de manifiesto por una serie de picos separados por 14 unidades de masa que se extiende de m/e 240 hasta m/e 114 (240, 226, 212, 198, 184, 170, 156, 142, 128) que se presentan con intensidades del orden o menores a 1%. Además de esta serie de picos aparecen otras dos, en las cuales los picos también se encuentran separados por 14 unidades de masa y las series se encuentran separadas entre sí por dos unidades de masa. Ambas se presentan con intensidades del orden de 1% o menor y se extienden desde m/e 238 y m/e 236 hasta m/e 112 y 110 respectivamente. La última serie está formada por iones en los cuales se ha producido una deshidratación del núcleo piperidínico y cuya cadena lateral, a similitud con la primera serie descrita, consta de fragmentos con número variable de metilenos. Es de interés mencionar que los picos de esta serie son los de mayor intensidad relativa en el espectro de 10 e.v.



m/e 236 → (222, 208, 194, 180, 166, 152, 138, 124) →



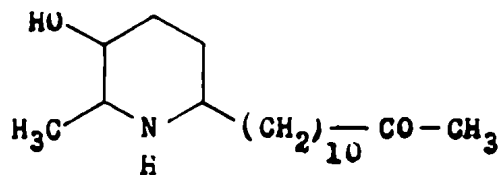
El pico de m/e 110 también se forma en el espectro de masa de la isopelleterina (125) y ha sido representado por la estructura (IX).

La otra serie indicada, entre m/e 238 y m/e 112, probablemente se diferencia de la normal, entre m/e 240 y m/e 114, en que por un reordenamiento se ha perdido una molécula de hidrógeno.

La pérdida de agua se confirma con claridad en el espectro por la presencia de picos metaestables que aparecen por ejemplo: a m/e 261,5 originado en el ión molecular M^+ , $\frac{(279)^2}{297} = 261,5$; a m/e 247 originado por el ión $M-15$, $\frac{(264)^2}{282} = 247$; m/e 205,5 originado por el ión $M-57$, $\frac{(222)^2}{240} = 202,5$; y a m/e 114,7 que, como ya ha sido mencionado, se origina del ión base de m/e 114, $\frac{(96)^2}{114} = 80,7$.

El grupo hidroxilo se hace evidente además por la presencia de picos característicos de compuestos alcohólicos como M-1, pérdida de hidrógeno, y M-17 pérdida de hidroxilo que inducen a iones de masa 296 y 280 con intensidades de 0,9% y 42% respectivamente.

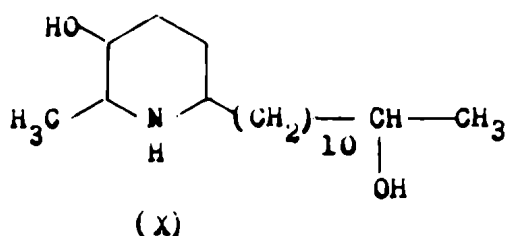
La información obtenida de las curvas de dispersión rotatoria, del espectro de masa, complementada con aquella obtenida por los espectros de resonancia nuclear magnética e infrarrojo permitieron postular la fórmula correcta (IV) de la cassina (15).



(IV)

ESTRUCTURA DE LA CARNAVALINA

La carnavalina (X) es un alcaloide piperidínico nuevo similar a la cassina que se separó de los componentes básicos de la C. carnaval por repetidas cromatografías en columna de sílica gel. El alcaloide se cristalizó como clorhidrato por precipitación parcial de una solución de la base en éter etílico anhidro con cloruro de hidrógeno gaseoso y seco. La base libre se purificó por destilación a alto vacío. Se preparó también un derivado triacetilado de la carnavalina que no pudo cristalizarse y se obtuvo como un aceite.



La estructura de este compuesto fué determinada en base a los datos obtenidos de los espectros infrarrojo, de resonancia magnética nuclear y de espectrometría de masa. La misma se confirmó por correlación química con el producto de reducción de la cassina con borohidruro de potasio (15).

El espectro infrarrojo de la carnavalina (X) es típico de una sustancia alifática con la excepción de la presencia de una banda ancha a 3330 cm^{-1} correspondiente a grupos amino y/o hidroxilo. A diferencia con la cassina no presenta absorción en el infrarrojo correspondiente a un grupo carbonilo.

el compuesto acetilado, desaparece la banda ancha a 3330 cm^{-1} parecen dos bandas carbonílicas intensas a 1740 cm^{-1} y a 1653 cm^{-1} además de una banda ancha e intensa a 1245 cm^{-1} , característica de grupos ésteres, lo cual demuestra la presencia de por lo menos dos grupos acetilables diferentes.

El espectro de resonancia nuclear magnética de la carnalina presenta a campo alto dos dobletes atribuibles a dos grupos metilos que en cada caso se encuentran acoplados a un protón y que están centrados a $\delta = 1,10$ ($J=5$ cps) y a $\delta = 1,19$ (5 cps). El primero corresponde a un grupo metilo unido al anillo piperidínico como en la cassina $\delta = 1,10$ ($J=6$ cps) y el segundo corresponde a un grupo metilo en posición α con respecto a un grupo alcohólico secundario como en el caso del 2-octanol, $\delta = 1,15$ ($J=6$ cps). Utilizando como referencia los 6 protones de los dos grupos metilos en la curva de integración, se establece un total de 37 protones en la molécula, de los cuales la mayor absorción, atribuible a los grupos metilenos alifáticos, se encuentran agrupados en el pico más intenso del espectro y que como en la cassina, aparece ubicado a $\delta = 1,28$. A $\delta = 2,53$ aparece un doblete ancho, atribuible a 3 protones activos, que se superpone a los multipletes que se extienden entre $\delta = 2,65$ y $\delta = 3,0$ de los protones en α al nitrógeno. La diferencia más apreciable en el espectro de la carnalina con respecto al de la cassina entre $\delta = 2,0$ y $\delta = 3,5$, es la ausencia del pico nítido en $\delta = 2,15$ que en la cassina corresponde a los protones del grupo metil cetona. El doblete ancho que aparece a $\delta = 3,6$ con un ancho de media altura

proximadamente igual a 7 cps, es característico y define a un hidrógeno ecuatorial unido a un átomo de carbono hidroxilado perteneciente a un ciclo de seis átomos, sustituido alifáticamente en posición alfa (131), correspondiente al pico a $\delta = 3,55$ en el espectro de la cassina. A continuación se observa un multiplete ancho centrado $\delta = 3,82$ que por integración corresponde a un protón atribuible al hidrógeno de un carbono hidroxilado secundario en una cadena alifática, que en el caso del 2-octanol se encuentra centrado a $\delta = 3,76$. No aparecen señales de resonancia de protones en campos mas bajos, lo cual confirma la ausencia de protones olefinicos o aldehídicos.

La posibilidad de complementar y substanciar la información obtenida con el espectro de resonancia magnética nuclear de la carnavalina, llevó a que se prepararan derivados acetilados de la base y de compuestos de referencia.

En la acetilcarnavalina se observa que las señales atribuidas a los átomos de hidrógeno de los carbonos hidroxilados se desplazan a campos mas bajos. Tanto el singulete ancho que se presenta a $\delta = 3,6$ en el espectro de resonancia magnética nuclear de la base, como el multiplete a $\delta = 3,82$ aparecen a $\delta = 4,89$. El paralelismo se encuentra para el primer caso en la cassina donde la señal a $\delta = 3,55$ se desplaza a $\delta = 4,9$ en el acetilderivado y para el segundo en el acetato del 2-octanol en el cual la señal a $\delta = 3,76$ se encuentra a $\delta = 4,88$.

En el espectro de resonancia nuclear de la acetilcarnavalina aparecen tres picos nítidos correspondientes a los hidró-

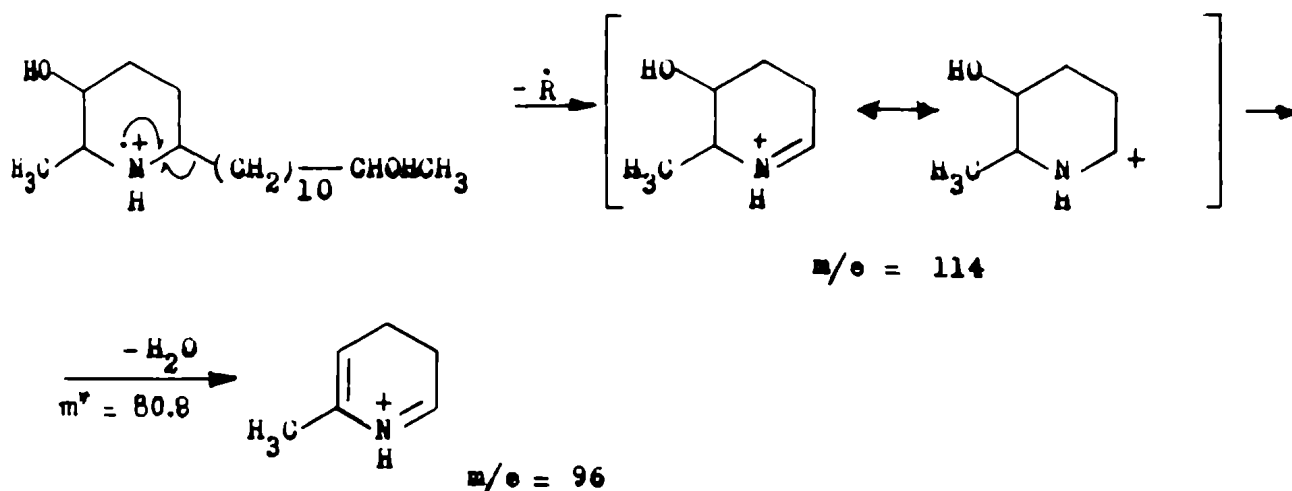
genos metílicos de los grupos acetilo a $\delta = 2.12, 2.07$ y 2.02 . La identificación de estas tres señales no es muy clara, pero se puede presumir que el pico a $\delta = 2.02$ corresponde a los hidrógenos del grupo acetato que esterifica el hidróxilo de la cadena lateral ya que la diacetilcassina presenta dos picos a $\delta = 2.12$ y 2.07 correspondientes a las acetilaciones del núcleo. Se realizaron espectros de otras sustancias O- y N-acetiladas, pero la relativa divergencia de valores no permite asignar con certeza cual de las señales corresponde a una u otra acetilación. El espectro de la acetilcarnavalina presenta además, el pico intenso de los metilenos alifáticos a $\delta = 1.28$ y desaparecen los dobletes de los dos grupos metilos debajo de la señal anterior.

De estos espectros se deduce claramente que la carnavalina posee una estructura alifática saturada con tres grupos acetilables, con un núcleo igual que el de la cassina y que se diferencia de esta última base por carecer del grupo carbonílico y tener en su lugar un grupo alcohólico. Esto queda corroborado por el espectro de masa.

El espectro de masa de la carnavalina presenta como ion base el de $m/e 114$ y que corresponde a la fórmula $C_6H_{12}NO$ por medición de alta resolución. El ion molecular aparece a $m/e 299$ e igualmente por una medición precisa se encontró que corresponde a la fórmula $C_{18}H_{37}NO_2$.

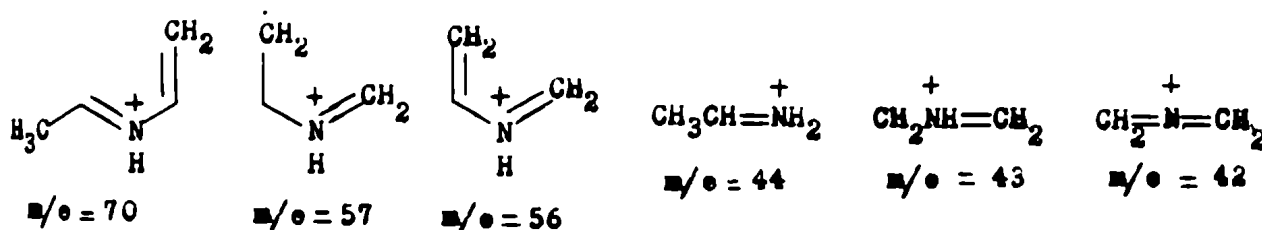
En líneas generales el diagrama de fragmentación del espectro de la carnavalina es muy similar al de la cassina. En la carnavalina (X) también se separa el sustituyente más grande

en posición α con respecto al átomo de nitrógeno del núcleo piperidínico para dar el ion base de m/e 114, estabilizado por resonancia.



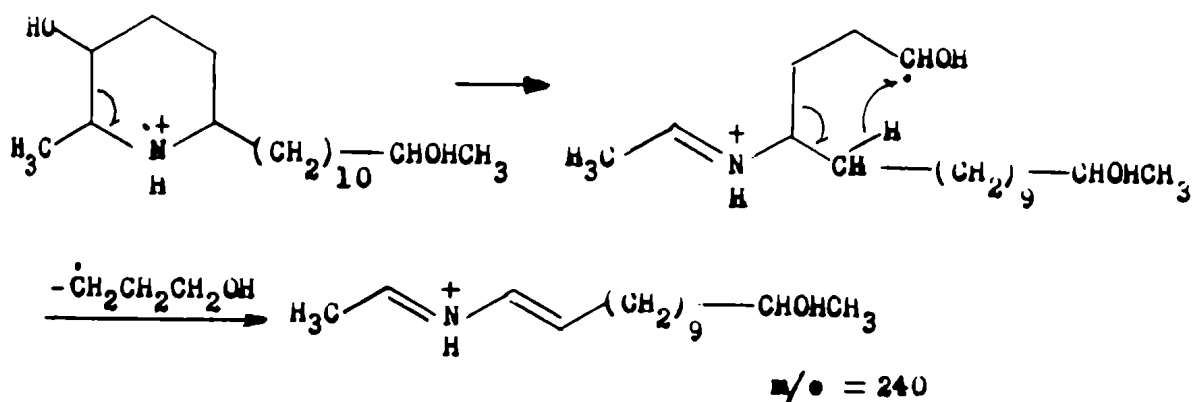
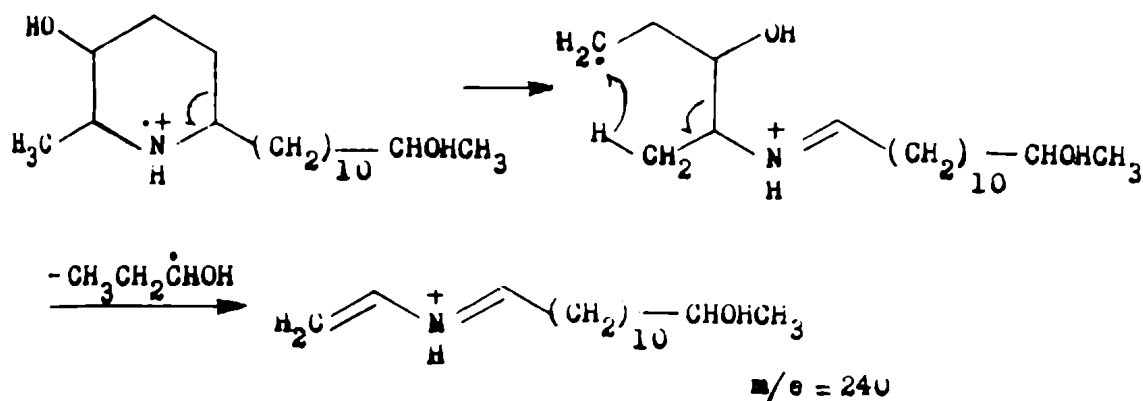
También como en la cassina se identifica el ion de masa 96, de apreciable abundancia relativa (8.45%), como producto de deshidratación del ion base, proceso que se confirma por la aparición de una señal "metaestable" a m/e 80.8 ($m^* = \frac{(96)^2}{114} \approx 80.8$).

Entre los fragmentos de masa pequeña aparecen los iones que contienen un átomo de nitrógeno, como ser:



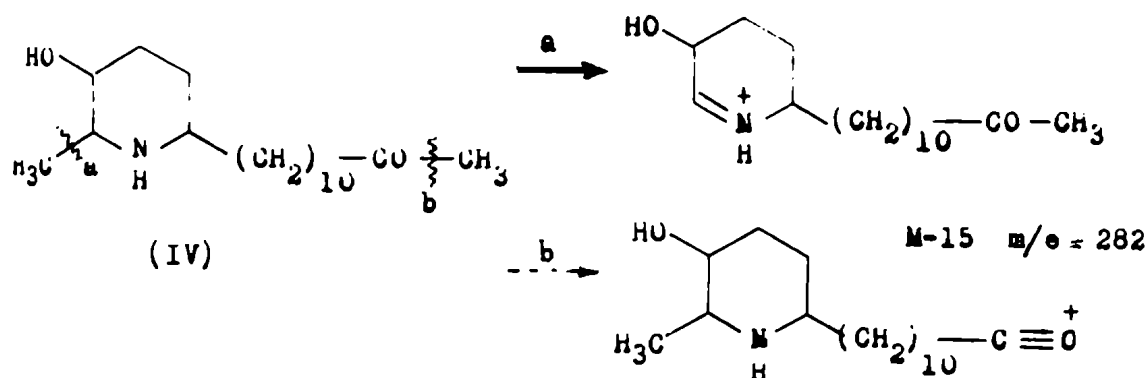
Un ion que sobresale entre estos (7.82%), es el de masa 70, que como se había visto en la descripción del espectro de masa de la cassina, corresponde a una apertura del núcleo piperidínico del tipo Retro-Diels-Alder. (143, 147).

La ruptura de las uniones α/β cíclicas, con respecto al átomo de nitrógeno, conducen a la formación de un ion radical, que se estabiliza perdiendo un radical de masa 59. En el espectro de la cassina este ion ($M-59=238$) aparece con una intensidad cercana del 2.5% y en este caso ($M-59=240$) aparece con una intensidad de 1.6% relativa al ion base.

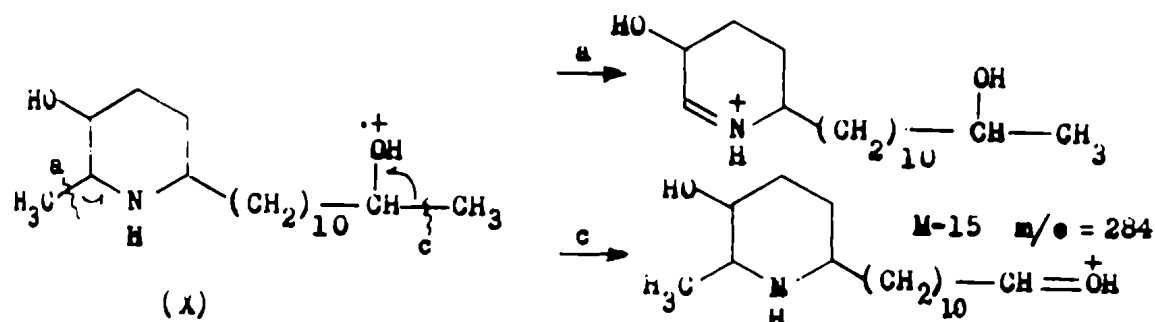


En el espectro de masa de la carnafalina el ion que aparece con mayor intensidad en la zona cercana al ion molecular es el M-15 (m/e 284) que se presenta con una intensidad de 3.36%. Como ya había visto al describir el espectro de masa de la cassina se ve el ion M-15, originado en la pérdida de un grupo metilo, podría ocurrir de dos maneras: la más favorecida a , por separación del metilo en α del núcleo piperidínico y la menos probable

b, pérdida del metilo carbonílico en el extremo de la cadena revelándose ambos en una señal de intensidad 1.81%.

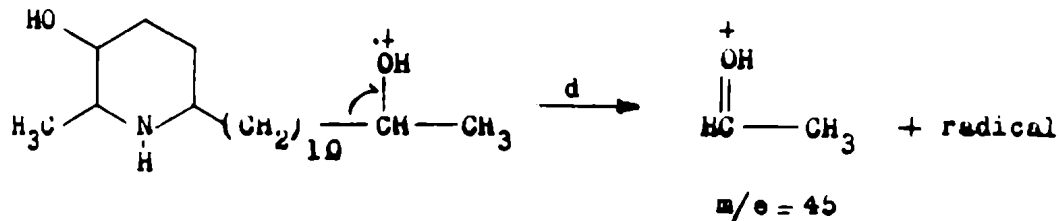


La mayor intensidad del pico M-15 en el espectro de la carnabalina es atribuible a una diferencia en la estructura de la cadena lateral, que conforma con las características de fragmentación de compuestos alcohólicos alifáticos en la que la carga positiva se estabiliza por formación de una unión oxonio y se ejemplifica en la fragmentación c.



Es una regla general de las fragmentaciones de este tipo, en las que hay sustituyentes de diferente tamaño en el átomo de carbono que lleva el heteroátomo, que se expela el sustituyente de mayor tamaño, pues el electrón del radical neutro puede estabilizarse más fácilmente en una cadena larga por las mejores posibilidades de reordenamiento o posterior descomposición (143). En la carnabalina se produce preferiblemente

la fragmentación d, evidenciada en un pico de intensidad 11.3% para el ion de masa 45.

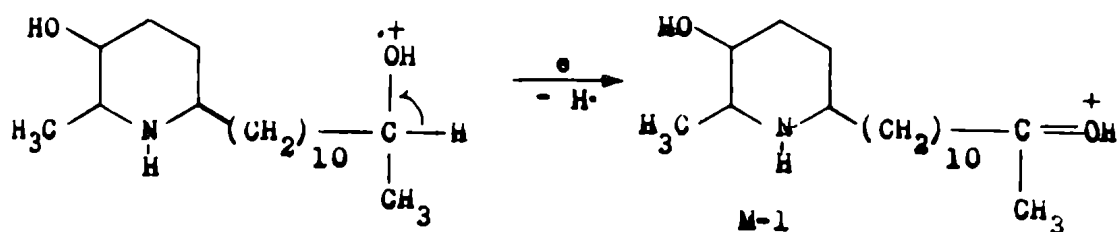


Se puede inferir que en el espectro de la carnavalina es importante la contribución del ion formado en la fragmentación d al pico de masa 45, porque en el espectro de la cassina la señal a m/e 45 se presenta con una intensidad menor de 2%.

