



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**DEPTO. DE PASANTES Y  
EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

**RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR  
DE GLUCOSIDOS.**

**T E S I S**

Que para obtener el título, de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a**

**María de Jesús Cecilia Cruz Ortega**

**México, D. F.**

**1981**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Ofelia Espejo de Ochoa.
Vocal	Dr. Rafael Castillo Bocanegra.
Secretario	Dr. Raúl G. Enriquez Habib.
1er. Suplente	M.C. Ma. Teresa Reguero Reza.
2o. Suplente	M.C. Ma. Isabel Aguilar Laurents.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales. Div. de Estudios de Posgrado. Fac. de Química. U.N.A.M.

*M<sup>ra</sup> de la Cecilia Cruz Ortega.*  
Sustentante : María de Jesús Cecilia Cruz Ortega.

Asesores del tema: Dra. Ofelia Espejo de Ochoa.  
Dr. Raúl G. Enriquez Habib.

En este pequeño espacio quiero manifestar mi gratitud a mis padres que con su ejemplo y cariño han guiado mi vida; a Cristina, Rocio y Carlos, por todos los momentos agradables que he pasado en su compañía.

A la memoria de:

Aída Ma. Villegas Ramirez.

Su amistad perdurará en

mí eternamente.

A Nadia Cristina.

Por la felicidad que significa.

Agradezco a todas las personas que con su inapreciable ayuda hicieron posible la realización de este trabajo; especialmente a la Dra. Espejo y al Dr. Enriquez por su acertada dirección; a Angélica, Isabel, Lilia y César, por su desinteresada ayuda.

A mis amigos.

## INDICE

1.	Introducción .....	1
2.	Generalidades .....	2
2.1	Heterósidos .....	2
2.1.1	Propiedades químicas .....	7
2.1.2	Estructura .....	8
2.1.3.	Determinación de la estructura de los heterósidos ..	10
2.2	Resonancia Magnética Nuclear .....	14
2.2.1	Fundamentos .....	14
2.2.2	Desplazamiento químico .....	16
2.2.3	Multiplicidad. Constante de acoplamiento .....	18
2.2.4	Fenómenos de relajamiento .....	23
2.2.5	Reactivos de desplazamiento .....	26
2.2.6	Determinación de pesos moleculares por RMN .....	30
3.	Parte Experimental .....	33
3.1	Material .....	33
3.2	Preparación de derivados acetilados y obtención de los espectros de RMN- <sup>1</sup> H .....	34
3.2.1	Pentacetato de Esculina .....	35
3.2.2	Acetato de Diosgenina .....	36
3.2.3	Tetracetato de 3-O-[β-D-Glucopiranosil]-diosgenina .	36
3.2.4	Hexacetato de 3-O-[α-L-Ramnopiranosil-(1→4)-β-D-glu- copiranosil]-diosgenina .....	37
3.2.5	Octacetato de 3-O-([α-L-Ramnopiranosil-(1→4)]-[α-L- -ramnopiranosil-(1→2)-β-D-gluco piranosil])-diosgenina	38
4.	Resultados .....	44
5.	Discusión .....	47
6.	Apéndice de espectros .....	51
7.	Bibliografía .....	65

## 1. INTRODUCCION.

La revisión bibliográfica sobre la resonancia magnética nuclear de compuestos polihidroxilados y de derivados de ellos, muestra que ésta técnica ha proporcionado una gran cantidad de información tanto acerca de sus estructuras como de su conformación.

En el abordaje del tema se han empleado diferentes métodos y técnicas entre las que se cuenta la irradiación múltiple, el uso de derivados químicos, las diferentes técnicas de pulsos y la detección alternativa de H-1 y C-13 con sus diferentes modos de desacoplamiento, el uso de campos magnéticos intensos (mayores de 200 MHz) y los reactivos de desplazamiento.

A lo largo de este trabajo se demuestra que es posible cuantificar el número de azúcares unidos a la molécula empleando un campo de valor intermedio-bajo (90 MHz) y el criterio del número de grupos acetilo observados. Esta información pudo utilizarse adicionalmente con la del peso molecular, obtenida con un margen de error que normalmente no excedió del 2% para el estudio de las sustancias de este trabajo.

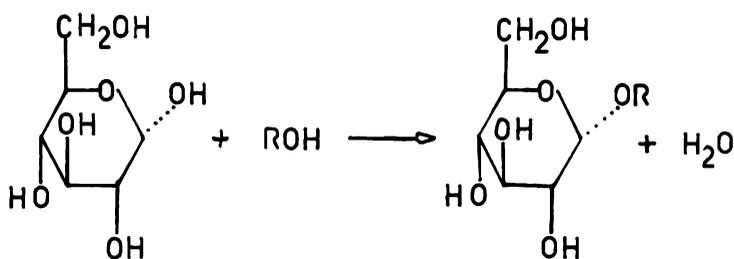
Con el peso molecular aproximado, el número de grupos oxhidrilos determinados y la información adicional de tipo químico sobre la naturaleza de los azúcares, se dispone de una información importante para postular la estructura de glucósidos en un gran número de casos.

## 2. GENERALIDADES.

### 2.1 Heterósidos.

El término más apropiado para nombrar a los glucósidos es el de heterósido, en el que el prefijo indica que la molécula está formada por dos moléculas diferentes y el sufijo hace referencia a que una de ellas es un azúcar; a la otra fracción se le conoce como aglicón o genina.

Los heterósidos son compuestos derivados de las formas cíclicas de los azúcares (piranosas y furanosas), en las que el hidrógeno del oxhidrilo hemiacetalítico del azúcar (carbono No. 1) ha sido sustituido por un grupo alquilo o arilo proveniente de un alcohol, formándose un nuevo enlace de tipo acetal <sup>(1)</sup>, como ésta unión es a través de un oxígeno se les nombra O-heterósidos y éste tipo de unión es la más abundante en las plantas.

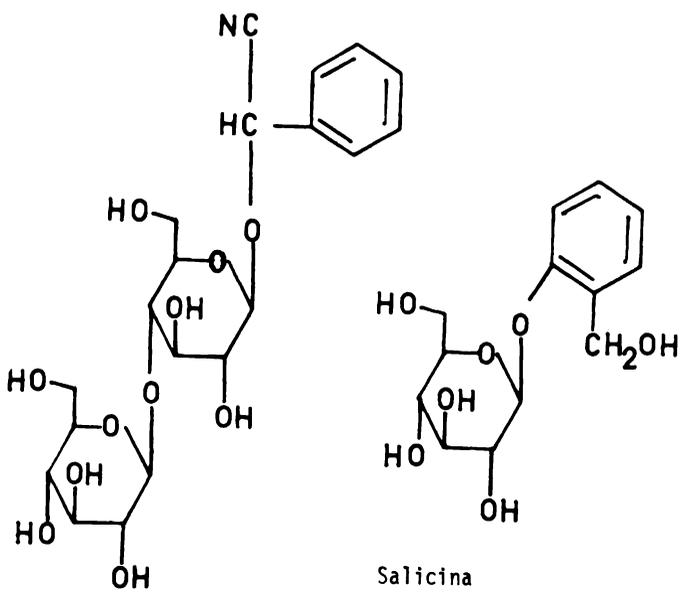
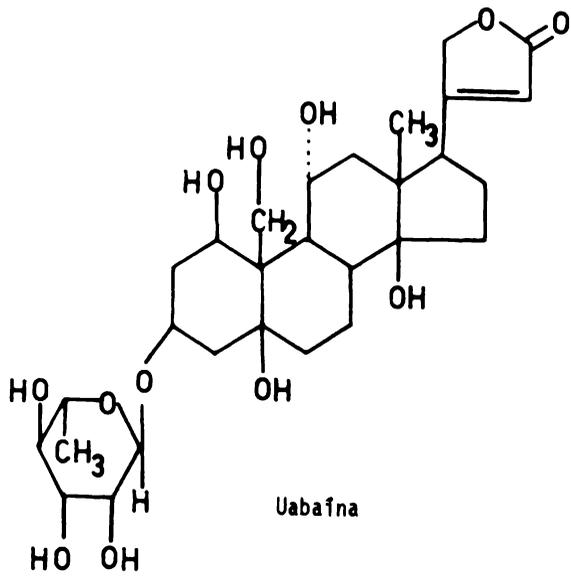


D-GLUCOSA

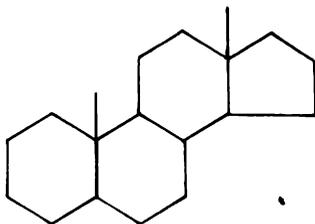
Los avances más recientes en la química de productos naturales demuestran la existencia de un gran número de estructuras heterosídicas con diversas actividades farmacológicas y antimicrobianas. Algunas de estas estructuras se encuentran en plantas, bacterias, hongos, algas y animales superiores, tomando parte en la actividad biológica o formando estructuras de protección. Ejemplo de ellas son los que se encuentran en el tejido nervioso (cerebrósidos), las glicoproteínas, que se encuentran en la sangre, leche y algunas enzimas, etc. (2).

Es evidente que la química de los O-heterósidos tiene importancia tanto industrial como biológica. Muchos de ellos actúan como agentes terapéuticos, como es el caso de los glucósidos cardiotónicos, los heterósidos laxantes de las hojas del sen, la salicina, cuya acción es semejante a la del ácido salicílico, (3).

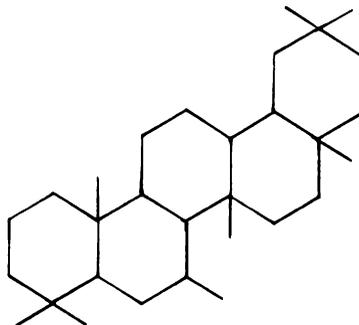
Su clasificación no ha sido sencilla, ésta puede darse tanto por la naturaleza del azúcar como por la de su aglicón. El azúcar que con mayor frecuencia se encuentra formando parte de un heterósido es la glucosa, pueden encontrarse todos los azúcares naturales conocidos en mayor o menor proporción como galactosa, manosa, fructosa, arabinosa, xilosa, ramnosa, apiosa, etc. Tomando como base la naturaleza química del aglicón se ha hecho la siguiente clasificación: a) Heterósidos de alcoholes y fenoles. b) Heterósidos de antraquinonas. c) Heterósidos cianogénéticos. d) Heterósidos de cumarinas (lactonas). e) Heterósidos cardiotónicos. f) Saponinas. g) Heterósidos de tiocianatos. h) Flavonoles. i) Otros (2). En la figura 1 se ilustran algunos de estos compuestos.



Las saponinas (del latín sapón: jabón, consistencia de.), ampliamente distribuidas en plantas superiores se caracterizan porque forman soluciones coloidales con el agua y poseen la propiedad de formar espuma jabonosa con ella ya que disminuyen la tensión superficial de la misma, presentan un sabor amargo, son tóxicas para los animales de sangre fría y hemolizan los glóbulos rojos. El aglucón de las saponinas recibe el nombre de sapogenina. De acuerdo a la estructura del aglucón las saponinas se dividen en dos diferentes grupos: saponinas neutras, que son derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno (II) y saponinas ácidas que derivan de un triterpeno(III)<sup>(4)</sup>.



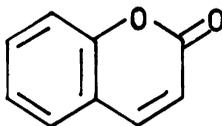
II



III

Los aglucones derivados del sistema esteroidal ciclopentano-perhidrofenantreno, tienen gran importancia farmacológica, ejemplo de ellos son el aglucon de los heterósidos cardiotónicos como la digitalina y el aglucon de las saponinas esteroidales como la diosgenina.

La cumarina es la lactona del ácido ortohidroxicinámico (IV).



IV

CUMARINA

Las cumarinas sustituidas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, sin embargo, los heterósidos derivados de cumarinas no son muy abundantes, siendo pocos los que tienen importancia farmacológica. Se les encuentra en ciertas drogas vegetales, por ejemplo la esquinina, presente en el anís estrella japonés, que por hidrólisis, produce 7-hidroxicumarina, conocida como umbeliferona; la esculina, encontrada en la corteza del castaño de indias, que por hidrólisis da la esculetina (6,7-dihidroxicumarina); la dafnina, que se encuentra en plantas del género Mexerum sp., Gnida polycephala, por hidrólisis produce la fraxetina (6-metoxi-7,8-dihidroxicumarina); la escopolina, encontrada en la

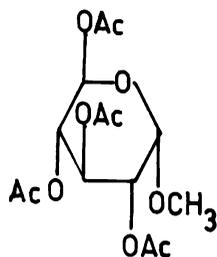
belladona y en plantas del género Gelsemium, produce escopoletina (6-metoxi-7-oxicumarina), que es un éter dimetílico de la esculina; para ninguno de los anteriores compuestos se ha reportado un uso medicinal (3,5).

### 2.1.1 Propiedades químicas.

Los heterósidos son relativamente estables frente a los álcalis, pero pueden ser hidrolizados fácilmente a sus correspondientes azúcares y aglicones por los ácidos y las enzimas. Muchos de ellos son solubles en agua, alcohol y en mezclas de alcohol-agua. Son escasamente solubles o insolubles en cloroformo y en éter. La solubilidad depende tanto de la naturaleza del azúcar como de la del aglicón. La solubilidad en disolventes orgánicos disminuye a medida que aumenta el número de azúcares (6).

Los heterósidos a diferencia de algunos azúcares no son compuestos capaces de reducir el nitrato de plata y las sales de cobre, debido a que cuando se forma la unión heterosídica se bloquea la función aldehídica del azúcar. Sólo pueden reducir a tales agentes cuando su aglicón posee grupos reductores como sucede con el aglicón del estrofantósido K (6).

Los grupos hidróxilo libres de los heterósidos pueden formar derivados acetilados, que son de gran utilidad en la determinación de su conformación y de su estructura. Por ejemplo, el tratamiento del metil-D-glucopiranosido con anhídrido acético produce tetra-O-acetil-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (V) (7);

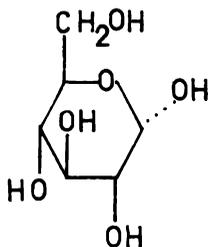


V

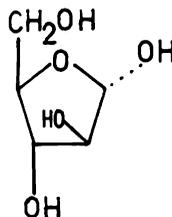
También se puede emplear como agente acetilante el ácido acético glacial. Los catalizadores más empleados son: el acetato de sodio, el cloruro de zinc, la piridina y el anhídrido trifluoroacético. Los heterósidos acetilados, a su vez, son hidrolizables por tratamiento ácido. El impedimento estérico y la temperatura afectan la formación de los derivados acetilados de los heterósidos <sup>(8)</sup>.

### 2.1.2 Estructura.

Los azúcares reductores en solución pasan de la forma lineal a la cíclica ya sea de tipo pirano o furano (VI).



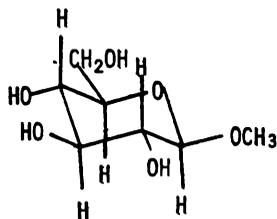
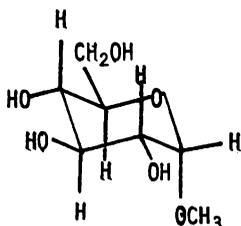
D-Glucopiranososa



D-Fructofuranosa

VI

Como los azúcares simples existen en las formas alfa y beta, son posibles dos tipos de heterósidos del mismo azúcar, siendo nombrados alfa y beta heterósidos respectivamente. El oxhidrilo del carbono No. 1 al efectuarse la ciclización, adquiere una de dos orientaciones, axial o ecuatorial. A la primera se le llama alfa y a la segunda beta y al carbono 1 por presentar este tipo de isomerismo se le denomina carbón anomérico. Lo anterior se ejemplifica con las estructuras del metil-D-glucopiranosido alfa y beta respectivamente (VII).