La validez de la regla arriba mencionada puede ilustrarse quizás de un modo arbitrario, determinando la relación de las intensidades de los picos $M-15$ y m/e 45 dadas por las fragmentaciones g y d, para lo cual habría que restar las contribuciones que hacen a los mismos el resto de la molécula. Esto se puede lograr de una forma aproximada utilizando el espectro de la cassina como base por lo que la relación sería: $(3.36 - 1.81)$ dividido por $(11.3 - 1.93)$, lo cual da una relación de 1 a 7. Esta relación es compatible con la comprobada para las fragmentaciones del 2-butanol en la que la fragmentación d prevalece con respecto a la g en una proporción de 5 a 1 (143).

El grupo alcohólico de la cadena lateral puede dar origen a un tercer ion oxonio por pérdida del átomo de hidrógeno unido al átomo de carbono hidroxílico, con lo que contribuye a la intensidad del ion de masa 298 ($M-1$).

El ion (M-1) aparece en el espectro de la carnavalina con una intensidad doble a la del ion molecular M, a la inversa de lo que ocurre en la cassina cuyo pico M-1 es de menor intensidad que el ion molecular.

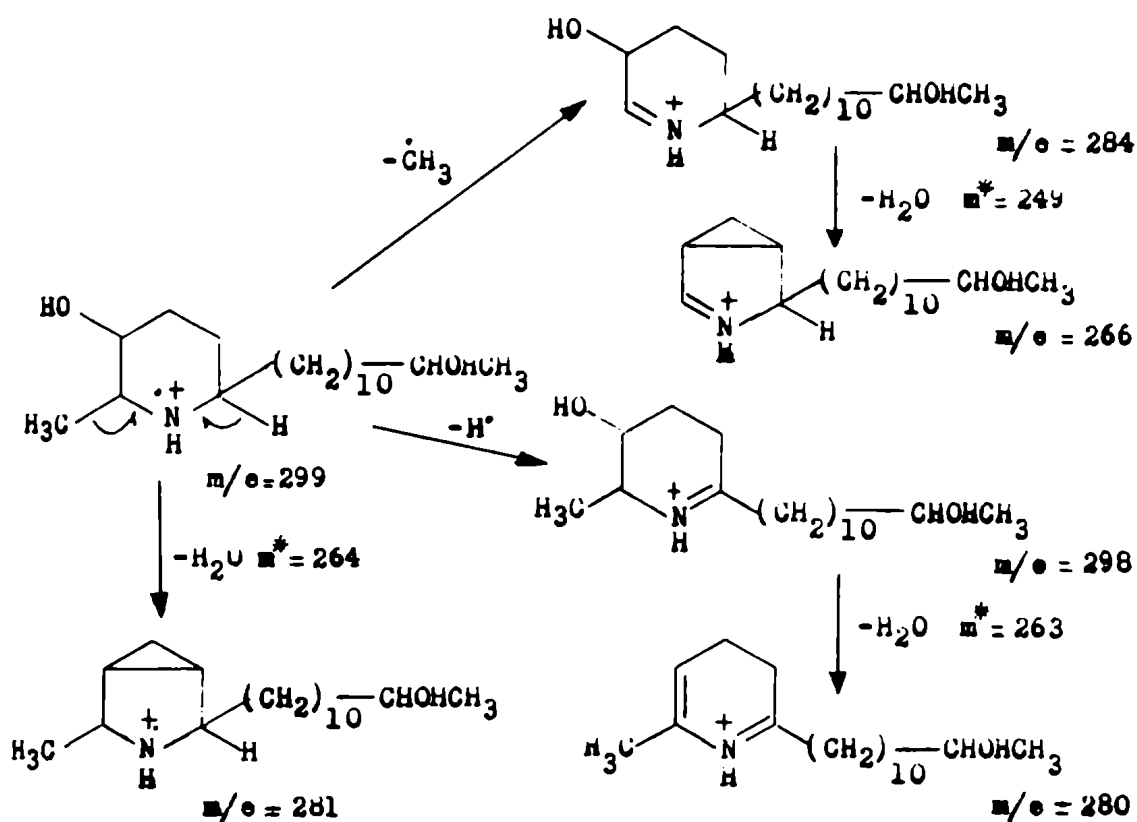


Sin embargo la contribución de la fragmentación β a la intensidad del ion M-1 es mínima, como ha sido demostrado en el ejemplo del 2-butanol citado anteriormente y que tiene una importancia del orden del 1% (143). De esto se desprende que el ion M-1, que tiene una intensidad del 0.9% tanto en el espectro de la cassina como en el de la carnavalina, se debe principalmente a la pérdida de los átomos de hidrógeno vecinos al nitrógeno del núcleo piperidínico. De ahí que puede utilizarse con cierta razón el espectro de la cassina como base al establecer la relación de preponderancias de las fragmentaciones β y γ arriba mencionadas. La menor intensidad del ion molecular de la carnavalina 0.53% respecto al de la cassina 1.98% es justificable en razón de la característica conocida de los alcoholes de dar iones moleculares muy bajos.

Una serie de picos metaestables presentes a m/e 264, 263 y 249 indican que se produce una pérdida de agua de los iones M^+ (m/e 299) $\left[m^* = \frac{(281)^2}{299} = 264 \right]$, M-1 (m/e 298)

$$[m^* = \frac{(280)^2}{298} = 263] \text{ y } M-15 (m/e 284) \left\{ m^* = \frac{(266)^2}{284} = 249 \right\},$$

o que es compatible con los procesos de fragmentación del núcleo, de la siguiente manera:

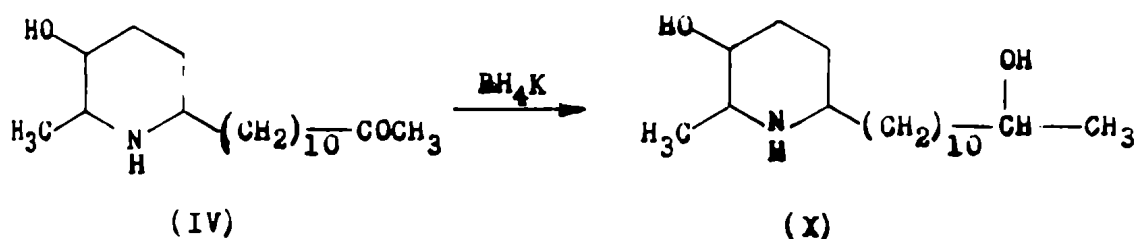


El resto del espectro, entre el ion molecular y el pibase de masa 114, presenta tres series de picos secundarios, intensidades menores de 1%, en los que los picos de cada serie se encuentran distanciados en 14 unidades de masa y las series están separadas entre sí por dos unidades de masa. La mayor de estas series se extiende desde m/e 254 hasta 114 e identifica la cadena lineal de 10 metilenos unidos al núcleo piperidínico tal como se había descripto en el espectro de la cassima.

a segunda serie se inicia dos m/e mas abajo o sea a 252 y se extiende hasta m/e 112 y probablemente corresponda a una serie que se diferencia de la anterior en la que por un reordenamiento se ha perdido una molécula de hidrógeno. La tercer serie se extiende desde m/e 236 hasta m/e 96 y que como se había visto en la cassina corresponde a los iones que contienen fragmentos de distinto número de metilenos en la cadena lateral y en la que el núcleo piperidínico se ha deshidratado.

La interpretación del espectro de masa de la carnalina (X) permite confirmar que la base tiene una fórmula $C_{18}H_{37}NO_2$, compuesta por un núcleo piperidínico sustituido por un grupo hidróxilo y en posiciones α por un metilo y una cadena alifática lineal en la que el segundo átomo de carbono a partir del extremo se encuentra sustituido por un grupo hidroxilo.

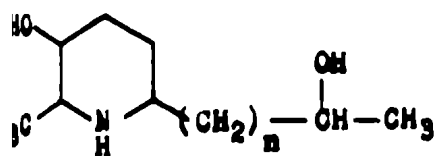
La confirmación química de la estructura del alcaloide se logró al obtener un compuesto idéntico por reducción del grupo carbonilo de la cassina (IV) con borohidruro de potasio en solución hidrometanólica.



El compuesto cristalino obtenido se identificó con la carnalina porque tanto la base sintética como la natural presentaron similares espectros infrarrojo y de resonancia

dear magnética además de los mismos R_f por comparación en autografía sobre placa delgada en distintos sistemas. La actividad persiste en los derivados triacetilados de estos compuestos. No se encontraron evidencias de la formación de una mezcla de diastereoisómeros. Este problema no puede resolverse hasta que no se obtengan pruebas sobre la estequímica del átomo de carbono carbinólico de la cadena lateral de la carnalina.

En uno de los espectros de masa efectuado con la técnica II se han observado picos de muy baja intensidad que responden a iones de masa mayor que el ion molecular de la carnalina, de los cuales se distinguen los de m/e 355, 340, 327, 326 y 312. Dadas las características de los alcaloides de la *Cassia carnaval* y la forma en que se efectuó su separación, es posible considerar que estos iones corresponden a bases de homólogos superiores en 2 y en 4 metilenos a la carnalina. El pico a m/e 355 se identifica con el ion molecular de una base de fórmula $C_{22}H_{45}NO_2$ para la cual el pico a m/e 340 responde al ion M-15 por pérdida de metilo. De la misma manera, el ion de m/e 327 corresponde a un compuesto de fórmula $C_{20}H_{41}NO_2$ y los de m/e 326 y 312 a los picos M-1 y M-15 de esta serie.



$n = 10$	Carnalinalina	$C_{18}H_{37}NO_2$
$n = 12$	Homólogo I	$C_{20}H_{41}NO_2$
$n = 14$	Homólogo II	$C_{22}H_{45}NO_2$

ESTUDIOS REALIZADOS CON LA BASE III

La Base III se obtuvo como un clorhidrato cristalino, al acidificar con ácido clorhídrico una solución de una mezcla de bases en etanol, que se precipitó por dilución con isopropanol y luego con éter de petróleo hasta turbidez. Por enfriamiento, cristalización, filtración y lavado, se obtuvo una pequeña cantidad de un compuesto de p.f. 138 - 139.5°C. El clorhidrato se recrystalizó de alcohol isopropílico, elevándose el p.f. a 139.5 - 141°C. La base se liberó de su clorhidrato y con la misma se realizaron espectros de resonancia nuclear magnética, infrarrojo y de masa.

El espectro infrarrojo de la Base III es muy similar al de la cassina e indica las características netamente alifáticas de este tipo de bases. La similitud se observa hasta en la presencia de una banda intensa de absorción a 1710 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de la doble ligadura carbono - oxígeno de un grupo carbonilo. La diferencia más marcada con el espectro de la cassina se evidencia en la mayor intensidad de la banda de absorción correspondiente a la región de estiramiento de uniones nitrógeno-hidrógeno y oxígeno-hidrógeno entre 3.500 y 3.300 cm^{-1} .

La Base III presenta un espectro de resonancia magnética nuclear relativamente simple. A similitud con las otras bases aisladas del carnaval, no aparecen señales por debajo de $\delta=4.8$ lo cual indica la ausencia de protones aldehídicos u olefínicos, y a $\delta=1.28$ se presenta el pico más intenso del

espectro correspondiente a los grupos metílicos. A diferencia con las otras bases no se observa el doblete centrado a $\delta = 1.08$ que corresponde al grupo metilo situado en la posición 2 del núcleo piperidínico. El único grupo metilo detectable en el espectro de r.n.m. de la Base III es el singulete nítido situado al igual que en la cassina, a $\delta = 2.15$ atribuible a los protones de un grupo acetilo. La curva de integración del espectro referido a la intensidad de esta señal da un total de 35 protones en la molécula.

El singulete ancho característico del proton ecuatorial del átomo de carbono hidroxílico en posición 3 del núcleo piperidínico presente en la cassina y la carnavalina a $\delta = 3.6$, en el caso de la Base III se confunde en una señal ancha que se extiende desde $\delta = 3.5$ a $\delta = 4.5$, centrada a $\delta = 3.95$, que integra un total 6 protones. No resulta clara la explicación de la intensidad de este pico con los datos que se poseen, ya que en el mismo debe estar incorporado otro protón además de los que esencialmente deben ser considerados; los dos protones no hidroxílicos del grupo alcohólico primario, sustituyente en posición α del núcleo piperidínico según se desprende de la interpretación del espectro de masa, el protón del átomo de carbono hidroxílico del núcleo, ya mencionado, y posiblemente los dos protones hidroxílicos.

La pequeña cantidad de sustancia disponible tampoco permite asignar con precisión las señales presentes entre $\delta = 2.25$ y $\delta = 3.0$ que integran 4 protones y que deben correspon-

ter a: Los 2 protones del metileno vecino al resto acetilo y los 2 átomos de hidrógeno en posición α respecto del átomo de nitrógeno del núcleo.

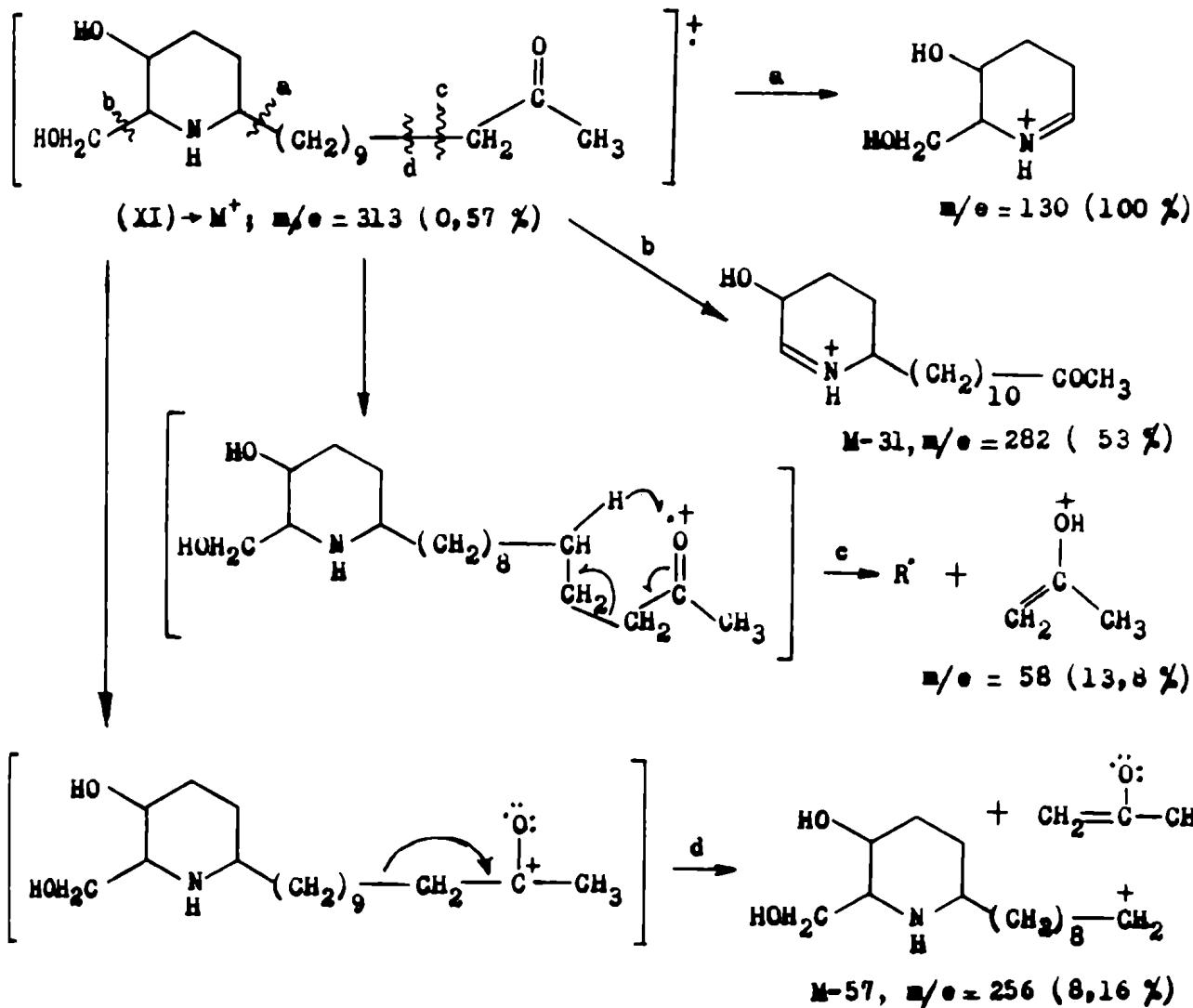
Una primera apreciación del espectro de masa demuestra que el ión base aparece a m/e 130, o sea desplazado en 16 unidades de masa con respecto a lo que ocurriría en los espectros de la cassina y de la carnavalina. Otras alteraciones evidentes en el espectro de masa de la Base III ocurren en las inmediaciones del ión molecular, destacándose además un pico muy intenso en m/e 282, 53% con respecto al ión base.

La evidencias de los espectros infrarrojo y de resonancia nuclear magnética demostraron la presencia de un grupo metilcetona además de un número considerable de metilenos alifáticos, a similitud de lo que ocurriría con la cassina donde un grupo acetilo concluía la cadena alifática. Este ordenamiento se caracteriza por dar en el espectro de masa de la cassina un ión M-57 que resalta en el espectro ya que aparece con una intensidad de 8.14% a m/e 240 y también un pico a m/e 58 con una intensidad de 5.2% probablemente originado por la participación del carbonilo en una ruptura de tipo McLafferty.

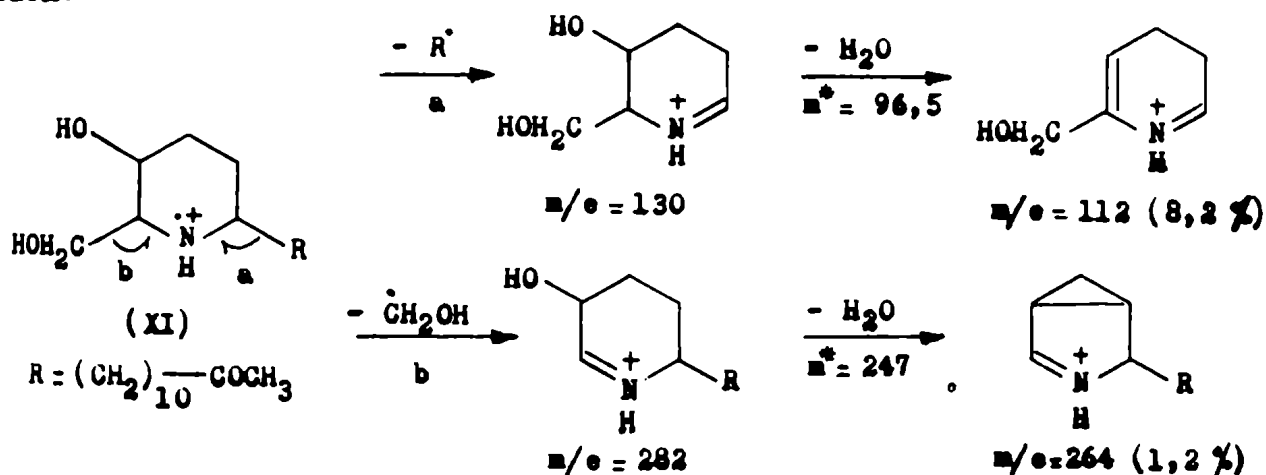
Analogamente en la Base III, se encuentra un ión de masa 58 que tiene una intensidad de 13.3% y un ión a m/e 256 que tiene una intensidad de 8.16%. Esta coincidencia implica que el ión molecular debería tener una masa igual a $256 + 57 = 313$, y además indica que el grupo metilcetona es extremo de una cadena alifática de 10 grupos metilenos de longitud ya que la diferencia

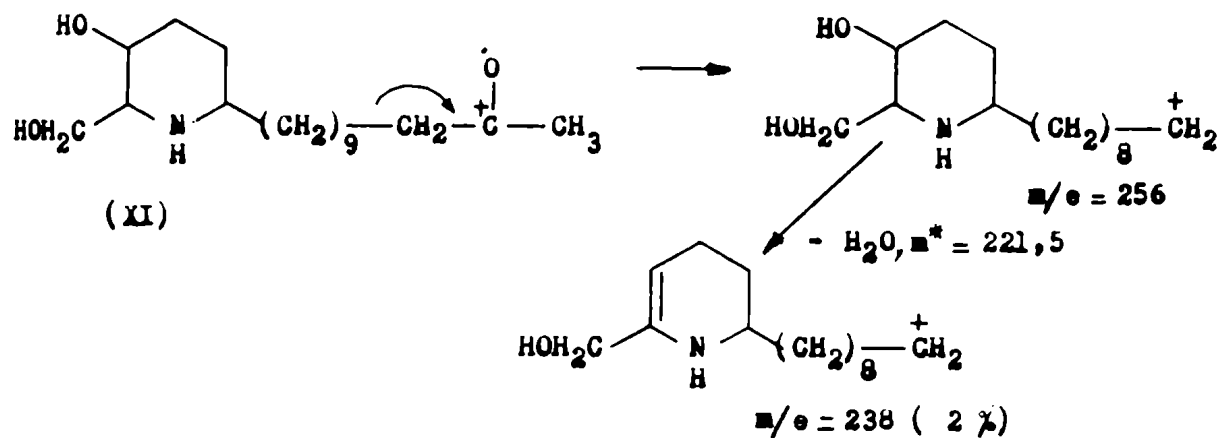
entre la masa del ión molecular y el ión base, 313 - 130, corresponde a 183 unidades de masa al igual que se había descrito para la cassina. Esta evidencia se confirma por la presencia de las series de picos secundarios de intensidades menores del 2% separadas por 14 unidades de masa y perfectamente identificadas con las mismas series encontradas en los espectros de la cassina y de la carnavalina. De lo que antecede y en base a la experiencia verificada en los espectros de masa descritos anteriormente, se puede inferir que la Base III tiene como sustituyente mas grande en posición α con respecto a un átomo de nitrógeno, a la misma cadena lateral de la cassina.

Una explicación análoga a la recién enunciada indicaría que el sustituyente de segunda magnitud en la molécula que se encuentra en posición α con respecto al átomo de nitrógeno debe ser bastante más grande que el metilo de la cassina o de la carnavalina, y que debe tener una masa igual a la diferencia entre la del ión molecular, 313 y la del ión intenso de m/e 282, que corresponde a 31 unidades de masa. Este requisito lo satisface perfectamente un grupo carbinólico y encuadra con la posibilidad de explicar el aumento de 16 unidades de masa del ión base de m/e 30 con respecto al correspondiente de la cassina o de la carnavalina a m/e 114. Esquematisando, la Base III tiene la estructura indicada por la fórmula (XI) a partir de la cual se explican las distintas fragmentaciones mencionadas:

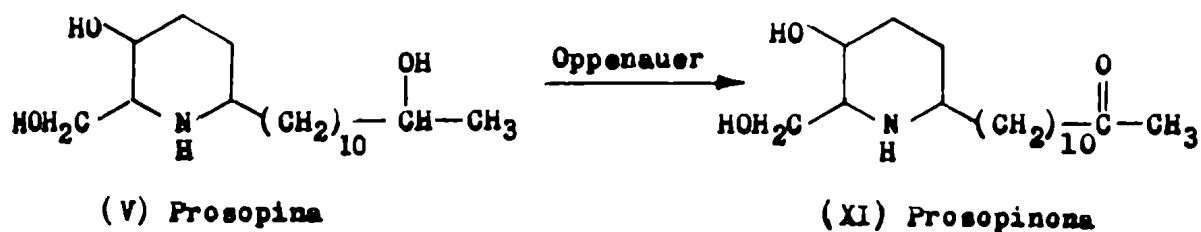


A similitud de lo observado en los espectros de masa de la cassina y de la carnavalina se distingue la presencia de picos metaestables, en este caso a m/e 's: 96.5; 247 y 221.5, que indican el proceso de pérdida de agua que se esquematiza a continuación:



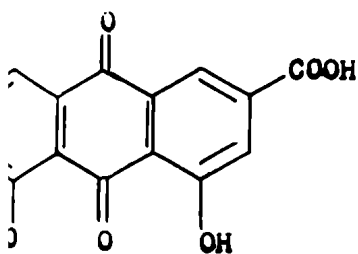


Salvo algunas excepciones, que se discutirán más adelante, el resto del espectro de masa conforma con las características dadas por la fórmula (XI) para la Base III. La interpretación no sólo se basa en la experiencia obtenida con la cassina y la carnavalina, sino que también se encuentra sustentada por los datos publicados por Goutarel y sus colaboradores (16), donde mencionan que los dos iones más importantes encontrados en los espectros de masa de la prosopina (V) y de la prosopinina (VI) son los que se presentan a m/e 130 y a $M-31$. En este trabajo (16) también se describe la obtención de la prosopinona por oxidación de Oppenauer de la prosopina. Como la Base III tiene la estructura propuesta (XI) igual a la del producto de oxidación, debería recibir el nombre de prosopinona.

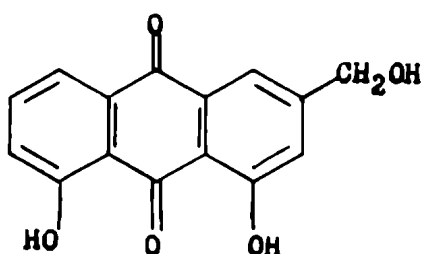


Experiencias posteriores a las descritas en esta tesis (149) confirmaron la identidad de una muestra de prosopinona propuesta por Goutarel con la Base III de Cassia Carnaval en comparaciones por cromatografía en placa delgada con diversos sistemas de solventes.

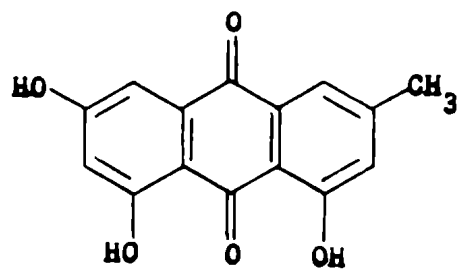
Como resumen de la estructura de la Base III se puede tipular que este alcaloide solamente difiere de la cassina en que posee a un grupo hidroximetilo como sustituyente en posición 2 del núcleo piperidínico en lugar de un grupo metilo. Si se consideran las especulaciones biogénéticas que se hicieron en el Capítulo II, es plausible suponer que el sustituyente en posición 2 del núcleo piperidínico pueda aparecer con distinto grado de oxidación entre los 6 o 7 alcaloides presentes en el Carnaval. A este respecto conviene indicar que entre los compuestos denominados acetogénicos por Hendricksen (144) se encuentran numerosas traquinonas naturales vinculadas a las antronas o a los senósidos presentes en el género *Cassia*, que se pueden ejemplificar con las fórmulas de la Reina (XII), Aloemodina (XIII) y Emodina (XIV) las cuales se observa que el sustituyente en posición 2 aparece con tres grados distintos de oxidación.



(XII)

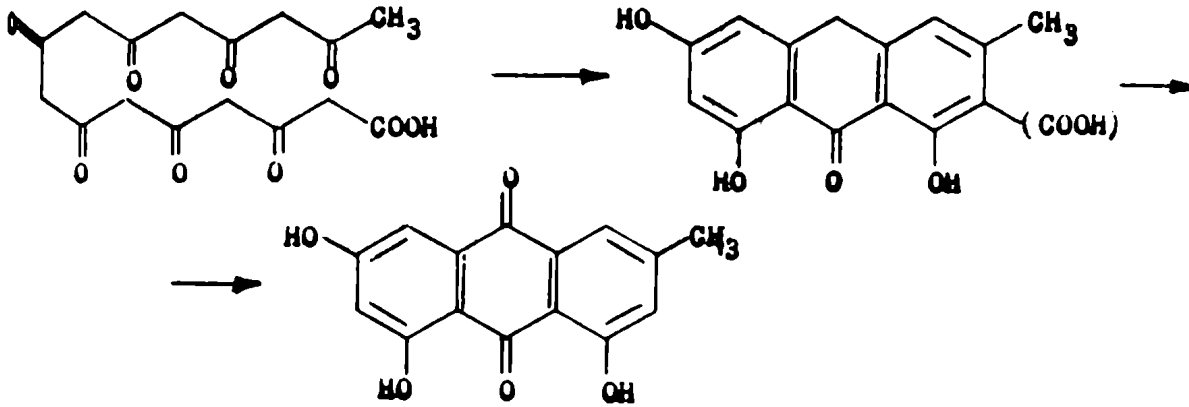


(XIII)

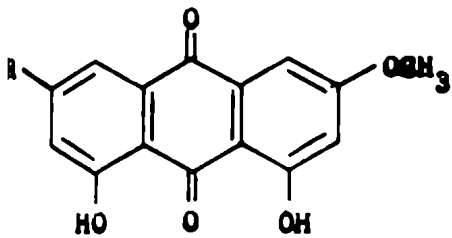


(XIV)

El diagrama biogénico de ciclación más característico de estos compuestos se origina en la condensación de ocho unidades de acetato con posterior oxidación del átomo de carbono de la posición 10 de la antrona intermedia y descarboxilación:

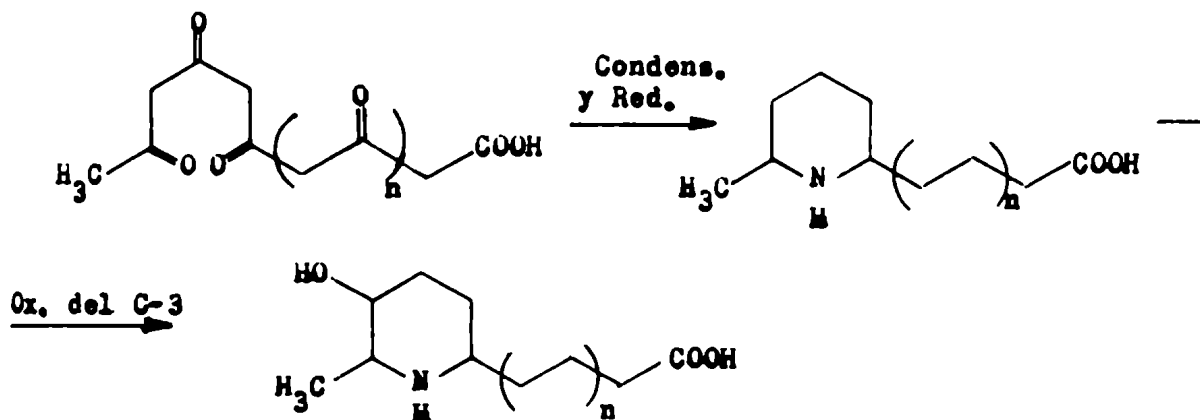


Se observa, asimismo, un grado creciente de oxidación del grupo metilo de la posición 2 de la parietina que aparece en estos compuestos transformado en un grupo alcohólico primario (ejemplo en teloschistina), en grupo aldehído (en fallacinal) o en ácido (en el ácido parietínico) (144).



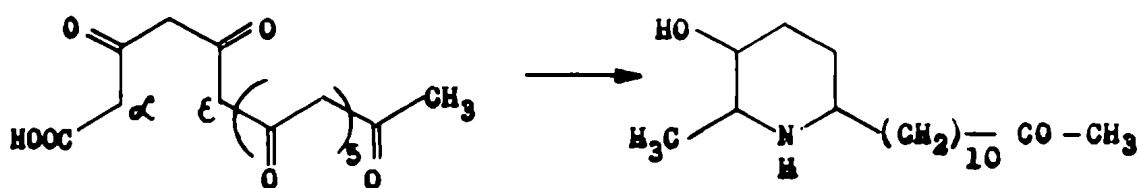
Parietina	R = CH ₃
Teloschistina	R = CH ₂ OH
Fallacinal	R = CHO
Ac. Parietínico	R = COOH

Los ejemplos precedentes servirían para explicar la relación entre la cassina y la prosopinona si estos alcaloides se forman de acuerdo al esquema establecido por Bevan y Ogan (159) estudiando con precursores marcados la biosíntesis de la carpafina que se estaría considerando la oxidación del metilo terminal a un ácido β-cetopolimetilénico.

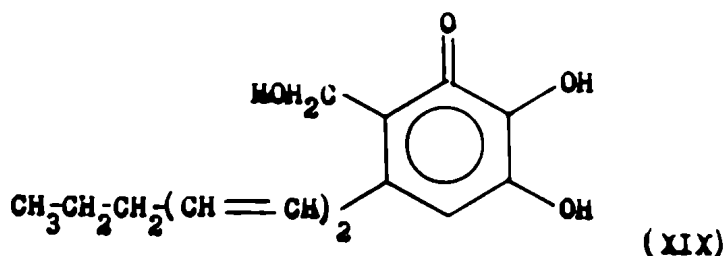
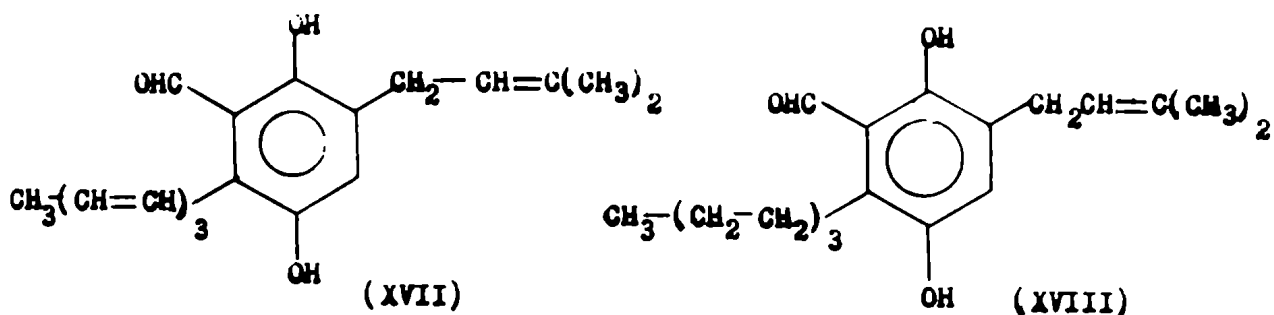


La carpaina se forma por interesterificación de dos de estas unidades, $n=3$, mientras que para llegar a la cassina, $n=5$, debe oxidarse también el C11' a cetona y reducirse el grupo carboxilo, C12', a metilo.

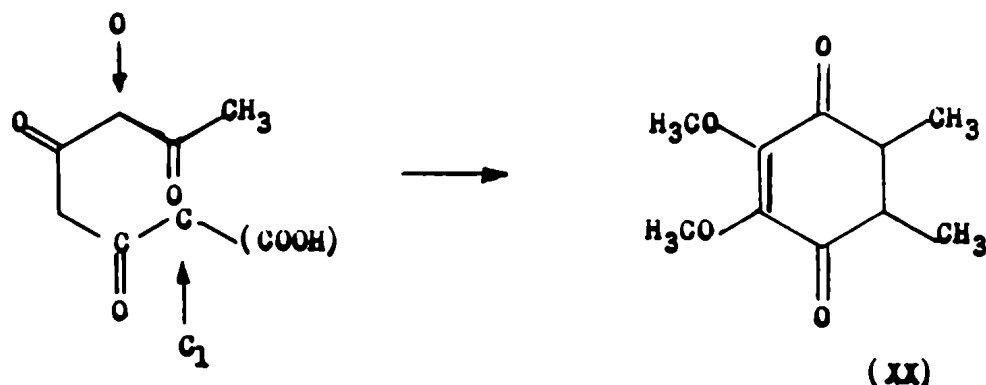
Si se considera el esquema inverso, más acorde con la ubicación de los átomos oxigenados en la cassina, el sustituyente en posición 2 del núcleo piperidínico se originaría en el carboxilo inicial del ácido β -cetopolimetilénico, y en este caso se deberían producir las oxidaciones de los carbonos α y/o ϵ para permitir la incorporación del nitrógeno y la condensación según los mecanismos conocidos (156, 167).



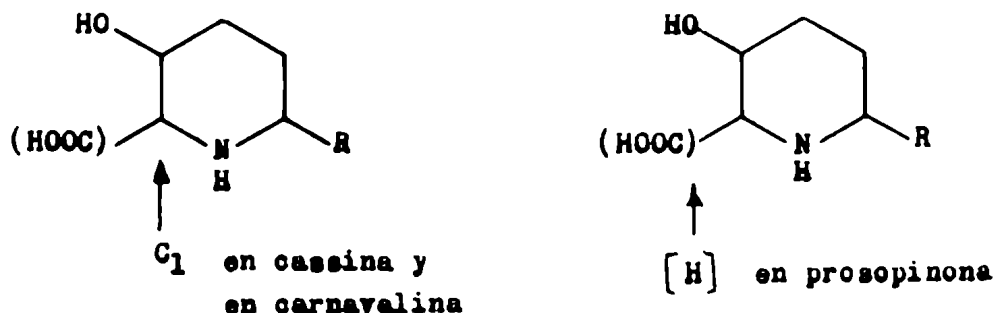
En ambos esquemas anteriores se requiere reducir o reemplazar el grupo carboxilo del ácido β -cetopolimetilénico. En este sentido, se sabe que en la auroglaucina (XVII), flavoglaucina (XVIII) y palitantina (XIX), todos compuestos que incorporan acetato en cultivos de diferentes especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, se produce la reducción del carbonilo terminal a un grupo aldehído o alcohólico primario (145).



Por otra parte Birch (146) ha encontrado en la auranogliocladina (XX), metabolito acetogénico de *Roseum gliocladum* que la distribución isotópica producida por la incorporación de acetato marcado está de acuerdo con un proceso biogénico como el que se muestra



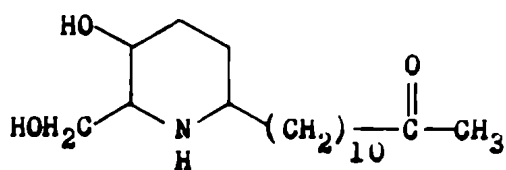
con un paso de descarboxilación del grupo carboxilo terminal e introducción de un grupo metilo por C-metilación. Un mecanismo de este tipo también podría explicar el origen del metilo de la posición 2 en cassina, o el del extremo de la cadena lateral según los esquemas considerados.



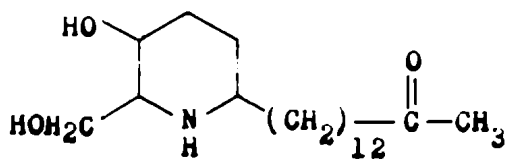
Aunque los datos aportados no permiten definir el mecanismo de biosíntesis, la presencia de Base III (prosopinona) conjuntamente con la cassina en C. Carnaval y de cassina y los demás alcaloides hidroximetilpiperidínicos en Prosopis Africana (139), permite suponer una correlación biogenética entre los alcaloides de estas especies.

Haciendo referencia nuevamente al espectro de masa de la Base III, se puede dar una evidencia concreta en favor de la biosíntesis por vía acetato, por lo menos en lo que concierne a la cadena lateral de este alcaloide. Aparecen en el espectro tres picos de intensidad considerable, a m/e 284 (4,0%), 310 (13,75%) y a 311 (3,15%) y los mismos no se pueden integrar en el marco general de las fragmentaciones conocidas para poder explicar racionalmente su presencia conforme a la estructura postulada para la prosopinona. Se había mencionado que para la

Aunque la espectrometría de masa permite detectar la presencia de trazas de otros compuestos que acompañan a la muestra analizada, no se puede clasificar al homólogo superior en dos metilenos de la prosopinona como traza en el espectro descrito de la Base III. La presencia de una cantidad apreciable del homólogo (XXI) puede entenderse debido a que el método de obtención de la pequeña cantidad de Base III (prosopinona) por cristalización del clorhidrato de una mezcla en solución y recristalización del mismo no ha sido suficientemente selectivo como para separar a los homólogos, ya que tiene muy poco carácter funcional una diferencia de dos metilenos en la longitud de la cadena lateral.



BASE III - Prosopinona



(XXI) Homólogo de la Base III

La separación se ha podido lograr por repetida cromatografía en columna y ulterior aislamiento de la Base III de una cromatografía en placa preparativa (149), según lo indica el espectro de masa de este compuesto en el que están prácticamente ausentes los picos causados por el homólogo superior, que se mencionaron anteriormente.

En una publicación (148) se ha indicado que en el espectro de masa de la cassina no se observa la ruptura característica de las cetonas del tipo McLafferty porque el ión a m/e 58, medido a alta resolución no corresponde a la fórmula C_3H_6O .

in embargo las mediciones de alta resolución efectuadas en el espectro de masa de la prosopinona purificada (149) muestran que este ión tiene 58,0425 unidades de masa correspondientes a la fórmula del ión $\text{CH}_2=\overset{+}{\text{C}}\text{OH}-\text{CH}_3$ y dada la intensidad del mismo es aparente que el reordenamiento del tipo McLafferty compite activamente con los otros esquemas de ruptura y estabilización de carga que involucran al carbonilo cetónico, descrito en este capítulo en la interpretación de los espectros de masa de la cassina y de la prosopinona.

En resumen, se ha identificado como uno de los compuestos naturales de la Cassia Carnaval a un compuesto que tiene la misma fórmula estructural que la prosopinona, además de un homólogo superior en 2 metilenos, lo que constituye una posible evidencia a favor de una formación biogénica vía acetato para estos alcaloides, considerando que no hay trazas de un homólogo superior en un etileno.

ESTUDIOS REALIZADOS CON LA BASE IV

Este compuesto se separó de los otros componentes del carnaval como una fracción cromatográficamente pura, tras una serie de cromatografías en columna con distintos materiales de soporte. No se logró cristalizar ni la base ni su clorhidrato y la pureza del alcaloide se determinó por cromatografía en placa delgada con distintos sistemas. La Base IV se sometió a una destilación a alto vacío (0.001 mm Hg) a 130°C y con el producto destilado se realizaron espectros de masa, infrarrojo y de resonancia nuclear magnética.

La interpretación de los datos espectroscópicos que se discuten a continuación, indican que la Base IV es un alcaloide semejante a los otros estudiados en este trabajo, que tiene un núcleo piperidínico sustituido por un hidróxilo y en posiciones alfa por un grupo metilo y una cadena alifática, diferenciándose de la cassina y de la carnavalina en la naturaleza de la cadena lateral.

El espectro infrarrojo de la Base IV revela una banda ancha e intensa a 3350 cm^{-1} , lo que debe corresponder a la presencia de grupos hidroxilos conjuntamente con un grupo imino. No se evidencia la señal correspondiente al estiramiento de la doble ligadura carbono-oxígeno característica de la cassina y de la prosopinona, y dadas las características alifáticas de este tipo de alcaloides, las únicas señales que prácticamente definen a este compuesto y lo diferencian de la carnavalina son las que aparecen a 1041 , 1001 y 933 cm^{-1} y la que no aparece a 1116 cm^{-1} .

El espectro de resonancia magnética nuclear de esta base semeja al de la carnavalina o al de la dihidrocassina y se diferencia de los de la cassina y la prosopinona principalmente por ser de la señal a $\delta=2.15$, originada por el grupo acetilo extremo de la cadena lateral alifática, que resultó ser una referencia precisa para las integraciones de los espectros.

La ausencia de protones con resonancia a campos bajos muestra que la Base IV a similitud de los otros alcaloides aislados del carnaval no tiene protones aldehídicos u olefínicos.

La señal que aparece a campo más alto es un pico centrado a $\delta=1.08$ que puede atribuirse a los protones del grupo metilo, sustituyente en la posición 2 del núcleo piperidínico según se deduce de la estructura del ión base de m/e 114 en el espectro de masas, y de que este grupo aparece como un doblete centrado a $\delta=1.10$ en los espectros de la cassina y la carnavalina.

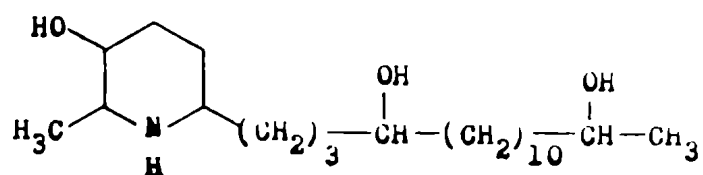
Vecina a esta señal, se encuentra otro pico a $\delta=1.17$ cuya integración es idéntica a la de la señal anterior por lo que puede corresponder a los protones del grupo metilo extremo de la cadena alifática sustituyente de un átomo de carbono hidroxilado, que en el espectro de la carnavalina se manifiesta como un doblete centrado a $\delta=1.19$ ppm. La no resolución de estos picos como dobletes nítidos puede estar relacionado al grado de pureza del alcaloide que no pudo ser cristalizado. Refiriendo la curva de integración a la proporción representada por estos dos grupos de protones, se obtiene un total de cerca de 45 protones en la molécula de los cuales la mayor parte se encuentran agrupados en la señal más intensa del espectro a $\delta=1.26$ que corresponde a una

cantidad numerosa de grupos metilenos. Entre $\delta=2,5$ y $\delta=3,0$ se observa un multiplete que como en las bases anteriores debe corresponder a los protones de los átomos de carbono en respecto del átomo de nitrógeno y entre $\delta=3,2$ y $\delta=4,2$ aparecen las señales de átomos de hidrógeno vinculados a grupos alcohólicos que caracterizan el espectro de resonancia magnética nuclear de la Base IV, aunque no resulta una correlación exacta entre la intensidad de los mismos y la información estructural obtenido del espectro de masa que revela la presencia de 3 grupos hidroxilos en la molécula. El ión base de la Base IV a m/e 114 ubica a uno de estos grupos en el núcleo y por semejanza con las bases anteriores es posible considerar que está identificado por la señal del protón del átomo de carbono hidroxílico, C_3 , a $\delta=3.6$. También por semejanza con el espectro de r.n.m. de la carnavalina se puede considerar que el multiplete que se extiende entre $\delta=3.65$ y $\delta=4.2$ le corresponde al protón similar al anterior sustituyente del átomo de carbono vecino al extremo de la cadena alifática. El tercer grupo hidroxilo de la molécula se considera como sustituyente del cuarto átomo de carbono de la cadena alifática a partir del núcleo piperidínico, según se interpreta del espectro de masa que se describe más adelante y es posible suponer que los átomos de hidrógeno del mismo aparecen en esta zona del espectro de resonancia nuclear magnética.