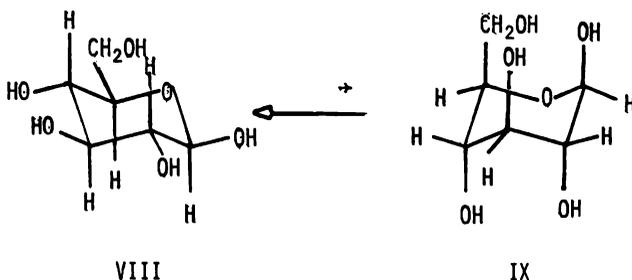


VII

Metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido

Metil- $\beta$ -D-glucopiranosido

El análisis conformacional indica que para las glucopiranosas la conformación de silla es la más estable. Hay dos conformaciones de silla posibles para la  $\beta$ -D-(+)-glucopiranososa:



Siendo VIII más estable que IX debido a que los sustituyentes voluminosos ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) ocupan posiciones ecuatoriales; en IX los sustituyentes voluminosos están en posición axial <sup>(9)</sup>.

### 2.1.3 Determinación de la estructura de los heterósidos.

Para dar la estructura de un heterósido es necesario establecer:

- El tipo de aglucón que lo compone.
- El tipo y cantidad de azúcares que los constituyen.
- La secuencia y el sitio de unión entre los azúcares.
- La estereoquímica de la unión glicosídica.

La estructura de un heterósido se puede determinar por métodos químicos o instrumentales que generalmente se complementan. Los métodos químicos más empleados son:

a) Hidrólisis total con ácidos minerales o enzimas y posterior identificación de los productos de reacción ya sea por la formación de derivados o por la degradación de la molécula a compuestos conocidos, esto con el fin de poder establecer el tipo de aglucón y azúcares que componen el heterósido. La formación de derivados como peracetatos, derivados permetilados, osazonas, se emplean para la identificación de los azúcares (6).

b) La cuantificación de los azúcares se hace basándose en las propiedades reductoras de éstos sobre iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{1+}$ , etc., determinándose sus productos de reducción por los diferentes métodos de análisis. Debido a la presencia de un grupo carbonilo (en equilibrio hemiacetálico), los monosacáridos son agentes reductores fuertes. En solución alcalina pueden reducir al nitrato de plata (reactivo de Tollens) y a las sales de cobre (reactivo de Fehling); también pueden ser oxidados por el ácido nítrico, el agua de bromo y el ácido peryódico (6). Los azúcares que son capaces de reducir a tales agentes oxidantes se llaman azúcares reductores. Por medio de una degradación oxidativa podemos determinar si un heterósido se encuentra en la forma de pirano o de furano. Los piranósidos después de efectuada la reacción dan como productos un dialdehído y ácido fórmico, mientras que los furanósidos únicamente dan el dialdehído (7).

c) La secuencia y sitio de unión entre azúcares se puede determinar por hidrólisis parcial, oxidación con ácido peryódico y análisis de los productos.

d) La estereoquímica de la unión glicosídica en los heterósidos se puede determinar por el método de las diferencias de rotación molecular entre un glucósido y su aglicón, o realizando hidrólisis enzimática.

El método de las diferencias de rotación molecular fue descrito en 1950 por Klyne, ésta técnica se desarrolló en un principio para establecer el enlace anomérico de glucósidos cardiotónicos y consiste en calcular la diferencia de la rotación molecular entre el glucósido y su aglicón, éste resultado se sustrae a la rotación molecular de un metil-glucósido, empleado como referencia, cuyo enlace anomérico es conocido; si el resultado de ésta última diferencia está dentro del rango de  $+100^{\circ}$  y  $-70^{\circ}$  el enlace anomérico del glucósido desconocido será el mismo que el de la referencia <sup>(10)</sup>.

Las enzimas que son capaces de hidrolizar a los heterósidos, en general a los oligosacáridos se encuentran en diversos materiales biológicos, es muy común encontrarlas asociadas con sus substratos y para obtener este último es necesario destruir la enzima antes de que tenga lugar la hidrólisis. Las enzimas que hidrolizan heterósidos y oligosacáridos se conocen como glicosidasas, las que hidrolizan polisacáridos se conocen como polisacaridasas.

La primera enzima en ser descubierta fue la emulsina, ésta enzima está presente en las almendras dulces e hidroliza al glucósido amigdalina, también encontrado en las almendras. Esta enzima es principalmente una  $\beta$ -glucosidasa, aunque dependiendo del pH puede presentar actividad de  $\alpha$ -glucosidasa.

Las  $\beta$ -hexosidasas catalizan la ruptura de  $\beta$ -heterósidos y las  $\alpha$ -hexosidasas la ruptura de  $\alpha$ -heterósidos (11).

Entre los métodos instrumentales que prestan gran ayuda para la determinación de la estructura de los heterósidos tenemos: la cromatografía de gases, la espectrometría de masas, la determinación de la rotación óptica, la resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) y de hidrógeno-1 (RMN- $^1\text{H}$ ) (12, 13).

Se ha visto que el estudio del espectro de RMN- $^1\text{H}$  de derivados acetilados de heterósidos y de azúcares es de gran utilidad en la identificación de éstos compuestos, así como también en la asignación de su estereoquímica (13, 14).

En este trabajo se estudian los peracetatos de diferentes glucósidos empleando la RMN de H-1.

## 2.2 Resonancia Magnética Nuclear.

### 2.2.1 Fundamentos.

La determinación de la estructura de compuestos orgánicos se ha facilitado enormemente por los avances de la espectroscopía, la interpretación y correlación de gran número de datos espectroscópicos y por el diseño de nuevos espectrómetros.

Los métodos espectroscópicos están basados en el hecho de que las moléculas son capaces de absorber o emitir radiaciones electromagnéticas (energía radiante) experimentando distintos tipos de excitación como: deformaciones de enlace, excitación rotacional, inversiones de spin nuclear o fragmentación de los enlaces. Estas formas de excitación requieren diferentes cantidades y tipos de energía. La relación entre la cantidad de energía radiante absorbida o emitida como función de la longitud de onda se llama espectro de absorción o de emisión. Los métodos espectroscópicos se pueden clasificar ya sea de acuerdo con la porción del espectro involucrada o de acuerdo al mecanismo atómico o molecular que se considere como el responsable de la absorción de energía radiante.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear implica la absorción de radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia del espectro y está basada en la transición de los estados

de spin de un núcleo, como resultado de una absorción de energía. Ciertos núcleos con número non de protones y de neutrones ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ , etc.) poseen un momento mecánico de spin, el cual conjuntamente con la carga del núcleo produce un momento magnético. El núcleo se comportará entonces como un pequeño imán cuando se sitúa en un campo magnético uniforme pudiendo tomar varias orientaciones o estados de spin ( $2I + 1$  orientaciones). Cuando a un protón ( $I = 1/2$ ) se le aplica un campo magnético externo van a ser posibles únicamente dos orientaciones: una de baja energía (a favor del campo magnético externo) y otra de alta energía (en contra del campo magnético externo). El campo magnético debe ser homogéneo, para que todos los protones de la muestra lo experimenten en igual forma. La diferencia de energía entre las dos orientaciones es proporcional a la fuerza del campo magnético experimentado por los núcleos. La irradiación de los núcleos en un campo magnético con una frecuencia uniforme da como resultado una absorción neta de energía por los núcleos. Una gráfica de absorción de energía contra la intensidad de campo aplicado se conoce como espectro de resonancia magnética, y se puede obtener manteniendo la frecuencia constante y la intensidad de campo variable o viceversa. En la práctica se ha encontrado que es más conveniente mantener constante la radiación de frecuencia y variar gradualmente la fuerza del campo magnético (15).

### 2.2.2 Desplazamiento químico.

El cambio en la frecuencia de resonancia con respecto a una posición arbitrariamente elegida se denomina desplazamiento químico. Las densidades electrónicas y otros efectos (anisotropía, campos eléctricos, etc.) de los protones de varios grupos funcionales son lo suficientemente diferentes como para absorber energía a diferentes valores del campo magnético aplicado. Con la espectroscopía de resonancia magnética nuclear disponemos de un método extremadamente sensible para investigar el entorno de los diferentes núcleos contenidos en una molécula particular. El desplazamiento químico depende mucho de la densidad electrónica que rodea al núcleo que se está observando o que está asociada con el átomo al cual está unido. Los electrones que rodean a los diferentes núcleos los protegen, en parte, del campo magnético que se opone al campo externo o de laboratorio. En una molécula los protones están protegidos en grado diverso, y gracias a ello se pueden distinguir unos de otros. Mientras más protegidos estén los protones se requerirá un campo magnético externo mayor. Debe tenerse en cuenta que tanto la geometría de la molécula como la contribución de las diferentes conformaciones moleculares y la presencia de grupos funcionales pueden tener efectos muy profundos en el desplazamiento químico de un hidrógeno dado.

Para determinar exactamente las posiciones de los picos se añade a la muestra un patrón interno. La posición en la cual se produce la absorción del patrón se utiliza como referencia para calibrar la intensidad del campo a la cual se le asigna un desplazamiento de cero Hertz (Hz). El patrón interno empleado casi universalmente es el tetrametilsilano (TMS), el cual tiene doce protones equivalentes, es químicamente inerte y produce una sola línea de resonancia.

Generalmente los desplazamientos químicos se miden en unidades delta ( $\delta$ ):

$$\delta = \frac{\Delta\nu \times 10^6}{\text{radiofrecuencia (MHz)}}$$

Donde:

$\Delta\nu$  = diferencia en la frecuencia de absorción de la muestra y del compuesto de referencia en Hz.

Cuando la radiofrecuencia para los protones es de 60 MHz (=  $60 \times 10^6$  Hz) y una absorción ocurre a 60 Hz abajo del campo del TMS, el valor de la absorción es :

$$\delta = \frac{60 \times 10^6}{60 \times 10^6} = 1$$

Un desplazamiento ( $\Delta\nu$ ) de 60 MHz es una radiofrecuencia total de 60 MHz, es un desplazamiento de una parte en un millón, por lo que  $\delta$  puede considerarse como el desplazamiento químico a partir del TMS expresado en ppm (partes por millón) (16).

### 2.2.3 Multiplicidad. Constante de acoplamiento.

El espectro de resonancia magnética nuclear (rmn) muestra usualmente señales diferentes para cada tipo de protones de una molécula, es por eso que una molécula con grupos funcionales diversos tendrá un espectro más complicado. Una señal de un grupo de protones equivalentes puede consistir de picos múltiples debido a las interacciones con otros núcleos magnéticamente activos que se encuentran en las vecindades. La multiplicidad va a reflejar el medio que rodea a los protones, no con respecto a los electrones, sino con respecto a otros protones y núcleos vecinos magnéticamente activos, es decir, que un grupo de protones químicamente equivalentes pueden estar influidos por otros núcleos localizados lo suficientemente cerca para que se acoplen a través de las nubes de electrones. Cuando dos protones interactúan uno con otro de ésta manera se dice que están acoplados. El grado de acoplamiento se conoce como constante de acoplamiento  $J$  y es el número de Hertz que separa a las señales entre sí. El valor de  $J$  es independiente de la frecuencia o del valor del campo magnético aplicado. Los protones en un mismo átomo de carbono cuando son equivalentes generalmente no muestran acoplamientos, a menos que estén interviniendo factores especiales. El valor de la constante de acoplamiento depende del ángulo entre las ligaduras a través de las cuales se transmite el efecto de acoplamiento. Es por eso que

la correlación entre ángulos contra J se puede emplear para elucidar la estructura de un compuesto.

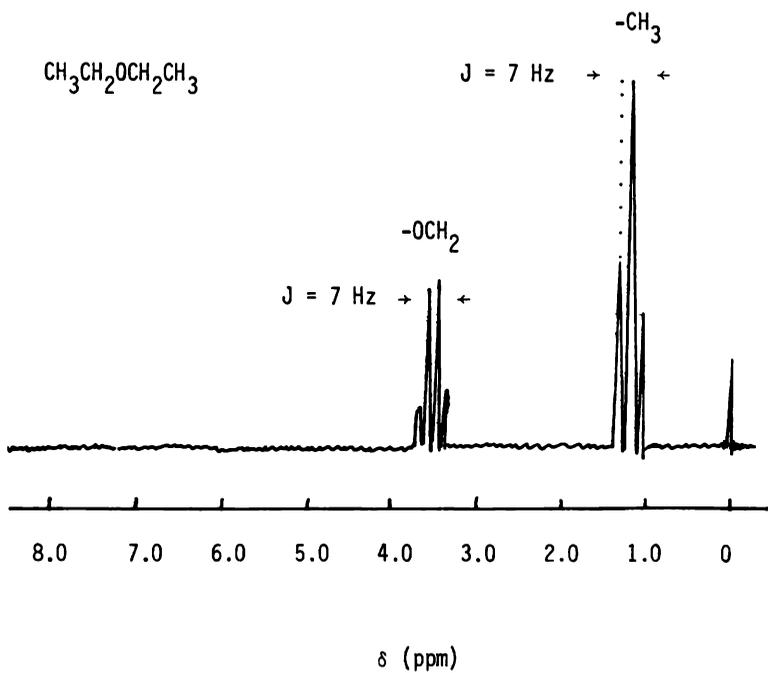


Figura 2

En la figura 2 se muestra el espectro del éter dietílico. Cada protón metílico está adyacente a dos protones  $\text{CH}_2$ , ambos protones pueden estar alineados a favor o en contra del campo o bien uno de ellos puede alinearse a favor y otro en contra del campo:

Ambos a favor del campo:  $\uparrow\uparrow$   
 Uno a favor y otro en  
 contra del campo:  $\uparrow\downarrow \quad \downarrow\uparrow$   
 Ambos en contra del campo:  $\downarrow\downarrow$

Los protones metílicos experimentan tres campos magnéticos ligeramente diferentes y aparecen como una señal triple (triplete). Puesto que la segunda situación tiene el doble de posibilidades que los otros dos el triplete tiene intensidades relativas 1:2:1. Cada protón metilénico está adyacente a tres protones metílicos que, como grupo, pueden estar alineados en una de cuatro formas diferentes:

$\uparrow\uparrow\uparrow \quad \uparrow\uparrow\downarrow \quad \uparrow\downarrow\uparrow \quad \downarrow\uparrow\uparrow \quad \uparrow\downarrow\downarrow \quad \downarrow\uparrow\downarrow \quad \downarrow\downarrow\uparrow \quad \downarrow\downarrow\downarrow$

Es por eso que los protones metilénicos aparecen como un cuadruplete 1:3:3:1. Los dos grupos de protones tienen valores de la constante de acoplamiento idénticos, indicando con ello que están acoplados entre sí. Se observa que en general, un grupo de "n" protones equivalentes pueden dividir las señales en  $n + 1$  picos.