De acuerdo con las características de fragmentación de los alcoholes alifáticos superiores, los mismos dan iones moleculares de muy baja intensidad, y generan una mayor proporción de iones fragmentarios en los que la carga positiva reside en el resto carbonado en lugar de obtenerse iones con estructura oxonio, por lo

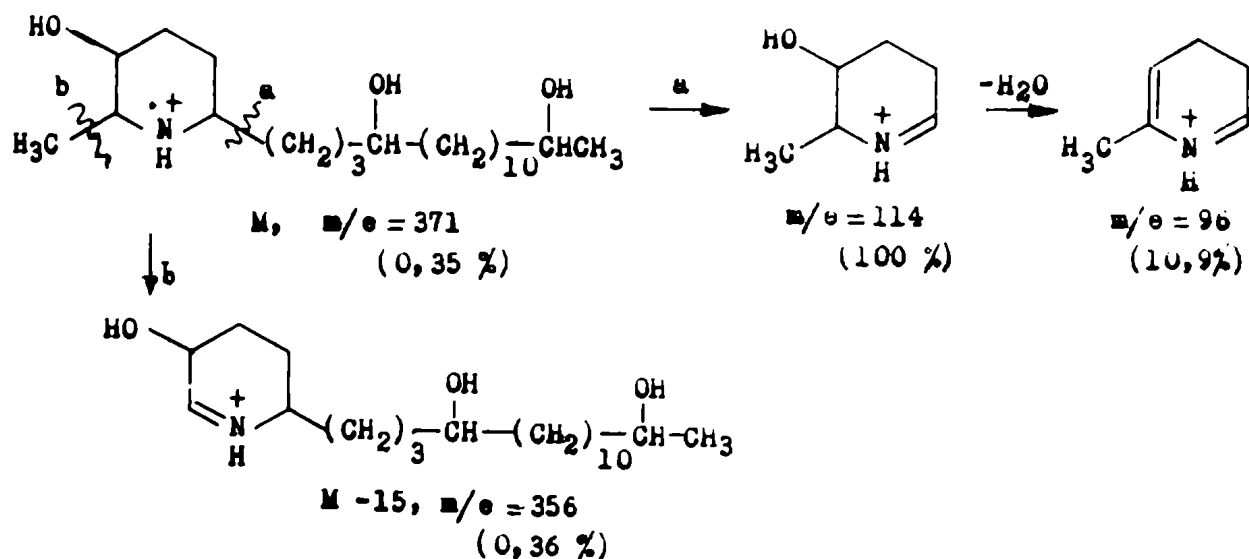
que resulta difícil discernir la fragmentación típica de los alcoholes (143).

Efectivamente, el ion molecular de la Base IV de m/e 371 aparece con una intensidad de 0.35% relativa al ión base de m/e 114 (100%). El ión M-15 es el otro ión que sobresale en esta región del espectro, también con intensidad baja, 0.36%, mientras que el ión M-1 apenas es observable con una intensidad de 0.15%. La fórmula molecular compatible con el peso molecular de 371 y con los demás datos del espectro es $C_{22}H_{45}NO_3$, para la cual se propone la posible estructura de la Base IV, indicada a continuación:

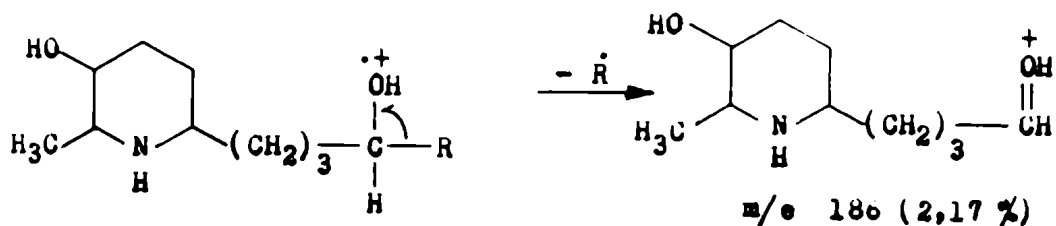


Base IV

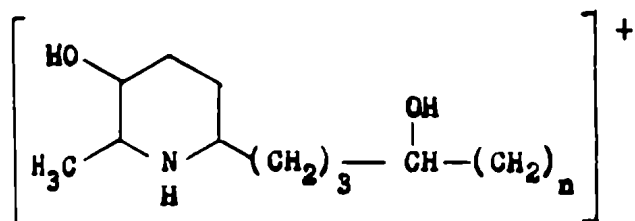
El ion molecular se descompone como en la cassina para dar el ión base y el ión M-15 por las fragmentaciones a y b respectivamente:



Entre los fragmentos de masa mayor al del ión base, se destacan los iones de m/e 186 y m/e 127, que aparecen con intensidades de 2.17% y 5.76% respectivamente. Con respecto al primero, conociendo la característica de los compuestos alcohólicos de fragmentarse rompiendo la unión alfa para dar un ión oxonio estable (143) y que el ión por presentarse a un número de masa par debe contener al átomo de nitrógeno y por lo tanto al núcleo piperidínico, se puede postular que se forma de acuerdo con el siguiente mecanismo:

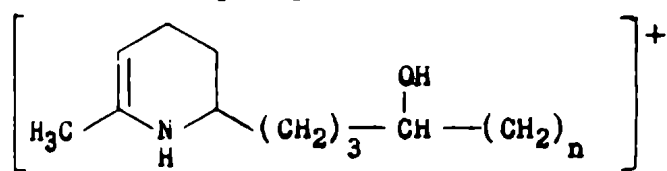


La longitud de la cadena alifática se revela en la aparición de una serie de picos de masa superior al anteriormente descrito de m/e 186 a intervalos regulares de 14 unidades de masa. Estos iones aparecen con intensidad reducida, del orden de 0.1% con excepción del ión de m/e 284 que posee una intensidad del 0.36%.



Con: n =	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
m/e =	186	200	214	228	242	256	270	284	298	312

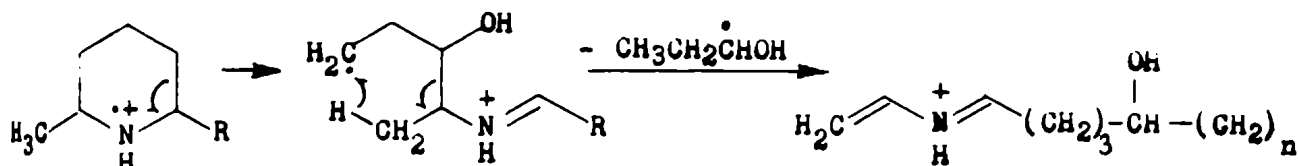
Una serie similar se observa en una secuencia de iones que difiere de la anterior por haber sufrido una deshidratación atribuible al hidroxilo del núcleo piperidínico. Esta serie se presenta con mayor intensidad que la primera, aproximadamente 0.3% destacándose el de masa 266 m/e con una intensidad de 0.47% y decreciendo la intensidad de los subsiguientes al de m/e 280, de manera tal que practicamente no resultan discernibles.



Con:	n =	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	m/e =	168	182	196	210	224	238	252	266	280

Las intensidades de estas series son marcadamente inferiores a las encontradas en los espectros de masa de los otros alcaloides estudiados en esta tesis, lo que estaría de acuerdo con la presencia de tres o más grupos alcohólicos en su estructura.

El ión de masa 127, también forma parte de una serie separada por 14 unidades de masa y puede interpretarse su formación por una ruptura del anillo piperidínico en la que se pierde un fragmento de masa 59. Degradaciones sucesivas de la cadena lateral darían lugar a iones radicales de m/e 169, 155, 141 terminando la serie en el ya mencionado de 127.

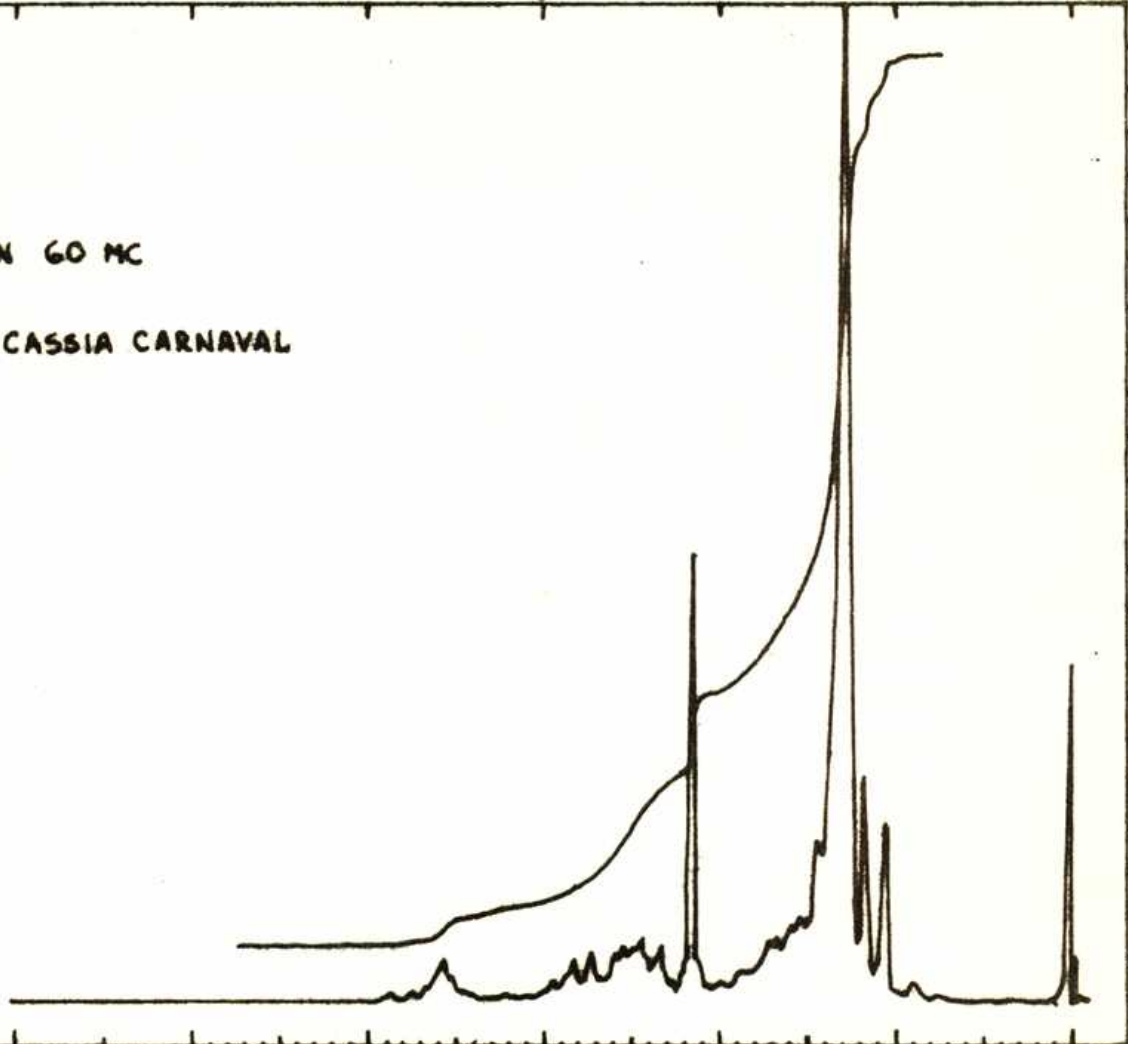


Con:	n =	0	1	2	3
	m/e =	127	141	155	169
	intensidad relativa % =	5,8	2,3	0,9	0,4

8 7 6 5 4 3 2 1 0 ppm (f)

ESPECTRO RMN 60 MC

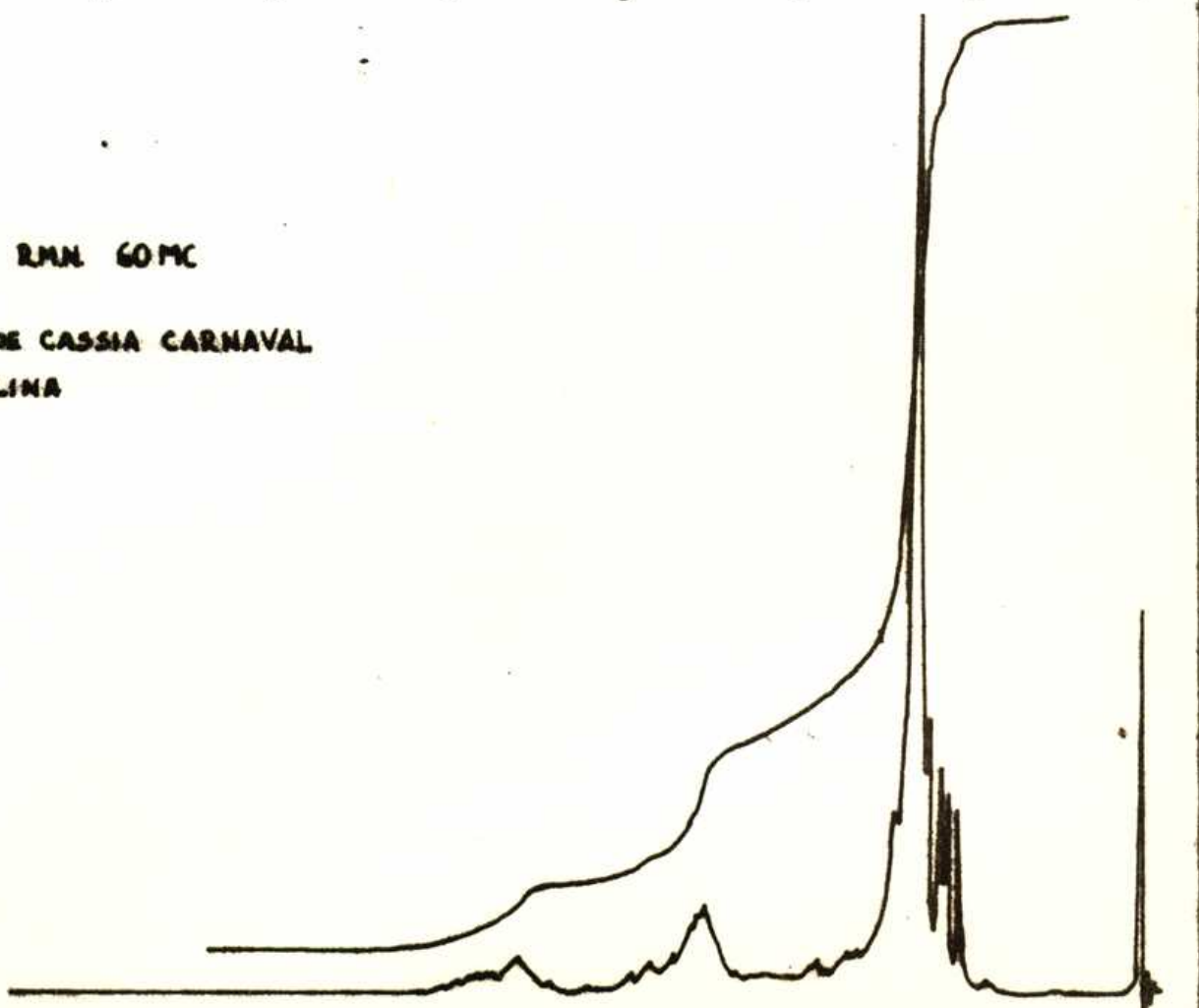
CASSINA DE CASSIA CARNAVAL



8 7 6 5 4 3 2 1 0 ppm (f)

ESPECTRO RMN 60 MC

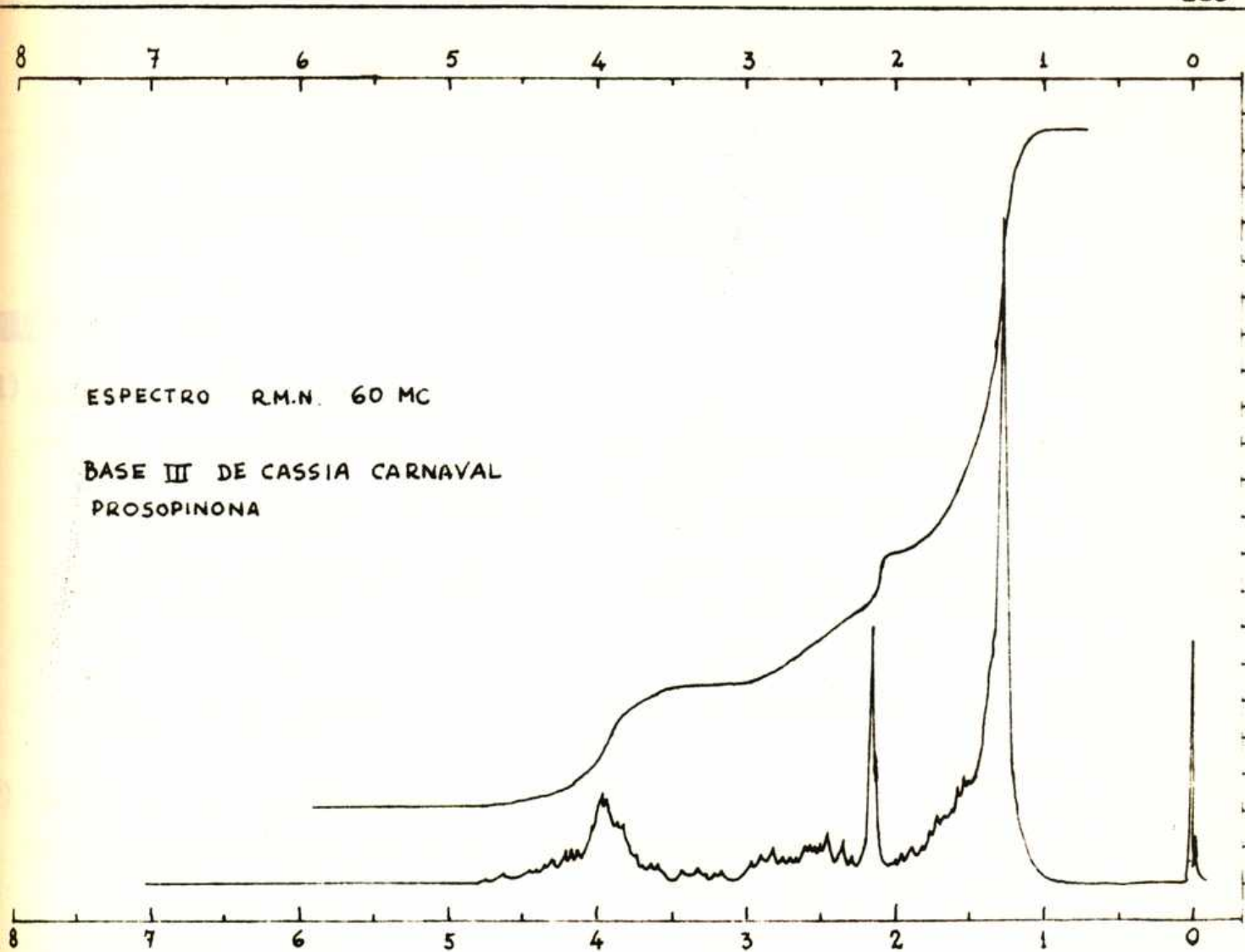
BASE II DE CASSIA CARNAVAL
CARNAVALINA



8 7 6 5 4 3 2 1 0 ppm (f)

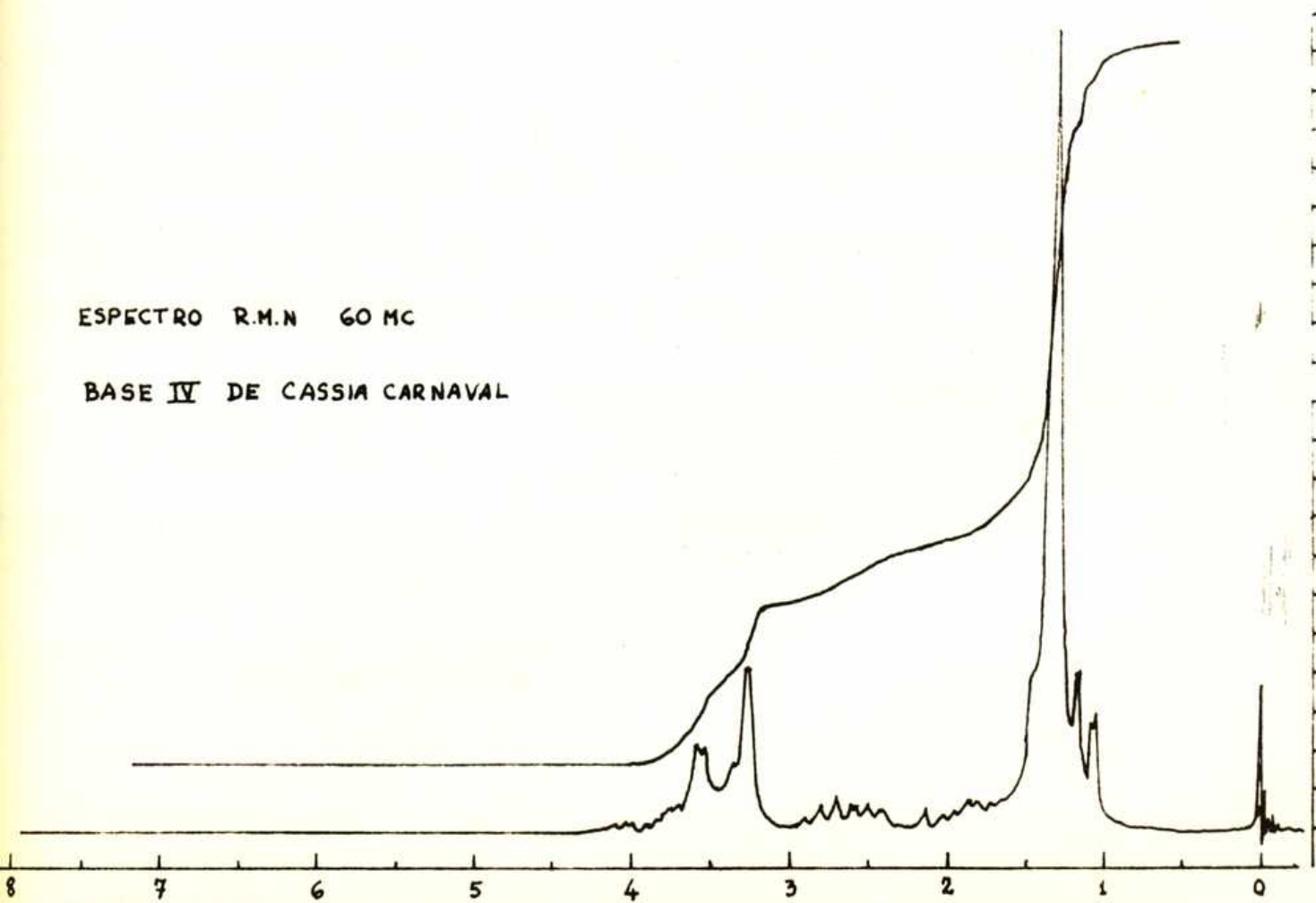
ESPECTRO R.M.N. 60 MC

BASE III DE CASSIA CARNAVAL
PROSOPINONA



ESPECTRO R.M.N. 60 MC

BASE IV DE CASSIA CARNAVAL



CAPITULO V

PARTE EXPERIMENTAL

GENERALIDADES

) Material Investigado

- a) Procedencia: Las muestras de corteza de raíz, corteza de tronco y hojas de Cassia Carnaval Spag. fueron coleccionadas por los Dres. Cuezco y Legname en las cercanías del Río Blanco, en el Departamento de Orán, de la Provincia de Salta el 7 de Diciembre de 1964 y clasificadas por el Dr. Teodoro Meyer del Instituto Miguel Lillo de la Universidad de Tucumán (Argentina).
- b) Preparación: En todos los casos las muestras fueron secadas en estufa a 60°C. Posteriormente se molieron en un molino a cuchillas, A. Thomas, y se pasaron a través de un tamiz con perforaciones de 1 mm de diámetro.

) Datos Espectroscópicos

- a) Dispersión Óptica Rotatoria: Fueron realizados por el Profesor W. Klyne y la Dra. P. Scopes de Westfield College, London University.
 - b) Infrarrojo: Se realizaron en un aparato Perkin Elmer Infracord 137, en el Departamento de Química Orgánica (F.C.E.N.) de la Universidad de Buenos Aires.
 - c) Masa: Fueron realizados en un aparato M.S.-9 por J. Baldas del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Melbourne, Australia; en la Universidad de Cambridge por D. H. Williams y I. Fleming y por el Dr. J. Romo del Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México.
 - d) Resonancia Magnética Nuclear: Se realizaron en un aparato Varian A 60 del Departamento de Química Orgánica de la F.C.E.N. de la Universidad de Buenos Aires por el Dr. E. B. Demler, utilizando como referencia interna tetrametilsilano.
 - e) Ultravioleta: Fueron realizados en un aparato K. Zeiss del Departamento de Química Orgánica de la F.C.E.N. de la Universidad de Buenos Aires
-) Análisis Cuantitativos: Fueron realizados por la Dr. B. B. de Deferrari del Departamento de Química Orgánica de la F.C.E.N. de la Universidad de Buenos Aires.
-) Puntos de Fusión: Los mismos no están corregidos. Los realizados en tubo capilar se indican "(c)" y los realizados con un aparato Kofler se indican "(k)".

5) Cromatografías en Placa Delgada: Se corrieron 12 cm sobre placas de vidrio plano con capas de soporte de 250 micrones de espesor y salvo indicación en contrario se empleo como soporte Kieselgel G. de Merck con ligante para cromatografía en placa delgada según Stahl. Se emplearon los siguientes sistemas de solventes de desarrollo para las cromatografías ascendentes:

<u>Sistema I:</u>	Ciclohexano:	cloroformo:	dietilamina	(5:4:1)
<u>Sistema II:</u>	"	:	"	(8:1:1)
<u>Sistema III:</u>	"	:	"	(1:8:1)

En todos los casos se revelaron las cromatografías con el reactivo de Dragendorff, modificado según Munier y Machdoeuf (1951) y se señalaron las manchas inmediatamente después de reveladas.

INVESTIGACION DE LOS COMPONENTES BASICOS DE LA CORTEZA DE LA RAIZ: AISLAMIENTO DE CLORHIDRATO DE CASSINA

1) Extracción de los componentes Básicos

Se extrajeron 784 g. de corteza de raíz finamente dividida, en un extractor del tipo Soxhlet con 2,5 litros de éter de petróleo (60-70°C), hasta que el éter de petróleo no extrajo más productos coloreados (tres días). En el extracto se encontró reacción positiva de esteroides (Liebermann-Burchard), reacción negativa de alcaloides (Dragendorff) y se descartó. En el mismo extractor se realizó una segunda extracción de la corteza durante cuatro días con tres litros de metanol, hasta reacción negativa de Dragendorff en una alícuota del líquido de extracción. El extracto metanólico, que dió reacciones típicas de reconocimiento de alcaloides (ácido pícrico, ácido silicotúngstico, reacción de Mayer y reacción de Dragendorff), se concentro por evaporación del solvente a presión reducida y a 45°C hasta obtener 200 ml. de un aceite oscuro de consistencia siruposa. El mismo se tomó con un litro de ácido acético al 10 por ciento en solución acuosa y como se verificó que la acidez no era marcada se agregó ácido clorhídrico concentrado hasta obtener una suspensión de pH 1. Se filtró la suspensión a través de un lecho de Celite obteniendo así un sólido (que por suspensión en metanol dió reacción negativa de Dragendorff) y una solución ácida con reacción positiva de Mayer. Se descartó el sólido. La solución acuosa se lavó repetidamente (1x350 ml., 2x250 ml.) con cloroformo. Tanto la solución acuosa como el conjunto de los lavados clorofórmicos dieron reacción positiva de alcaloides. La fase clorofórmica se extrajo tres veces con ácido clorhídrico diluido (1%) y el conjunto de lavados ácidos se reunió con la solución acuosa original. Se descartaron los lavados clorofórmicos y la fase acuosa conjunta se llevó a pH 6 con hidróxido de amonio, precipitándose un sólido oscuro que se separó por decantación. Con el sólido se efectuó una suspensión metanólica que dió una reacción positiva leve de Dragendorff y se descartó. La fase acuosa se llevó a franca alcalinidad con hidróxido de amonio, produciéndose una nueva suspensión que se extrajo con cloroformo hasta

reacción negativa de Mayer. Se descartó la fase acuosa y el extracto cloroformico se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La solución cloroformica dió una reacción intensamente positiva de Dragendorff y se evaporó al vacío, obteniéndose 4 g. de un aceite pardo oscuro. Al realizar una cromatografía en placa delgada (c.p.d.) -Sistema I- se observó que preponderaba en la mezcla una base con R_f : 0,75 acompañada por una serie de bases con R_f menores de 0,50.

2) Purificación del extracto básico.

Los 4 g. de aceite de productos básicos se suspendieron en un pequeño volumen de benceno y se volcaron sobre una columna de alumina neutra WOLLM (30 g.). Se eluyó con benceno y luego con soluciones sucesivamente más concentradas de cloroformo. Por cromatografía en placa delgada no se observó separación apreciable en ninguna de las fracciones, por lo cual se reunieron y evaporaron obteniendo 3,8 g. de aceite algo más límpido que el inicial. Este aceite se disolvió fácilmente en etanol y el tratamiento de la solución con ácido clorhídrico concentrado acuoso no produjo después de dos días de estacionamiento en heladera ningún precipitado atribuible al clorhidrato de alguna de las bases. La evaporación de la solución a presión reducida produjo cerca de 4 g. de aceite. Este nuevo aceite se sometió entonces a una cromatografía sobre una columna de Sílice BDH (preparada con 100 g. de sílica gel suspendidos en benceno). El aceite se suspendió en 4 ml. de benceno y se volcó sobre la columna. Se observó que por estacionamiento durante una noche la mezcla se difundió hasta alcanzar la mitad de la columna. Se eluyó a continuación con dos litros de benceno obteniéndose un eluido coloreado que dió reacción negativa de Dragendorff. Luego se separaron fracciones en un litro de eluyente que estaban constituidas por cantidades crecientes (1, 2, 5, 10 y 50%) de cloroformo de benceno y finalmente con cloroformo puro, sin que ninguno de los eluidos presentara reacción de alcaloides. Aumentando la polaridad del eluyente por agregado de metanol al cloroformo se obtuvieron los resultados que figuran en la table siguiente:

Fracción Nº	Eluyente Cl ₃ : MeOH	Volumen litros	Residuo mg.	Denomina- ción Fracción	C. P. D. -Sist. I- R _f
1	99 : 1	1,5	100		mezcla
2	98 : 2	1,5	50		mezcla
3	97 : 3	1,5	100		mezcla
4	96 : 4	1,0	1000	A	0,77
5	" : "	1,0	270	B	0,77
6	" : "	1,0	100		0,77
7	" : "	1,0	30		0,77
8	" : "	1,0	5		
9	95 : 5	1,0	70		mezcla
10	94 : 6	1,0	70		mezcla

3) Tratamiento de las fracciones cromatográficas: aislamiento del Clorhidrato de Cassina.

a) Tratamiento de la fracción A: obtención de la fracción A-1.

Por cpd -Sistema I- se encontró que predominaba en la mezcla una base con R_f 0,77 acompañada de pequeñas cantidades de bases de R_f 0,90, 0,35 y 0,05. Se tomó el aceite en un tubo de ensayos con 3 ml. de acetato de etilo con lo que se produjo un precipitado microcristalino y una solución sobrenadante de color rojo que se descartó. El precipitado se disolvió en 3 ml. de isopropanol en caliente y por posterior enfriamiento se separó una masa voluminosa de cristales. Se repitió tres veces la recrystalización de isopropanol separándose finalmente agujas tenuemente coloreadas de amarillo. Se recrystalizó de isopropanol con filtración en caliente, se lavó con éter etílico y se secó a vacío y temperatura ambiente obteniéndose 110 mg. de agujas de Punto de fusión (c) 162°C , fracción a la que se denominó Fracción A-1. Las soluciones remanentes de las cristalizaciones en isopropanol se reunieron y denominaron licores madres de la fracción A.

b) Espectro infrarrojo de la fracción A-1, clorhidrato de cassina, en mull de nujol.

Presenta máximos a los siguientes números de onda:

3300 (O-H, N-H), 2920 (f)(C-H), 2860 (sh)(C-H), 1715 (f)(C=O), 1540 (N-H), 1460 (f)(C-H), 1415 (sh), 1380 (f)(C-H), 1175 - 1165 (doblete), 1010, 1000, 860 y 725 cm^{-1} .

c) Tratamiento de la fracción B: obtención de la fracción B-1.

Esta fracción de 270 mg. cristalizó al evaporar el solvente utilizado en la elución. El sólido se tomó en éter etílico y se obtuvo una solución coloreada y un precipitado blanco. Se descartó la solución etérea. El sólido se sublimó a 110°C y 0,001 mm de Hg, obteniéndose una fracción sólida blanca mas pura que se denominó fracción B-1 y un residuo marrón que se disolvió en cloroforno y se reunió con los licores madres de la fracción A.

d) Licores madres de la fracción A y residuo de la fracción B: obtención de la fracción C.

Esta solución se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 4 ml. de isopropanol en caliente pero por enfriamiento no se produjo ningún precipitado apreciable. Por agregado de 3 ml. de acetato de etilo no se produjo ningún cambio. Posteriormente se agregaron 6 ml. de éter etílico a esta solución, produciéndose un precipitado abundante que se separó por filtración. La solución se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en un ml. de isopropanol y se volvió a precipitar por agregado de 6 ml. de éter etílico. Nuevamente se separó el precipitado por filtración, se lavó con éter etílico y se reunió con el precipitado obtenido anteriormente. Este sólido se disolvió en metanol en frío obteniéndose una solución pardo amarillenta. Se percoló a través de una columna de 10 g. de alúmina neutra Woelm, perdiendo parte del color. Por evaporación de esta solución se obtuvieron 174 mg.

de producto cristalino ligeramente coloreado. Por sublimación a 0,001 mm de Hg. y 130°C se obtuvieron 81 mg. de un compuesto completamente limpio denominado fracción C.

4) Caracterización de los productos obtenidos como clorhidrato de Cassina.

Las tres fracciones cristalinas A-1, B-1 y C provenientes de los distintos tratamientos de los eluidos de la columna de sílice con (cloroformo:metanol) (96 : 4), resultaron ser muestras idénticas al comprobarse la presencia de una sola sustancia de R_f 0,77 en cpd -Sistema I- que no se alteraba por sublimación. Se comprobó además que la fracción A-1 mostraba tener el menor grado de contaminación de trazas de otros alcaloides. Se sublimó una parte de la fracción A-1 a 130°C y 0,001 mm de Hg. obteniéndose un sólido de punto de fusión (c) 169,5 - 170,5 °C con ablandamiento a 168°C, y punto de fusión (k) 172 - 176 °C. Con este compuesto se efectuó el análisis elemental, un espectro ultravioleta y un espectro de resonancia magnética nuclear para el clorhidrato de cassina.

a) Análisis elemental del Clorhidrato de Cassina

En base a la fórmula $C_{18}H_{35}O_2N \cdot HCl$ los valores de los elementos son:

	Carbono	Hidrógeno	Nitrógeno
Calculado:	64,73	10,86	4,19
Obtenido :	65,67	10,89	4,53

b) Espectro ultravioleta del Clorhidrato de Cassina

Este espectro solo presenta un máximo muy débil a 280 $m\mu$ ($\epsilon_{max} = 35$).

c) Espectro de resonancia magnética nuclear del Clorhidrato de Cassina.

Dada la baja concentración de esta sal que se puede lograr en cloroformo, el espectro fué realizado empleando como solvente el ácido trifluoroacético.

Se presentan 3 picos claramente definidos, ubicados a :
 $\delta = 1,34$ (CH_2)_n que es el más intenso del espectro; otro a
 $\delta = 2,33$ (CH_3-CO-) y el último a $\delta = 4,33$ ($>CH-OH$).

La integración del espectro utilizando como referencia estas dos señales indica un total de cerca de 35 protones y para las señales mismas 3 y 1 protones respectivamente. No aparecen señales a campos mas bajos característicos de protones aldehídicos u olefínicos.

EXTRACCION Y RECONOCIMIENTO DE LOS PRODUCTOS BASICOS DE LA CORTEZA DE TRONCO DE CASSIA CARNAVAL

Se extrajeron 500 g. de corteza de troncos finamente divididos en un extractor de tipo Soxhlet durante 6 días con 2,5 litros de etanol a reflujo hasta reacción negativa de Dragendorff. El extracto metanólico se concentró hasta un volumen de 150 ml. y se tomó con 750 ml. de una solución diluida en ácido clorhídrico. Se agitó la suspensión ácida durante 15 minutos a 55°C y después se enfrió a temperatura ambiente se filtró a través de un lecho de Celite. Se separó así un residuo oscuro que por suspensión en metanol no dio reacción de alcaloides por lo que se descartó. La solución clorhídrica se llevó a pH 6 con hidróxido de amonio reduciéndose un barro que se separó por decantación. Este barro se tomó en metanol y dio reacción positiva de alcaloides. Se trató con ácido clorhídrico concentrado, un pequeño volumen de cloroformo y un exceso de éter de petróleo sin que apareciera ningún precipitado sólido después de dejarlo estacionar en heladera durante 3 días.

La solución acuosa decantada se alcalinizó con hidróxido de amonio hasta no más turbidez y se extrajo repetidamente con cloroformo (3x500 ml.) hasta reacción negativa de Mayer. El extracto cloroformico se lavó con agua y se secó durante una noche sobre sulfato de sodio anhidro. Por evaporación del solvente al vacío se obtuvieron 1,65 g. de un aceite oscuro. Por c.p.d. (Sistema I) se comprobó la presencia de una mezcla de alcaloides similar a la de la corteza de la raíz con predominio de la base de R_f:0,75. La destilación del aceite a 130°C y 0,001 mm Hg. no produjo ninguna separación diferencial apreciable de los componentes básicos que el destilado, un aceite coloreado, presentó en c.p.d. Sistema I- las mismas manchas que el extracto original en proporciones similares.

Comatografía en placa delgada de los productos básicos de la corteza de tronco - Sistema I -

R _f	0,90	0,75	0,35	0,25	0,05
intensidad relativa	±	+++	±	±	±

EXTRACCION Y RECONOCIMIENTO DE LOS PRODUCTOS BASICOS DE HOJAS

1) Extracción y subdivisión del extracto en soluciones acuosa D y cloroformica E

Se extrajeron 500 g. de hojas finamente divididas en un extractor de tipo Soxhlet durante 2 días con 2,5 litros de metanol. El extracto metanólico se concentró al vacío hasta un volumen de 100 ml. y el residuo se tomó con 500 ml. de ácido clorhídrico al 1%, agitándose la suspensión a 60°C durante 30 minutos y luego se filtró a través de un lecho de Celite, lavándose el residuo con otros 250 ml. de ácido clorhídrico diluido.

Las soluciones acuosas reunidas se extrajeron con cloroformo hasta que el último extracto cloroformico no dió reacción apreciable positiva de Dragendorff. Se obtuvieron así 800 ml. de una solución cloroformica de clorhidratos (Solución E), quedando la solución acuosa (Fase acuosa D) con reacción positiva de Mayer.

2) Tratamiento de la solución E; obtención del extracto acuoso F y la fracción cristalina E-1.

La solución E, cloroformica, se extrajo una vez con 250 ml. de ácido clorhídrico al 5% y una vez mas con 250 ml. de ácido clorhídrico al 7%, reuniéndose estos extractos ácidos (Fase acuosa F) que daban reacción positiva de Mayer. Luego se lavó repetidamente la solución cloroformica con una solución acuosa de hidróxido de potasio hasta que los últimos lavados salieron incoloros, (en total 1 litro). La solución cloroformica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó, obteniéndose un aceite oscuro con reacción positiva de alcaloides. Se tomó el aceite con 500 ml. de ácido clorhídrico al 1% con lo que se formó una suspensión con un brillo nacarado. Esta se dejó decantar durante una noche y se filtró a través de un lecho de Celite separándose un sólido brillante de color verde oliva claro que dió reacción negativa de Dragendorff disuelto en cloroformo. La solución filtrada se lavó con éter etílico, se alcalinizó con hidróxido de amonio y se extrajo con cloroformo (3x150 ml.). Los extractos cloroformicos reunidos se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó el solvente a vacío obteniendo un aceite de color amarillo que fue tratado con 5 ml. de etanol absoluto y vuelto a evaporar con lo que se formó una masa cristalina al enfriarse (1,7 g.) (Fracción E-1).

3) Tratamiento del extracto F y obtención del sólido F-1.

La fase acuosa F se alcalinizó con hidróxido de amonio hasta no más turbidez y se extrajo 2 veces con cloroformo. La fase organica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y por evaporación a vacío dejó un residuo aceitoso que por estacionamiento en desecador a vacío a temperatura ambiente durante una noche cristalizó parcialmente (Fracción F-1).

4) Tratamiento de la fase acuosa D, y obtención del residuo D-1.

La fase acuosa D se neutralizó con hidróxido de amonio, precipitándose un barro que se separó por decantación y luego se alcalinizó con hidróxido de amonio hasta no más turbidez. La suspensión acuosa se extrajo repetidamente con cloroformo hasta reacción negativa de Mayer. Los extractos cloroformicos reunidos se lavaron con agua, se secaron con sulfato de sodio anhidro y por evaporación del solvente se obtuvo un aceite pardo oscuro (Fracción D-1).

5) Comparación de las fracciones.

Se compararon estas 3 fracciones (E-1, D-1, F-1) con el producto sublimado C de la corteza de raíces (pag.170) por c.d.p. - Sistema I-. Una vez corrida la placa se observaron a la luz ultravioleta numerosas manchas fluorescentes retenidas cerca del punto de sembrado, otras que corrieron con el frente de solvente y otras que acompañaban al frente de los alcaloides, pero que no correspondían a las bases ya que el revelado con el reactivo de Dragendorff demostró que las manchas de los alcaloides no eran superponibles con las manchas fluorescentes. Se obtuvieron los siguientes resultados:

R_f	0,90	0,75	0,50	0,30	0,20	0,05
Fracción E-1	+	+++	+		+	
Fracción F-1	±	+++	++		±	
Fracción D-1		+++	++	+	+	±
Fracción C		+++				

Se observó en consecuencia que en los extractos básicos de las hojas se encuentran presentes una serie de alcaloides similares a los de la corteza de raíz y de tronco preponderando en todos los casos la base de $R_f:0,75$.

6) Purificación de la fracción E-1 y obtención de las fracciones X, Y y Z

Por destilación de la fracción E-1 a 150°C y 0,001 mmHg. se obtuvo un aceite que cristalizó totalmente obteniéndose un sólido (1,57 g.) con una leve tonalidad amarilla. El peso correspondió al 90% de la fracción E-1. Por c.d.p. del destilado - Sistema I- se comprobó la presencia de una mezcla de bases en la que predominaba el alcaloide de $R_f:0,75$. Se disolvió la muestra en un pequeño volumen de encenso y se cromatógrafió por una columna de sílice Malinckrott (60 g.) con el siguiente resultado:

TABLA II

Fracción Nº	Eluyente Cl ₃ CH : MeOH	Volumen ml	Residuo mg.	C.P.D.	
				R _f	intensidad relativa
1	100 : 0	1200	-		
2	99 : 1	200	-		
3	" "	50	170	0,93 0,75 0,50	+ +++
4	" "	50	74		
5	" "	50	79		
X 6	" "	50	67	0,75	+++
7	" "	70	76		
8	" "	100	40		
9	" "	600	25		
10	" "	500	-		
11	98 : 2	750	(X)		
12	97 : 3	750	(X)		
13	96 : 4	750	(X)		
Y 14	95 : 5	750	(X)	0,75 0,30	+++ +
15	94 : 6	750	(X)		-
16	93 : 7	750	5		
17	90 : 10	750	(X)		
Z 18	0 : 100	500	107	0,75 0,50 0,30 0,20 0,05	+ +++ + + -

(X) : Estos residuos no fueron pesados

La composición de los residuos obtenidos por evaporación del eluyente se determinó por c.p.d. (Sistema I). Las fracciones que resultaron similares se reunieron obteniéndose 3 fracciones mayores, X, Y y Z, compuestas respectivamente por las fracciones anteriores (4, 5, 6, 7 y 8), (12, 13, 14, 15, 16 y 17) y 18.