Esta regla tiene dos partes: primero, el número de picos en el multiplete para la resonancia de un grupo de núcleos será uno más que el número de núcleos en el otro grupo. Segundo, las intensidades relativas de los picos entre los multipletes seguirá los coeficientes de la distribución binomial: dobletes serán 1:1, tripletes serán 1:2:1 y así sucesivamente como se indica en la figura 3.

Número de vecinos.	Número de picos en el multiplete.	Nombre del multiplete.	Intensidades relativas entre los multipletes.
0	1	Singulete	1
1	2	Doblete	1:1
2	3	Triplete	1:2:1
3	4	Cuarteto	1:3:3:1
4	5	Quinteto	1:4:6:4:1
5	6	Sexteto	1:5:10:10:5:1
6	7	Septeto	1:6:15:20:20:15:6:1
n	n + 1		

Figura 3

Por lo general la multiplicidad de una señal de absorción se puede representar por la siguiente ecuación:

$$\text{Número de picos} = 2In + 1 \quad \dots(1)$$

en la cual  $I$  es el número cuántico de spin de los núcleos acoplados y  $n$  es el número de ellos químicamente equivalentes (15).

El análisis de la multiplicidad spin-spin es relativamente simple para los efectos de "primer orden". Se entiende por sistema de spin el conjunto de núcleos que están acoplados spin-spin, dando lugar a absorciones reconocibles. Una molécula dada puede contener varios de estos sistemas de spin identificables, los cuales, casi siempre son descritos asignándoles letras a los núcleos, por ejemplo, el grupo etilo ( $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) es un sistema de spin  $A_2X_3$  y un benceno para-disustituido es un sistema  $AA'BB'$ . Contando el número de estados de spin diferentes es posible predecir el número de picos que tendrá un multiplete. El análisis de la multiplicidad de primer orden sigue las siguientes reglas (16):

- 1) El desplazamiento químico, en hertz, entre los núcleos A y B es  $\nu_A - \nu_B = \Delta\nu_{AB}$ . Si la relación  $\nu_{AB}/J_{AB}$  es grande (mayor de 10) se observa multiplicidad de primer orden.
- 2) Un grupo de  $n_A$  núcleos equivalentes del tipo A acoplados con  $n_X$  núcleos equivalentes del tipo X producirán una señal de resonancia para A teniendo  $2n_X I_X$  picos, asimismo la señal para X será  $2n_A I_A + 1$  componentes.
- 3) La constante de acoplamiento  $J_{AX}$  se obtiene de la distancia entre dos de cualquiera de los submultipletes y debe ser la misma para los multipletes de A y X.

4) Las intensidades relativas de los picos de los multipletes están dadas por los coeficientes de la expansión binomial  $(a + b)^n$ .

Resumiendo, la asignación correcta de las señales de rmn permiten estudiar varios aspectos como son:

El número de señales, que indica el tipo de efectos a que esta sometida cada clase de núcleos y sugiere sus vecindades funcionales.

La intensidad de las señales (integración), informa de la cantidad de protones de cada clase presente en la molécula.

La multiplicidad de la señal, indica los núcleos que son vecinos a la clase de núcleos considerada.

#### 2.2.4 Fenómenos de relajamiento.

Cuando una muestra de núcleos se coloca en un campo magnético  $H_0$ , los momentos magnéticos de los núcleos estarán orientados en el campo magnético de acuerdo a los niveles de energía permitidos. Para un sistema con núcleos idénticos  $I = 1/2$ , existen dos niveles de energía permitidos correspondientes a la orientación del momento magnético, ya sea que estén alineados con el campo u opuestos a él <sup>(15)</sup>. El movimiento térmico, se opone a que los núcleos estén en el nivel más bajo de energía, éste movimiento tiende a igualar la población entre los dos niveles (saturación). Cuando un gran número de núcleos, de un isótopo en particular, magnéticamente activos están en un campo magnético

deben alcanzar el equilibrio térmico, esto es, que en el estado de baja energía habrá mucho más núcleos que en el de alta energía (17).

El número relativo de núcleos en los estados corresponderá a la distribución de Boltzman:

$$\frac{n_+}{n_-} = e^{-\Delta E/kt}$$

En donde  $n_+$  y  $n_-$  son el número de núcleos en el estado de alta energía y en el de baja energía, respectivamente;  $\Delta E$ , es la energía de separación entre los dos niveles energéticos;  $k$ , es la constante de Boltzman;  $T$ , es la temperatura absoluta.

Los niveles de energía para un conjunto de núcleos equivalentes están degenerados y por lo tanto igualmente poblados en ausencia de un campo magnético grande, existe un proceso por el cual la distribución de Boltzman queda establecida (constante). Los núcleos experimentan movimientos térmicos e interactúan con sus alrededores. Esta interacción proporciona un mecanismo para la transferencia de energía entre el sistema de spines y sus alrededores, de tal forma que la transición entre los niveles de energía ocurre. Este proceso recibe el nombre de relajación longitudinal y en él, la energía del spin nuclear se convierte en energía térmica y es la responsable de que se mantenga una diferencia de población entre los estados de spin o sea del reestablecimiento del equilibrio de la distribución de Boltzman, después de que el equilibrio se ha modificado por la absorción de energía de radiofrecuencia. Este relajamiento está caracterizado por un tiempo

de relajamiento longitudinal " $t_1$ ", que es el tiempo de vida media requerido para que un grupo de núcleos perturbados alcance o retorne al estado de equilibrio. La magnitud de  $t_1$ , depende del estado físico de la muestra, la temperatura y del tipo de núcleos en consideración (18).

El mecanismo de relajación longitudinal es importante porque determina la posibilidad de que se lleve a cabo la rmn. Tiende a mantener un exceso de spines en el nivel de baja energía y por lo tanto evita la saturación (18).

Existe también un proceso conocido como relajamiento transversal o relajamiento spin-spin, caracterizado por un tiempo " $t_2$ " se origina de la transferencia de los estados de spin nuclear, por lo tanto se refiere como un tiempo de relajamiento spin-spin, de tal manera que:  $t_1 \geq t_2$ .

El relajamiento transversal es un proceso por el cual los núcleos vecinos intercambian las orientaciones de spin mediante la interacción entre sus momentos magnéticos. En este proceso no hay un cambio en la energía total del sistema, no afecta la población relativa de los niveles energéticos, pero puede afectar la amplitud de la línea (17).

La magnitud de  $t_1$  determina el grado por el cual una línea de resonancia dada estará saturada mientras que la magnitud de  $t_2$  determina la anchura de la línea (18).

### 2.2.5 Reactivos de desplazamiento.

La utilidad de la rmn en los estudios de compuestos hidrocarbonados semejantes ha estado severamente limitada por la insuficiente resolución de los espectros. Esta deficiencia ha sido corregida parcialmente por el desarrollo de espectrometros de alta frecuencia (200, 250, 360, 400 y hasta 600 MHz), hecho que implica un alto costo de los aparatos <sup>(19)</sup>. Para ayudar a resolver este problema, se han empleado diferentes métodos que incluyen el empleo de disolventes aromáticos que inducen desplazamientos químicos, pero estos únicamente son útiles para pocas clases de moléculas orgánicas <sup>(20)</sup>.

En 1969 Hinckley reportó la influencia del aducto de dipiridina de  $\text{Eu}(\text{thd})_3$  sobre el espectro de rmn del colesterol y los desplazamientos químicos inducidos fueron significativos. Se ha visto que estos compuestos son de gran utilidad en la determinación de estructuras de tipo esteroidal <sup>(21,19)</sup>.

Los espectros de rmn de especies paramagnéticas a menudo muestran desplazamientos químicos muy grandes y las señales están expandidas algunas veces de tal manera que son difíciles de observar. Análogamente, la presencia de materiales paramagnéticos puede producir grandes cambios en los desplazamientos o amplitud del espectros de otros compuestos. Estos efectos proporcionan información sobre la estructura cuando existe una interacción específica entre

las especies paramagnéticas y la sustancia que actúa como sustrato.

El cambio en el desplazamiento químico causado por la adición de especies paramagnéticas puede ser dividido dentro de tres términos:

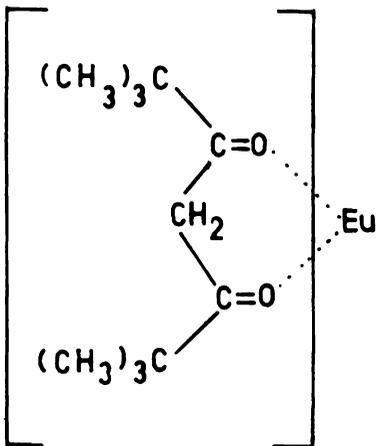
$$\Delta\delta = \Delta\delta(\text{contacto}) + \Delta\delta(\text{dipolar}) + \Delta\delta(\text{diamagnético})$$

La transmisión de la densidad electrónica de los spines sin aparear del centro paramagnético al núcleo que se está observando, produce los desplazamientos de contacto. Se observa que estos desplazamientos son mayores en ligandos con sistemas deslocalizados  $\pi$  que en sistemas de enlaces  $\sigma$ , donde el efecto se atenúa rápidamente. Los desplazamientos dipolares o de pseudocontacto se originan del campo magnético producido por las especies paramagnéticas en la posición del núcleo. En el caso de un complejo con simetría axial, los cambios en los desplazamientos dependen de la distancia que existe entre los ejes principales del complejo y el vector que une el centro paramagnético y el núcleo. El tercer término reúne todos los factores que no resultan del paramagnetismo del ion metálico. Los desplazamientos de contacto son fuente de información acerca de la estructura electrónica mientras que los desplazamientos de pseudocontacto están relacionados con la geometría molecular. Las especies paramagnéticas contribuyen al relajamiento longitudinal, induciendo las transiciones entre los estados de spin nucleares y electrónicos (22).

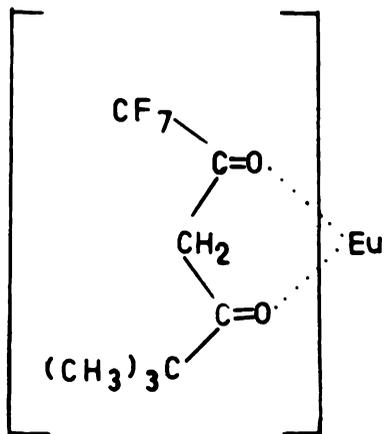
Las especies paramagnéticas empleadas para modificar los espectros de rmn están divididas convenientemente en dos grupos: reactivos de relajamiento, como los complejos de europio (Eu (III)) y praseodimio (Pr (III)); y reactivos de relajamiento como los complejos de gadolinio (Gd (III)) y de cromo (Cr (III)) (23).

Los cambios en los desplazamientos químicos ocurren por complejación de los lantánidos con los pares de electrones libres del sustrato, se deben principalmente a efectos a través del espacio (mecanismo de pseudocontacto) (24). Los protones unidos al ligante experimentan desplazamientos a campo bajo o alto, los cuales se incrementan con la concentración de reactivo de desplazamiento relativa al sustrato. A estos compuestos se les ha llamado genéricamente LSR (lanthanide shift reagent: reactivos (lantánidos) de desplazamiento) (25). Estos compuestos actúan como ácidos de Lewis y forman complejos con una gran variedad de bases orgánicas de Lewis, tales como: aminas, alcoholes, cetonas, éteres, esterres, sulfóxidos, tioéteres, nitrilos, oximas, lactonas y aldehidos. Comúnmente los quelatos de europio causan desplazamientos hacia campo bajo, mientras que los quelatos de praseodimio causan desplazamientos hacia campo alto (23, 26).

Los reactivos de desplazamiento químico más empleados son los complejos de praseodimio (III) y los de europio (III), quelatados con  $\beta$ -dicetonas tales como dipivaloilmetanato (dpm) (X) y heptafluorodionato (fod) (XI).



X



XI

Se ha observado que los desplazamientos más significativos ocurren con compuestos que están unidos más fuertemente a los reactivos de desplazamiento, en particular aquellos con grupos amino o hidróxilo. Cuando el sustrato es un donador de electrones débil, se emplean complejos polifluorados de los lantánidos. Los reactivos de desplazamiento son solubles en la mayoría de disolventes empleados comúnmente en rnm. Las soluciones son estables, pero la presencia de ácidos carboxílicos y de algunos fenoles, pueden provocar la descomposición de las soluciones, en cuyos casos se deben preparar derivados sustituibles. La resonancia de los reactivos de desplazamiento con frecuencia no interfiere en el espectro, pero cuando esto llega a suceder se utilizan ligantes deuterados. Los desplazamientos inducidos observados cuando estos reactivos son utilizados en disolventes polares son muy pequeños porque el disolvente mismo puede coordinarse al reactivo<sup>(22)</sup>. En tales casos las sales de lantánidos, notablemente los cloruros hidratados, nitratos y percloratos pueden ser utilizados como reactivos de desplazamiento. Los disolventes más empleados son: D<sub>2</sub>O y deuterioacetona; se han observado desplazamientos atenuados en soluciones de metanol y piridina. El tricloruro de europio ha sido utilizado en dimetil sulfóxido para estudiar esteroides polifuncionales<sup>(22)</sup>.

La aplicación cualitativa más común de estos compuestos es la de separar las señales sobrepuestas. En la práctica se agregan cantidades sucesivas de reactivo a la muestra hasta obtener la

separación deseada de las señales. En espectros más complejos es necesario utilizar diferentes concentraciones para separar todas las señales que sean posibles.

Cuando las constantes de acoplamiento se miden del espectro simplificado por un reactivo de desplazamiento los valores obtenidos son un promedio de las formas libres y acomplejadas del sustrato. Cuando no hay un cambio en la conformación, las variaciones en las constantes de acoplamiento son similares a aquellas causadas por los efectos de los sustituyentes. Debe mencionarse que el equilibrio conformacional puede verse afectado por la coordinación a un reactivo de desplazamiento voluminoso y que puede producir cambios muy grandes en las constantes de acoplamiento (25).

Debido a la dependencia de los desplazamientos de pseudocontacto sobre la distancia y la relación angular entre el sustrato y el reactivo de desplazamiento, el análisis cuantitativo de estos desplazamientos, muchas veces proporciona información sobre la estructura del compuesto (22).

#### 2.2.6 Determinación de pesos moleculares por rmn.

Como el grado por el cual la absorción de energía por cualesquier núcleos magnéticamente activos es independiente del medio estructural que rodea a dichos núcleos, el área total bajo una señal de rmn o la integral de la señal es directamente proporcional al número de núcleos responsables de esa señal.

El área se determina electrónicamente después de obtener el espectro de absorción de una muestra. En la figura 4 se muestra el espectro del p-xileno y de su integral.