La fracción Y no se trabajó mas por tratarse de una mezcla en la que prepondera la cassina.

Tratamiento de la fracción X y aislamiento de la Cassina.

a) Cristalización y purificación.

La fracción X estaba compuesta por los residuos de los eluidos que contenían 1% de metanol (fracciones 4, 5, 6, 7 y 8) y al evaporar

El cloroformo que se empleó como solvente para reunirlos, se formó por estacionamiento prolongado a temperatura ambiente una masa cristalina de color amarillo tenue. Esta se disolvió en 70 ml. de ácido clorhídrico al 1%, se lavó con benceno y luego con éter etílico, finalmente se alcalinizó con hidróxido de amonio y se extrajo con cloroformo. La solución clorofórmica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. Por evaporación a sequedad del solvente se obtuvieron 325 mg. de base libre cristalina. No se pudo recrystalizar de ningún solvente. El sólido obtenido tenía p.f.(c) 54,8-56,5°C con ablandamiento a 53°, luego se secó prolongadamente en desecador a vacío y temperatura ambiente. La destilación del mismo a 0,001 mm Hg. y 130°C produjo 307 mg. de producto aceitoso casi incoloro. Por estacionamiento durante 2 horas solidificó dando una masa de color blanco de p.f. (k) 55-57°C. a comparación en c.p.d. - Sistema I- con la fracción C de la corteza de la raíz muestra que en ambos casos se trata de una sola base con $\alpha=0.75$.

b) Espectro infrarrojo del sólido cristalino, cassina, realizado en mull de nujol

Presenta máximos en los siguientes números de onda: 3120 (ancho) (C-H, N-H), 2920 (f) (C-H), 2860 (sh, f) (C-H), 1715 (C=O), 1460 (f) (C-H), 1375 (f) (C-H), 1160, 1005, 990, 910, 860, 835, 790, 775, 725 y 700 cm^{-1} . El espectro es similar, aunque distinto al de su clorhidrato, identificado como fracción A-1 (pag. 169).

Los demás datos de orden espectroscópico que complementan la identificación de la base como cassina pueden verse en la pagina 183.

) Preparación del clorhidrato de la base anterior, clorhidrato de cassina.

Se disolvieron 30 mg. del alcaloide en 0,2 ml. de etanol y se agregó 0,05 ml. de ácido clorhídrico concentrado formándose un precipitado. Se añadió 0,1 ml. de etanol, se agitó bien y se enfrió. Se colocó una fracción del precipitado sobre una placa porosa y se secó al aire, obteniéndose cristales de p.f. (c) 168-169,5°C con ablandamiento a 161°C. El espectro I.R. resultó ser idéntico al de la fracción A-1 de la corteza de raíz (pag. 169). Asimismo ambos compuestos dieron reacción positiva de Beilstein.

Con los resultados anteriores y los datos publicados (12) se comprobó que la base obtenida de la fracción E-1 del extracto de hojas de cassina y el compuesto aislado en la extracción de la corteza de raíz es el clorhidrato de cassina.

9) Tratamiento de las fracciones D-1 y F-1, incorporación de la fracción Z y obtención de la mezcla G

Las fracciones D-1 y F-1 estaban constituidas por mezclas similares de alcaloides (c.p.d. pág. 173). Se reunieron por disolución en cloroformo. Se lavó la solución clorofórmica con una solución acuosa de hidróxido de potasio al 5% y posteriormente con agua después de lo cual se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida con lo que se obtuvieron 6,7 gr. de un aceite marrón,

Este aceite se extrajo 3 veces reflujiéndolo con éter de petróleo (60-80°C) durante 15 minutos, separándose la solución etérea por decantación en caliente del residuo, R-1. Por enfriamiento a temperatura ambiente de los extractos etéreos reunidos (P-1) se precipitó un aceite (R-2).

La cromatografía en placa delgada demostró que con el éter de petróleo en caliente se había logrado extraer la mayor proporción de bases de R_f superior a 0,50, quedando el residuo R-1 enriquecido en bases con R_f menor a 0,50. El residuo R-2 estaba compuesto principalmente por una base de R_f :0,50, quedando así el extracto P-1 proporcionalmente enriquecido en cassina.

La solución P-1 se evaporó a sequedad y se extrajo el residuo con 200 ml. de *n*-hexano a reflujo durante 15 minutos y luego se enfrió a temperatura ambiente. Por decantación de la solución de *n*-hexano quedó un residuo H-1. La c.p.d. indicó que la solución de *n*-hexano contenía cassina con trazas de otros alcaloides y que el residuo H-1 tenía una composición similar a la del residuo R-2.

Se reunieron los residuos R-2 y H-1 y se volvieron a extraer 2 veces con 200 ml. cada vez de *n*-hexano a reflujo durante 15 minutos, enfriándose luego a 5°C durante una noche y separándose la solución sobrenadante de *n*-hexano del residuo H-2.

Las soluciones de *n*-hexano se reunieron con la que se obtuvo anteriormente y el residuo H-2 se reunió con la Fracción Z (pág. 174) cuyas composiciones eran similares (c.p.d.), obteniendo 1,33 g. de mezcla de bases de color pardo amarillento - mezcla G - .

El residuo de las extracciones con el éter de petróleo, R-1, se extrajo 3 veces a reflujo con 150 ml. de éter etílico decantándose en frío. Las soluciones etéreas reunidas consistían en una mezcla compleja de bases de R_f inferior a 0,50 (Sistema I) y en el residuo quedó una pequeña cantidad de bases con R_f inferior a 0,20. Estas dos fracciones no se estudiaron en más detalle.

10) Cromatografía en sílica gel de la mezcla G.

La mezcla G (1,33 g.) se disolvió en 3 ml. de una mezcla de partes iguales en volumen de benceno y cloroformo y se volcó sobre una columna de 25 g. de sílice Schaar (preparada por suspensión en el mismo solvente). Se eluyó con los siguientes resultados:

TABLA III

Fracción Nº	Eluyente	Peso del Residuo mg.
1	Benceno : Cl_3CH (50 : 50)	-
2	Cloroformo puro	-
3	Cl_3CH : MeOH (99 : 1)	-
4	" " (98 : 2)	250
5	" " (98 : 2)	210
6	" " (98 : 2)	50
7	" " (98 : 2)	10
8	" " (95 : 5)	370
9	" " (92 : 8)	320
10	" " (92 : 8)	45
11	" " (92 : 8)	15

La cromatografía en placa delgada -Sistema I- de los eluidos, mostró los siguientes resultados:

R_f	0,75	0,66	0,50	0,30	0,22	0,10
Fracción 4	++	+	++	+	+	
Fracción 5	+	+	+++	+	+	+
Fracción 8	+	+	+++	+	+	
Fracción 9		+	+++	++		+
Fracción 10		+	+++		+	+

11) Aislamiento del clorhidrato de la Base III, clorhidrato de prosopinona

a) Cristalización

La fracción Nº 8 no contenía prácticamente cassina y en ella se encontraba en mayor proporción una base de Rf : 0,50 además de una menor cantidad de otras dos con Rf de 0,30 y 0,22. Se disolvieron los 370 mg. en 1 ml. de etanol y se agregó 0,4 ml. de ácido clorhídrico concentrado y se enfrió en baño de hielo sin que se produjera precipitado. Se agregó luego 3 ml. de isopropanol, sin que se notara cambio, y luego 0,5 ml. de éter de petróleo hasta turbidez. Se dejó en heladera durante 48 horas obteniéndose 26 mg. de un producto cristalino que se separó por filtración. Por c.p.d. - Sistema I - se comprobó que este clorhidrato correspondía a una base con Rf 0,30 (Base Nº III). Secado en desecador a vacío a temperatura ambiente durante 24 hs. dió p.f. (c) 138 - 139,5. Por recrystalización de isopropanol se obtuvieron 17 mg. de p.f. (c) 139,5 - 141 °C.

b) Espectro infrarrojo del clorhidrato de la Base III, prosopinona HCl, en mull de nujol

Presenta máximos a los siguientes números de onda:

3400 (O-H), 3280 (N-H), 2920 (f)(C-H), 2860 (sh)(C-H), 1710 (C=O), 1535 (N-H), 1460 (f)(C-H), 1380 (f)(C-H), 1160, 1090, 1060, 990, 925 y 725 cm^{-1} .

12) Obtención de la Base Nº III: Prosopinona.

Se liberó la base por disolución en agua, alcalinizando con hidróxido de amonio y extracción con cloroformo. Este se secó y evaporó, obteniendo 15 mg de un aceite que cristalizó por estacionamiento y secado a temperatura ambiente. Con la base libre se efectuaron:

a) Espectro infrarrojo de la Base III en solución de Cl_3CH

Presenta máximos a los siguientes números de onda:

3350 - 3020 (ancho)(O-H, N-H), 2920 (f)(C-H), 2860 (sh)(C-H), 1710 (f)(C=O), 1650 (sh)(N-H), 1460 - 1360 (ancho), 1290, 1140, 1090, 1000, y 835 - 825 (ancho), cm^{-1} .

b) Espectro de resonancia nuclear magnética en solución de dinitrocloroformo de la Base III

El espectro está representado en la página 165 y las señales más importantes se destacan a:

<u>Pico</u> (ppm)	<u>Extensión</u> (ppm)	<u>Integración</u> (protones)	<u>Asignaciones</u>
s, 1,28	1,0 - 2,0	22	-CH ₂ - alifáticos y cíclicos
s, 2,15	2,0 - 2,25	3	CH ₃ CO -
m, (2,45)	2,25 - 2,65	2	-CH ₂ -CO -
m, (2,83)	2,65 - 3,10	2	-CH - NH - CH -
3,95	3,5 - 4,5	6	HO - CH < cíclico (aprox. δ=3,6) HO - H ₂ C - (δ = 3,95) 2 - OH (?) y NH (?)

No hay señales a campos más bajos que δ = 4,5 ppm. La integración basada en los 3 protones del acetilo indican un total de 35.

La destilación de la Base III a 0,001 mm Hg y a 130°C produjo 1 mg. de un aceite que solidificó en una masa cristalina de color blanco. Su c.p.d. -Sistema III- indicó que contenía pequeñas impurezas de otros alcaloides. Con el producto destilado se obtuvo el espectro de masa.

c) Espectro de masa de la Base III

Intensidades relativas de los picos importantes referidas al ion base de m/e=130, 100%, común a M-183 y M-211; siendo M⁺ el ion molecular de la Base III (prosopinona) y M'⁺ el ion molecular del análogo que tiene la cadena lateral extendida en dos metilenos. En m* se identifican picos metaestables.

Ion (+)	m/e	abundancia relativa, %	Ion (+)	m/e	abundancia relativa, %
M	313	0,57	M'	341	0,19
M-1	312	1,14	M'-1	340	0,15
M-15	298	0,98	M'-15	326	0,40
M-17	296	0,51	M'-17	324	0,37
M-18	295	0,25			
M-31	282	53,27	M'-31	310	13,75
M-43	270	1,20	M'-43	298	(ver M-15)
m*	278	(313-H ₂ O)			
M-57	256	8,16	M'-57	284	4,0
M-59	254	0,69	M'-59	282	(ver M-31)
m*	247	(282-H ₂ O)	m*	276	(310-H ₂ O)
M-75	238	2,00	M'-75	266	1,20
m*	221	(256-H ₂ O)	m*	249	(284-H ₂ O)
M-183	180	100,00	= M'-211		

Picos significativos de masa menor que el ión base:

114 : 17%; 112 : 8% (base - H₂O) y m* = 96,5; 86 : 4%;
69 : 18%; 60 : 34%; 58 : 13%; 57 : 17%; 56 : 23%;
55 : 40%; 43 : 73%; 41 : 48%.

13) Aislamiento del Clorhidrato de Carnavalina (Base II de Rf 0,50 - Sistema I)-

La solución remanente de la precipitación de la Base III se evaporó, se tomó en ácido clorhídrico, se alcalinizó con hidróxido de amonio y se extrajeron los componentes básicos con cloroformo. La solución cloroformica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se llevó a sequedad por evaporación a presión reducida. La mezcla de bases se disolvió en 150 ml. de éter etílico bien seco y se burbujeó ácido clorhídrico seco hasta turbidez. Se dejó estacionar la solución etérea en frasco bien cerrado en una heladera durante 24 horas obteniéndose 26 mg. de clorhidrato de carnavalina en buen estado de pureza (c.p.d.) -p.f.(c)154-155°C con ablandamiento a 144°C.

La solución etérea remanente se trató con un exceso de ácido clorhídrico gaseoso seco y se dejó nuevamente en la heladera durante 48 horas obteniéndose por decantación un aceite que consistía en una mezcla de clorhidratos de diferentes alcaloides.

14) Aislamiento de Carnavalina

La base se liberó de su clorhidrato por disolución en una solución diluida de ácido clorhídrico, alcalinización con hidróxido de amonio y extracción con éter etílico que se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó dejando una masa blanca cristalina de 23 mg. de carnavalina - p.f.(c) : 60,7-61,5°C. Con la misma se efectuaron los siguientes espectros:

a) Infrarrojo, como film, de la Base II, Carnavalina

Presenta máximos a los siguientes números de onda:

3380 (ancha - f)(O-H,N-H); 2920 (f)(C-H); 2860 (sh)(C-H);
1460 (C-H); 1440(sh)(C-H); 1375; 1320; 1120-1080 (doblete);
980 (ancha) y 725 cm⁻¹.

b) Resonancia magnética nuclear en dotorocloroformo de la Base II

El espectro está representado en la página 164 y las señales más importantes se destacan a:

Pico (ppm)	Extensión (ppm)	Integración (protones)	Asignación
d, 1,10	1,00 - 1,12	3	CH ₃ -CH< cíclico J = 5 c.p.s.
d, 1,19	1,12 - 1,22	3	CH ₃ -CHOH -
s, 1,28	1,22 - 2,40	24	-CH ₂ - alifáticos y cíclicos
s, 2,53	2,40 - 2,65	3	2-OH (?) y NH (?)
m, (2,85)	2,65 - 3,10	2	-CH - NH - CH -
s, 3,60	3,50 - 3,7	1	HO - CH< cíclico
m, (3,82)	3,7 - 4,1	1	-CH ₂ - CHOH - CH ₃

No hay señales a campos mas bajos. La integración basada en los seis protones metílicos da un total de 37 protones.

c) Espectro de masa de la Base II

Presenta los siguientes picos importantes cuyas intensidades relativas (%) se dan con respecto a la abundancia del ión base a m/e = 114, siendo M el ión molecular de la carnavalina y M' y M'' los iones moleculares de las trazas de homólogos de la carnavalina que tienen sus cadenas laterales extendidas en 2 y en 4 metilenos respectivamente. Con m* se identifican picos metaestables.

ión (+)	m/e	abundancia relativa %	ión (+)	m/e	abundancia relativa %	ión (+)	m/e	abundancia relativa %
M	299	0,53	M'	327	0,02	M''	355	0,03
M-1	298	0,94	M'-1	326	0,04	M''-1	354	0,07
M-15	284	3,36	M'-15	312	0,07	M''-15	340	0,04
M-17	282	0,74	M'-17	310	0,04	M''-17	338	0,01
M-18	281	0,28	M'-18	309	0,02	M''-18	337	0,03
M-19	280	0,50	M'-19	308	0,03	M''-19	336	-
M-33	266	1,18						
m*	264	(299-H ₂ O)						
m*	263	(298-H ₂ O)						
M-45	254	0,53						
m*	249	(284-H ₂ O)						
M-57	242	0,97						
M-59	240	1,58						

Picos significativos de masa menor al ión base; M-185, m/e=114 : 100%; M-16 : 8,5% (Base-H₂O) y m* =80,8, 70:8%, 69:5%, 67:5%, 58:1,7%, M-17 : 3,4%, 56:4,3%, 55:5,6%, 45:11,3%, (44, 43 y 42) intensidad superior a 20%.

EXTRACCION DE LAS HOJAS DE CASSIA CARNAVAL EN MAYOR ESCALA

1) Extracción y separación con n-hexano

Se extrajeron 6,827 kgs. de hojas secas finamente divididas por suspensión en 25 litros de metanol durante 3 semanas a temperatura ambiente.

El extracto metanólico se separó por filtración y se concentró a presión reducida a 50°C hasta un volumen de 2 litros, obteniéndose un aceite oscuro y siruposo que se dividió en dos fracciones para facilitar su posterior tratamiento. Estas se trataron repetidamente con soluciones acuosas de ácido sulfúrico al 2% obteniéndose un extracto acuoso total de 3 litros, separado por filtración (Filter-Cell) del barro residual libre de alcaloides.

Luego se extrajo la fase acuosa varias veces con cloroformo hasta que éste saliera incoloro. Se encontró reacción negativa de Dragendorff en los lavados clorofórmicos. La solución acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio y se extrajo con cloroformo (4 litros en total) hasta reacción negativa de Mayer en la fase acuosa.

Una vez lavada la fase orgánica con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida obteniéndose 40,5 gs. de un aceite de bases de color pardo cuya composición se estableció cualitativamente por c.p.d. Sistema I - determinándose la presencia de por lo menos 6 alcaloides siendo el principal de ellos la cassina.

El aceite se extrajo con 150 ml. de n-hexano a reflujo durante 30 minutos, luego se enfrió a 5°C durante media hora y se dejó equilibrar la solución con el residuo a temperatura ambiente durante media hora, después de lo cual se decantó la solución sobrenadante de n-hexano. Esta operación se repitió 5 veces y se reunieron los extractos de n-hexano, obteniendo 750 ml. de una solución amarilla que por evaporación del solvente a presión reducida dejó un residuo de 9 g. que por c.p.d. (Sistema I) demostró estar formada principalmente por cassina ($R_f:0,75$) y una pequeña proporción de carnavaína ($R_f:0,50$). Se obtuvo además un residuo de la extracción con n-hexano cuyo tratamiento se describe más adelante.

2) Aislamiento del clorhidrato de cassina

La mezcla de bases que se extrajo con n-hexano se disolvió en 25 ml. de isopropanol, se agregó un exceso de ácido clorhídrico concentrado y se calentó a ebullición hasta disolución total. Enfriando la solución se produjo un precipitado voluminoso de agujas de color ambar. Se separó la masa de cristales por filtración. Se recrystalizó dos veces más de isopropanol obteniéndose 6,5 gr. de clorhidrato de cassina (pura por c.p.d. - Sistema I) de color amarillo tenue : p.f. (c): 165°C. Las aguas madres se reunieron y su tratamiento se describe más adelante, (pag. 184).

a) Purificación del clorhidrato de Cassina

Se sublimó una fracción del clorhidrato de cassina a 0,001 mm Hg y a 120°C obteniéndose 800 mg. de clorhidrato de cassina pura, p.f. (c): 169-170°C.

b) Espectros realizados con el clorhidrato de cassina

- Datos de la curva de dispersión óptica rotatoria: en solución de 0,644 gr. por 7 ml., en metanol, no dió ninguna indicación de actividad óptica entre 200 y 500 m μ . La curva está representada en la página 120.

- Espectro ultravioleta en etanol: en solución de 314 mg./litro y 449 mg./litro no se encontraron máximos ni absorción apreciable. Solamente a 280 m μ aparece un máximo de muy pequeña intensidad.

- Espectro infrarrojo (ver página 169).

- El espectro de masa del clorhidrato no se pudo realizar debido a que no tenía una volatilidad apropiada.

3) Aislamiento de la cassina.

Los 5,5 g. restantes del clorhidrato de cassina se disolvieron en una solución acuosa metanólica que se alcalinizó con un exceso de hidróxido de amonio y se extrajo con cloroformo. La solución clorofórmica se lavó con agua y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se evaporó a presión reducida obteniéndose 5,2 g. de cassina que cristalizó al eliminarse el solvente. Se separó 1 g. de esta base y se destiló a 0,001 mm. Hg y a 100°C obteniéndose 850 mg. de cassina pura, p.f. (c): 55.5-57,2°C.

- Datos de la curva de dispersión óptica rotatoria: en solución de 5,032 gr. por 1 ml. en metanol dió una curva simple negativa con $\rho = 0$ (400 m μ); -20 (300 m μ); -120 (250 m μ); -530 (200 m μ). La curva está representada en la página 120.

- Espectro ultravioleta en etanol: en solución de 449 mg./litro no se encontraron máximos ni absorción apreciable. Solamente a 277 m μ aparece un máximo de muy pequeña intensidad.

- Espectro infrarrojo en tetracloruro de carbono presenta máximos a los siguientes números de onda:

3500 (OH), 3300 (NH), 2900 (f)(C-H), 2820 (sh)(f)(C-H), 1702 (f) (C=O), 1630 (N-H), 1445 (f)(C-H), 1420, 1375, 1340, 1300, 1155, 960 y 690 cm⁻¹.

- Espectro de R.N.M: está representado en la página 164 e integra 35 protones. Señales a δ (ppm): d, 1,10 (CH₃ del C₂) (J=6 cps); s, 1,28 (CH₂) (22 H entre 1,18 y 2,0); s, 2,15 (CH₃C=O); m, entre 2,2 y 2,47 (CH₂-C=O); 2,53 (1H); m, entre 2,57 y 3,0 (HC-NH-CH); entre 3,0 y 3,50 (1H); s, 3,55 (HO-CH< cíclico). No hay señales a campos más bajos.