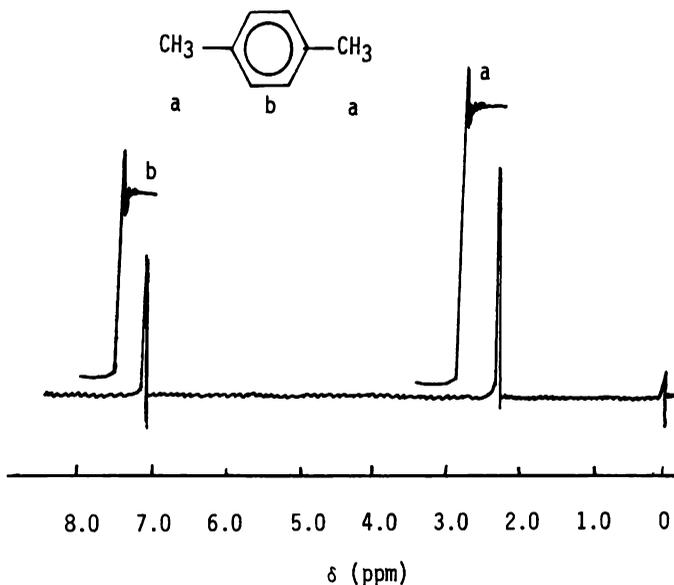


Figura 4

La determinación de pesos moleculares por rnm se basa en que la intensidad de la integral de una señal de absorción en la rnm de protones depende únicamente de la concentración molar de la sustancia y del número de núcleos responsable, por molécula, de la señal. Por lo tanto, la intensidad integrada de núcleos por mol es la misma para todas las sustancias en la muestra. Por ésta razón cuando una sustancia en cantidad y peso molecular conocidos

(estándar) se adiciona a una muestra que contiene una substancia de peso molecular desconocido y peso conocido, la siguiente igualdad debe cumplirse:

$$\frac{I_s/n_s}{p_s/Pm_s} = \frac{I/n}{p/Pm} \quad \dots (2)$$

Donde:  $I_s$ ,  $n_s$ ,  $p_s$ ,  $Pm_s$ , son la intensidad, el número de protones responsables de la señal, el peso y el peso molecular del estándar respectivamente, así como para el problema cuyo peso molecular es desconocido.

Despejando de la ecuación número 2 el peso molecular para el problema, se obtiene la siguiente igualdad que permite determinar el peso molecular de cualquier sustancia (15):

$$Pm = \frac{I_s \times n \times p}{I \times n_s \times p_s} \times Pm_s \quad \dots (3)$$

Las señales de resonancia tanto para el estándar como para el problema daben estar bien distinguidas y separadas unas de otras. Para el problema la señal fuerte de un singulete de un metilo es excelente, también se puede utilizar la señal de un multiplete aislado. Como estándares se han empleado iodoformo y 1,3,5-trinitrobenceno.

Aunque los integradores de los aparatos de rmn tienen una precisión de 1-2%, no se puede hablar de la exactitud o precisión del método para la determinación de pesos moleculares por rmn ya que los resultados cuantitativos obtenidos por rmn estan sujetos a la calidad del aparato, a las condiciones a las cuales se efectúa el experimento y al operador del aparato (17).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL.

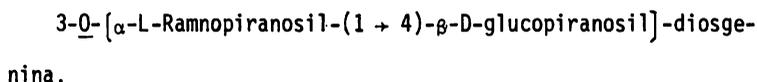
#### 3.1 Material.

Los glucósidos de diosgenina empleados en el presente trabajo se obtuvieron por extracción con metanol de una muestra representativa de barbasco (Dioscorea composita) fermentado, seco y molido, previamente desengrasado con hexano y purificado de metanol por sucesivas cristalizaciones. La diosgenina se obtuvo por hidrólisis del material purificado, obteniéndose pura por cristalización. Los glucósidos se identificaron como (27, 28):

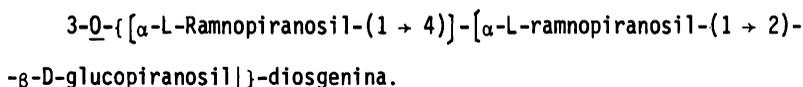
Primer glucósido:



Segundo glucósido:



Tercer glucósido:



La esculina se obtuvo de la corteza del castaño de indias (Aesculus hippocastanum) y es el 6-( $\beta$ -D-glucopiranosiloxi)-7-hidroxí-2H-1-benzopiran-2-ona.

Como agente acetilante se utilizó anhídrido acético y como catalizador piridina anhidra.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Johns. Los espectros de infrarojo fueron hechos en un aparato Perkin Elmer 337. Los espectros de rnm se efectuaron en un Varian EM-390 a temperatura ambiente.

En la determinación de los espectros de rmn se empleó como disolvente cloroformo deuterado, tetrametilsilano como sustancia de referencia interna, reactivo de desplazamiento  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  y como sustancia estándar p-dibromo-benceno.

### 3.2 Preparación de los derivados acetilados y obtención de los espectros de RMN- $^1\text{H}$ .

Los derivados acetilados se obtuvieron por el método común de acetilación con anhídrido acético y piridina <sup>(29)</sup>. Las sustancias puras se disolvieron en piridina anhidra, se acetilaron con anhídrido acético a temperatura ambiente durante setenta y dos horas, el derivado acetilado se obtuvo por precipitación sobre agua fría, se filtraron y cristalizaron en el disolvente apropiado para cada caso.

Los espectros de  $\text{rmn-}^1\text{H}$  se obtuvieron a 90 MHz a temperatura ambiente. El procedimiento fue el siguiente:

- 1) Se pesaron con precisión alrededor de 60 mg del derivado acetilado en un embudo obturado con un pequeño pedazo de algodón.
- 2) En el mismo embudo se pesó aproximadamente 10 mg de p-dibromo-benceno.
- 3) Se filtró sobre el tubo de rmn disolviendo con  $\text{CDCl}_3$  (sin TMS). Se determinó el espectro y se realizaron las determinaciones de las integrales para la región aromática y la del compuesto problema (región de bases de  $\text{AcO-}$  y alifática).

- 4) Se realizaron adiciones de  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  de aproximadamente 5 mg cada una, poniendo el reactivo de desplazamiento en un vial y agregando el contenido del tubo con todo y referencia obteniéndose una disolución homogénea y filtrando nuevamente ésta solución dentro del tubo de rnm. Se repitió esta operación hasta obtener una separación clara de las señales de los grupos  $\text{AcO-}$ .
- 5) Se calculó el peso molecular empleando la ecuación 3.

### 3.2.1 Pentacetato de Esculina (XII).

Se preparó por el método indicado, el precipitado que se obtuvo con agua fría se disolvió en la mínima cantidad de cloroformo, ésta fase se lavó con agua destilada y con solución saturada de sulfato de cobre, la fase orgánica se filtró sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta sequedad. El peracetato obtenido se cristalizó de etanol caliente. Presentó un punto de fusión de  $160^\circ\text{C}$ . IR  $\text{cm}^{-1}$ : 2850 - 2950 ( $\text{CH}_3$ ); 1740 ( $\text{C=O}$ ); 1470 ( $\text{CH}_2$ ); 1600 - 1600 ( $\text{CH}$ , aromático); 1380 ( $\text{CH}_3\text{COO-}$ ); 1340 ( $\text{CH}$ ). RMN- $^1\text{H}$  ppm: 2.00 - 2.30 (tres señales  $\text{CH}_3\text{COO-}$ ); 3.8 - 4.00 ( $\text{CH}_2\text{O}$ , glucosa); 4.30 - 5.30 ( $\text{CHO}$ , glucosa); 6.40 - 7.15 ( $\text{CH}$ ,  $\text{H}_6$  y  $\text{H}_9$ , aromáticos); 7.60 - 7.70 ( $\text{CH}$ ,  $\text{H}_3$  y  $\text{H}_4$ ); 7.30 (señal estándar). Espectros No. 1 y No. 2.

### 3.2.2 Acetato de Diosgenina (XIII).

El acetato se obtuvo por el método indicado, se cristalizó de etanol. Presentó un punto de fusión de 197.5°C. IR  $\text{cm}^{-1}$ : 2850 -2940 ( $\text{CH}_3$ ); 1725 (CO, éter); 1450 ( $\text{CH}_2$ ); 1380 ( $\text{CH}_3\text{CO}-$ , de éster); 1290 (CO, de éter, anillo). Espectro No 3. RMN-  $^1\text{H}$  ppm: 0.75 - 1.15 ( $\text{CH}_3$ , angulares); 2.05 ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ ); 5.40 ( $\text{HC}=\text{CH}$ ). Espectro No. 4.

Se agregaron 10 mg de LSR, se hizo la determinación del espectro, se observa la señal para el grupo acetilo desplazada a campo bajo a 2.6, las otras señales también aparecen desplazadas. Espectro No. 5.

### 3.2.3 Tetracetato de 3-O- $[\beta\text{-D-gluco-piranosil}]$ -diosgenina. (XIV).

Se obtuvo por el método indicado, cristalizándolo de metanol, fueron necesarias tres cristalizaciones para obtener el producto puro. Punto de fusión 208°C. IR  $\text{cm}^{-1}$ : 2900 - 2940 ( $\text{CH}_3$ ); 1750 (C=O); 1455 ( $\text{CH}_2$ ); 1380 ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ ); 1650 (C=C); 1250 (C-O). RMN- $^1\text{H}$  ppm: 0.55 - 1.00 ( $\text{CH}_3$ , angulares); 1.90 - 2.05 (cuatro señales de  $\text{AcO}-$ ); 3.22 - 3.50 (protones aglucón); 3.6 - 3.8 ( $\text{CH}_2\text{O}$ , glucosa); 3.85 - 4.05 (protones aglucón); 4.10 - 4.25 (CHO, glucosa); 4.75 - 5.29 (CHO, glucosa); 4.29 - 4.7 (protones aglucón); 5.40 (C=C); 7.35 (señal estándar). Espectros Nos. 6 y 7.

Se obtuvo el espectro con la adición de 20 mg de reactivo de desplazamiento, se observó el desplazamiento, de las cuatro señales de los grupos acetilo a campo bajo en 2.3 - 2.90 ppm. Espectro No. 8.

### 3.2.4 Hexacetato de 3-O-( $\alpha$ -L-Ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosil)-diosgenina (XV).

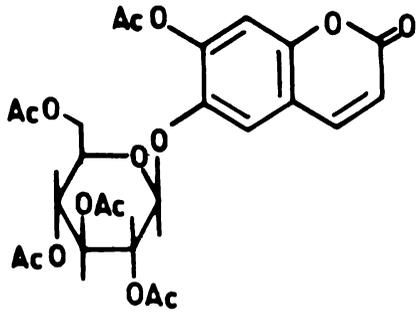
El peracetato se preparó por el método indicado, se cristalizó de metanol-agua, fueron necesarias tres recristalizaciones para obtener el producto puro. Punto de fusión  $112^{\circ}\text{C}$ . IR  $\text{cm}^{-1}$ : 2940, 2900, 1750, 1650, 1455, 1380, 1250.  $\text{RMN-}^1\text{H}$  ppm: 0.50 - 1.21 ( $\text{CH}_3$ , angulares); 1.90 - 1.80 (5 señales  $\text{AcO-}$ ); 3.23 - 3.45 (protones aglucón); 3.51 - 3.90 ( $\text{CH}_2\text{O-}$ , azúcar); 4.10 - 4.40 ( $\text{CHO}$ , azúcar); 4.45 - 4.70 (protones aglucón); 4.72 - 5.17 ( $\text{CHO}$ , azúcar); 5.35 ( $\text{C=C}$ ); 7.31 (señal estándar). Espectros Nos. 6 y 9.

Se hizo la determinación de los espectros con reactivo de desplazamiento; con 10 mg de LSR las señales de los grupos acetilo se desplazaron a campo bajo a 1.95 - 2.7 ppm, observándose claramente las seis señales; con 15 mg de reactivo las señales se observan en 1.98 - 3.05 ppm. Espectros Nos. 10 y 11.

3.2.5 Octacetato de 3-O- $\{[\alpha\text{-L-ramnopyranosil-(1 \rightarrow 4)]-[\alpha\text{-L-ramnopyranosil-(1 \rightarrow 2)-}\beta\text{-D-gluco piranosil}]\}$ -diosgenina (XVI).

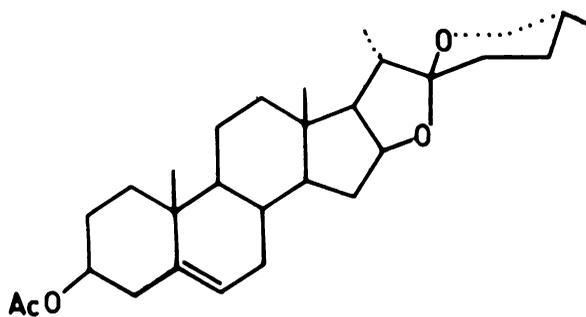
El peracetato se obtuvo por el método indicado, se cristalizó de metanol-agua, fueron necesarias tres recristalizaciones para obtener puro el producto. Punto de fusión 133°C. IR  $\text{cm}^{-1}$ : 2900, 2940, 1750, 1650, 1455, 1380, 1250. RMN- $^1\text{H}$  ppm: 0.65 - 1.3 ( $\text{CH}_3$ , angulares); 1.90 - 2.15 (5 señales  $\text{AcO-}$ ); 3.35 - 3.69 ( protones aglucón); 3.71 - 3.80 ( $\text{CH}_2\text{O}$ , azúcar); 4.20, 4.45, 4.72, 5.3 ( $\text{CHO}$ , azúcar); 4.5 - 4.6 (protones aglucón); 5.40 ( $\text{C=C}$ ); 7.35 (señal estándar). Espectros Nos. 6 y 12.

La adición de 10 mg de LSR provocó el desplazamiento de las señales a 2.0 -2.92 ppm observándose claramente las ocho señales para los grupos acetilo. Espectro No. 13.



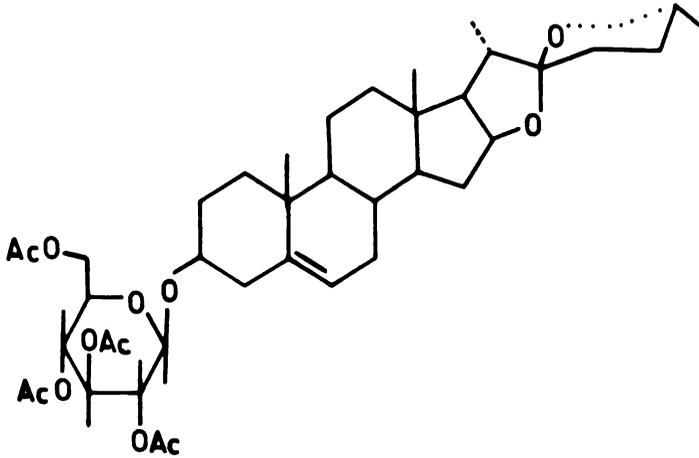
XII

PENTACETATO DE ESCULINA.



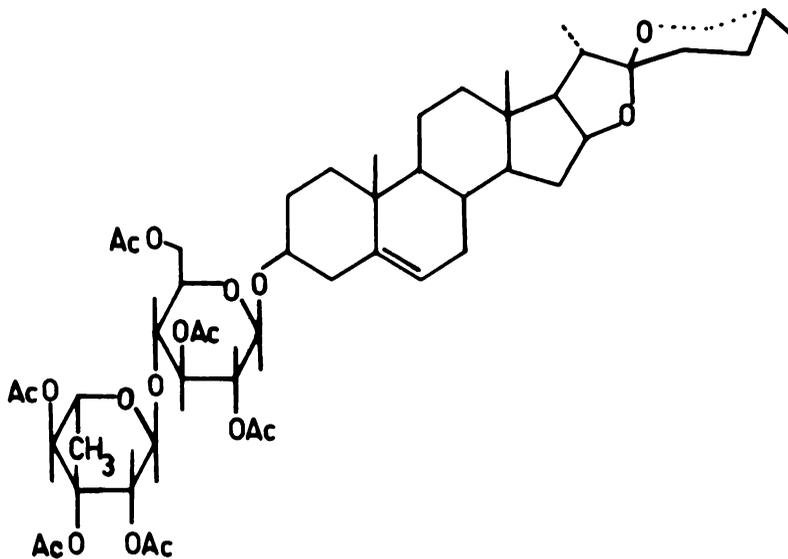
XIII

ACETATO DE DIOSGENINA.



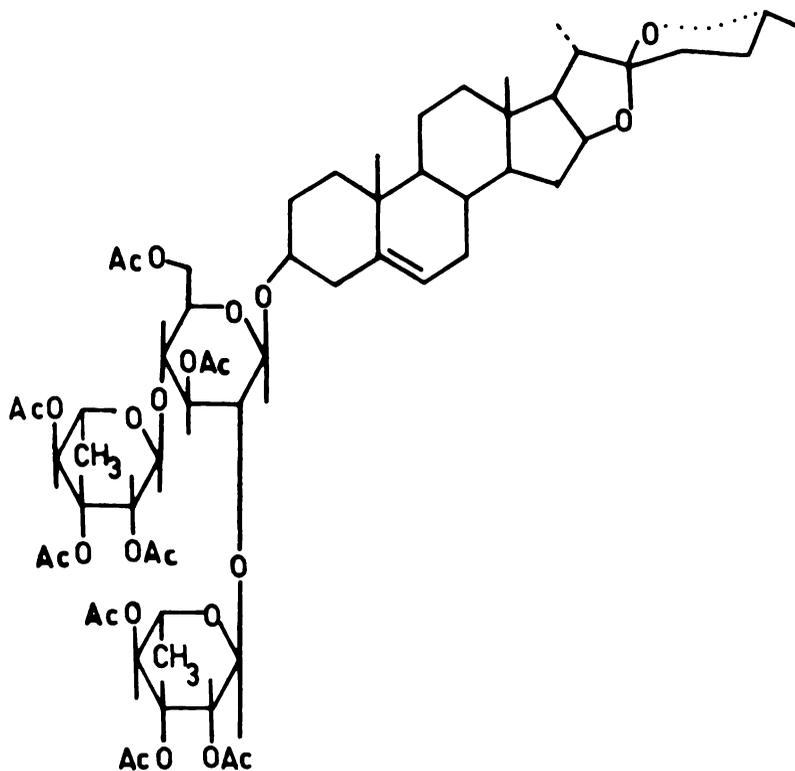
XIV

TETRACETATO DE 3-O-[β-D-GLUCOPIRANOSIL]-DIOSGENINA.



XV

HEXACETATO DE 3-O- $[\alpha$ -L-RAMNOPIRANOSIL-(1  $\rightarrow$  4)-  
 $\beta$ -D-GLUCOPIRANOSIL]-DIOSGENINA.



XVI

OCTACETATO DE 3-O-([ $\alpha$ -L-RAMNOPIRANOSIL-(1  $\rightarrow$  4)-][ $\alpha$ -L-RAMNOPIRANOSIL-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-GLUCOPIRANOSIL])-DIOSGENINA.

#### 4. RESULTADOS.

La determinación de los pesos moleculares de los derivados acetilados se hizo como se indicó anteriormente (pág. 33), para su cálculo se empleó la ecuación 3, en donde  $m$  = muestra problema y  $s$  = estándar.

Peso molecular del peracetato de esculina. Espectro No. 2.

$$\begin{aligned} P_{m_s} &= 235.92 & P_{m_{real}} &= 550 \\ I_s &= 58 & I_m &= 34 \\ n_s &= 4 & n_m &= 34 \\ p_s &= 10.7 \text{ mg} & p_m &= 59.81 \text{ mg} \\ P_{m_{exp.}} &= 562 \\ \text{Error} &= 2.25\% \end{aligned}$$

Peso molecular del acetato de diosgenina. Espectro No. 4.

$$\begin{aligned} P_{m_s} &= 235.92 & P_{m_{real}} &= 456 \\ I_s &= 56 & I_m &= 33 \\ n_s &= 4 & n_m &= 1 \\ p_s &= 13.17 \text{ mg} & p_m &= 60.83 \text{ mg} \\ P_{m_{exp.}} &= 462 \\ \text{Error} &= 1.31\% \end{aligned}$$

Peso molecular del tetracetato de 3-O-[ $\beta$ -D-glucopiranosil]  
-diosgenina. Espectro No. 7.

$$\begin{aligned} Pm_s &= 235.92 & Pm_{real} &= 744.78 \\ I_s &= 26 & I_m &= 157 \\ n_s &= 4 & n_m &= 11 \\ p_s &= 8.69 \text{ mg} & p_m &= 60.06 \text{ mg} \\ Pm_{exp.} &= 742.5 \\ \text{Error} &= 0.296\% \end{aligned}$$

Peso molecular del hexacetato de 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-  
-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-diosgenina. Espectro No. 10.

$$\begin{aligned} Pm_s &= 235.92 & Pm_{real} &= 975 \\ I_s &= 33 & I_m &= 135 \\ n_s &= 4 & n_m &= 17 \\ p_s &= 15.27 \text{ mg} & p_m &= 61.73 \text{ mg} \\ Pm_{exp.} &= 990.9 \\ \text{Error} &= 1.53\% \end{aligned}$$

Peso molecular del octacetato de 3-O- $\{[\alpha\text{-L-ramnopiranosil-}(1 \rightarrow 4)]\text{-}[\alpha\text{-L-ramnopiranosil-}(1 \rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-glucopiranosil}]\}$ -diosgenina. Espectro No. 14.

$$Pm_s = 235.92$$

$$Pm_{\text{real}} = 1205.31$$

$$I_s = 33$$

$$I_m = 129$$

$$n_s = 4$$

$$n_m = 20$$

$$p_s = 15.58 \text{ mg}$$

$$p_m = 56.02 \text{ mg}$$

$$Pm_{\text{exp.}} = 1193.0$$

$$\text{Error} = 1.02 \%$$

## 5. DISCUSION.

Se eligió la esculina dado que representa adecuadamente el grupo de heterósidos sustituidos con glucosa. La señal en 2.8 ppm (3H) corresponde al aceto aromático del cual se conoce su desplazamiento usual alrededor de 2.2 a 2.3 ppm. El sistema ABX en C-6' y el protón en C-5' son claramente discernibles por la forma de sus respectivas señales en 3.95 y 4.25 ppm respectivamente. El multiplete centrado en 5.23 ppm corresponde al resto de protones de la glucosa.

Es importante anotar que el protón anomérico no es observable en esta sobreposición y que el efecto del anillo aromático consiste en desplazar a campos bajos a los protones en C-2', C-3' y C-4'. La separación de grupos aceto no resultó óptima aunque es perfectamente discernible su número por la integración, no habiendo en éste caso sobreposición de otras señales. El cálculo del peso molecular promedio de cinco integraciones tuvo un error del 2.25% respecto del valor real.

En el caso del acetato de diosgenina se observa una impureza (parte A de un sistema ABX)  $J_{AB} = 12$  Hz, centrada en 3.95 ppm que corresponde a otra entidad química del mismo peso molecular como se deduce del espectro de masas que mostró un ion molecular único. Dada la igualdad de pesos moleculares y la señal seleccionada para referencia, éste no constituye en este caso particular, una fuente de error.

El espectro del tetracetato de 3-O- $\{\beta$ -D-glucopiranosil}-diosgenina, permite inicialmente la distinción de cuatro grupos acetilo. La región de las bases de los oxhidrilos, sin embargo se observa compleja. La adición de LSR desplaza en la adición de 20 mg uno de los grupos acetilo y éste se asignó al soportado por C-6' sobre la base de estudios en los que se observa un desplazamiento mayor para el grupo acetilo de esa posición (26). Este hecho es explicable si se considera que C-6' tiene el grupo acetilo orientado hacia el exterior de la molécula y permite una aproximación del reactivo con relativamente pocos impedimentos estéricos.

El error en la determinación del peso molecular fue de 0.3% después del promedio de cinco integraciones efectuadas con intervalos de un minuto.

El espectro del hexacetato de 3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucopiranosil}-diosgenina, muestra entre 3.2 y 5.4 ppm una región compleja correspondiente a todos los protones sobre carbonos unidos a oxígeno, más la señal del protón vinílico centrada en 5.3 ppm. En éste caso después de llevar a cabo las integraciones correspondientes a la referencia y a las señales entre 3.2 y 5.4 ppm es necesario utilizar la información precisa sobre el número de grupos acetilo. Dado que químicamente se conoce la existencia de glucosa y ramnosa por reacciones de hidrólisis y cromatografía en placa fina, el número de estos azúcares queda precisado por la integración y por el número de acetilos separados mediante la adición de LSR (seis señales en total). La señal con

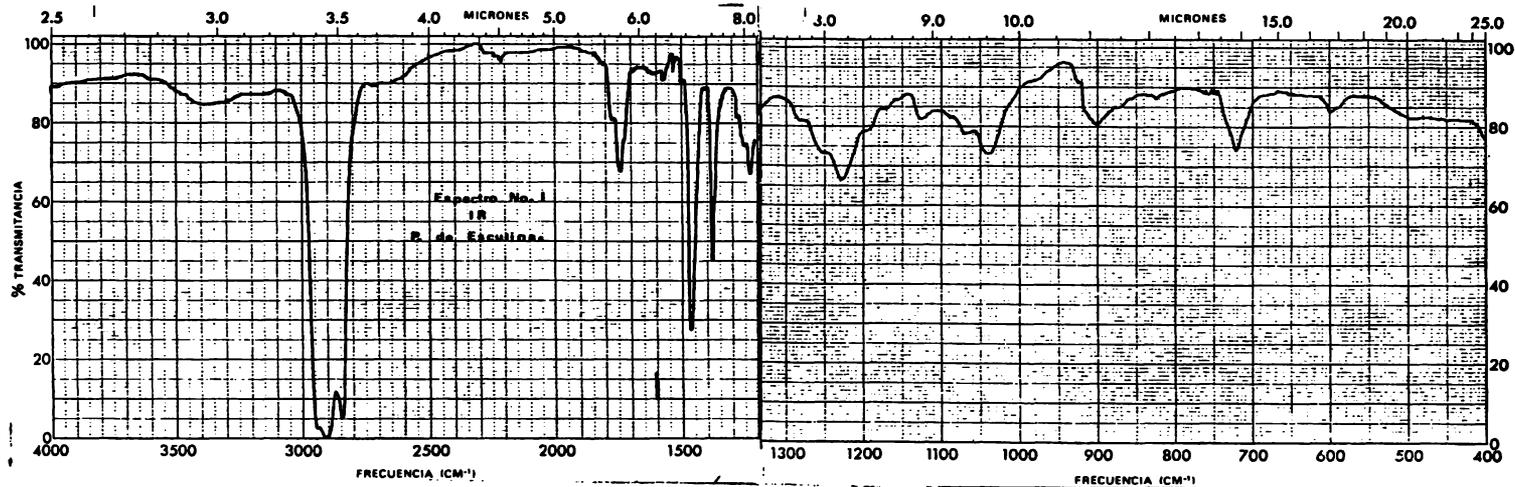
aparición de un doble en 5.3 ppm (5.4 ppm en el caso de diosgenina) corresponde al protón vinflico y tanto en la diosgenina como en este glucósido es desplazada "rápidamente" por la adición de LSR. Esto puede ser interpretado como el resultado de la asociación preferencial del reactivo a la región del grupo acetilo en el caso de la diosgenina y a la región de los azúcares en el caso de este glucósido, donde comparativamente, se observa mayor desplazamiento del protón vinflico que del resto de protones en la molécula. Adicionalmente se observa un sistema AB con acoplamientos posteriores que también se desplaza muy "rápidamente" por la adición de LSR. Tentativamente se asignó esta señal al metileno de la glucosa unida directamente a la genina. Esta hipótesis se ve apoyada si se considera que ambos azúcares en conjunto, a pesar de ofrecer sitios múltiples a la asociación del reactivo, también presentan impedimentos estéricos. El metileno de la glucosa (C-6), resultaría la fracción molecular menos sujeta a los impedimentos estéricos con una asociación favorable que desplaza tanto al sistema AB de los protones en C-6' como al protón en C-3. La fracción de la ramnosa, aparentemente no sufre tales desplazamientos en comparación con H-3 como se desprende de la observación del desplazamiento pequeño de la señal del metilo secundario en éste azúcar, es decir, la asociación ocurre cuando la relación  $[LSR]/[S]$  es  $\ll 1$ , preferencialmente sobre la fracción de glucosa. El peso molecular, estimado después de cinco integraciones en la manera usual fue de 990.9, lo que representa un error de 1.53% con respecto al valor real.

El octacetato de 3-O- $\{[\alpha\text{-L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-\alpha\text{-L-ramno-}$   
 $\text{piranosil-(1 \rightarrow 2)-}\beta\text{-D-glucopiranosil}\}$ -diosgenina, representa una  
molécula con una molécula de glucosa y dos de ramnosa. El espec-  
tro original de ésta sustancia no permite la distinción del núme-  
ro de acetilos. La mayor separación se logra cuando a 58 mg se  
le agregan 10 mg de LSR, pudiendo distinguirse siete señales, de  
las cuales, una es resultado de la sobreposición de dos acetilos.  
De esta manera pueden contabilizarse ocho grupos acetilo y por  
tanto, estimarse tres moléculas de azúcares unidos a la genina.  
El peso molecular promedio resultó ser 1193, que constituye 1.1%  
de error con respecto al valor real.

En todos los casos, la estructura de la genina era conocida,  
pero ésto no es un requisito indispensable para aplicar el método,  
siendo solamente necesario que exista una señal o grupo de señales  
que pueda ser asignada a un número definido de protones.