- Espectro de masa: Intensidades relativas de los picos importantes referidas al ión base de m/e=114

<u>Ión (+)</u>	<u>m/e</u>	<u>abundancia relativa %</u>
M	297	1,98
M-1	296	0,90
M-15	282	1,81
M-17	280	0,42
M-18	279	0,30
m*	261.5	(297-H ₂ O)
M-43	254	0,85
M-57	240	8,14
M-59	238	2,46
M-75	222	0,56
m*	205.5	(240-H ₂ O)
M-183	114	100,00

Picos significativos de masa menor que el ión base:

96: 7,4% (base-H₂O) y m* 80,8; 70: 6%; 69: 7,8%;
 68: 5%; 67: 4,4%; 58: 5,2%; 57: 2,5%; 56: 5%;
 55: 11,2%; 47: 8,3%; 43: 24%; 41: 13,5%

4) Tratamiento del residuo de las extracciones con n-hexano

El residuo de las extracciones con n-hexano se cromatógrafió en una columna de alúmina neutra WOELM. (100g.) que se eluyó con benceno, soluciones de cloroformo en benceno cada vez mas concentradas en cloroformo, cloroformo puro, soluciones de metanol en cloroformo cada vez mas concentradas en metanol y con metanol puro. Se cambió el eluyente cuando los residuos obtenidos por evaporación de la fracción eran mínimos. La c.p.d. de los residuos de las distintas fracciones mostro que la columna no producía separaciones nítidas sino que se eluían mezclas de bases cuyos R_f (Sistema I) disminuían a medida que aumentaba la polaridad del eluyente. De acuerdo con los resultados de la c.p.d. de los residuos, se reunieron las mezclas para formar cuatro nuevas fracciones que tenían la mayor proporción de bases de igual R_f (Sistema I), fracciones J, K, L y M.

5) Tratamiento de la fracción J

La primera fracción, J, consistía en 6 g. de bases libres y contenía principalmente cassina y carnavalina en proporciones iguales. Se reunió esta fracción J con las aguas madres de la cristalización del clorhidrato de cassina (ver pág. 182) que por c.p.d. demostraron tener una composición similar y el conjunto se disolvió en una solución hidroalcohólica, se alcalinizó con hidróxido de amonio y se extrajeron las bases libres con cloroformo. Después de lavar,

ecar y evaporar la solución se obtuvieron 9,5 g. de una mezcla de bases libres que se cromatografió sobre una columna de sílice BDH (160 g.) suspendida en cloroformo. Por estacionamiento de la mezcla en la cabeza de la columna se produjo una difusión que alcanzó a mitad de la misma y a continuación se eluyó con cloroformo libre de alcohol y bien seco y posteriormente con soluciones de metanol en cloroformo según se indica en la tabla.

CROMATOGRAFIA DE LA FRACCION J

Fracción Nº	Eluyente Cl ₃ CH : MeOH	Volumen ml.	Peso del residuo mg.	c.p.d. R _f	Sistema I- Intensidad relativa
1	100 : 0	1500	20	mezcla	
2	99,5 : 0,5	1000	20	"	
3	99 : 1	1000	30	"	
4	98 : 2	1000	35	"	
5	97 : 3	1000	25	"	
6	96 : 4	2000	5.700		
7	95 : 5	1500		0,75	+++
8	92,5 : 7,5	1000		0,67	+
9	90 : 10	1000		0,50	±
10	87,5 : 12,5	1000	1.000		
11	85 : 15	1500		0,67	++
12	80 : 20	2000		0,50	+++
13	75 : 25	1000	400		
14	60 : 40	1500		0,66	+
15	40 : 60	1500		0,50	+++
16	20 : 80	1500			
17	0 : 100	2500	1.000	mezcla coloreada	

1) Tratamiento de la fracción K

La segunda fracción, K, estaba formada por una mezcla de bases en la que predominaba la carnavalina, estando presente en menor cantidad la Base III. Esta mezcla se suspendió en una solución hidroalcohólica, se alcalinizó con hidróxido de amonio y se extrajo con cloroformo que una vez lavado, secado sobre sulfato de sodio y evaporado

dejó un residuo de 9,7 gs. de productos básicos que se cromatografiaron en una columna de sílice de BDH (170 gs.)

La elución de esta columna se realizó como la anterior y los resultados están consignados en la siguiente tabla.

CROMATOGRAFIA DE LA FRACCION K

Fracción Nº	Eluyente Cl ₃ CH : MeOH	Volumen ml.	Peso del residuo mg.	c.p.d. R _f	Sistema I- Intensidad relativa
1	100 : 0	1000	20		
2	98 : 2	1000	3.000	0,75	++
3	96 : 4	2000		0,66	+
4	94 : 6	1500		0,50	+++
5	92 : 8	1500	500	0,75	+
				0,66	+
				0,50	++
				0,30	+
				0,20	++
6	90 : 10	1000	2.000	0,66	±
7	80 : 20	2000		0,50	+++
8	60 : 40	1500		0,40	±
9	40 : 60	1000		0,30	±
10	20 : 80	1000		0,20	±
11	0 : 100	1500	1.000	mezcla coloreada	

Se observó que cierta cantidad de bases quedó retenida en la columna. No se pudo obtener ninguna fracción que contuviera una cantidad apreciable de Base III.

7) Tratamiento de la fracción L

La tercera fracción, L, contenía principalmente tres alcaloides de R_f: 0,30, 0,20 y 0,10 (c.p.d. - Sistema I -) encontrándose en mayor proporción la base de R_f: 0,20. Como esta mezcla quedó estacionada por un período de tres semanas se disolvió en una solución hidroalcohólica que se acidificó con ácido sulfúrico y se lavó con cloroformo. Por evaporación del extracto cloroformico se obtuvieron 3,13 g. de un aceite oscuro que se suspendió en cloroformo y se cromatografió en una columna de sílice BDH (57 gs.) con el siguiente resultado:

CROMATOGRAFIA DE LA FRACCION L

Fracción Nº	Eluyente Cl ₃ CH : MeOH	Volúmen ml.	Peso del residuo mg.	c.p.d. (-Sistema I-)
1	100 : 0	500	70	mezcla oscura
2	99 : 1	500	1.500 (re- siduos blancos sólidos)	mezclas de 4 ó 5 bases con R _f entre 0,10 y 0,66 que se encontraban en proporciones similares
3	98 : 2	500		
4	96 : 4	750		
5	92 : 8	500		
6	90 : 10	750		
7	75 : 25	750		
8	0 : 100	100	200 (acei- te oscuro)	
9	0 : 100	200	270 (sólido blanco)	R _f = 0,23
10	0 : 100	200	250	R _f = 0,23
11	0 : 100	50	10	R _f = 0,23

La c.p.d. (Sistema III) demostró que la base (IV) aislada en las fracciones 9, 10 y 11 tenía un R_f = 0,29 y era distinta a la base Nº III (R_f = 0,40) que se había aislado como clorhidrato (página 178).

La cuarta fracción, M, era una mezcla de bases de muy bajos R_f. La elución de la misma por una columna de sílica gel no permitió ninguna separación apreciable, por lo que se descartó su estudio posterior.

) Aislamiento de carnavalina

Se reunieron los residuos ricos en carnavalina (fracciones No. 14, 15 y 16 de la cromatografía de la fracción J, y las fracciones Nº 6, 7, 8, 9 y 10 de la cromatografía de la fracción K) disolviéndolas en cloroformo, que luego se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se tomó en 400 ml. de ácido sulfúrico al 2% y se lavó esta solución acuosa con éter etílico y posteriormente con cloroformo, descartando los solventes orgánicos que extrajeron parte del color de la solución acuosa. Posteriormente se alcalinizó la solución acuosa con un exceso de hidróxido de amonio, extrayéndose los componentes básicos con cloroformo. La solución clorofórmica se extrajo

repetidamente con una solución de ácido sulfúrico al 2% hasta reacción negativa de Dragendorff descartándose la fase orgánica. La solución acuosa se alcalinizó nuevamente con un exceso de hidróxido de amonio y se extrajeron los componentes básicos con cloroformo. Por evaporación del solvente lavado y secado se obtuvieron aproximadamente dos gramos de una mezcla de bases que se cromatografiaron sobre una columna de 25 g. de sílica gel Davidson.

Fracción Nº	Eluyente Cl ₃ CH : MeOH	Peso del residuo mg.	c.p.d.
1	100 : 0	escaso	
2	90 : 10	800	Mezcla de bases
3	80 : 20	560 cristalino	Carnavalina
4	75 : 25	130 cristalino	Carnavalina
5	20 : 80	200	Mezcla de bases

La fracción 4 se destiló a 0,001 mm Hg y a 120° C, separándose un aceite que solidificó formando una masa cristalina incolora en el tubo de destilación por estacionamiento a temperatura ambiente durante una noche, obteniéndose 107 mg. de Carnavalina cromatográficamente pura (c.p.d. de p.f. (c)- 60,5-61,5°C; p.f.(k)- 62-65°C.

La fracción 2 de esta última cromatografía se reunió con el residuo obtenido de los eluidos metanólicos de la cromatografía de la fracción K. La mezcla se disolvió en una solución hidroalcohólica ácida que se lavó con cloroformo. La fase acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio y se extrajeron las bases con cloroformo que se lavó, secó sobre sulfato de sodio y se evaporó, con lo que se obtuvieron 1,6 gs. de carnavalina impura. Esta se cromatografió nuevamente por una columna de sílica gel Davidson de 25 gs.

Fracción Nº	Solvente ^x Cl ₃ CH : MeOH	Residuo	c.p.d.
1	100 : 0		
2	95 : 5	16 mgs.	mezcla
3	90 : 10	500 "	mezcla
4	80 : 20	250 "	carnavalina
5	50 : 50	250 "	carnavalina
6	CH ₃ OH	300 "	mezcla

^x El volumen de cada una de las fracciones se reguló de acuerdo con la reacción de Dragendorff que se obtenía en el eluido.

De esta manera se obtuvo por evaporación de la fracción 4 una segunda cosecha de carnavalina (250 mg.).

Los datos físicos del producto obtenido fueron similares a los descritos en pag. 180 para la extracción en menores cantidades.

9) Aislamiento de la Base N° IV

Se reunieron las fracciones 9, 10 y 11 de la cromatografía de la fracción L por disolución en éter etílico de los residuos obtenidos al evaporar el eluyente, obteniendo 480 mg. de un producto sólido blanco que por cromatografía en placa delgada - Sistema III- demostró estar constituida principalmente por la Base IV e impurificada con una pequeña cantidad de Base III además de trazas de otras bases con Rf menores.

El producto sólido se dividió en dos fracciones iguales. Con una de ellas se intentó preparar el clorhidrato de la base disolviéndola en éter etílico seco y haciéndolo burbujear ácido clorhídrico gaseoso y seco, hasta que apareciera una turbidez acentuada. Se guardó la solución en frasco bien cerrado en heladera durante 48 horas observándose la formación de un precipitado blanco amorfo escaso. La otra fracción se destiló a 0,001 mm Hg a 130°C, pero la c.p.d. del sólido obtenido demostró que por destilación no se producía una separación de los alcaloides contaminantes.

10) Purificación de la Base N° IV

Se reunió el residuo de la destilación de la Base IV con el producto destilado disolviéndolos en cloroformo. Se eliminó el solvente por destilación a presión reducida y se tomó el residuo con 200 ml. de una solución acuosa de ácido sulfúrico al 2%. Se lavó la solución con cloroformo y luego se alcalinizó con un exceso de hidróxido de amonio. Los compuestos básicos se extrajeron con 250 ml. de éter etílico. La solución etérea se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Por evaporación de la misma se obtuvieron 250 mg. de productos básicos, que se disolvieron en un pequeño volumen de cloroformo y se volcaron sobre una columna de 20 g. de alúmina neutra WOELM.

Fracción N°	Solvente Cl ₃ CH : MeOH	Volúmen ml.	Peso del residuo mg.	c.p.d. - Sistema III
1	100 : 0	200	-	
2	99 : 1	200	-	
3	98 : 2	200	-	
4	97 : 3	200	15	mezcla
5	96 : 4	50	70	mezcla
6	95 : 5	250	110	base IV R _f : 0,29
7	95 : 5	110	15	base IV R _f : 0,29
8	90 : 10	200	8	mezcla

La evaporación de la fracción 6 dejó un residuo aceitoso translúcido con un color amarillo tenue cuyo peso fué de 110 mg. Se guardó en desecador a vacío cubierto con papel de estaño para evitar su coloración por acción de la luz y con el mismo se efectuaron los siguientes espectros:

a) Infrarrojo, como nujol, de la Base IV:

Presenta máximos a los siguientes números de onda:

3350 (ancha)(f)(O-H,N-H), 2920 (f)(C-H), 2860 (f)(C-H),
1465 (f)(C-H), 1380, 1080, 1045, 1001 - 985 (doblete),
933, 790 y 725 cm^{-1} .

b) Resonancia magnética nuclear de la Base IV en deuterocloroformo:

El espectro está representado en la página 165 y las señales más importantes se destacan a δ (ppm):

1,07 (CH_3 en 2), 1,16 (CH_3 en 16'), 1,26 (numerosos metilenos)
m, 2,35 - 3,00 (H, en α del N), 3,25 (6H ?), 3,60 (H carbinólico
del núcleo), m, 3,65-4,10 (2H carbinólicos de la cadena lateral).

No hay señales a campos más bajos. La integración basada en los
dos metilos indica un total cercano a 45 protones.

c) El espectro de masa, presenta los siguientes picos importantes cu-
yas intensidades relativas se dan con respecto a la abundancia del
ión base a m/e 114.

ión	m/e	abundancia relativa %	ión	m/e	abundancia relativa %
M^+	371	0,35	M-89	280	0,25
M-1	370	0,15	M-105	266	0,47
M-15	356	0,36	M-164	207	0,63
M-17	353	0,20	M-185	186	2,17
M-18	352	0,24	M-202	169	0,43
M-33	338	0,14	M-216	155	0,92
M-45	326	0,10	M-230	141	2,28
M-57	314	0,13	M-244	127	5,76
M-59	312	0,19	M-257	114	100
M-87	284	0,36	Base-18	96	10,9

VI - DERIVADOS DE LAS BASES NATURALES DE CASSIA CARNAVAL

1) Dihidrocassina

a) Obtención de dihidrocassina por reducción de cassina.

Se disolvieron 200 mg. de cassina en 10 ml. de metanol y se agregó 1 ml. de agua y 115 g. de borohidruro de potasio. No se produjo reacción en frío. Se calentó la solución a 70° en baño maría, observándose el desprendimiento de burbujas durante 15 minutos. Se suspendió el calentamiento después de una hora y se descompuso el exceso de borohidruro de potasio volcando la solución sobre 200 ml. de agua. El producto de la reacción se extrajo de la solución acuosa con 150 ml. de éter etílico. La solución etérea se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó, obteniéndose 200 mg. de cassina reducida, que al dejar estar a temperatura ambiente durante tres días cristalizó totalmente, p.f. (c): 56°C. El producto se destiló a 0,001 mm Hg y su pureza se comprobó por c.p.d. -Sistema I- al aparecer una sola mancha de $R_f = 0,50$.

b) Comparación de la dihidrocassina con la carnavalina

Los espectros infrarrojos de la dihidrocassina y carnavalina resultaron ser idénticos y la similitud se mantiene a través de los espectros de resonancia magnética nuclear.

La comparación de estos compuestos, por c.p.d. con los diferentes materiales de soporte y distintos sistemas de solventes, indicados a continuación, comprobó su identidad.

MATERIAL DE SOPORTE	SISTEMA DE SOLVENTES	R_f		
		Cassina	Dihidro-cassina	Carna-valina
Sílica gel G (con ligante)	Ciclo- Cloro- Dietila- hexano: formo: mina 5: : 4 : 1	0,73	0,50	0,50
Alúmina bási- ca WOELM (Banda azul)	Acetona	0,71	0,63	0,63
	Cloroformo	0,41	0,19	0,19
	Cloroformo : Metanol 4 : 1	0,88	0,87	0,87
	9 : 1	0,90	0,90	0,90
	98 : 2	0,90	0,83	0,83
	Cloroformo : n-Hexanol 7 : 3	-	0,06	0,06
Avicel	Butanol : Ac.acético: Agua 4 : 1 : 1	0,90	0,90	0,90

2) O,O,N-triacetilcarnavalina y O,O,N-triacetildihidrocassina

a) Obtención por acetilación de las bases; método general.

Se calentaron a reflujo 75.5 mg. de carnavalina, o 150 mg. de dihidrocassina con 10 ml. de anhídrido acético y 120 o 200 mg. de acetato de sodio durante una hora a baño maría. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se volcó sobre 250 o 300 ml. de solución 1 N de bicarbonato de sodio para descomponer el exceso de anhídrido acético. El producto de reacción se extrajo con 150 a 200 ml. de éter etílico o cloroformo y la fase orgánica separada por decantación se lavó con 50 ml. de una solución saturada de bicarbonato de sodio, luego con agua hasta neutralidad y finalmente se secó sobre sulfato de sodio anhidro durante una noche. La evaporación del solvente produjo un aceite con una tenue coloración amarilla que se purificó por disolución en 100 ml. de éter etílico y percolación de la solución a través de una columna de 15 g. de alumina neutra WOEELM. Una vez lavada la columna con 50 ml. de éter etílico se evaporó la solución obteniendo en los respectivos casos 102 mg. o 170 mg. de un aceite traslúcido constatándose en cada caso la presencia de una sola sustancia de $R_f=0,50$ por c.p.d. - Sistema II-.

b) Comparación de los espectros de las bases acetiladas

Resultaron ser idénticos los espectros infrarrojo y de resonancia nuclear magnética de O,O,N-triacetilcarnavalina y de O,O,N-triacetildihidrocassina.

En los espectros infrarrojo de los films de estos compuestos se aprecian picos a los siguientes números de onda:

2920 (f) (C-H); 2860 (sh)(f)(C-H); 1740 (f) (éster); 1650 (f) (amida); 1460, 1420, 1375 (f), 1245(f)(ancho)(amida), 1170, 1130, 1075, 1033, 955, 915, 860, 750 y 725 cm^{-1} .

En los espectros de resonancia magnética nuclear de los mismos se destacan las siguientes señales: a $\delta=1,28$ el pico mas intenso del espectro correspondiente a los numerosos grupos metilenos, a $\delta=2,02$, $\delta=2,07$ y $\delta=2,13$ los singuletes de los tres grupos acetilo introducidos, a $\delta=4,89$ un multiplete correspondiente a la superposición de dos señales atribuibles al protón de cada uno de los dos átomos de carbono que portan las funciones éster de la molécula, y a $\delta=1,17$ un pico que debe corresponder a una parte del doblete originado por uno de los dos grupos metilos de la molécula, mientras que la parte restante, como así también la señal del segundo grupo metilo, probablemente se encuentran enmascaradas por la intensa señal de absorción metilénica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Burkart A. - Las Leguminosas Argentinas - ACME Agency, Buenos Aires, (1952) 2ª Edición.
- (2) Hieronymus J. - Bolet. Acad. Nac. Cien. en Córdoba - Tomo IV , 199 (1881).
- (3) Dominguez J.A. - Datos para la Materia Médica Argentina, 1905 , 1910 . Manganaro A. - Anales Soc. Cient. Arg. - 87, 157 (1919).
- (4) Faura R.E. - Physis. 18, 433 (1939).
- (5) Abiusso N.G. - Rev. Invest. Agric., 11, 259 (1957).
- (6) Burkart A. - Rev. Arg. de Agron. , 13, 36 (1946).
- (7) Colladon L.T. - Histoire Naturelle et Medicale des Casses Cassia, Montpellier - 1816 .
- (8) Perrot E. - Matieres Premieres usuelles du Regne Vegetal, Vol. 2 - Masson et Cie., Paris, 1943 .
- (9) (A) Henry A.T. The plant alkaloids, 123 (Ref. Nº 49 de esta tesis).
- (B) Webb L.J. "Australian Phytochemical Survey. Part I". CSIRO (Australia) Bulletin 241 (1949).
- (C) Wall M.E., Eddy C.R., Willaman J.J., Correll D.S., Schubert B.G., and Gentry H.S., "Steroidal Sapogenins XIII. Supplementary Table of Data for Steroidal Sapogenins XII," "U.S. Department of Agriculture, Eastern Utilization Research and Development Division, Philadelphia, AIC - 367 (1954).
- (D) Hight R.J. (Ref. Nº 12 de esta tesis).
- (E) Wall M.E., Fenske C.S., Willaman J.J. Correll D.S., Schubert B.G., and Gentry H.S. , "Steroidal Sapogenins XXVI. Supplementary Table of Data for Steroidal Sapogenins XXV," U.S. Department of Agriculture, Eastern Utilization Research and Development Division, Philadelphia, ARS -73-4 (1955).
- (F) Douglas B. and Kiang A.K. "A Phytochemical Survey. Part I. ALKALOIDS ". Malayan Pharmacy Journal 6, 138 (1957).

- (9) (G) Klein G., "Handbuch der Pflanzenanalyse" Vol. 4, J. Springer, Jena (1933).
- (H) Wall M.E., Fenske C.S., Garvin J.W., Willaman J.J. Jones Q., Schubert B.G., and Gentry H.S., "Steroidal Sapogenins LV. Survey of Plants for Steroidal Sapogenins and Other Constituents " American Pharmaceutical Association Journal, Scientific Edition, 48, 695 (1959).
- (10) Corresponde a la Ref. (9) (F) anterior.
- (11) Gonçaves de Lima O., d'Albuquerque I.L., Machado M. P., y Pinto G.P. - Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife, 1, 23 (1958).
- (12) Hight R.J. - J. Org. Chem., 29, 1471 (1964).
- (13) Hight R.J. and Hight P.F., J. Org. Chem., 31, 1275 (1966).
- (14) Rice W.Y. and Coke J.L., J. Org. Chem., 31, 1010 (1966).
- (15) Lythgoe D. and Vernengo M.J., Tetrahedron Letters, 12, 1133, (1967).
- (16) Ratle G., Monseur X., Das B.C., Yassi J., Khuong-Huu Q. et Goutarel R. - Bull. Soc. Chim. France, 2, 2945 (1966).
- (17) Cercos A.P., Argentina Agron. , 18, 200 (1950).
- (18) Siddiqui S. and Ahmad Z. - Ind. Acad. Sci. 2, 421 (1935).
- (19) Eisenbraun E.J. Bright A., Appel H.H. - Chem. & Ind. 1242 (1962).
- (20) Casinovi G.C., Garbarino J.A. y Marini-Bettolo, - Chem. & Ind. 253 (1961).
- (21) Casinovi G.C., Delle Monache F., Marini-Bettolo G.B. Bianchi E., Garbarino J.A. - Gazz Chim. Ital., 92, 479 (1962).
- (22) Casinovi G.C., Delle Monache F., Grandolini G., Marini-Bettolo G.B., y Appel H.H., Chem. & Ind.- London- 984 (1963).