## 6. APENDICE DE ESPECTROS.

No. de espectro:	Espectro de:	Compuesto:
1	IR	XII
2	RMN	XII
3	IR	XIII
4	RMN	XIII
5	RMN	XIII + LSR
6	IR	XIV
7	RMN	XIV
8	RMN	XIV + LSR
9	RMN	XV
10	RMN	XV + LSR
11	RMN	XV + LSR
12	RMN	XVI
13	RMN	XVI + LSR

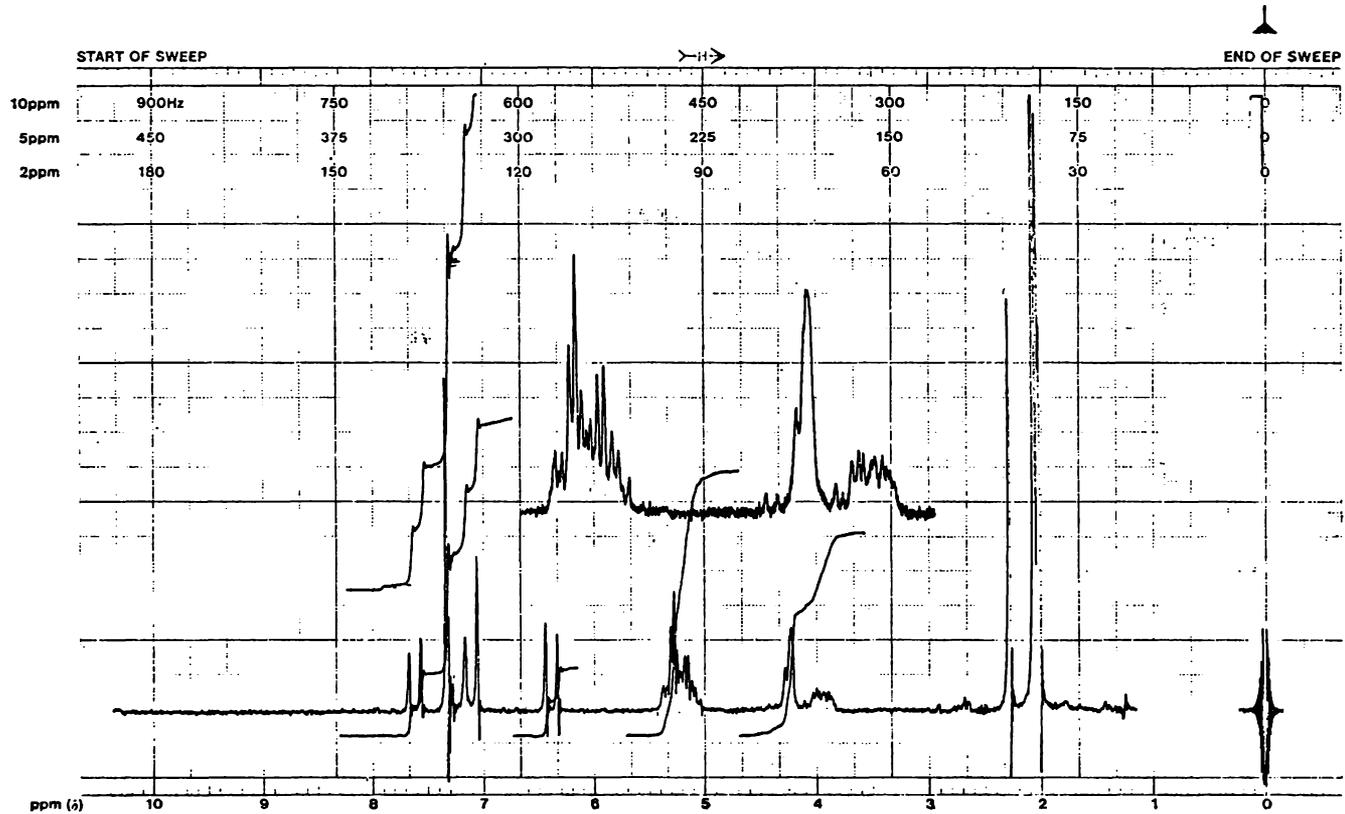


Espectro No. 1  
IR  
Pentacetato de Esculina.



varian instrument division

palo alto, california

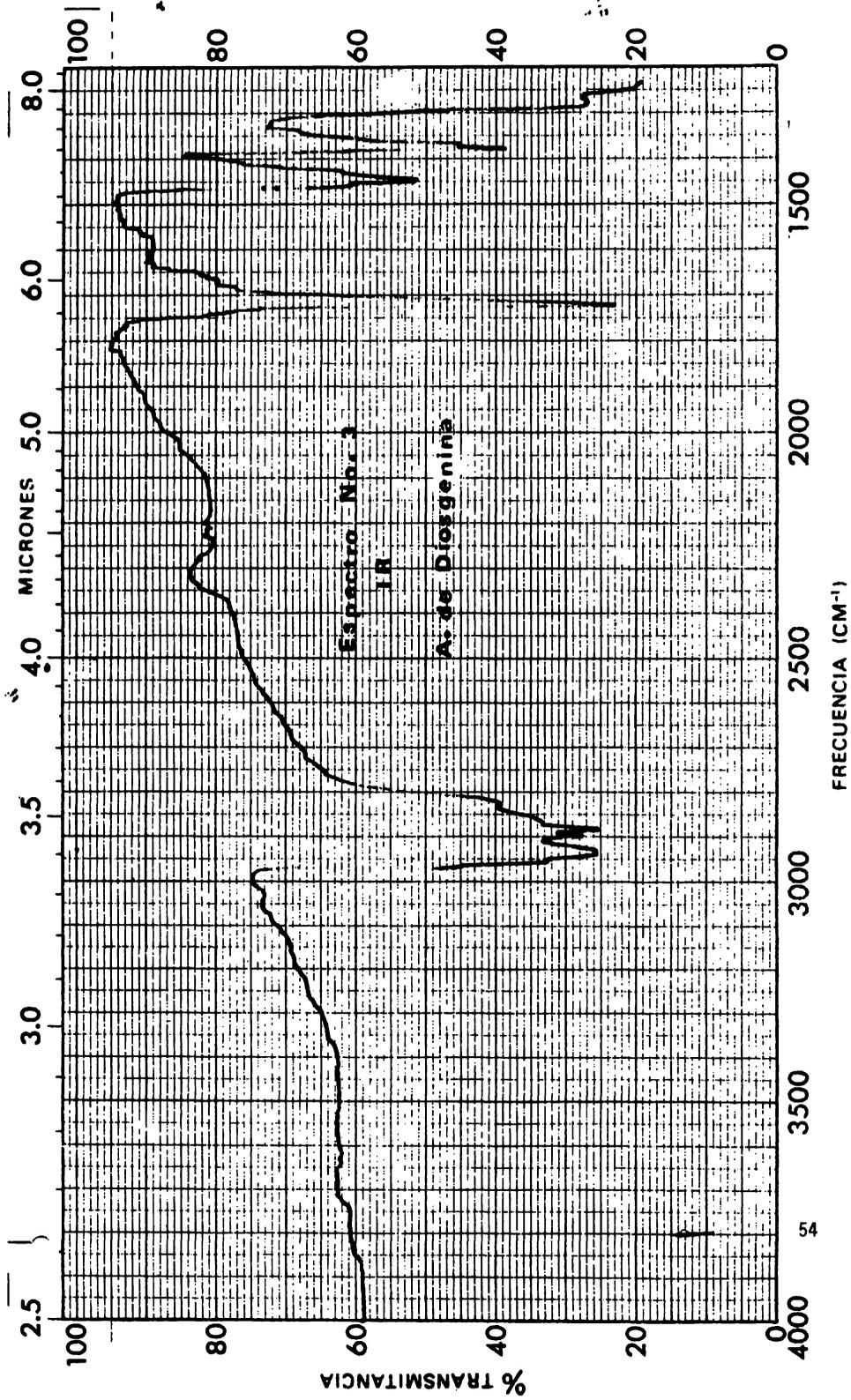


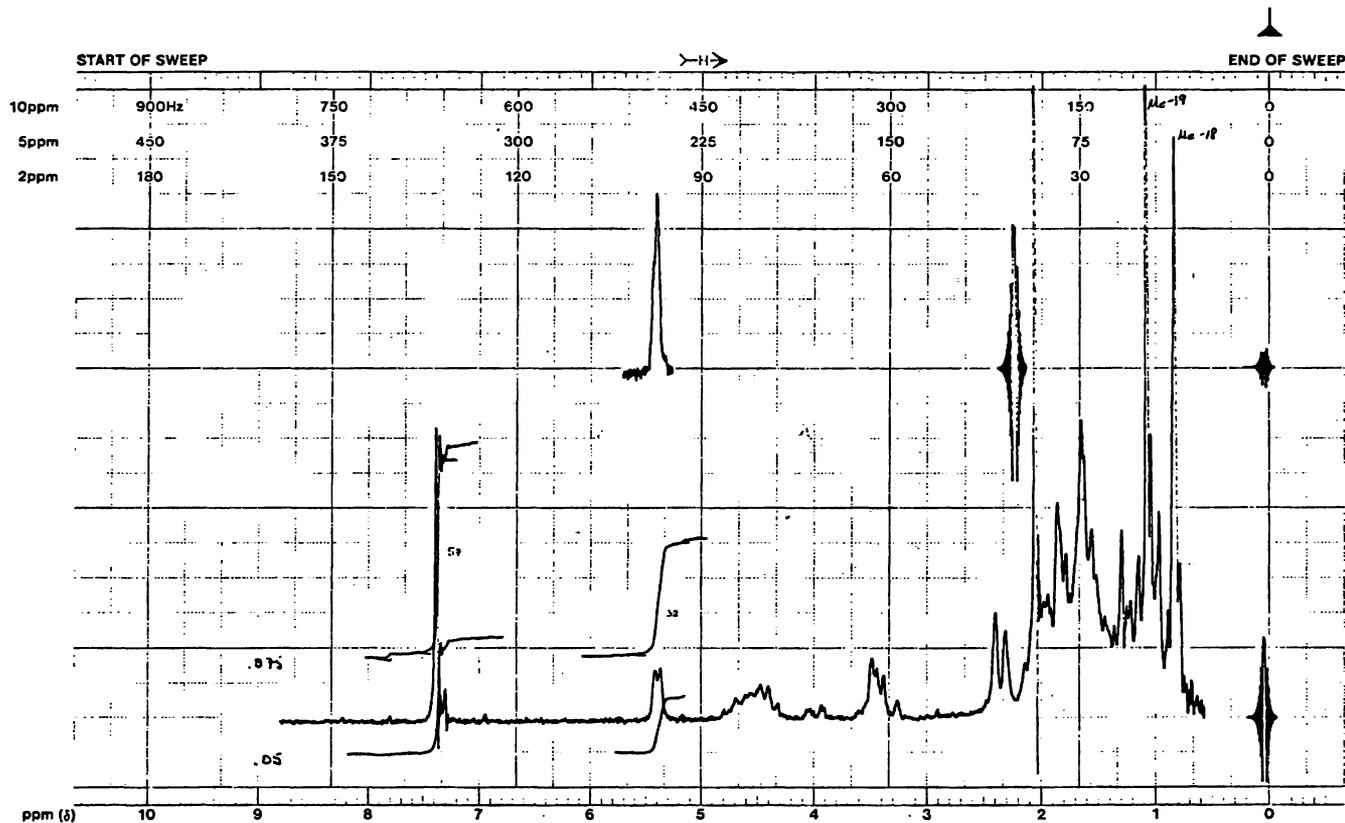
EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm    SPECTRUM AMPL. \_\_\_\_\_    SWEEP TIME 5 min    NUCLEUS H-1    SAMPLE: \_\_\_\_\_    OPERATOR \_\_\_\_\_

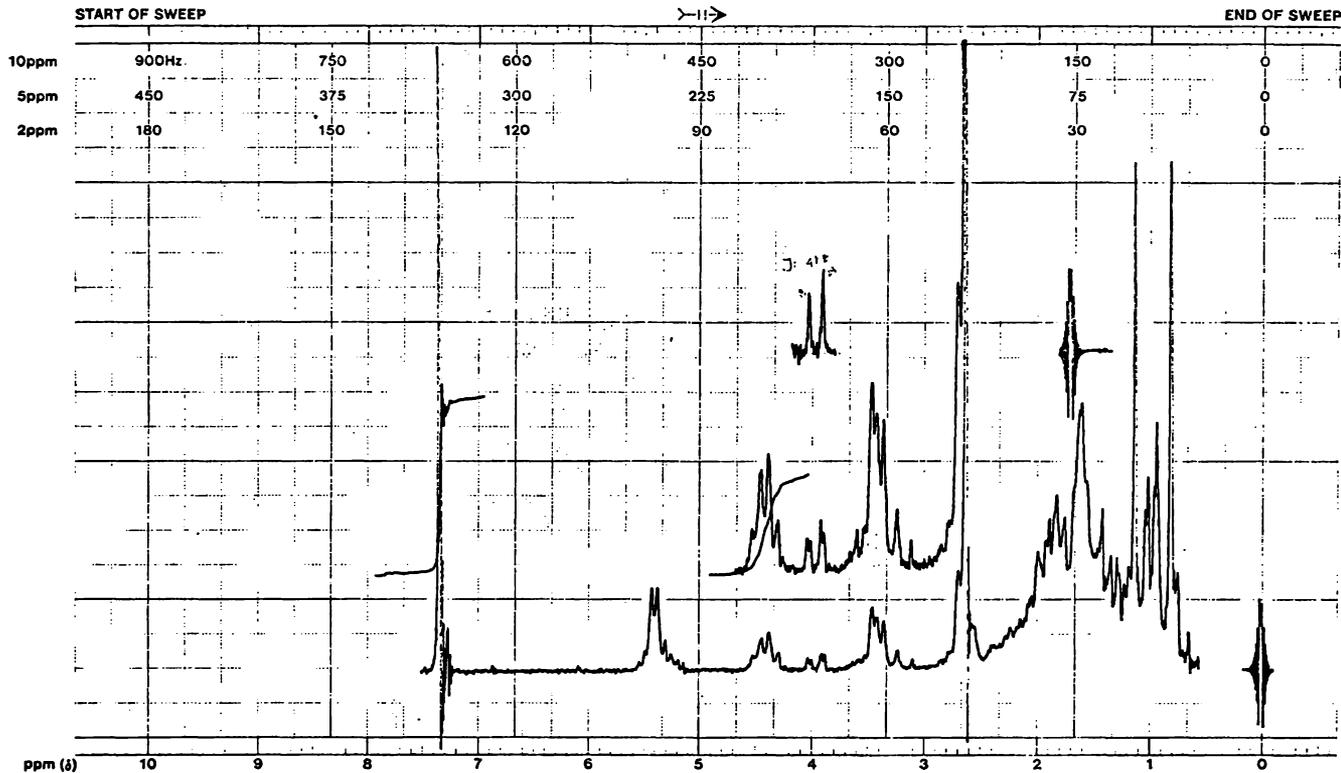
LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG    FILTER \_\_\_\_\_ sec    SWEEP WIDTH 10 ppm    ZERO REF. TMS    P. Esculina    DATE \_\_\_\_\_

DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm    DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG    RF POWER \_\_\_\_\_ mG    END OF SWEEP 0 ppm    SAMPLE TEMP. Amb. °C    SOLVENT: CDCl<sub>3</sub>    SPECTRUM NO. 2

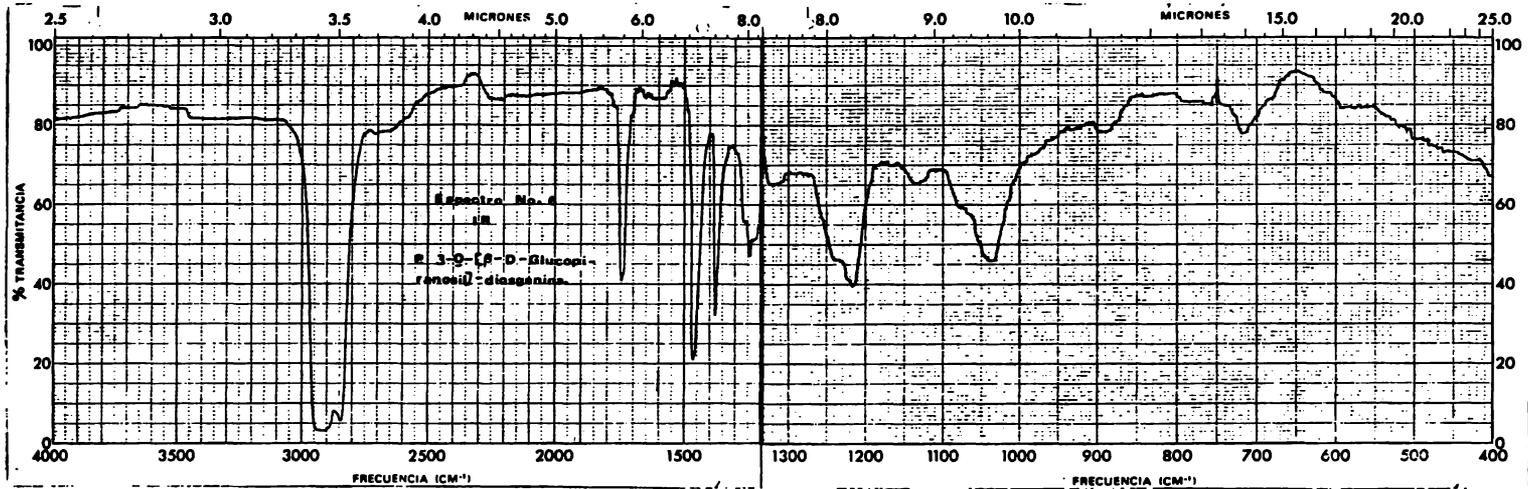




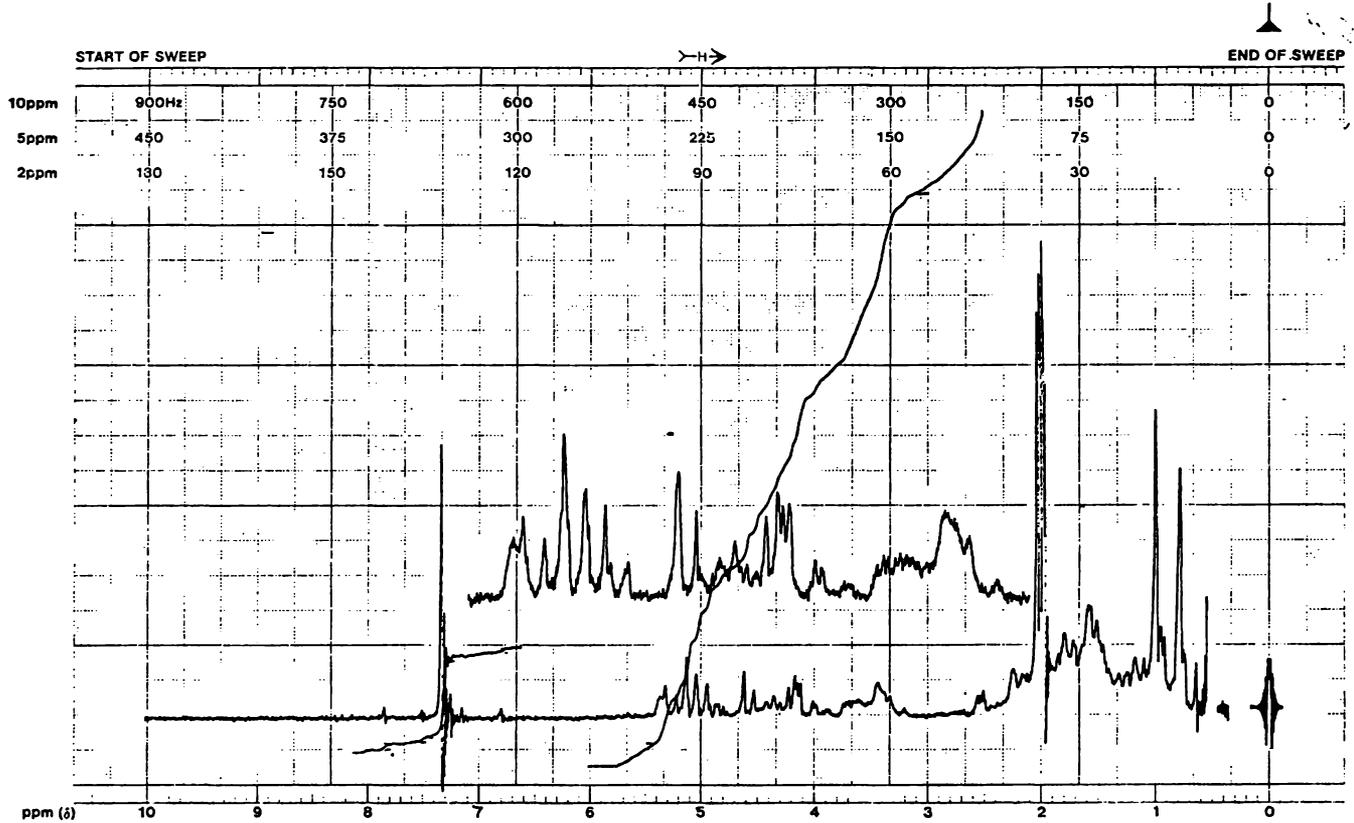
LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm    SPECTRUM AMPL. \_\_\_\_\_    SWEEP TIME 5 min    NUCLEUS H-1    SAMPLE: \_\_\_\_\_    OPERATOR \_\_\_\_\_  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG    FILTER \_\_\_\_\_ sec    SWEEP WIDTH 10 ppm    ZERO REF. TMS    **A. Diosgenina**    DATE \_\_\_\_\_  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm    RF POWER \_\_\_\_\_ mG    END OF SWEEP 0 ppm    SAMPLE TEMP. Amb. °C    SOLVENT: CDCl<sub>3</sub>    SPECTRUM NO. 4  
 DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG



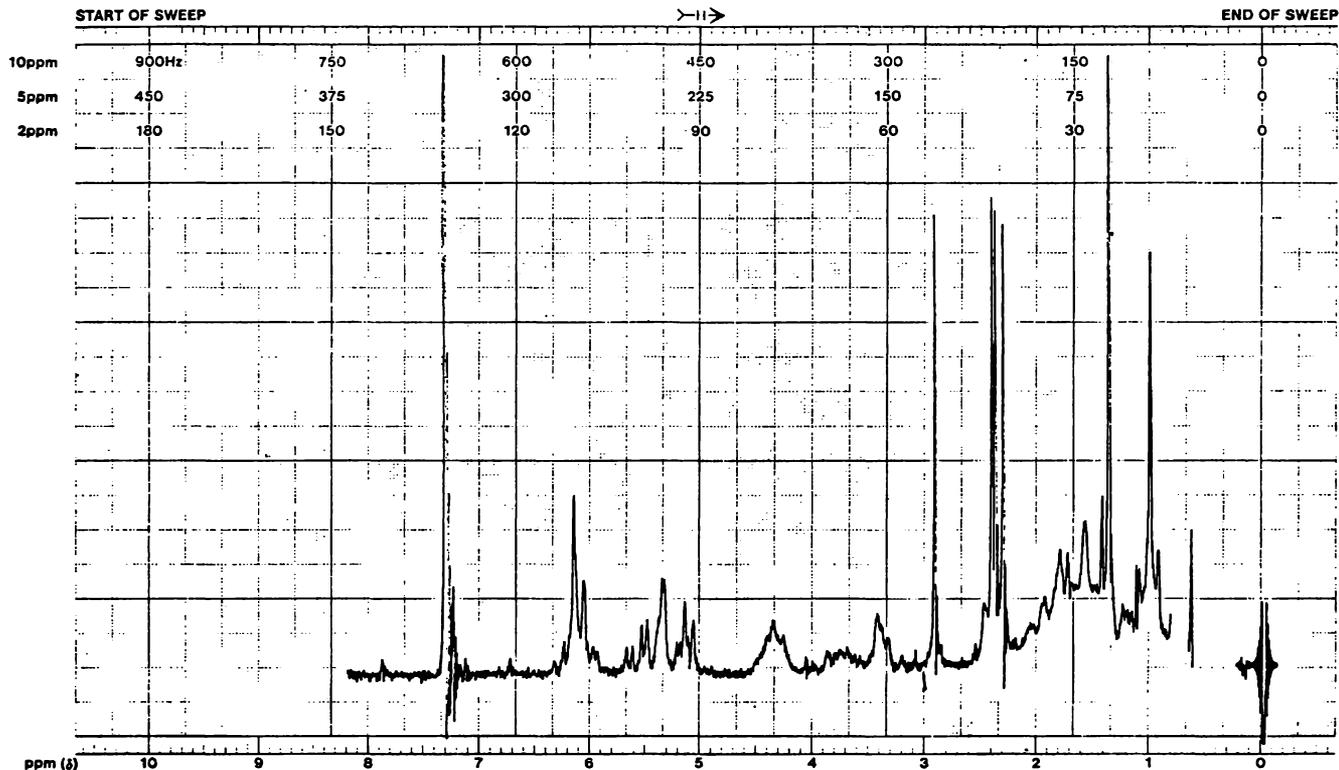
LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. \_\_\_\_\_ SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H-1 SAMPLE: \_\_\_\_\_ OPERATOR \_\_\_\_\_  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER \_\_\_\_\_ sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. TMS SAMPLE: A. Diosgenina DATE \_\_\_\_\_  
 DECOUPLE POS. 1.3 ppm ppm DECOUPLING POWER 4mg mG RF POWER \_\_\_\_\_ mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. Amb. °C SOLVENT: CDCl<sub>3</sub> SPECTRUM NO. 5



Espectro No. 6.  
IR.



LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm    SPECTRUM AMPL. \_\_\_\_\_    SWEEP TIME 5 min    NUCLEUS H-1    SAMPLE R del 3-D-E    OPERATOR Paul E.  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG    FILTER \_\_\_\_\_ sec    SWEEP WIDTH 10 ppm    ZERO REF. TMS    -D-Glucopyranosil]-  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm                               diogenina. (88)    DATE 22/Jul/80  
 DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG    RF POWER \_\_\_\_\_ mG    END OF SWEEP 0 ppm    SAMPLE TEMP. Amb °C    SOLVENT: CDCl<sub>3</sub>    SPECTRUM NO. 21



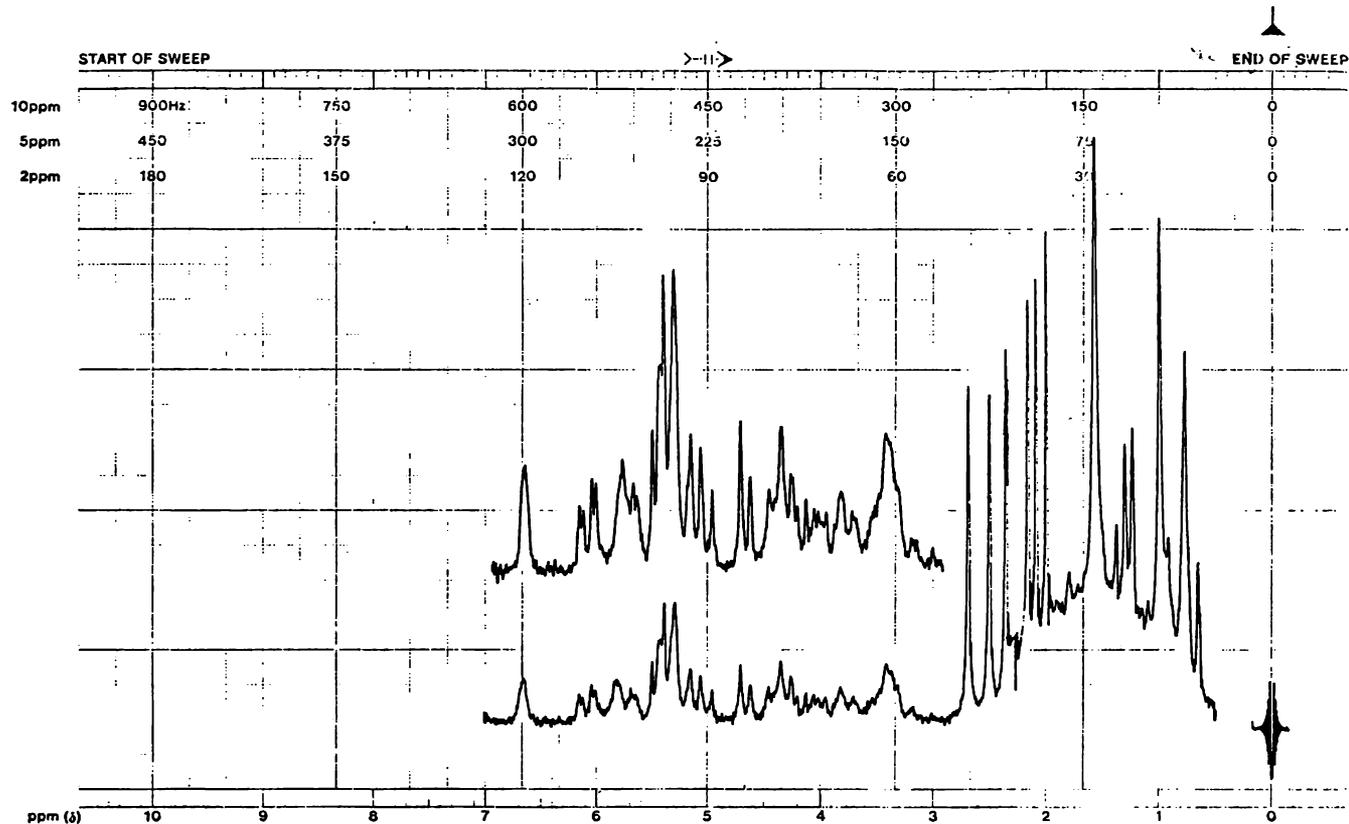
LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm    SPECTRUM AMPL. \_\_\_\_\_    SWEEP TIME 5 min    NUCLEUS H-1    SAMPLE: P. 20 [3-2-[P-OPERATOR  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG    FILTER \_\_\_\_\_ sec    SWEEP WIDTH 10 ppm    ZERO REF. TMS    -D-Glucopyranosyl]-    DATE \_\_\_\_\_  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm    RF POWER \_\_\_\_\_ mG    END OF SWEEP 0 ppm    SAMPLE TEMP. Amb. °C    + LSR    SOLVENT: CDCl<sub>3</sub>    SPECTRUM NO. 8  
 DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG





varian instrument division

palo alto, california

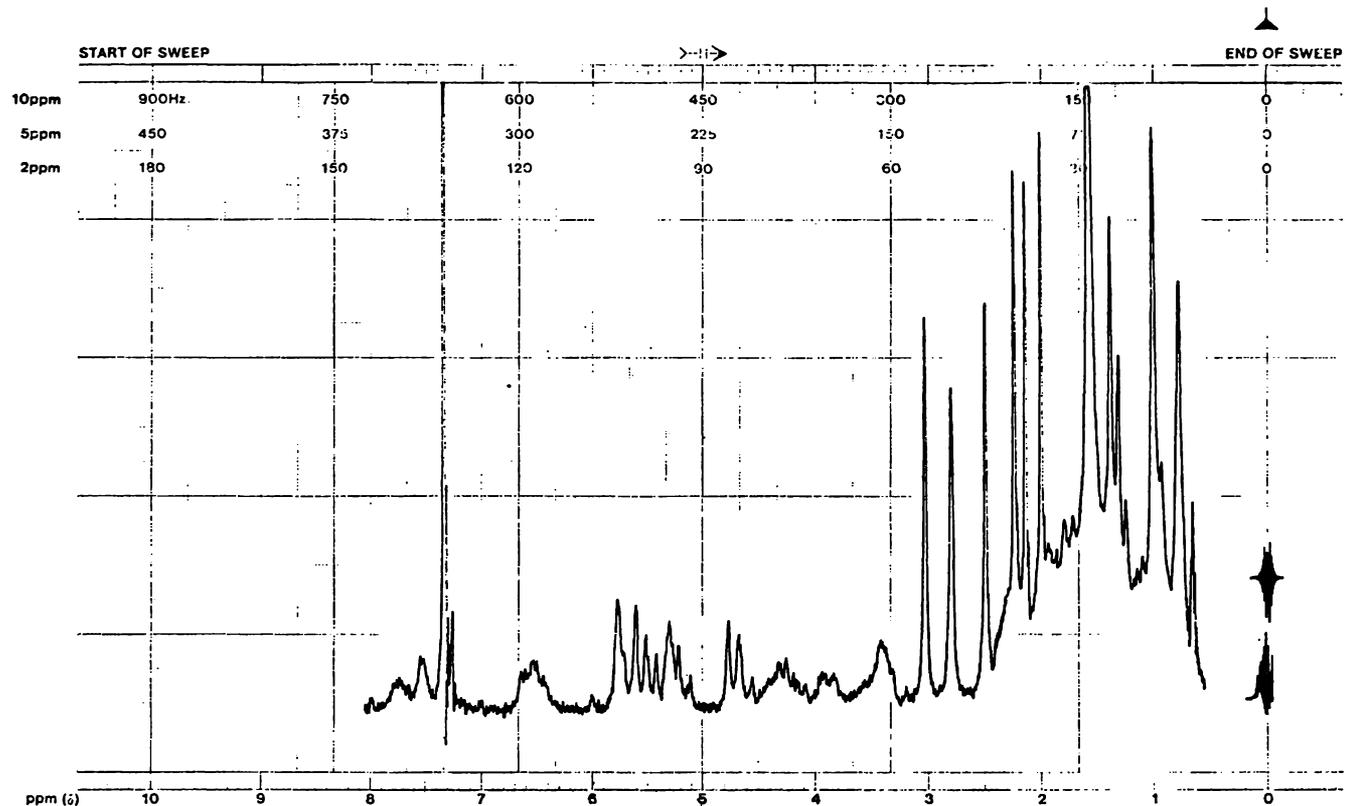


LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. \_\_\_\_\_ SWEEP TIME 5 min NUCLEUS. H-1

LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER \_\_\_\_\_ sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. TMS

DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG RF POWER \_\_\_\_\_ mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. Amb. °C

SAMPLE: P del 3-O [u] OPERATOR R. F.  
L-Ramnopiranosil (1-4)  
β-D-glucopiranosil (1-2) DATE \_\_\_\_\_  
diogenina (32)  
+ LSR  
 SOLVENT. CDCl<sub>3</sub> SPECTRUM NO. 10

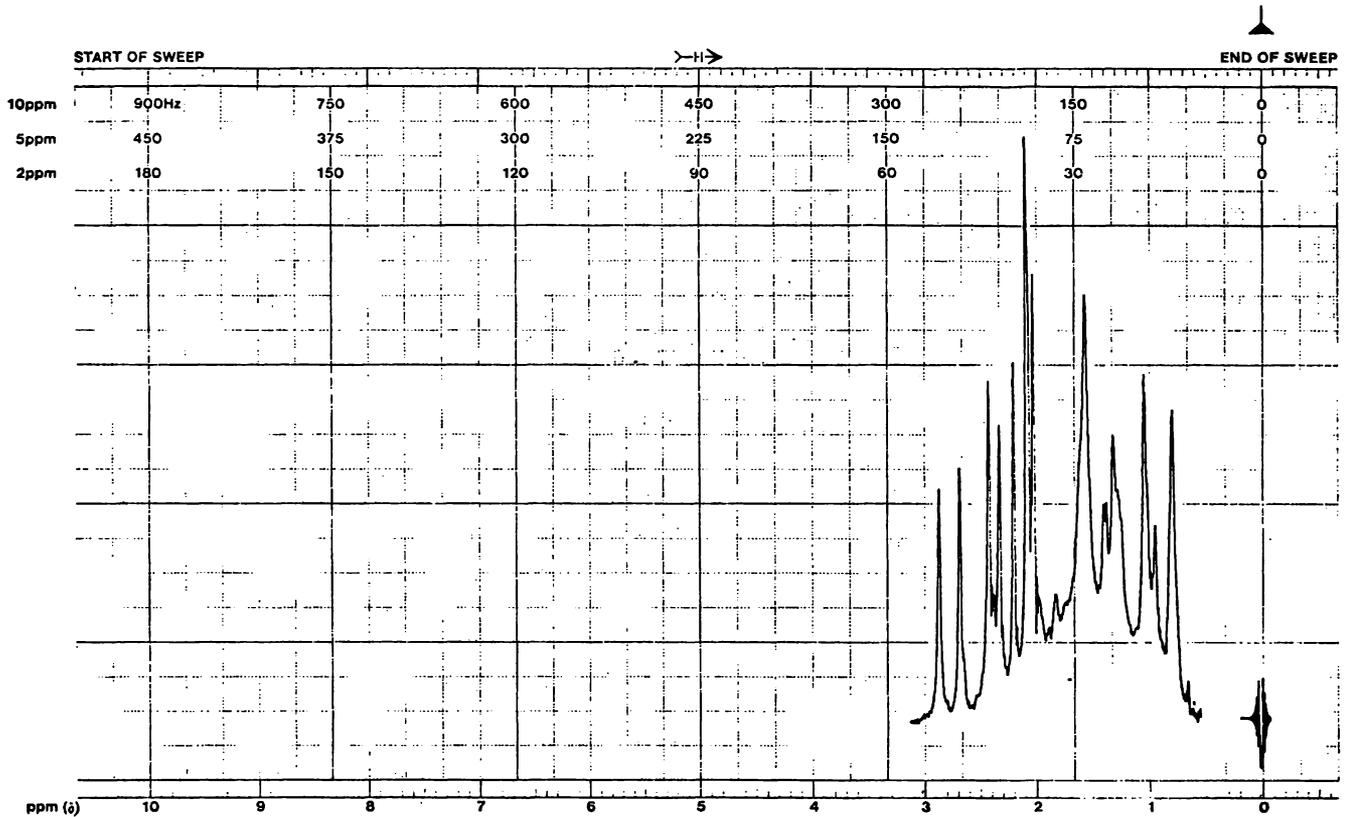


LOCK POS. _____ ppm	SPECTRUM AMPL. _____	SWEEP TIME <u>5</u> min	NUCLEUS <u>H-1</u>	SAMPLE <u>P. de 3-O-L- -L-Rauvafuranol-(1-<math>\beta</math>- -<math>\beta</math>-D-glucopyranosyl)- -diosgenin. (2X)</u>	OPERATOR _____
LOCK POWER _____ mG	FILTER _____	SWEEP WIDTH <u>10</u> ppm	ZERO REF. <u>TMS</u>	DATE _____	
DECOUPLE POS. _____ ppm	RF POWER _____ mG	END OF SWEEP <u>0</u> ppm	SAMPLE TEMP. <u>Amb.</u> °C	<u>+LSR</u>	
DECOUPLING POWER _____ mG			SOLVENT: <u>CDCl<sub>3</sub></u>	SPECTRUM NO. <u>11</u>	



varian instrument division

pato alto, california



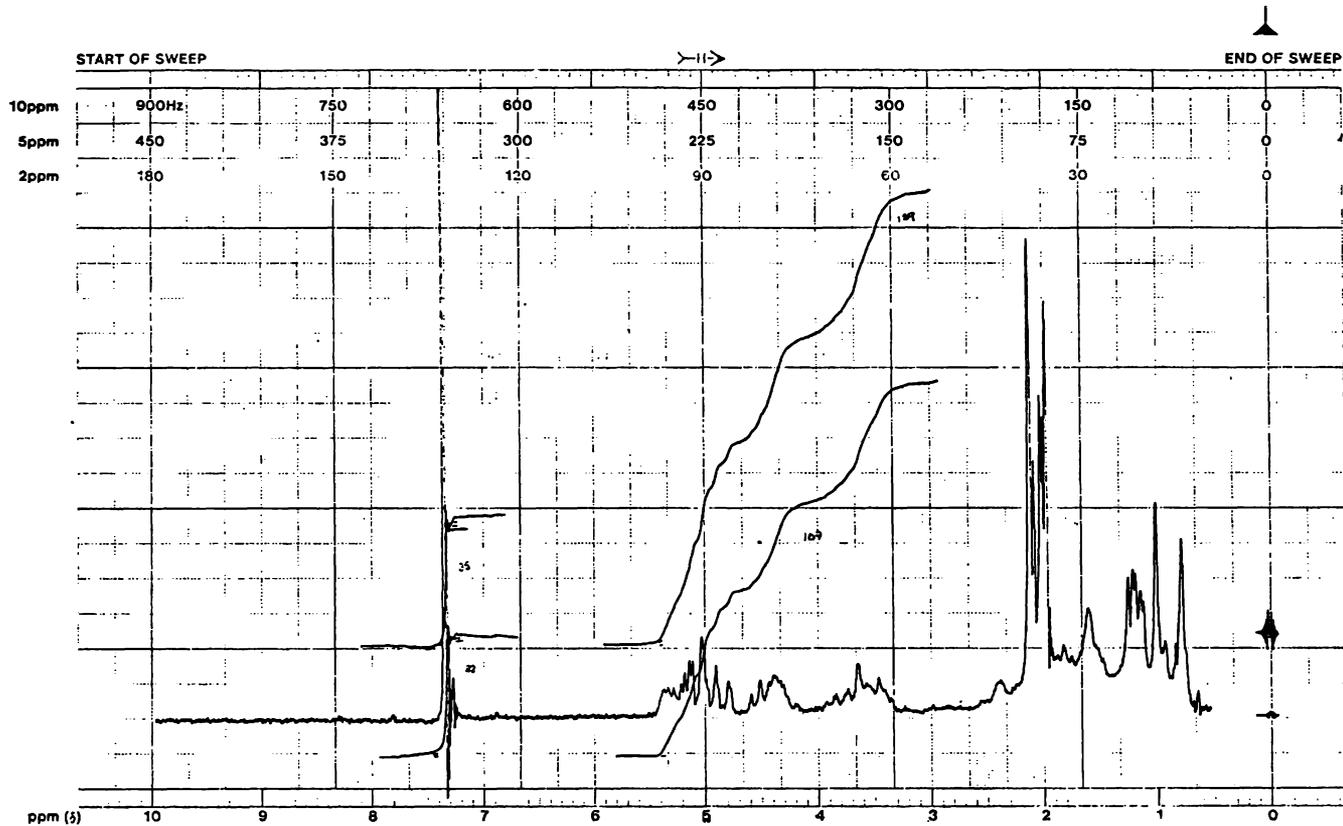
EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm    SPECTRUM AMPL \_\_\_\_\_    SWEEP TIME 5 min    NUCLEUS H-1    SAMPLE: P 40 3-D- [L- OPERATOR  
L- Ramnopiranosil (1-2)  
-[L- ramnopiranosil]-  
(1-2) -p-D-glucopiranosil-  
-diogepirna- (2VI)  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG    FILTER \_\_\_\_\_ sec    SWEEP WIDTH 10 ppm    ZERO REF. TMS    SOLVENT: CDCl<sub>3</sub>  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm    DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG    END OF SWEEP 0 ppm    SAMPLE TEMP. Amb °C    SPECTRUM NO. 12



varian instrument division

palo alto, california



LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. \_\_\_\_\_ SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H-1  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER \_\_\_\_\_ sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. TMS  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG RF POWER \_\_\_\_\_ mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. Amb. C

SAMPLE # del 3-2-[α-OPERATOR *R. Simpson*  
L-Ramnopiranosil-(1-2)  
[α-L-ranopiranosil - DATE \_\_\_\_\_  
(1-2)-β-D-glucopirano-  
sil]-D-glucoside + LSR  
 SOLVENT. CDCl<sub>3</sub> SPECTRUM NO. 13

## 7. BIBLIOGRAFIA.

- 1) The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry., 2nd. Ed., Ed. W. Pigman and Derek H., Academic Press, Vol. II A, USA. (1970).
- 2) Chemical Plant Taxonomy, Swain Ed., Academic Press, England, (1965).
- 3) Varro E. Tyler, Pharmacognosy, 7th. Ed., Lea and Febiger Ed., USA., (1976).
- 4) L. Feiser, Steroids, Reinhold Publ., USA., (1949).
- 5) Edward O. Claus, 4th. Ed., Lea and Febiger Ed., USA., (1962).
- 6) Egil Ranistad, Modern Pharmacognosy, Mac. Graw-Hill Ed., USA., (1959).
- 7) Lehninger, Albert L., Biochemistry, 2nd. Ed., Worth Publishers, Inc., USA. (1975).
- 8) Guthrie and Honeyman's, Introduction to Carbohydrate Chemistry, 4th. Ed., Oxford University Press, England, (1974).
- 9) Morrison and Boyd, Organic Chemistry, 3th. Ed., Allyn and Bacon, Inc., USA., (1974).
- 10) Klyne W., Biochem. J., 47,XII, (1950).
- 11) The Carbohydrates, Chemistry, Biochemistry and Physiology., 1st. Ed., Ward Pigman Ed., Academic Press, USA., (1957).
- 12) S. Koto, Tetrahedron 30, 1933 - 1944, (1974).
- 13) Shigehiro Hirano, Organic Magnetic Resonance, Vol. 3, 353-360, (1971).
- 14) Wesley A. Pearson, Journal of Chem. Educ., Vol. 52, No. 12, 814, (1975).

- 15) Addison Ault, Gerald O. Dudek, NMR Spectroscopy, USA., (1976).
- 16) Kenneth A. Connors, A Textbook of Pharmaceutical Analysis, 2nd. Ed., A Willey-Interscience Publication, USA., (1975).
- 17) D. E. Leyden and R. H. Cox, Analytical Applications of NMR, Willey-Interscience Publications, USA., (1977).
- 18) Pierre Laslo and Peter Stang, Organic Spectroscopy Principles and Applications, Harper and Row Publishers, USA., England , (1971).
- 19) Paul V. Demarco, J. of the Am. Chem. Soc., 92, 19, (1970).
- 20) M. H. Freemantle, J. Chem. Soc., (B), 547 - 553, (1969).
- 21) C. C. Hinckley, J. Am. Chem. Soc., 91, 5160, (1969).
- 22) Perkin-Elmer NMR News, No. 17, January 1978.
- 23) Joseph B. Lambert, Organic Structural Analysis, Mc. Millan Publishing Co. Inc., USA., (1980).
- 24) Hans B. Boren, Acta Chemica Scandinavia, 26, 3261 - 3268, (1973).
- 25) Anthony F. Cockerill, Chemical Reviews, 73, 6, (1973).
- 26) Michio Matsui, Chem. Pharm. Bull., 20 (5), 1033, (1972).
- 27) Jung Cook Helgi, Contribución al estudio de los glucósidos de Dioscorea composita, Tesis Facultad de Química, (1975).
- 28) Jesús Campos Llavot, Glucósidos de Dioscorea composita, Tesis Facultad de Química, UNAM., (1977).
- 29) M. L. Wolfrom and A. Thompson. Methods in Carbohydrate Chemistry., Vol. II. Reactions of Carbohydrates., Ed. Roy L. Whistler. M. L. Wolfrom., Academic Press Inc., USA. (1963).