- (23) Djerassi C., Kutney J.P., Shamma M. -Tetrahedron, 18, 183 (1962). -Chem. & Ind.-London-210 (1961).
- (24) Sakan T., Fujino A., Murai F., Butsugan Y., y Suzui A. - Bull. Chem. Soc. Japan, 32, 315 (1959). -ibid, 32, 1154 (1959). -ibid, 33, 712 (1960).
- (25) Torsell K. y Wahlberg K. - Tetrahedron Letters, 4, 445 (1966). -Acta Chem. Scand. 21, 53 (1967).
- (26) Maurin E. - Bulletin des Sciences Pharmacologiques, 34, 10-12 (1927).
- (27) Stoll A., Kussmaul W., Becker B. - Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges. 235 (1941).
- (28) Stoll A., Kussmaul W., Becker B. - Helv. Chim. Acta 32, 1892 (1949).
- (29) Stoll A., Becker B., Helfenstein A. - Helv. Chim. Acta, 33, 313-336 (1950).
- (30) Fairbairn J.W.,- J. Pharm. & Pharmacol -1, 683 (1949).
- (31) Fairbairn J.W., Michaelis R.- J. Pharm. & Pharmacol 2, 807 (1950).
- (32) Fairbairn J.W., Saleh M.R.I. - J. Pharm. & Pharmacol. - 3, 918 (1951).
- (33) Fairbairn J.W. - Planta Med., 12, 260 (1964).
- (34) Fairbairn J.W., Crellin J.K., Friedmann C.A., Ryan H.A. - J. Pharm. & Pharmacol., 13, 639 (1961).
- (35) Lou T.C. - J. Pharm. & Pharmacol., 1, 673 (1949).
- (36) Lou T.C., Fairbairn J.W. - J. Pharm. & Pharmacol. 3, 225 (1951).
- (37) Straub y Gebhardt - Arch. Exp. Path. Pharmacol., 181, 399 (1936).
- (38) Tutin - J. Chem. Soc., 103, 2006 (1913).
- (39) Lemli J. - Pharm. Tijdschr. Belg. 39, 67 (1962). -Pharm. Tijdschr. Belg., 40, 149 (1963). - Verh. Koninkl. Vlaam. Acad. Geneesk Belg., 25, 458 (1963).
- (40) Schmid W., Angliker E. - Helv. Chim. Acta, 48(8), 1911-21, (1965).

- (41) Lenli J., Dequeker R., Cuveele J. - Pharmac. Weekblad., 99, 589, 613 (1964).
- (42) Moes A. - J. Pharm. Belg., 19(3-4), 173-89 (1964).
- (43) Venkataraman K., Dutta N.L., Ghosh A.c., Nair P.M. - Tetrahedron Letters, 39-40, 3023-30, (1964).
- (44) Shibata S. - Recent Progress in the Chemistry of Natural and Synthetic Colouring Matters - T.S. Gore, Editor - Academic Press - New York - 1962.
- (45) Chatterjee A., Bhattacharjee S.R. - J. Indian Chem. Soc., 41(6), 415-19, (1964).
- (46) Seshadri T.R., Chiber S.S., Bhutani S.P. - Current Sci. (India) 35, 363 (1966).
- (47) Seshadri T.R., Adinayarana D. - Indian J. Chem., 4(2), 73-75 (1966).
- (48) Paris R.R., Cubuchu B. - Ann. Pharm. Franc., 20, 583-7, (1962).
- (49) Henry A.T. - The Plant Alkaloids - Fourth Edition - 723 (1949).
- (50) Wiesner K., Valenta Z., Hulbert B.S., Bickelhaupt f., Fowler L.R. - J. Am. Chem. Soc., 80, 1521 (1958).
- (51) Wiesner K., Valenta Z., Fowler L.R. - Chem. & Ind. 95 (1962).
- (52) Singh G., Nair G.V., Aggarwal K.P., Saksena S.S. - Chem. & Ind., 739 (1956).
- (53) Singh G., Nair G.V., Aggarwal K.P., Saksena S.S., Singh K. - J. Sci. Ind. Res. (India), 17B, 423 (1958); C.A. 53, 11423 (1959).
- (54) Leete E. - J. Am. Chem. Soc. 78, 3520 (1956).
- (55) Leete E., Gros E.G., Gilbertson J.J. - J. Am. Chem. Soc. 86, 3907 (1964).
- (56) Robertson A.V., Marion L. - Can. J. Chem. 37, 1043, (1959).
- (57) a) Grobbelaar N., Steward F.C. - J. Am. Chem. Soc. 75, 4341 (1953).

- (57) b) Lowry P.H., - Arch. Biochem. Biophys. 47, 228 (1953).
e) Meister A., Buckley S.D. - Biochem. Biophys. Acta, 23, 202 (1957).
d) Fowden L. - J. Exptl. Botany, 11, 302 (1960).
- (58) a) Leete E. - J. Am. Chem. Soc. 85, 3523 (1963).
b) Leete E. - J. Am. Chem. Soc. 86, 2509 (1964).
- (59) Leete E. - Science, 147, 1000 (1965).
- (60) Casinovi G.C., Marini-Bettolo G.B. - Abstracts A. meeting of International Union Pure Applied Chemistry, London (1963).
- (61) Auda H., Juneja H.R., Eisenbraun E.J., Waller G.R. Kays W.R., Appel H.H. - J. Am. Chem. Soc. 89, 2476 (1967).
- (62) Mothes K. - J. Pharm. Pharmacol. 11, 193 (1959).
- (63) Manske R.H.F. - "The Alkaloids" ed. Manske R.H.F. & Holmes H.L. - Academic Press, New York, vol.V, 295 (1955).
- (64) a) Smak A., Borozdina A. - Compt. rend. acad. Sci. U.R.S.S., 32, 62 (1941).
b) Smith H.H., Smith R.C. - J. Agr. Research, 65, 347 (1942).
c) Dawson R.F. - Am. J. Botany, 32, 416 (1945).
- (65) Battersby A.R. - Quart. Rev., 15, 265 (1961).
- (66) Alworth W.L., De Selms R.C., Rapoport H. - J. Am. Chem. Soc., 86, 1608 (1964).
- (67) a) Dawson R.F., Christman D.R., Anderson R.C., J. Am. Chem. Soc. 75, 5114 (1953).
b) Dawson R.F., Christman D.R., D'Adamo A., Solt M. L., Wolf A.P. - J. Am. Chem. Soc. 82, 2628 (1960).
c) Dawson R.F., Christman D.R., Solt M.L. - Plant Physiol., 35, 887 (1966).
- (68) Tuson R.V. - J. Chem. Soc., 17, 195 (1864).

- (69) a) Waller G.R., Henderson L.M. - J. Biol. Chem. 236, 1186 (1961).
b) Leete E., Leitz F.H.B. - Chem. Ind. London, 1572 (1957).
- (70) Leete E. - Chem. & Industry, 1477 (1958).
- (71) Krehl W.A., Teply L.J., Sarma P.S., Elvehjem C.A., -Science 101, 489 (1945).
b) Beadle G.W., Mitchel H.K., Nye J.F. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 33, 155 (1947).
c) Nishizuka Y., Hayaishi O. - J. Biol. Chem., 238, 3369 (1963).
d) Gholson R.K., Ueda I., Ogasawara N., Henderson L.M. - J. Biol. Chem., 239, 1268 (1964).
- (72) Leete E. - Chem. & Ind., 1270 (1957).
- (73) Henderson L.M., Someroski J.F., Rao D.R., Wu P.H.L., Griffith T., Byerrum R.U. - J. Biol. Chem., 234, 94 (1959).
- (74) Leete E., Friedman A.R. - J. Am. Chem. Soc., 85, 2141 (1963). - *ibid* 86, 1224 (1964).
- (75) Marion L., Juby P.F. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 461 (1961). ; Can. J. Chem., 41, 117 (1963). ; Can. J. Chem., 41, 1142 (1963).
- (76) Henderson M.L., Waller G.R. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 5, 5 (1961).
- (77) Schiedt U., Boeckh-Behrens G., Deluva A.M. - Z. Physiol. Chem. 330, 46, 58 (1962).
- (78) Brown G.M., Ortega M.V. - J. Biol. Chem., 235, 2939 (1960-).
- (79) Gross D., Schütte H.R., Hubner G., Mothes K. - Tetrahedron Lett., 541 (1963).
- (80) Leete E. - Chem. & Ind., 537 (1955).
- (81) Dewey L.J., Byerrum R.U., Ball C.D. - Biochim. Biophys. Acta, 18, 141 (1955).
- (82) Leete E., Gros E.G., Gilbertson T.J. - Tetrahedron Lett., 587 (1964).

- (83) Leete E., Gilbertson T.J. - J. Am. Chem. Soc., 89, 7085 (1967).
- (84) Schutte H.R., Maier W., Mothes K. - Acta Biochim. Polon. - 13, 401 (1966).
- (85) Tuppy H., Faltaous M.S. - Monatsch., 91, 167 (1960).
- (86) Leete E. - J. Am. Chem. Soc., 89, 7081 (1967).
- (87) Liebman A.A., Mundy B.P., Rapoport H. - J. Am. Chem. Soc., 89, 664 (1967).
- (88) Liebman A.A., Alworth W.L., Rapoport H. - J. Am. Chem. Soc. - 86, 3375 (1964).
- (89) Rothstein M., Miller L.L. - J. Am. Chem. Soc. - 76, 1459 (1954).
- (90) Schweet R.S., Holden T.J., Lowy P.H. - J. Biol. Chem. - 211, 517 (1954).
- (91) Robinson R. - J. Chem. Soc. - 111, 876 (1917).
- (92) Schiedt U., Hoss H.G. - Z. Naturforsch. - 13b, 691 (1958).
- (93) Bieman K., Buchi G., Walker B.H. - J. Am. Chem. Soc. - 79, 5558 (1957).
- (94) a) Leete E. - J. Am. Chem. Soc. - 80, 4393 (1958).
b) Leete E. - "Biogenesis of Natural Compounds" - P. Bernfeld, Editor, Pergamon Press-Oxford, 1963.
- (95) Schneider W.G., Bernstein H.J., Pople J.A. - Canad. J. Chem. - 35, 1487 (1957).
- (96) Eisenbraun E.J., Mc Elvain S.M. - J. Am. Chem. Soc. - 77, 3383 (1955).
- (97) Dolejs L., Mironov A., Sorm F. - Tetrahedron Letters - 11, 18 (1960).
- (98) Minato H., - Chem. & Pharm. Bull. Japan- 8, 625 (1961).
- (99) Bates R.B., Eisenbraun E.J., Mc Elvain S.M. - J. Am. Chem. Soc. - 80, 3420 (1958).
- (100) Mc Elvain S.M., Eisenbraun E.J. - J. Am. Chem. Soc. - 77, 1599 (1955).
- (101) Pavan M. - Ricerca Sci. - 19, 1011 (1949).

- (102) Appel H.H., Müller B. - *Scientia* - 115, 3 (1961).
- (103) Adolphsen G., Appel H.H., Overton K.H., Warnock W.D. C. - *Tetrahedron* - 23, 3147 (1967).
- (104) Lambert J.B., Kesbe R.G. - *J. Am. Chem. Soc.* - 88, 622 (1966).
- (105) Auda H., Juneja H.R., Eisenbraun E.J., Waller G.R., Kays W.R., Appel H.H. - *J. Am. Chem. Soc.* - 89, 2476 (1966).
- (106) Casinovi C.G., Giovanozzi-Sermanni G., Marini-Bettolo G.B. - *Gazz. Chim. Ital.* - 94, 1356 (1964).
- (107) Spitteller-Friedann M., Spitteller G. - *Monatsh.* - 95, 1234 (1964).
- (108) Greshoff, Mededeel - uit's Lands. Plant. Buitenzorg. - 7, 5 (1890).
- (109) Merck - Merck's Report - 30 (1891).
- (110) Van Rijn - *Arch. Pharm.* - 231, 184 (1893); *ibid.* - 232, 332 (1897).
- (111) Barger G. - *J. Chem. Soc.* - 97, 466 (1910).
- (112) Barger G., Girardet A., Robinson R. - *Helv. Chim. Acta* - 16, 90 (1933).
- (113) Barger G., Robinson R.,
y colaboradores - *J. Chem. Soc.* 711 a 718 (1937).
a) Work - 711
b) Urushibara - 714
c) Short - 715
d) Hart Smith - 718
- (114) Rapoport H., Baldrige H.D. - *J. Am. Chem. Soc.* - 73, 343 (1951).
- (115) Govindachari T.R., Narasimhan N.S. - *J. Chem. Soc.* 2635 (1953).
- (116) Rapoport H., Baldrige H.D. - *J. Am. Chem. Soc.* - 74, 5365 (1952).
- (117) a) Hammick D.L., Brown B.R. - *J. Chem. Soc.* - 73, 343 (1951).
b) Brown B.R. - *Quart. Rev.* - 5, 131 (1951).
c) Cantwell N.H., Brown E.V. - *J. Am. Chem. Soc.* - 74, 5967 (1952); *ibid.* - 75, 1489 (1953).

- (117) d) Sperber N.S., Papa D., Schwenck E., Sherlock M. - J. Am. Chem. Soc. - 71, 887 (1949).
e) Buchdahl M.R., Soine T.O. - J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. - 41, 225 (1952).
f) Dorfman L., Furlenmeier A., Huebner C.F., Lucas R., Mac Phillamy H.B., Mueller J.M., Schittler E. Schwyzer R., St. Andre A.F. - Helv. Chim. Acta - 37, 59 (1954).
- (118) Rapoport H., Volcheck E.J.(jr.) - J. Am. Chem. Soc. - 78, 2451 (1956).
- (119) Rapoport H., Baldrige H.D., Volcheck E.J.(jr.) - J. Am. Chem. Soc. - 75, 5290 (1953).
- (120) Govindachari T.R., Narasimhan N.S., Rajadurai S. - J. Chem. Soc. - 558 (1957).
- (121) Govindachari T.R., Narasimhan N.S., Rajadurai S. - Chem. Ind. - 53 (1956); J. Chem. Soc. - 560 (1957).
- (122) Gruber . - Berichte - 88, 178 (1955).
- (123) Narasimhan N.S. - Chem. Ind. - 1526 (1956).
- (124) Budzickiewicz H., Dejerassi C., Williams D.H. - "Structural Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Vol II." Holden-Day Ed. Inc. San Francisco, London, Amsterdam, 1964.
- (125) Spitteller-Friedmann M., Spitteller G. - *Monatsh.* - 96, 104 (1965).
- (126) Mc Lafferty F.W., - Appl. Spectroscopy - 11, 148 (1957); Anal. Chem. 31, 82 (1959).
- (127) Govindachari T.R., Narasimhan N.S. - J. Org. Chem. - 1563 (1955).
- (128) Scheuing, Winterhalder - Ann. - 473, 126 (1929).
- (129) Tichy M., Sicher J., - Tetrahedron Letters - 12, 511, (1962).
- (130) Govindachari T.R., Nagarejan K., Viswanathan - Tetr. Letters - 24, 1907 (1965).
- (131) Eliel E.L. - Tetrahedron letters 741 (1962).
- (132) Coke J.L., Rice W.Y.(jr.) - J. Org. Chem. - 30, 3420 (1965).

- (133) Govindachari T.R., Narasimhan N.S., Pai B.R. - J. Chem. Soc. - 1847 (1954).
- 134) a) Bartlett M.F., Dickel D.F., Taylor W.I. - J. Am. Chem. Soc. - 80, 126 (1958).
b) Hill R.K., Conley R.T. - J. Am. Chem. Soc. - 82, 645 (1960).
c) Grob C.A., Fischer H.P., Link N., Renk E. - Helv. Chim. Acta - 46, 1190 (1963).
- (135) Stuckert - Citado por Dominguez en ; Instituto de Botánica y Farmacología (Fac. Ciencias Médicas, Bs. As.) - Trb. Nº 1, 242 (1903).
- (136) Parodi - Rev. Farmacéutica - 15, 201 (1877).
- (137) Mosher H.S. - Heterocyclic Compounds - Vol. 1. - R.C. Elderfield Ed., J. Wiley & Sons Inc, New York - 442 (1950).
- (138) La Planche L.A., Rogers M.T. - J. Am. Chem. Soc. - 86, 337 (1964).
- (139) Comunicación Privada de R. Gouffarel
- (140) Djerassi C., Gellier L.E. - J. Am. Chem. Soc. - 81, 2789 (1959).
- (141) Craig J.C., Roy S.K. - Tetrahedron - 21, 401 (1965).
- (142) "Investigación Química de Vegetales" -F.C.E. y N. Buenos Aires , 1964.
- (143) Budzickiewicz H., Djerassi C., Williams D.H.- Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds - Holden-Day, Inc. - San Francisco - 1964.
- (144) Richards & Hendrickson - Biosynthesis of Terpenes, Steroids and Acetogenins - W.A. Benjamin Inc. - 1964.
- (145) Richards R.W. - Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds - Ed. W.D. Ollis - Pergamon Press - London - 1961.
- (146) Birch A.J., Fryer R.I., Smith H. - Proc. Chem. Soc. 343 (1958).
- (147) Mc Lafferty F.W. - Interpretation of Mass Spectra - W.A. Benjamin Inc., New York - 1967.
- (148) Hight R.J. - Hight P.F. - Tetrahedron Lett. 21, 1803 (1970).

- (149) Busch A. - Informe personal
- (150) Catálogo Sadtler - Espectro Nº 10 -(1966).
- (151) Decaux F. - Acta Phytotherapeutica - V. XV Nº 7, 122 (1968)
- (152) Bourrinet P., Quevauviller A. - Annales Pharmaceutiques Francaises. - 26 Nº 12, 787 (1968).
- (153) Streeter M., Adolphsen P.G., Appel H.H. - Chem. & Ind. Nº 45 (1969)
- (154) Hart N.K., Johns S.R., Lamberton J.A. - Austral J. Chem. - 21, 1321 (1968)
- (155) a) Poetke von W., Anaud Rao D., Löscher K.D. - Pharmaz. Zentralhalle - 107, (8) - 571 (1968)
b) Kaneda M., Morishita E., Shibata S. - Chem. & Pharm. Bulletin - 17 (3), 454 (1969); *ibid*, 17, 458 (1969)
- (156) Leete E. - Acc. Chem. Res. 4, 100 (1971)
- (157) a) Anton R., Duquenois P. - Annal. Pharm. Francaises - 26 (11), 45 (1968)
b) Ginde B.S., Hosangadi B.D., Kudav N.A., Nayak K.V., Kulkarni A.B., - J. Chem. Soc. 2, (1970)
- (158) Anchel M., McMorris T.C., Nair M.S.R. - Phytochem. 9 (5), 1153 (1970)
- (159) Bevan C.W., Ogan A.U. - Phytochem. - 3, 591 (1968)
- (160) a) Rondina R.V.D., Bandoni A.L., Coussio J.D. - Revist. Invest. Agropec. (INTA, Bs.As.) Serie 2, 8 (1), 29 (1971)
b) *ibid*. Rev. Invest. Agropec. (INTA, Bs.As.) En prensa.
- (161) Arora S., Deymann H., Tiwari R.D., Winterfield E. Tetrahedron, 27, 981 (1971)
- (162) Bycroft B.W., Hassani-ali-Walji A., Johnson A.W., King T.J. - J.Chem.Soc.(London) C, 1686 (1970)
- (163) Morales Mendez A. - Phytochemistry 10, 2255 (1971)
- (164) Gilbertson T.J. - Phytochemistry, 11, 1737 (1972)
- (165) Oberti J.C., Juliani H.R., - Anales Asoc. Quim. Argentina, 59 101 (1971).

- (166) Juliani H.R., - Comunicación Privada
- (167) Leete E., Olson J.O. - J. Am. Chem. Soc. - 94 (15),
5472 (1972)
- (168) Gupta R.N., Spencer I.D. - Phytochemistry, 9, 2329
(1970)
- (169) Rall G.J.H., Smalberger T.M., de Waal H.L., Arndt
R.R. - Tetrahedron Lett. - 36, 3465 (1967)
- (170) Khuong-Huu Q., Ratle G., Monseur X., Goutarel R. -
Bull. Soc. Chim. Belges - 81, 425 (1972)
- (171) Horeau A. - Tetrahedron Lett. - 15, 506 (1961) y
21, 965 (1962)
- (172) Khuong-Huu Q., Ratle G., Monseur X., Goutarel R. -
Bull. Soc. Chim. Belges - 81, 443 (1972)

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	1
I) COMPUESTOS AISLADOS DEL GENERO CASSIA	8
- Glicósidos antraquinónicos y flavonoides	8
- Chabsina	21
II) ALCALOIDES PIPERIDINICOS	24
- Alcaloides del Tabaco	26
- Alcaloides de la Cicuta	34
- Esquitantinas	38
III) ALCALOIDES PIPERIDINICOS RELACIONADOS CON LOS EN- CONTRADOS EN LA CASSIA CARNAVAL SPEG.	54
- Estructura de la carpaína	55
- Configuración de la carpaína	72
- Pseudocarpaína	82
- Alcaloides piperidínicos dimeros de <u>Azima tetra-</u> <u>cantha</u> Lam.	85
- Cassina - Estructura del núcleo piperidínico	87
- Estructura de la cadena lateral de la cassina	94
- Configuración absoluta de la cassina	97
- Alcaloides del género <u>Prosopia</u>	100
IV) ALCALOIDES DE LA CASSIA CARNAVAL SPEG.	114
- Introducción	114
- Separación y aislamiento de las bases	115
- Estudios realizados con la cassina	117
- Estructura de la carnavalina	132
- Estudios realizados con la Base III	144
- Estudios realizados con la Base IV	158
- Espectros de RMN de las bases	164

	Pag.
V) PARTE EXPERIMENTAL	166
- Generalidades	166
- Investigación de los componentes básicos de la corteza de la raíz	167
- Aislamiento de clorhidrato de cassina	169
- Extracción y reconocimiento de los productos básicos de la corteza de tronco de <u>Cassia carnaval</u>	171
- Extracción y reconocimiento de los productos básicos de hojas	172
- Aislamiento de cassina	174
- Aislamiento de clorhidrato de la Base III	178
- Aislamiento de clorhidrato de carnavalina	180
- Extracción de las hojas de <u>Cassia carnaval</u> en mayor escala	182
- Aislamiento de la Base IV	189
- Derivados de las bases naturales de <u>Cassia carnaval</u>	191

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS