

8
209



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

Estudio quimiotaxonómico de raíces de *Salvia coulteri*; Electroquímica de diterpenos abietánicos

SECRETARÍA DE PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S
Que para Obtener el Título de
Q U I M I C O
P r e s e n t a
Bernardo Antonio Frontana Uribe



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1993.



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 está 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.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	8
ANTECEDENTES.....	10
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	24
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	87
PARTE EXPERIMENTAL.....	90
BIBLIOGRAFIA.....	99

INTRODUCCION

Desde tiempos remotos el hombre ha buscado satisfacer sus necesidades con los productos que produce la naturaleza. Específicamente en el caso de aliviar sus malestares y dolencias, ha empleado todo tipo de remedios entre los que destacan las plantas. De esta manera nació la herbolaria, rama de la medicina de la que en México tenemos tradición como lo indica el Códice Badiano (1), compendio de remedios tradicionales indígenas.

La familia de las *Labiatae* ha sido empleada ampliamente como una fuente de plantas utilizadas dentro de la herbolaria tradicional mexicana (2) (1). Estudios realizados a estas plantas han demostrado ser una cantera de sustancias biológicamente activas y con propiedades farmacológicas interesantes (2,3). Entre las propiedades que presentan los metabolitos secundarios aislados de estas plantas se encuentran: antivirales, antibacterianos, espasmolíticos, citotóxicos y antitumorales (3,4,5). Además, las plantas se han empleado como fuentes de sustancias químicas que son precursoras de productos con alguna otra actividad o uso.

En México la familia *Labiatae* está representada por aproximadamente 550 especies comprendidas en 42 géneros (6), de estos géneros el más abundante es el género *Salvia*, representado por aproximadamente 300 especies (7). El género *Salvia* se caracteriza por ser una importante fuente de metabolitos secundarios entre los que destacan: monoterpenos, diterpenos, triterpenos y flavonas (8). Este género se subdivide en 4 subgéneros: *Leonia*, *Salvia*, *Sclarea* y *Calosphace* (9)(10), siendo este último el más abundante y está dividido en 105 secciones formado en su totalidad por especies pertenecientes exclusivamente al continente americano. Entre estas secciones se encuentra la sección *Tomentellae*, que está formada por veinte especies, diez de las cuales se encuentran en territorio mexicano y son:

Salvia ballotaeflora

Salvia frutescens

Salvia goldmanii

Salvia anastomosans

Salvia rubropunctata

Salvia candicans

Salvia parryi

Salvia coulteri

Salvia pruinosa

Salvia pinguiflora

Los productos aislados de las plantas se pueden relacionar con el subgénero o sección a la que pertenecen, y con esta información servir de herramienta importante para ayudar a la clasificación taxonómica de la planta en estudio, esto gracias a que las especies de plantas de cada subgénero y sección sintetizan metabolitos secundarios similares entre ellas, lo que permite modificar o corroborar la clasificación existente. Esto se denomina el estudio quimiotaxonómico de la planta. Este tipo de estudios son importantes por las siguientes razones (11):

a) El conocimiento de los metabolitos secundarios que tienen las plantas permite proponer rutas biogénicas para la formación de los mismos, contribuyendo al conocimiento de la fitoquímica vegetal.

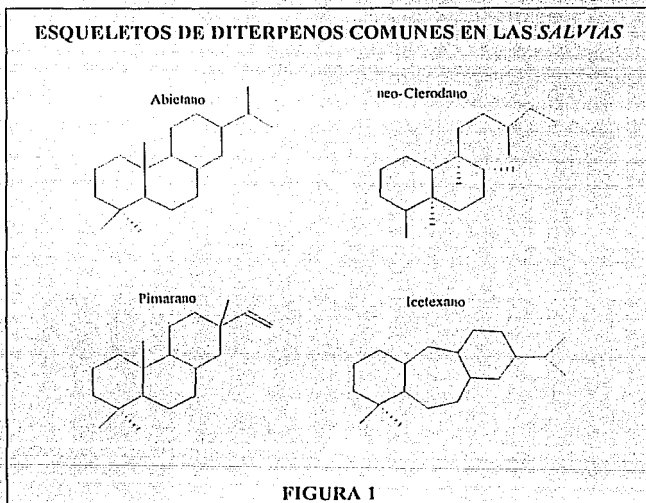
b) Algunos de los productos aislados son característicos del subgénero y sección a la que pertenecen las plantas, esto permite establecer relaciones quimio-biológicas, lo que hace posible definir el perfil químico de las plantas, y con ello, corroborar su inclusión dentro de la clasificación taxonómica.

c) El conocimiento de nuevas estructuras químicas, grupos funcionales complejos y diferentes que poseen los metabolitos secundarios aislados, son uno de los cauces con los que se enriquecen las posibilidades para los químicos que trabajan en síntesis orgánica.

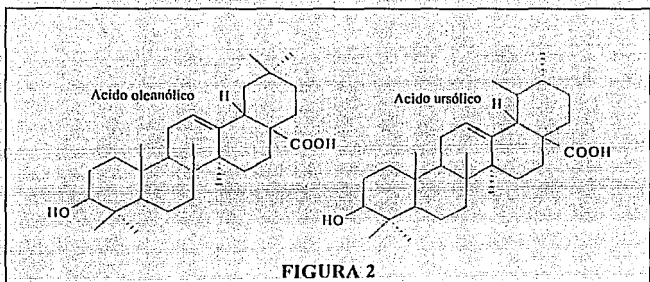
d) En estos estudios se aíslan y caracterizan nuevos metabolitos secundarios con alguna actividad biológica de utilidad para el hombre.

De esta manera se han llevado a cabo estudios sistemáticos de algunos géneros de *Labiadas* como son: *Sideritis* (12), *Teucrium* (13) y *Ajuga* (14). Actualmente se investiga el género *Salvia* en el Instituto de Química de la UNAM, lo cual ha llevado a la caracterización de nuevos metabolitos secundarios característicos de las secciones de este género. Así, con el estudio quimiotaxonómico se ha demostrado que existe cierta relación entre los metabolitos secundarios aislados y la sección a la que pertenecen las plantas estudiadas; para la sección *Scorodonia* del subgénero *Calosphaea* del género *Salvia*, se caracterizaron diterpenos con esqueleto de clerodano; en la sección *Fulgentes* se identificaron diterpenos con esqueleto de clerodano y pimarano; y en la sección *Erytrostachys* diterpenos con esqueleto de abietano. El estudio sistemático del género *Salvia* ha conducido a la caracterización de diterpenos con esqueletos de abietano,

abietano transpuesto o icetexano, pimarano y clerodano (Figura 1). Del total de los diterpenos aislados de *Salvias* mexicanas, cerca del 80% poseen esqueleto de neo-clerodano (8).



Los triterpenos más frecuentes que se han encontrado en las *Salvias* estudiadas son el ácido oleanólico y el ácido ursólico (Figura 2).



Como se mencionó, los productos naturales se han utilizado como precursores en la síntesis de otros productos de interés particular. Entre las técnicas empleadas para lograr estas transformaciones se encuentra la electroquímica. Para lograr con éxito las electrosíntesis es necesario antes llevar a cabo un estudio de las propiedades del sistema electroquímico, para que con la información generada se propongan medios y condiciones de reacción y de esta manera se logre el mayor rendimiento en la reacción.

Una vez que se conocen las principales características del sistema electroquímico, podemos intentar una síntesis o transformación electroquímica a nivel preparativo. Las ventajas que presenta la electroquímica orgánica son (15):

- La cinética de una reacción electroquímica depende del potencial al que se realice la transferencia de electrones y el control de este potencial es equivalente a controlar la temperatura para una reacción normal.
- La electroquímica es selectiva, ya que en moléculas que tienen dos o más grupos funcionales electroactivos diferentes o donde un grupo pueda presentar diferentes estados de oxidación, se puede escoger el potencial al cual se llevará a cabo la reacción para afectar a uno o más grupos electroactivos, y con ello preparar compuestos difíciles y muchas veces imposibles de obtener de otra manera.

- Facilidad de aislar el producto transformado ya que al termino de la electrólisis, el medio de reacción no contiene oxidante o reductor por lo que la reacción es más limpia, evitando la contaminación por productos de la reacción química.

- El costo de inversión es relativamente alto pero a largo plazo se paga por el alto precio de los agentes redox químicos específicos como el OsO_4 o el RuO_4 .

- Con el empleo de la electroquímica, se sustituyen agentes redox tóxicos y peligrosos

- El empleo de técnicas electroquímicas, además de llevar a cabo la transformación, permite estudiar el mecanismo por el cual se esta llevando a cabo la reducción u oxidación, con lo que es posible mejorar las técnicas propuestas.

- La electrólisis genera especies muy reactivas como radicales neutros o cargados, carbaniones y carbocationes.

- Con las reacciones electroquímicas no hay que preocuparse por disolver el agente redox, sino simplemente por disolver el producto a transformar, lo que permite usar una mayor variedad de disolventes si es necesario.

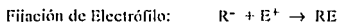
- Como las reacciones electroquímicas se llevan a cabo en la superficie del electrodo, pueden conducir a una estereoselectividad interesante y eventualmente diferente a la observada en fase homogénea.

Los inconvenientes que presenta esta técnica son:

- La electroquímica es una técnica redox de superficie por lo que el rendimiento y velocidad de la reacción está limitado por la difusión de las moléculas al electrodo.

- El dominio de potenciales accesibles está limitado aproximadamente de $\pm 3 \text{ V}$ vs Electrodo Standar de Calomel (ESC). Esto corresponde a una barrera energética de 300 KJ por lo que moléculas electroactivas más allá de estos valores no son detectables.

- La reactividad de los grupos generados implica la competencia de reacciones químicas acopladas como son:



- El material necesario es en primera instancia costoso; celdas, electrodos y membranas provocan el encarecimiento de esta técnica.

- La solución electrolítica debe presentar conducción eléctrica por lo que debe ser capaz de solvatar iones para permitirlo. Por ello la mayor parte de las reacciones se llevan a cabo en disolventes polares.

Con la electroquímica orgánica sintética es posible llevar a cabo las siguientes reacciones:

- Reacciones de transformaciones de grupos funcionales
- Reacciones de adición
- Reacciones de sustitución
- Reacciones de acoplamiento
- Reacciones de apertura
- Reacciones por electrólisis indirecta
- Reacciones de polimerización

La electroquímica orgánica tiene relevancia en el análisis y la síntesis de productos orgánicos, elucidación o confirmación de estructuras, investigaciones sobre catálisis, estudio de intermediarios, la naturaleza del proceso de transferencia de electrones, iniciación de polimerización, síntesis de catalizadores, degradación de substancias, estudio de sistemas redox biológicos, mecanismos de reacción, efecto de solvatación, efecto salino y mucho más.

OBJETIVOS

Participar en el estudio sistemático del género *Salvia* que se realiza en el Instituto de Química de la UNAM.

Aislar, purificar e identificar los metabolitos secundarios de las raíces de *Salvia coulteri*.

Corroborar la clasificación botánica mediante el estudio quimiotaxonómico de la planta.

Llevar a cabo el estudio electroquímico básico necesario para proponer transformaciones a nivel preparativo en productos aislados.

ANTECEDENTES

Con el cúmulo de conocimientos que poseen los químicos que trabajan en el área de productos naturales, se han buscado teorías apropiadas que expliquen y describan las posibles rutas biogénéticas de los productos encontrados en los seres vivos. Un ejemplo notable es la regla del isopreno propuesta por Ruzicka (16). Él observó que los terpenos están constituidos por unidades de isopreno (2-metil 1,3-butadieno) y se unen en un arreglo cabeza cola (17) (Figura 3).

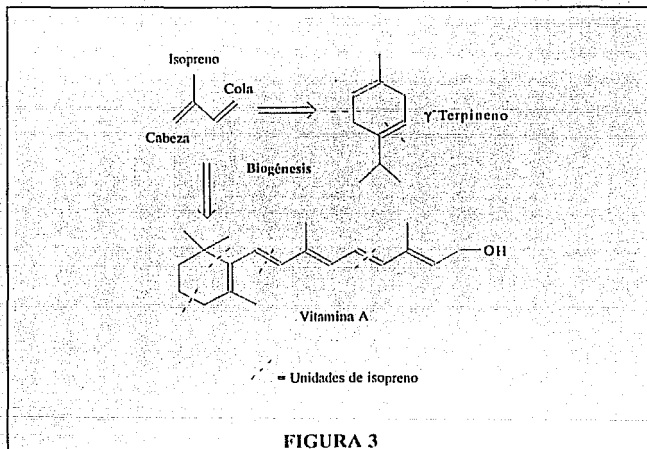


FIGURA 3

El isopreno nunca ha sido encontrado en la naturaleza en forma libre, pero se ha verificado experimentalmente su presencia en productos naturales con la biosíntesis de lanosterol y colesterol empleando marcadores isotópicos de ^{14}C con la siguiente secuencia de síntesis: acetato \rightarrow acetyl-CoA \rightarrow Acetoacetyl-CoA \rightarrow β -Hidroxi β -Metil Glutaril-CoA \rightarrow Acido mevalónico \rightarrow Mevalonil 5-fosfato \rightarrow Mevalonil 5-pirofosfato \rightarrow pirofosfato de isopentenilo (18). Se considera que el pirofosfato de isopentenilo (Figura 4) es la forma activada del isopreno y es éste producto el que tiene suficiente energía para formar las uniones cabeza cola que forman los terpenos (Esquema 1).



Pirofosfato de isopentenilo (IPP)

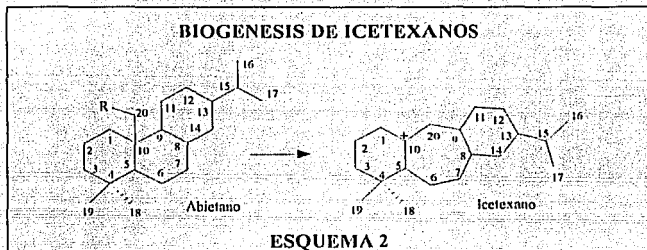
FIGURA 4

Dependiendo del número de unidades de isopreno que contenga un compuesto será el tipo de terpeno. Así tenemos:

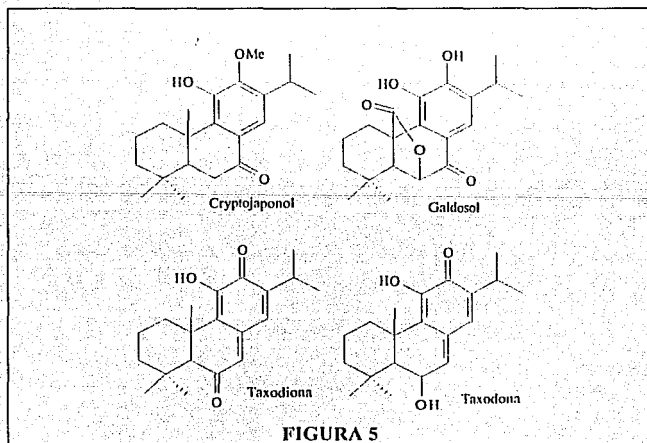
TABLA 1

Nombre	Nº de Carbonos en el esqueleto	Nº de unidades de isopreno
Hemiterpeno	5	1
Monoterpeno	10	2
Sesquiterpeno	15	3
Diterpeno	20	4
Sesterterpeno	25	5
Triterpeno	30	6

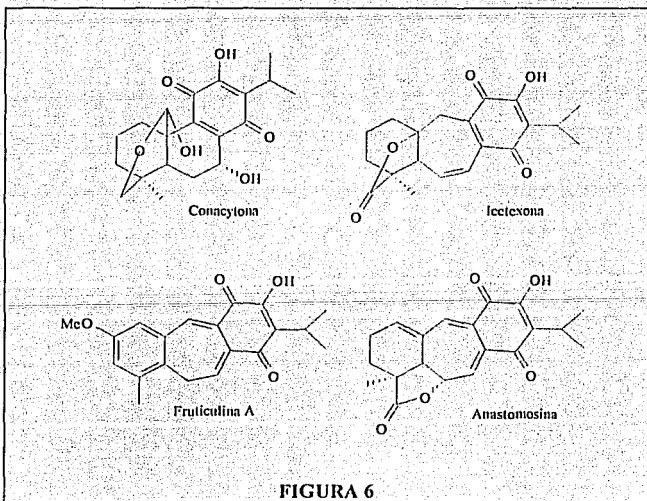
Se ha propuesto la siguiente biosíntesis, vía ácido mevalónico, para los diterpenos encontrados como productos naturales: Abietanos y pimaranos Esquema 1, (19) (20); Ictexanos Esquema 2 (4);



El estudio quimiotaxonómico de las *Salvias* europeas y asiáticas condujo al aislamiento de diterpenos con esqueleto de abietano. La mayoría de los abietanos aislados de estas plantas presentan el anillo C oxidado. En algunos productos este anillo se encuentra como un anillo aromático, con uno o más grupos fenólicos libres o metilados, mientras que otros presentan sistemas *para*-quinona sobre él (4) (Figura 5).



La *Salvia coulteri* pertenece a la familia *Labiatae*, género *Salvia*, subgénero *Calosphaece*, sección *Tomentellae* (9). Los estudios realizados en especies pertenecientes a esta sección, han demostrado que estas tienen como principal característica fitoquímica, la presencia de diterpenos con esqueleto de abietano y abietano transpuesto (9[10-20] *abeo*-abietano), también conocido con el nombre de icetexano. Al igual que los diterpenos abietánicos de las *Salvias* europeas, los de la sección *Tomentellae* tienen el anillo C oxidado y en la mayoría de los productos aislados éste es quinoidico con un sistema de *orto*-hidroxi-*para*-quinona en él (4) (Figura 6).



En la estructura de los productos naturales encontrados dentro de la sección *Toméntellae* existen grupos funcionales electroactivos, los cuales son susceptibles de sufrir una transformación por vía electroquímica. Tal es el caso de las *para*-quinonas, compuestos que sufren reacciones electroquímicas de una manera reversible (21). Para lograr condiciones de reacción en las que el rendimiento de los productos electrogenerados sea cuantitativo, es necesario primero estudiar las propiedades electroactivas del sistema. Este es el campo de la electroquímica analítica.

FUNDAMENTOS DE ELECTROQUIMICA

La electroquímica estudia los fenómenos de transferencia de electrones que ocurren en las interfases electrodo-electrolito de una celda electroquímica. Estas celdas constan de superficies conductoras, por lo regular metálicas, denominadas electrodos y una fase líquida no necesariamente acuosa pero sí conductora llamada electrolito. Si una especie entra en contacto con un electrodo y toma electrones, se reduce y se dice que el electrodo actúa como cátodo; las reacciones que ocurren en él se denominan reacciones catódicas. Por el contrario, si una especie pierde electrones al entrar en contacto con un electrodo, se oxida y se dice que el electrodo actúa como ánodo; las reacciones que ocurren en él se denominan reacciones anódicas. En la práctica para estudiar las reacciones electroquímicas se necesita una celda electroquímica de tres electrodos (Figura 7). El electrodo en el cual se va a llevar a cabo la reacción de interés se denomina electrodo de trabajo y se representa con un círculo al final de una línea. Al electrodo que sirve para cerrar el circuito eléctrico se le conoce como electrodo auxiliar y se le representa con una línea al final de una línea. Dado que nos interesa el proceso que está ocurriendo en el electrodo de trabajo, se mide de manera colateral su potencial respecto a un electrodo de composición conocida y constante como es un electrodo de referencia, el cual se representa con una flecha al final de una línea.

Las reacciones electroquímicas se caracterizan por (22):

a) Son reacciones en sistemas heterogéneos: estas ocurren en una interfase electrodo-electrolito, donde este último puede ser acuoso, no acuoso, gaseoso, sistemas membranales o sales fundidas.

b) Son reacciones fuera del equilibrio: ya que dependen del tiempo, la concentración de las especies que participan en la reacción electroquímica cambian con el tiempo en las cercanías de la interfase.

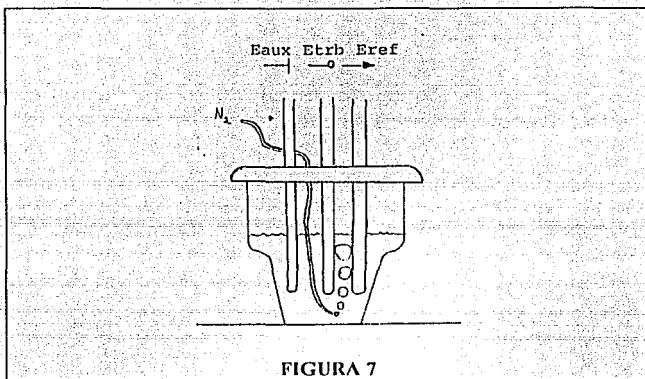


FIGURA 7

c) Son unidireccionales: por haber perturbado el equilibrio con la imposición de un potencial, se está favoreciendo únicamente una dirección de la reacción electroquímica.

d) Son compartimentalizadas: ya que en toda celda electroquímica si en un electrodo se está llevando a cabo una reducción, en otro debe estar ocurriendo una oxidación, por lo que para evitar que se interfieran los productos que se generan en un electrodo con los que se producen en el otro se tienen que separar los electrodos.

En el estudio de las reacciones redox el tipo de perturbación más usado, es el provocado por la imposición de un potencial eléctrico sobre un electrodo con una fuente externa (Potenciostato). La consecuencia de esta perturbación es que tiene lugar una reacción electroquímica la cual genera una corriente de electrólisis. Durante la serie de eventos que ocurren en una experiencia electroquímica, el potencial que registra el potenciómetro y la corriente eléctrica de electrólisis que registra el amperímetro tiene diferentes aportes a la lectura que se detecta externamente:

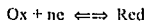
$$\Delta E_{medido} = (E_i + E_j + IR) - E_{Ref.}$$

$$I_{medida} = i_{capacitiva} + i_{migración} + i_{difusión} + i_{convección} + i_{reacc. quim. acoplada} \\ i_{faradáica o de electrólisis}$$

Cuando se impone un potencial lo que se mide en el potenciómetro es la suma del potencial impuesto por el potenciómetro (E_j); el potencial de unión líquida por separaciones semipermeables (E_j) y el potencial de resistencia eléctrica del electrolito ($E=IR$). En la práctica E_j e IR son despreciables si se usan membranas de separación adecuadas o se prescinde de ellas y si se trabaja siempre en soluciones de sales iónicas concentradas (electrolitos soporte) para disminuir la resistencia eléctrica de la solución.

En el caso de la corriente total registrada, puede distinguirse entre la corriente capacitiva ($i_{capacitiva}$) o residual y la corriente faradéica o de electrólisis. La primera obedece al fenómeno inevitable de formación de la doble capa eléctrica en los electrodos, la cual se comporta como un capacitor eléctrico. Esta corriente puede disminuirse a valores despreciables reduciendo la superficie electroactiva del electrodo empleando microelectrodos. El segundo tipo de corriente es la faradéica y es la que tiene relación con la especie electrolizada. En general, esta corriente se ve afectada por tres eventos característicos del sistema en estudio: velocidad de transferencia de electrones entre un electrodo y la especie a electrolizar, velocidad de transferencia de masa de la especie a electrolizar y velocidad de reacción química acoplada a la transferencia de electrones.

Con respecto a la velocidad de transferencia de electrones se puede decir que cuando un sistema se encuentra en su potencial de equilibrio, la velocidad de transferencia de electrones en el proceso de oxidación y reducción es la misma:



Si se perturba este equilibrio imponiendo un potencial diferente al de equilibrio ($E_{1/2}$ aunque no es necesariamente E_{eq}), esta sobretensión (η) provocará que una de las velocidades aumente, lo que provoca que aparezca una corriente de electrólisis que puede ser positiva si la velocidad de oxidación predomina o bien negativa si la de reducción es la predominante. Si la sobretensión aplicada para producir un cambio considerable de corriente es pequeña, entonces se dice que el sistema se comporta como un sistema rápido, por el contrario la imposición de una sobretensión considerable para producir los efectos antes mencionados es característica de los sistemas lentos (Figura 8) (23).

Por lo que respecta a la transferencia de masa puede decirse que ésta se lleva a cabo por diferencias en el potencial químico de las especies y/o por diferencias en el potencial electroquímico. Las formas de transporte de masa al electrodo son por migración iónica, por difusión y por convección.

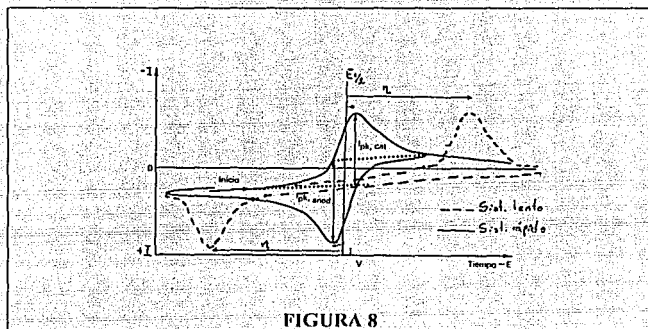


FIGURA 8

La migración iónica es el movimiento de cargas en forma de iones solvatados bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado. Las moléculas neutras no se ven afectadas por este campo. Los iones positivos se dirigen al cátodo y los iones negativos se dirigen al ánodo.

La difusión es el transporte de especies en solución provocado por un gradiente de concentración, el cual provoca un movimiento de materia hacia donde esta está en menor concentración. Este gradiente es formado por la electrotransformación en la interfase del electrodo lo que provoca que la especie electroactiva se mueva del seno de la solución a esta interfase.

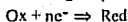
La convección es el movimiento de capas de solución hacia el electrodo por agitación mecánica externa. Este régimen para que sea reproducible debe de ser laminar y constante. Las formas habituales de lograr un régimen convectivo constante y reproducible es por el empleo de electrodos giratorios o por el goteo libre de mercurio.

En la práctica se busca mantener constante el aporte a la corriente proporcionado por los procesos de migración y convección. En el primer caso se logra empleando sales iónicas inertes como soporte del electrolito a utilizarse, y en el segundo caso manteniendo un régimen convectivo constante. De esta manera únicamente la corriente

de difusión es la que se registra como variable dentro del proceso de transferencia de masa.

La transferencia de electrones y la transferencia de masa son procesos inherentes a la reacción electroquímica. La existencia de reacciones químicas acopladas no siempre acompaña a la reacción electroquímica. Estas reacciones pueden ocurrir entre una especie química y la especie a electrolizar o bien entre una especie química y el producto de la reacción electroquímica. Estas reacciones se clasifican de acuerdo al orden de los eventos que ocurren asignando la letra E a la reacción electroquímica y la letra C a la reacción química. La rapidez o reversibilidad de estas reacciones se denota con los subíndices r (reversible o rápida) o i (irreversible o lenta). De las posibles combinaciones sencillas se pueden obtener las principales posibilidades de reacciones químicas acopladas (24,25):

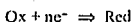
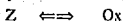
I.- Transferencia de carga rápida simple: E_r



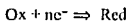
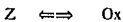
II.- Transferencia de carga lenta: E_i



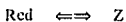
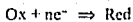
III.- Reacción quím. reversible precedente a una transferencia rápida de electrones: C_rE_r



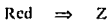
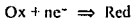
IV.- Reacción química reversible precedente a una transferencia lenta de electrones: C_rE_i



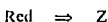
V.- Transferencia de carga rápida precedente a una reacción química reversible: E_rC_r



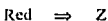
VI.- Transferencia de carga rápida precedente a una reacción química irreversible: E_rC_i



VII.- Transferencia de carga rápida precedente a una reacción química catalítica: E_rC^*



VIII.- Transferencia de carga lenta precedente a una reacción química catalítica: E_iC^*



Si se trabaja con microelectrodos, con electrolitos soporte y con separaciones físicas adecuadas y dentro de un régimen convectivo laminar constante las variables que se presentan dentro del sistema son:

$$\Delta E_{\text{medida}} = E_i - E_{\text{ref}} \quad (\text{Perturbación: variable independiente})$$

$$I_{\text{medida}} = i_{\text{difusión}} + i_{\text{recc. quim. acoplada}} \quad (\text{Respuesta: variable dependiente})$$

Las técnicas electroquímicas basadas en las variables anteriores se conocen como Voltamperométricas y se pueden realizar en dos modalidades: con agitación constante (Voltamperometría en régimen de difusión convectiva) o sin agitar (Voltamperometría en régimen de difusión pura). Los registros que se obtienen se conocen como voltamperogramas (Curvas $I = f(E)$). En general los métodos en RDC son excelentes en estudios de electroanálisis ya que el régimen convectivo es reproducible. Con estos métodos se pueden estudiar reacciones químicas acopladas y obtener información como: estequiometría de compuestos de coordinación, cálculos de constantes químicas etc... Los métodos en RDP son excelentes en el estudio de mecanismos cinéticos, mecanismos de reacción en química orgánica, bioquímica y química de coordinación principalmente gracias a que es posible detectar las especies generadas al electrodo y las etapas en que esto ocurre. Dentro de las técnicas más usuales se encuentran (26) (27) (24):

POLAROGRAFIA CLASICA:

La polarografía es una técnica voltamperométrica que estudia las reacciones electroquímicas que ocurren sobre un electrodo de trabajo de gota de mercurio, el cual fluye libremente a través de un tubo capilar. El electrodo goteante de mercurio presenta ventajas que hacen que sea el más utilizado dentro de las técnicas electroanalíticas:

- Renovación continua de la superficie
- Goteo y condiciones reproducibles
- El depósito de metales no es acumulativo ya que difunden dentro de la gota
- Es un microelectrodo
- El tiempo de goteo es ajustable según las necesidades
- El dominio de electroactividad catódico (reducciones) es muy amplio

Las desventajas y limitaciones de este electrodo son:

- La onda obtenida puede ser irregular por fenómenos de adsorción o cambios en la tensión superficial.
- Se requieren potenciales de barrido muy lentos (< 10 mv/s)
- La sensibilidad depende de la corriente capacitiva y en condiciones adecuadas de trabajo se obtiene del orden de 1×10^{-4} M.
- No es posible distinguir dos ondas si se encuentran a menos de 300 mv
- El dominio de electroactividad anódico (oxidaciones) está limitado por la oxidación del mismo mercurio.

POLAROGRAFIA DIFERENCIAL DE PULSOS

Esta polarografía básicamente tiene las mismas características de la polarografía clásica. La ventaja principal es su mayor sensibilidad, debido a que la corriente que se obtiene es una corriente diferenciada, obtenida de la diferencia entre el valor de la corriente antes y después de aplicar un pulso de potencial.

VOLTAMPEROMETRIA CON ELECTRODOS GIRATORIOS

Gracias a que la convección puede ser utilizada para proporcionar un transporte de masa constante que no dependa del tiempo, el uso de microelectrodos permite obtener información I/E reproducible y controlable. La ventaja del empleo de microelectrodos sólidos giratorios, estriba en el hecho de la gran gama de materiales con que estos pueden ser fabricados (Au, Pt, C) lo que proporciona un control sobre el dominio de electroactividad en que se puede trabajar. Pueden usarse como complemento de la polarografía ya que esta última no puede emplear valores altos de potencial anódico. Su principal desventaja es la limpieza del electrodo ya que fácilmente pueden pasivarse por distintos procesos como son: adsorción de especies en el electrodo, ataque químico y/o electroquímico del electrodo etc..

VOLTAMPEROMETRIA DE BARRIDO TRIANGULAR

Esta técnica se caracteriza por aplicar un barrido de potencial hasta cierto valor e inmediatamente regresar al potencial de inicio todo a una velocidad constante generando un ciclo de potencial. Este tipo de barridos se puede efectuar por un ciclo o por multiciclos. Esta técnica se efectua en régimen de difusión pura. Cuando el potencial regresa y al no haber agitación, las especies producidas al electrodo son una vez más electrolizadas (sistemas reversibles) con lo que tenemos una corriente faradaica de igual magnitud a la de inicio si el sistema es rápido y no hay reacciones químicas acopladas. La determinación de la rapidez de un sistema es relativamente sencillo por esta técnica cuando no hay reacciones químicas acopladas. Pero si las hay, los criterios de Nicholson y Shain (25) (Figura 9) basados en relaciones matemáticas entre el valor de la corriente de los picos observados, entre el valor de los desplazamientos en el potencial de pico, y la velocidad de barrido proporcionan los parámetros para distinguir el tipo de reacción química acoplada que posee nuestro sistema. Las reacciones químicas acopladas más comunes se encuentran previamente descritas (ver pag 20).

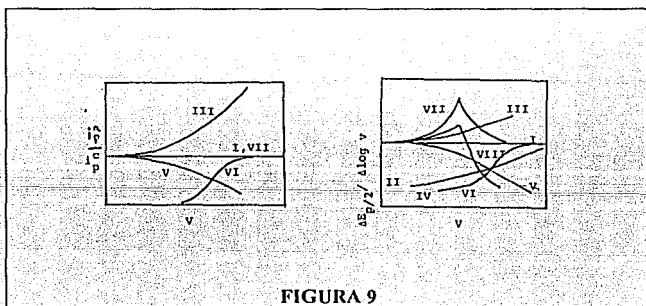
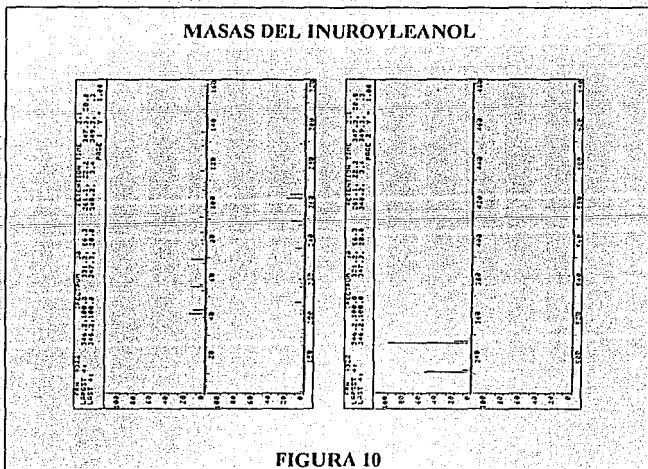


FIGURA 9

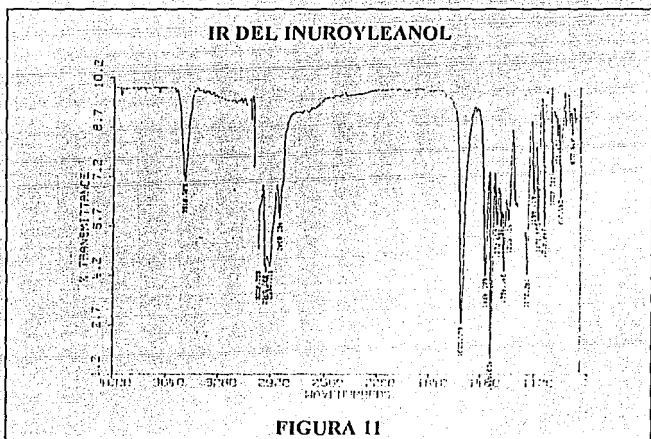
ANALISIS
Y
DISCUSION
DE
RESULTADOS

ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL INUROYLEANOL

De las fracciones cluidas con hexano 100% en la primera columna cromatográfica y mediante recromatografias sucesivas, se logró aislar un producto amarillo (20 mg p.f.°C 180-182), soluble en acetato de etilo, hexano e insoluble en metanol y acetona. El espectro de masas (Figura 10) muestra que el ión molecular se encuentra a m/z 346. Este peso corresponde a una sustancia con una fórmula molecular condensada $C_{21}H_{30}O_4$, el pico base del espectro es el mismo ión molecular. Además se observan las siguientes señales importantes en la fragmentación del producto: 331 ($M^+ - 15$), 289 ($M^+ - iPr$). Las señales a m/z de 263, 261, 249, 235 y 207 corresponden a la fragmentación de los anillos A y B del producto, como se propone en el artículo en que se describe a este producto (28).

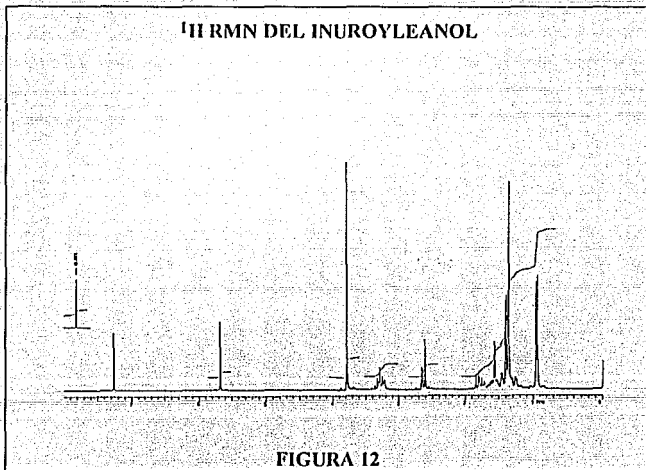


En la figura 11 se muestra el espectro de IR del producto aislado. En el se observan los siguientes grupos funcionales: alcohol (3516 cm^{-1}), carbonilo de cetona benzilica quelatada (1620 cm^{-1}) y metileno α carbonilo benzilico (1415 cm^{-1}).



El espectro de RMN ^1H (Figura 12) y sus asignaciones (Tabla 2) confirman la presencia de los grupos funcionales propuestos en el IR. Están presentes las señales para un fenol quelatado δ 13.36 y fenol no quelatado δ 5.67, ambas señales desaparecen después de equilibrarse con agua deuterada. Una señal característica para un grupo metoxilo aromático (29) se observa en δ 3.78. Se observan las señales características de un grupo isopropilo sobre un anillo aromático. Estos datos apoyan la existencia de un anillo aromático en el producto aislado.

^1H RMN DEL INUROYLEANOL



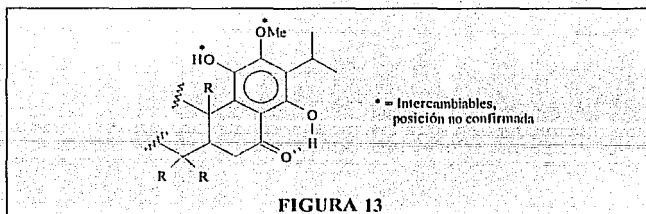
DATOS DE ¹H RMN DEL INUROYLEANOL

TABLA 2

δ PPM	Nº DE H'S	SEÑAL	J HZ	HIDROGENO
13.36	1	s	-	Fenol quelatado
5.67	1	s	-	Fenol
3.78	3	s	-	Metoxilo aromático
3.29	1	7'te	7.2	H-15
3.27	1	dt	J ₁ =J ₂ =14 J ₃ =3	H-1 ec
2.66	1	dd	J ₁ =19.2 J ₂ =4	H-6 ec
2.6	1	dd	J ₁ =19.2 J ₂ =13.2	H-6 ax
1.79	1	dd	J ₁ =13.2 J ₂ =4	H-5 ax
1.38	3	d	7.2	Metilo 16 o 17
1.38	3	d	7.2	Metilo 16 o 17
1.37	3	s	-	Metilo 20
0.95	3	s	-	Metilo 19
0.93	3	s	-	Metilo 18

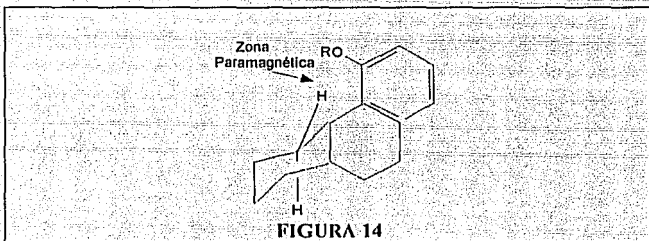
En el espectro de RMN ^1H se observa un sistema ABX en δ 2.66, 2.6 y 1.79, el cual posee constantes de acoplamiento más grandes de lo normal. Un grupo que puede generar este tipo de señales es $-\text{CH}-\text{CH}_2-$ el cual debe estar sin giro libre, esto es, formando parte de un anillo. Para que este sistema genere constantes de acoplamiento tan grandes como las observadas en este producto, el metileno debe estar colocado en posición α a un carbonilo. Normalmente la J_{gem} es de 12-14 Hz pero en este producto es de 19.2, la J_{ax} es de 8-10 Hz y se observa una de 13.2 y por último la $J_{\text{ax-ec}}$ y la $J_{\text{ec-ec}}$ normalmente son de 2-3 Hz y en este producto se observa una de 4 Hz. Estas señales son interacciones características entre los hidrógenos del carbón 6 con el hidrógeno del carbono 5 en un esqueleto de abietano (30). Cada protón interacciona con otros dos hidrógenos y generan señales dobles de doble (dd), pero la forma de estos depende del valor de la constante de acoplamiento.

Con la información disponible y por consideraciones biogénicas y quimiotaxonómicas de la sección a la que pertenece la planta, se propone la siguiente parte del esqueleto del producto (Figura 13)

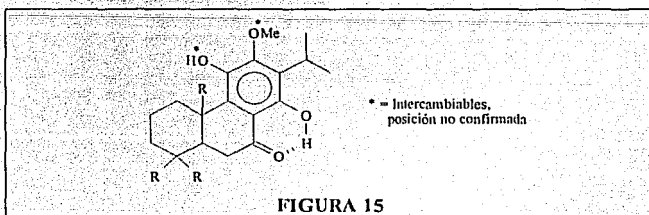


Entre las señales que se observan en el espectro de RMN ^1H existe una señal doble de triples (dt) en δ 3.27 debida a la parte de un sistema ABCD. Esta señal es característica de un hidrógeno que está acoplado con otros tres hidrógenos donde la primera constante de acoplamiento es grande (geminal) y las otras dos son iguales. Un caso como el anterior se encuentra en un diterpeno con esqueleto de abietano para los hidrógenos 1 ec y 3 ec, los cuales pertenecen a un sistema $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ con giro

restringido, esto es, formando parte de un anillo. Ambos tienen un acoplamiento geminal de 14 Hz, un acoplamiento axial-ecuatorial y un ecuatorial ecuatorial de 3 Hz cada uno. El desplazamiento químico de esta señal solo es explicable para el hidrógeno 1 ec, ya que éste se encuentra dentro de la zona paramagnética o de desprotección del anillo aromático, además de la presencia de un oxígeno en C-11 que acentúa este efecto (Figura 14).



Con estas señales se corroboró la existencia del anillo A que forma parte de un esqueleto de abietano (Figura 15).



Quedan por asignar tres metilos (δ 0.95, 0.93 y 1.37) y quedan tres posiciones para completar el esqueleto de abietano por lo que se asignan estos metilos a las posiciones 18, 19 y 20 del esqueleto de abietano.

El espectro de RMN ^{13}C y los experimentos DEPT (Figura 16) confirman la presencia de un carbono de cetona en δ 206.12, seis carbonos sp^2 totalmente sustituidos que corresponden al anillo aromático, tres de ellos soportan oxígenos (δ 126.10, 152.17, 158.24) y los otros tres no (δ 118.38, 138.58, 135.86). En la zona de carbono sp^3 se observan 2 señales para carbono totalmente sustituido (δ 33.40, 40.33), dos metinos (δ 49.64, 26.04), cuatro metilenos (δ 36.45, 19.04, 41.14, 35.88), cinco metilos (δ 20.37, 20.31, 21.55, 33.11, 17.90) y un metoxilo (62.02).

^{13}C RMN DEL INUROYLEANOL

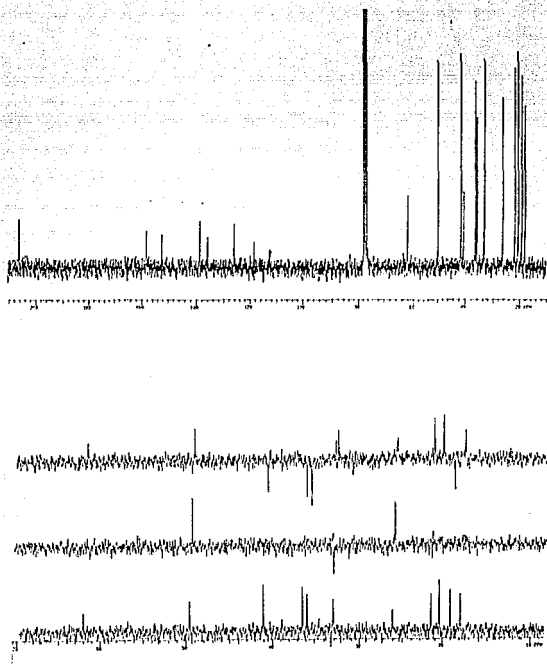


FIGURA 16

La fórmula molecular propuesta concuerda con los datos proporcionados por las espectroscopías y se propone la siguiente estructura para el producto aislado de estas primeras fracciones:

ESTRUCTURA DEL INUROYLEANOL

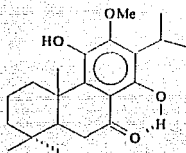
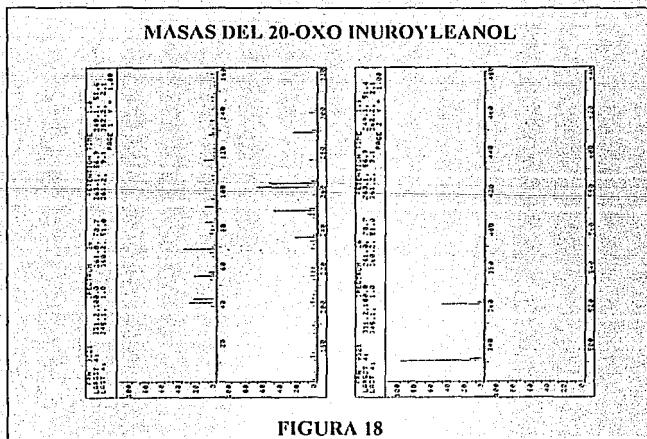


FIGURA 17

Mediante las técnicas espectroscópicas con las que se cuentan, no se pudo confirmar la posición exacta del grupo fenol no quelatado y el -OMe que se encuentran sobre el anillo C aromático, pero se asignó tomando en cuenta que los productos aislados de plantas de la sección *Tomentellae*, en el anillo C presentan orto-hidroxi-para-quinonas (4). La estructura propuesta corresponde con los datos descritos para el inuroyleanol producto descrito en 1975. La posición relativa de los grupos en el anillo C fué demostrada por el producto de oxidación (28).

ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL 20-OXO- INUROYLEANOL

De las fracciones de polaridad 95/5 de hexano/acetato de etilo, se logró aislar mediante recromatografías sucesivas, un producto amarillo, soluble en acetato de etilo, acetona, insoluble en metanol y hexano frío de p.f. de 180-182 °C. El espectro de masas de este producto (Figura 18) presenta el ión molecular a m/z de 360. Este peso molecular corresponde a una fórmula condensada $C_{21}H_{28}O_5$. El pico base se genera por la pérdida de un grupo formilo ($M^+ - 29$) a una m/z de 331. Además resaltan las siguientes señales en el patrón de fragmentación: 345 (-15), 299 (-MeOH), 289 (-iPr), las señales a m/z de 263, 261, 249, 235 y 207, corresponden a la fragmentación del anillo A y B como se propone para el inuroyleanol (28).



El espectro de IR se muestra en la figura 19, donde se observan las señales de los siguientes grupos funcionales: oxhidrilo (3514 cm^{-1}), aldehído ($2728, 1713\text{ cm}^{-1}$), carbonilo bencílico quelatado (1627 cm^{-1}) y metileno α carbonilo bencílico (1416 cm^{-1}).

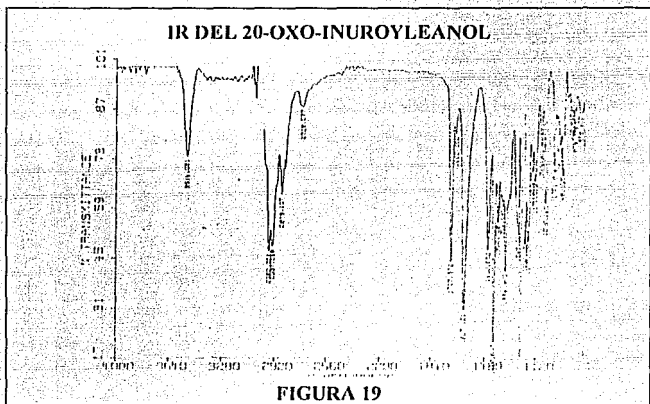


FIGURA 19

El espectro de RMN ^1H (Figura 20) y las asignaciones de éste (Tabla 3) corroboran los grupos funcionales propuestos en la asignación de espectro de IR. Este espectro es muy similar al obtenido para el inuroyleanol. De los datos del espectro de IR se sabe que existe un grupo carbonilo bencílico quelatado. Este grupo podría estar quelatando al protón del fenol que se observa a δ 13.25. La señal a δ 5.88 integra para un hidrógeno y desaparece después de equilibrarse con agua deuterada, por lo que fué asignada a un fenol. La señal en δ 3.8 integra para tres hidrógenos y tiene el desplazamiento químico característico (29) de un grupo metoxilo aromático. De estos datos se dedujo la presencia de un anillo aromático en el producto.

III RMN DEL 20-OXO-INUROYLEANOL

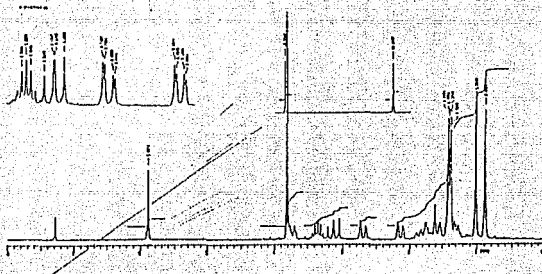


FIGURA 20

DATOS DE ¹H RMN DEL 20-OXO-INUROYLEANOL

TABLA 3

δ PPM	Nº DE H'S	SEÑAL	J HZ	HIDROGENO
13.26	1	s	-	Fenol quelatado
10.09	1	s	-	Aldehido
5.88	1	s	-	Fenol
3.80	3	s	-	Metoxilo aromático
3.71	1	dt	J ₁ =J ₂ =14 J ₃ =3.2	H-1 ec
3.35	1	7'te	7.1	H-15
3.12	1	dd	J ₁ =16.9 J ₂ =13.2	H-6 ax
2.71	1	dd	J ₁ =16.9 J ₂ =3	H-6 ec
2.15	1	dd	J ₁ =13.2 J ₂ =3	H-5 ax
1.39	3	d	7.1	Metilo 16 o 17
1.38	3	d	7.1	Metilo 16 o 17
1.01	3	s	-	Metilo 18
0.88	3	s	-	Metilo 19

Otra posición del anillo aromático la ocupa un grupo isopropilo cuyas señales características (29) se encuentran dadas por un heptuplete que se observa a δ 3.35, desplazamiento químico característico de un protón en posición bencílica y dos señales dobles (δ 1.39 y 1.38), esto debido a un posible giro restringido del grupo isopropilo.

Existe una señal fuerte en IR en 1416 cm⁻¹, esta señal es característica de metilenos α carbonilo bencílico. En el espectro de RMN ¹H se observa un sistema ABX en δ 3.12, 2.71 y 2.15, en el cual las constantes de acoplamiento tienen las mismas

características que las que posee el inuroyleanol, por lo que el metileno debe estar colocado en posición α a un carbonilo. Estas señales son acoplamientos característicos entre los hidrógenos del metileno 6 con el hidrógeno del carbono 5 en un esqueleto de abietano (30).

Entre las señales que se observan en el espectro de RMN ^1H existe una señal doble de triples (dt) en δ 3.71 debida a la parte de un sistema ABCD. Esta señal se encuentra también en el inuroyleanol y como se mencionó pertenece al hidrógeno 1 ec, pero se observa a 0.44 ppm a campo más bajo en este producto debido a la desprotección del carbonilo del aldehído que hay en 20, además de que este se encuentra dentro de la zona paramagnética o de desprotección del anillo aromático, afectado además por la presencia de un oxígeno en C-11 (Figura 14).

Hasta estos momentos los datos que se tienen son los mismos a los proporcionados por el inuroyleanol. La única diferencia que se observa en el espectro de RMN ^1H , es la presencia de una señal del protón del grupo aldehído (δ 10.09) en lugar de un metilo.

^{13}C RMN DEL 20-OXO-INUROYLEANOL

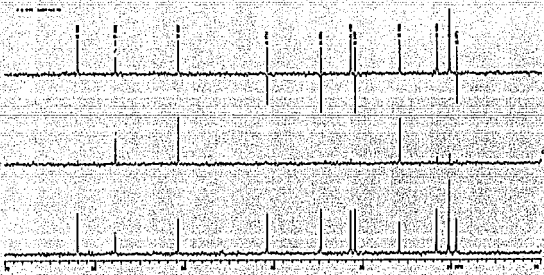
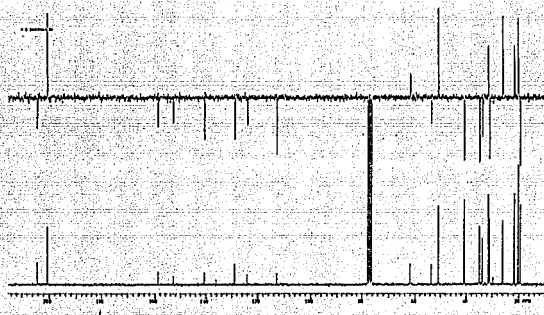
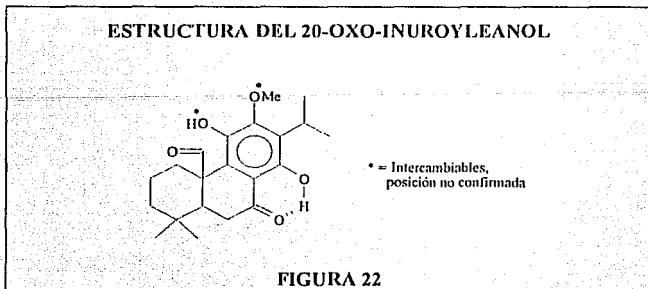


FIGURA 21

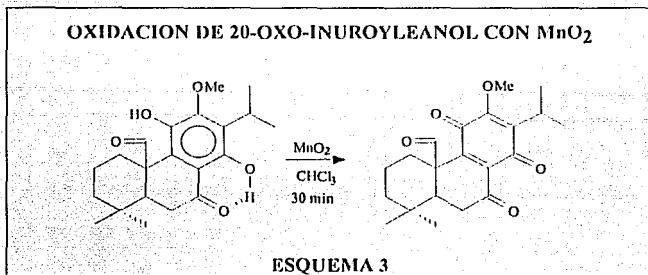
Faltan por asignar los dos grupos metilo que se observan a δ 1.01 y 0.88 y el grupo aldehído observado a δ 10.09. Este grupo aldehído podría asignarse sobre C-10 o sobre C-4 ya sea en posición α o β . Por comparación del desplazamiento químico en RMN ^{13}C del aldehído con un producto descrito (30) el cual tiene un aldehído sobre C-4 con orientación β , este último está a 5 ppm a campo más alto que la señal que se observa. Al comparar con la nemorona (31), producto descrito con aldehído en C-20, se observa que tiene el mismo desplazamiento químico en RMN ^1H que el producto que aislado, por lo que se asigna este grupo sobre C-10.

El espectro de RMN ^{13}C y con la ayuda de los experimentos DEPT (Figura 21) se confirma la presencia de un carbono de aldehído en δ 200.57, un carbono de cetona quelatada en δ 204.28, seis carbonos sp^2 totalmente sustituidos (δ 112.88, 140.20, 124.02), tres de ellos soportan oxígenos (δ 128.94, 152.88, 158.84). En la zona de carbonos sp^3 se observan 2 señales para carbonos totalmente sustituido (δ 33.79, 53.61), dos metinos (δ 50.82, 25.99), cuatro metilenos (δ 30.94, 19.42, 40.77, 34.82), cuatro metilos (δ dos en 20.24; 21.68, 31.44) y un metoxilo (δ 60.05). Las asignaciones para cada carbono se encuentran en la tabla 8. La fórmula molecular propuesta concuerda con los datos espectroscópicos y se propone la siguiente estructura para el producto aislado:



Este diterpeno no ha sido descrito en la literatura (39, 40, 41), por lo que se propone el nombre de 20-oxo-inuroyleanol para este producto aislado.

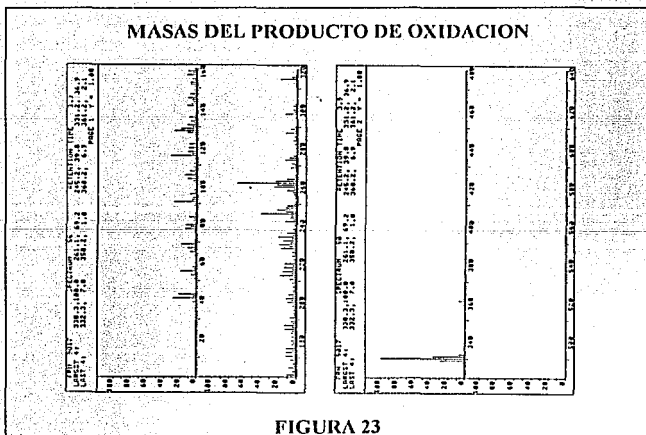
Como se observa en la figura 22 existen dos grupos cuya posición no está confirmada. Para corroborar la propuesta de una *orto*-metoxi-*para*-hidroquinona en el anillo C, se llevó a cabo la oxidación con MnO_2 de este producto para generar su correspondiente *orto*-metoxi-*para*-quinona (Esquema 3) (ver parte experimental).



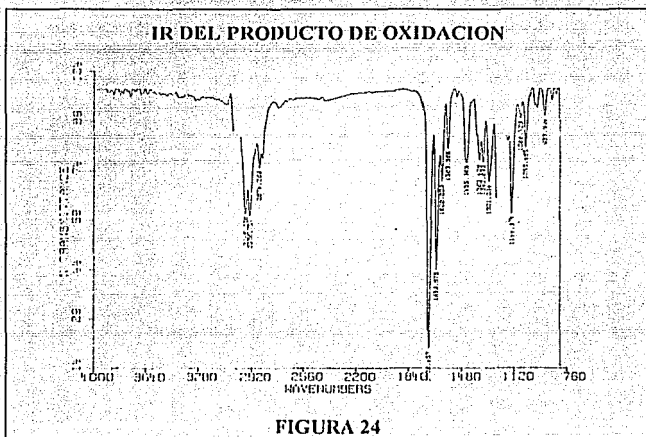
Como la reacción se llevó a cabo, se concluye que la estructura del producto oxidado es la *orto*-metoxi-*para*-quinona del 20-oxo-inuroyleanol, estructura posteriormente confirmada por estudios espectroscópicos. Por lo tanto la estructura propuesta para el 20-oxo-inuroyleanol es correcta.

CORROBORACION DE LA ESTRUCTURA DEL PRODUCTO DE OXIDACION DEL 20-OXO- INUROYLEANOL

Este producto se obtuvo como resultado de la oxidación del 20-oxo-inuroyleanol. Se obtuvo un producto naranja (17 mg, p.f. °C 87-90), soluble en acetona, acetato de etilo, insoluble en hexano. El espectro de masas mostrado en la figura 23 presenta el ión molecular a m/z 358. Este peso molecular corresponde a una fórmula condensada $C_{21}H_{26}O_5$. El pico base está dado por la pérdida de un grupo formilo ($M^+ - 29$) y se encuentra a m/z 329. El peso molecular concuerda con la oxidación del producto de materia prima mediante la pérdida de dos hidrógenos. Destacan los siguientes fragmentos en el espectro de masas a m/z: 330, 319, 261 y 245.



El espectro de IR del producto de oxidación se muestra en la figura 24 y se observan los siguientes grupos funcionales: Aldehído ($2728, 1708 \text{ cm}^{-1}$), carbonilo de quinona (1659 cm^{-1}). Al comparar este espectro con el del 20-oxo-inuroyleanol, se observa la pérdida de las señales de fenoles y la aparición de una señal perteneciente a una 1,4 quinona.



En el espectro de RMN ^1H (Figura 25) se observa la pérdida de las dos señales de fenol que se tenían en la materia prima. Las otras señales se conservan aunque su desplazamiento químico varía ligeramente dado que se ha llevado a cabo una transformación química en la molécula lo que modifica el ambiente magnético de ésta. El cambio más drástico ($\Delta\delta = 0.79$ a campo alto) se da en el hidrógeno 1 ecuatorial, el cual queda inmerso en la zona de desprotección paramagnética del anillo C (ver figura 14). En este producto tenemos un anillo quinonoido en lugar de un anillo benzénico, este último tiene una corriente anular más fuerte y por lo tanto el efecto paramagnético es mayor. Las asignaciones para estas señales se dan en la tabla 4.

RMN ¹H DEL PRODUCTO OXIDADO

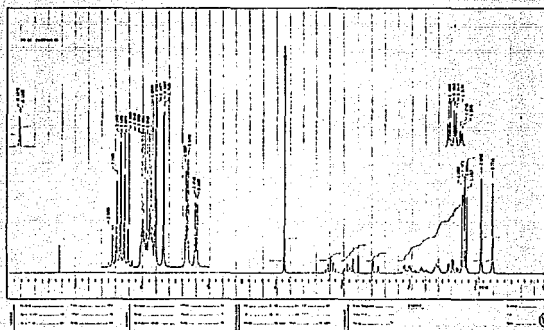


FIGURA 25

DATOS DE RMN ¹H DEL PRODUCTO OXIDADO.

TABLA 4

δ PPM	Nº DE H'S	SEÑAL	J HIZ	HIDROGENO
10.13	1	s	-	Aldehido
3.86	3	s	-	Metoxilo aromático
3.15	1	7' te	7.1	H-15
2.92	1	dt	J ₁ =J ₂ =13.5 J ₃ =3.1	H-1 ec
2.83	1	dd	J ₁ =16.5 J ₂ =1.5	H-6 ax
2.51	1	dd	J ₁ =16.5 J ₂ =3.1	H-6 ec
2.04	1	dd	J ₁ =15 J ₂ =3.1	H-5 ax
1.32	1	td	J ₁ =13.3 J ₂ =J ₃ =4.4	H-1 ax
1.18	3	d	7.1	Metilo 16 o 17
1.14	3	d	7.1	Metilo 16 o 17
0.99	3	s	-	Metilo 18
0.77	3	s	-	Metilo 19

Se observa una señal (δ 1.32) que pertenece a un sistema ABCD que corresponde a un triple de dobles (td) que no se observa en el espectro de la materia prima. Esta señal es asignada al hidrógeno 1 ax, ya que interacciona con tres hidrógenos y debido a que tiene dos acoplamientos grandes de igual magnitud, geminal y axial-axial, los que generan una señal de triplete el que al interactuar con el hidrógeno 2 ec se duplica cada una de las señales generando la señal observada.

¹³C RMN DEL COMPUESTO OXIDADO

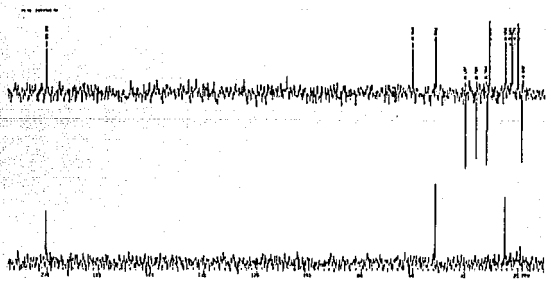
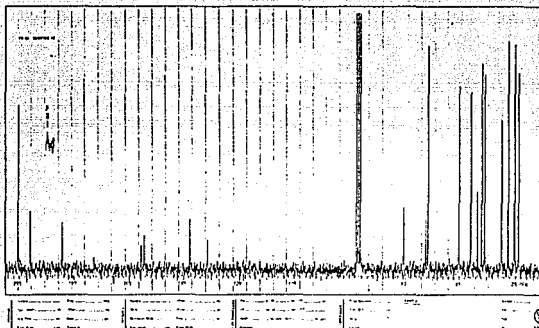


FIGURA 26

El espectro de RMN ^{13}C y los experimentos DEPT (Figura 26) muestran que la señal asignada para el carbonilo de cetona (δ 195.82) presente en el compuesto original ya no está quelatado, ya que se desplaza a campo más alto ($\Delta\delta = 8.46$); dos de las señales de carbón sp^2 sin hidrógenos se desplazan a campo bajo (δ 184.32) y se asignan a los carbonilos formados en la oxidación pertenecientes a la *para*-quinona. Las otras señales en el espectro se conservan. De lo anterior se corrobora que la estructura propuesta para el producto de la oxidación del 20-oxo-inuroyleanol debe de ser una *orto*-metoxi-*para*-quinona (Figura 27) y por lo tanto la estructura propuesta para el nuevo producto (20-oxo-inuroyleanol) es correcta.

ESTRUCTURA DEL COMPUESTO OXIDADO

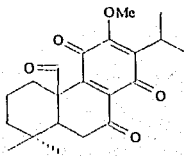
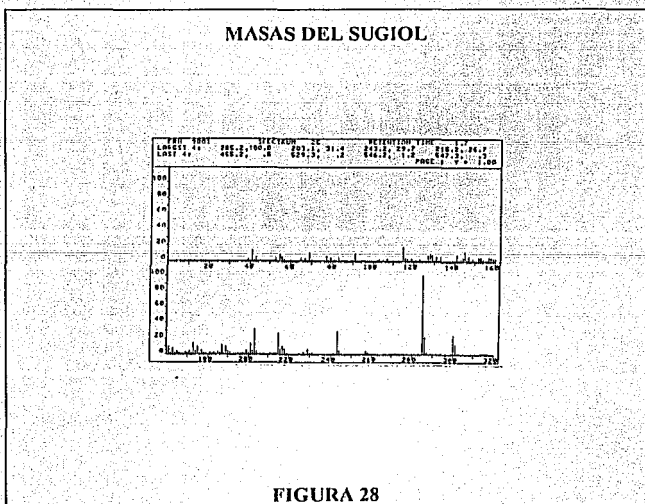


FIGURA 27

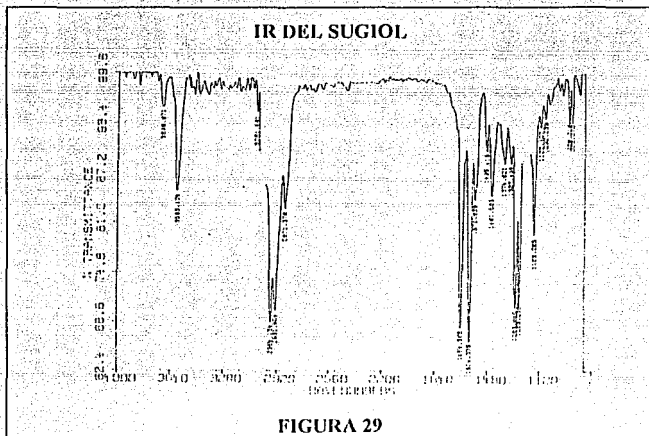
Este producto no se encuentra descrito en la literatura y se le propone el nombre de 7-ceto-12-metoxi-20-oxo-royleanona.

ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL SUGIOL

De las últimas fracciones eluidas con una mezcla de hexano/acetato de etilo 95/5, se logra aislar un producto amarillo claro (5 mg p.f.°C 270-272), soluble en acetona, acetato de etilo e insoluble en hexano. La espectrometría de masas (Figura 28) permite observar el ión molecular a m/z 300, lo que corresponde a una fórmula condensada $C_{20}H_{28}O_2$. El pico base en este caso está dado por la pérdida de un metilo ($M^+ - 15$) y a m/z 285. Además de observar las siguientes señales principales en la fragmentación: 243 (-iPr), 215, y 203.



En la figura 29 se muestra el espectro de IR del producto aislado. Destacan las señales de los siguientes grupos funcionales: alcohol (3593, 3698 cm^{-1}), carbonilo de cetona aromática (1664 cm^{-1}) y de anillo aromático con hidrógenos (1604 cm^{-1}).



El espectro de RMN ^1H (Figura 30) permite observar dos señales simples que se asignan a dos protones aromáticos (δ 7.89, 6.69). Si estos protones se encuentran sobre un anillo aromático deben encontrarse en posición 1-4, para que de esta manera la interacción entre ellos genere un acoplamiento muy pequeño y parezcan singuletes. Se observan la señal de un fenol a δ 5.47, que integra para un hidrógeno el cual después de equilibrarse con agua deuterada desaparece, la de un grupo isopropilo unido a un anillo aromático (δ 3.14, 1.28, 1.26). La presencia de un sistema ABX de las mismas características que los sistemas antes mencionados, se asigna a los protones H-5 y H-6.

RMN ¹H DEL SUGIOL

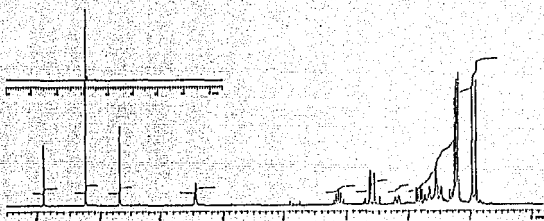


FIGURA 30

DATOS DE RMN ¹H DEL SUGIOL

TABLA 5

δ PPM	Nº DE H'S	SEÑAL	J HZ	HIDROGENO
7.89	1	s	-	Hidrógeno aromático
6.69	1	s	-	Hidrógeno aromático
5.47	1	s	-	Fenol
3.14	1	7'te	6.8	H-15
2.73	1	dd	J ₁ =17.6 J ₂ =4.8	H-6 ec
2.57	1	dd	J ₁ =17.6 J ₂ =11.2	H-6 ax
2.22	1	dt	J ₁ =J ₂ =13.5 J ₃ =3.1	H-1 ec
1.84	1	dd	J ₁ =11.2 J ₂ =4.8	H-5 ax
1.28	3	d	6.8	Metilo 16 o 17
1.26	3	d	6.8	Metilo 16 o 17
1.25	3	s	-	Metilo 20
0.98	3	s	-	Metilo 19
0.92	3	s	-	Metilo 18

Otra señal observable es un dt (δ 2.22). Esta señal se asignó al H-1 cc, el cual se encuentra dentro de la zona de influencia paramagnética del anillo aromático, pero el desplazamiento es muy diferente a los productos antes descritos. En este producto se encuentra a campo más alto que en los otros productos, debido a que el sustituyente de C-11 en el anillo aromático afecta la magnitud del paramagnetismo que sufre el H-1 cc. En los productos anteriores se tenía un fenol o un carbonilo sobre C-11, grupos que aumentan considerablemente el efecto paramagnético, pero en este producto tenemos hidrógeno en este carbono, lo que disminuye considerablemente el efecto paramagnético que sufre el H-1 cc. Las señales mencionadas se observan en los productos anteriores y son características de una sustancia con esqueleto de abietano con el anillo C aromático. De esta manera la única forma de colocar a los hidrógenos aromáticos en posición 1-4 es colocarlos sobre los carbonos 11 y 14, dejando la posición 12 para el fenol.

El espectro de RMN ^{13}C y con los experimentos DEPT (Figura 31) se confirma la presencia de un carbono de cetona aromática no quelatada en δ 198.58 y por eso es que muestra un desplazamiento de 10 ppm a campo alto con respecto a la cetona presente en los otros dos productos descritos; seis carbonos sp^2 dos con hidrógenos (δ 109.66, 126.29) tres sin hidrógenos (δ 123.88, 156.25, 133.027) y uno de ellos soportando oxígeno (δ 159.23). En la zona de carbonos sp^3 se observan 2 señales para carbonos sp^3 tetrasustituídos (δ 33.16, 37.73), dos metinos (δ 49.42, 26.59), cuatro metilenos (δ 37.74, 18.81, 41.28, 35.96) y cinco metilos (δ 22.37, 22.23, 21.27, 32.48, 23.10).

^{13}C RMN DEL SUGIOL

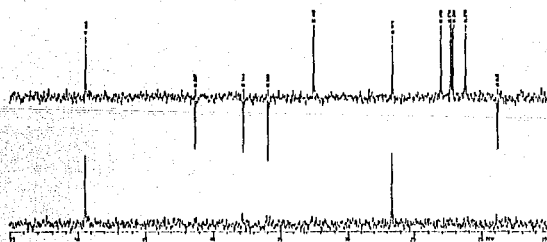
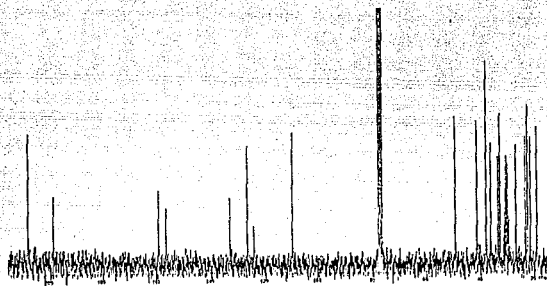


FIGURA 31

La fórmula molecular propuesta concuerda con los datos proporcionados por las espectroscopias y la estructura propuesta para el producto aislado de las fracciones mencionadas se muestra en la figura 32. Este producto se encuentra descrito en la literatura con el nombre de Sugiol (32).

ESTRUCTURA DEL SUGIOL

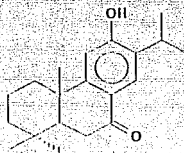


FIGURA 32

ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DE LA COULTIERONA

De las fracciones eluidas con una mezcla 90/10 de hexano/acetato de etilo, se aisló un producto amarillo (47 mg p.f. 185-187 °C), soluble en acetona, metanol e insoluble en hexano. La espectrometría de masas (Figura 33) muestra que el ión molecular se encuentra a m/z 362, que corresponde a una fórmula condensada de $C_{21}H_{30}O_5$. El pico base tiene una m/z 223. La primera pérdida corresponde a una molécula de agua a m/z 344. Además se observan las siguientes señales principales en la fragmentación del producto: 329 (M- H_2O -15), 275.

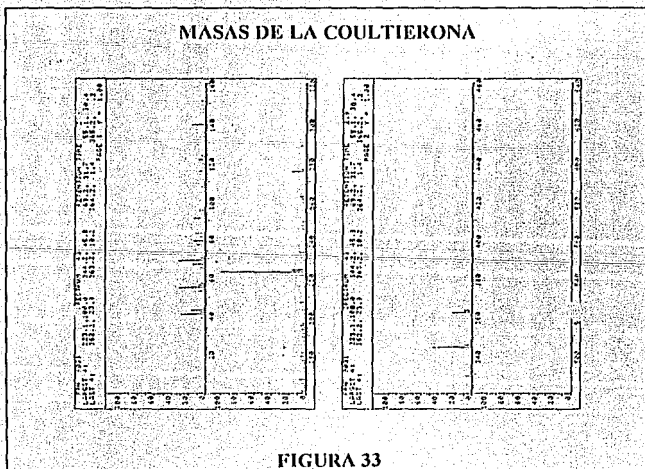
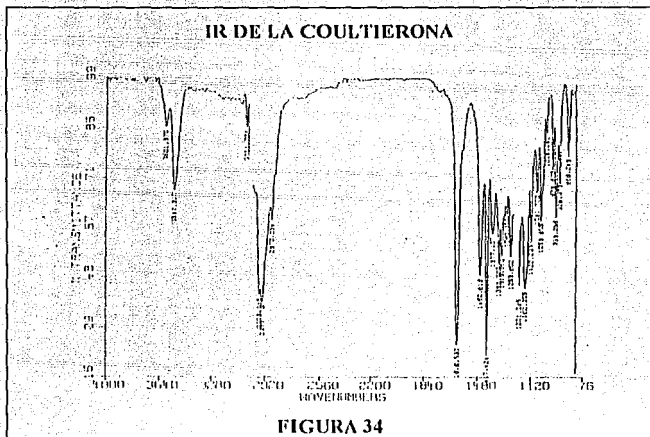


FIGURA 33

La figura 34 muestra el espectro de IR de este producto. Destacan las señales de los siguientes grupos funcionales: oxhidrilo ($3601, 3541 \text{ cm}^{-1}$), carbonilo benzílico quelatado (1616 cm^{-1}), metileno α carbonilo benzílico (1417 cm^{-1}).



El espectro de RMN ^1H se muestra en la figura 35 y sus asignaciones en la tabla 6. En el se pueden observar las señales de un fenol quelatado (δ 12.27), un fenol (δ 5.35) y un alcohol (δ 1.73), estas señales integran para 1 hidrógeno cada una y desaparecen al equilibrarse con agua deuterada. Un metoxilo aromático en δ 3.79 y un grupo isopropilo unido también a un anillo aromático (δ 3.35, 1.41, 1.38). La presencia de un sistema ABX, generado por un grupo $-\text{CH}-\text{CH}_2-$, colocado en la misma posición que en los productos anteriores. El metileno de este sistema debe de estar α carbonilo ya que las constantes de acoplamiento son, al igual que los otros productos, más grandes de lo normal. Esta propuesta se ve apoyada por una señal intensa en el espectro de IR en 1417 cm^{-1} que es generada por un metileno α carbonilo benzílico.

RMN ¹H DE LA COULTIERONA

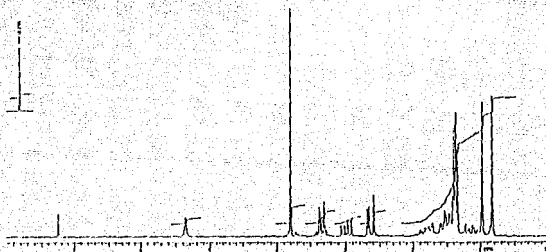


FIGURA 35

DATOS DE RMN ¹H DE LA COULTIERONA

TABLA 6

δ PPM	Nº DE H'S	SEÑAL	J HZ	HIDROGENOS
12.27	1	s	-	Fenol quelatado
5.35	1	s	-	Fenol
3.79	3	s	-	Metoxilo aromático
3.35	1	7' te	6.8	H-15
3.36	1	d	14	H-20 ec
3.01	1	dd	J ₁ =18.4 J ₂ =10.2	H-6 ax
2.63	1	d	J ₁ =18.4 J ₂ =0	H-6 ec
2.62	1	d	14	H-20 ax
1.55	1	d	J ₁ =10.2 J ₂ =0	H-5 ax
1.87	1	dt	J ₁ =J ₂ =14.8 J ₃ =4.2	H-1 ec
1.73	1	s	-	Alcohol
1.41	3	d	6.8	Metilo 16 o 17
1.38	3	d	6.8	Metilo 16 o 17
1.19	1	td	J ₁ =14.7 J ₂ =J ₃ =4.2	H-1 ax
0.97	3	s	-	Metilo 19
0.82	3	s	-	Metilo 18

Otra señal observable es un dt (δ 1.87) que forma parte de un sistema ABCD y que pertenece a el H-1 cc. Esta señal también se encuentra en los productos anteriores y como se mencionó, forma parte de un anillo. Además un td (δ 1.19) el cual pertenece al hidrógeno axial del anillo A. Las señales mencionadas, como se observa en los productos anteriores, son características de una sustancia con esqueleto de abietano con el anillo C aromático, pero además de estas se observa un sistema AB en δ 3.36 y 2.62 ($J=14$ Hz). Este sistema se debe a los protones diastereotópicos del metileno 20, que debe formar parte de un anillo y por lo tanto los hidrógenos no son químicamente equivalentes y el ambiente magnético que rodea a cada uno es diferente.

La presencia de un metileno aislado y las señales antes mencionadas son atribuibles a un diterpeno con esqueleto de icetexano (Figura 1). Esta propuesta es apoyada por el desplazamiento químico tan diferente que presenta la señal del dt del H-1 cc. En los productos anteriores se encontraba a $\delta > 3$, en este caso se encuentra por debajo de 2 ppm. Esto es debido a que este hidrógeno ya no está inmerso de la misma manera en la zona de desprotección generada por el anillo aromático y el oxígeno del carbono 11. En un esqueleto de icetexano, la presencia de un anillo de siete miembros en el anillo B aleja el anillo aromático y el oxígeno de C-11 del H-1 cc, con lo que se explica el desplazamiento a campo alto que sufre este hidrógeno en este producto aislado. Este tipo de esqueletos se han encontrado en otras plantas pertenecientes a la sección *Tomentellae* (4).

El espectro de RMN ^{13}C y los experimentos DEPT (Figura 36) confirman la presencia de un carbono de cetona quelatada en δ 210.63 en el que se observa que el quelatamiento es más fuerte ya que se encuentra a 5 ppm a campo bajo del valor en que normalmente lo habíamos encontrado, seis carbonos sp^2 , tres de ellos soportan oxígenos (δ 121.10, 150.10, 157.10) y los otros tres no (δ 116.74, 139.53, 127.43). En la zona de carbonos sp^3 se observan 2 señales para carbono tetrasustituído (δ 33.86, 73.74) donde el último es una función oxigenada, dos metinos (δ 48.88, 26.06), cinco metilenos (δ 38.44, 18.68, 40.65, 40.50, 61.96) cuatro metilos (δ 20.59, 20.36, 21.47, 40.37) y un metoxilo (61.96).

RMN ^{13}C DE LA COULTIERONA

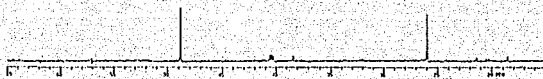
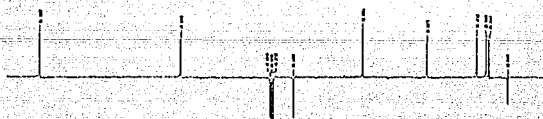
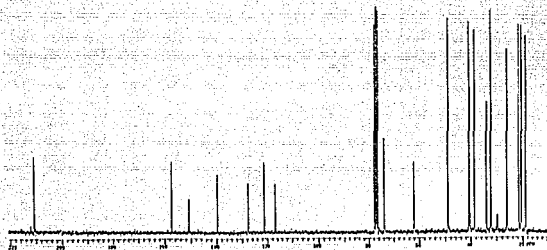
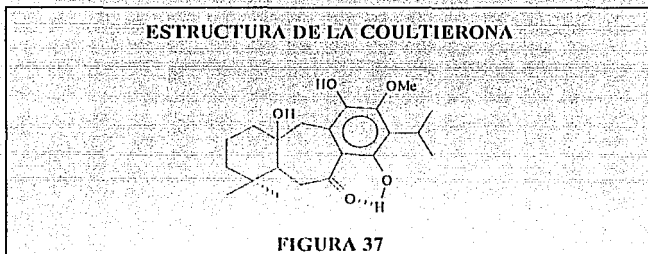


FIGURA 36

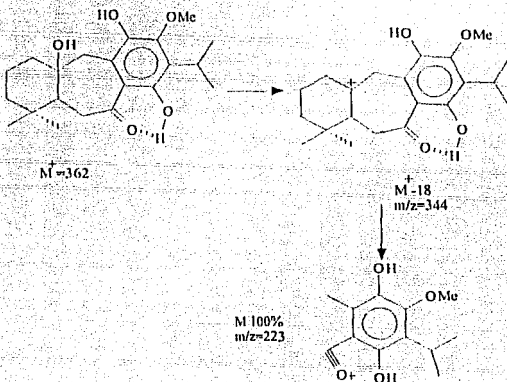
La fórmula molecular propuesta concuerda con los datos proporcionados por las espectroscopias y se propone la siguiente estructura para el producto aislado de las fracciones mencionadas:



Mediante las técnicas espectroscópicas al igual que en los productos antes descritos, no se pudo confirmar la posición exacta del grupo fenol no quelatado y el -OMe que se encuentran sobre el anillo C aromático, pero tomando en cuenta que productos aislados de plantas de la sección *Tomentellae* presentan en el anillo C un sistema *orto*-hidroxi-*para*-quinona (4) y que al llevar a cabo la transformación química del 20-oxo-inuroyleanol, se confirmó la posición de una *orto*-metoxi-*para*-hidroquinona se decidió asignar el fenol sobre C-11 y el metoxilo sobre C-12 como se muestra en la figura 37. Este producto no está descrito y se propone el nombre de coultierona para designarlo.

El pico base del espectro de masas ($m/z=223$) puede generarse por la fragmentación propuesta en un estudio de espectrometría de masas de alta resolución para el inuroyleanol (Esquema 4) (28).

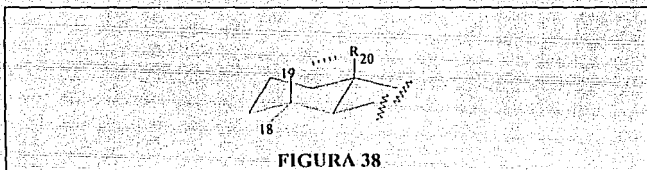
FRAGMENTACION DE LA COULTIERONA PARA GENERAR EL PICO BASE DEL ESPECTRO DE MASAS



ESQUEMA 4

Al comparar los espectros de RMN de ^1H del 20-oxo-inuroyleanol, inuroyleanol y la coultierona, se observa que la señal del metilo-19 cambia su desplazamiento químico dependiendo del grupo funcional que exista sobre C-10. Para poder justificar este cambio en el desplazamiento químico, se puede pensar en la disposición de los metilos en estos productos (Figura 38). Se observa que el metilo 19 tiene una relación 1,3 diaxial con el carbono 20 de tal manera que el sustituyente de este último afecta el ambiente magnético de los hidrógenos del metilo. El 20-oxo-inuroyleanol, tiene un grupo carbonilo en C-20 que se encuentra orientado de tal manera que presenta la zona diamagnética de frente al metilo 19, lo que protege fuertemente a los hidrógenos del metilo 19 que tienen un desplazamiento químico de 0.88 ppm. Esto se hace evidente al observar el producto de oxidación del 20-oxo-inuroyleanol, que tiene la señal del protón

del aldehído como un doble, que se encuentra acoplado a larga distancia con H-1 ax. El inuroyleanol tiene un metilo sobre C-10 y los hidrógenos del metilo 19 tienen un desplazamiento de 0.93 ppm. De esta manera corroboramos el efecto que tiene el sustituyente en C-10 para el desplazamiento químico del metilo 19.

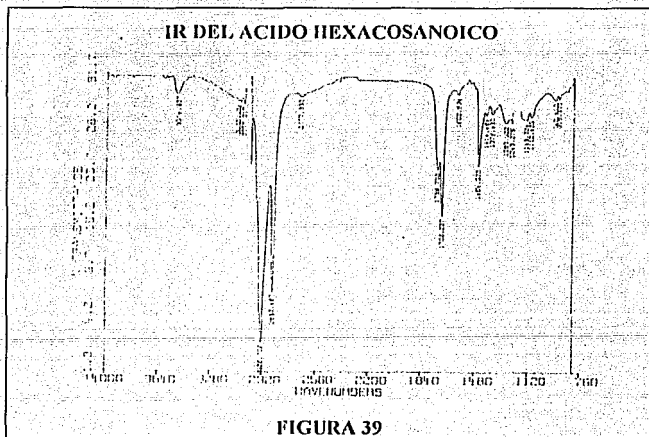


Para asignar la estereoquímica del alcohol terciario que soporta el carbono-10 en el producto aislado, se comparó con los datos descritos para un icetexano que también tiene alcohol sobre carbono-10 (salvicanol) (33) pero la estereoquímica de éste no se encuentra asignada. En un trabajo posterior (34) se describe que la estereoquímica del oxhidrilo sobre C-10 es β mediante un estudio de difracción de rayos X. El ambiente magnético que posee el metilo 19 se propone que sea el mismo en ambos productos por lo que son válidas las comparaciones entre estos dos productos. Como se observa en la figura 38, el grupo funcional que se encuentre sobre el carbono 10 afecta el desplazamiento químico del metilo 19. Este metilo en el salvicanol, tiene un desplazamiento químico de 0.92 ppm, mientras que en el compuesto aislado es de 0.97 ppm, por lo que se concluye que el alcohol debe encontrarse en posición β axial como lo ilustra la figura 37.

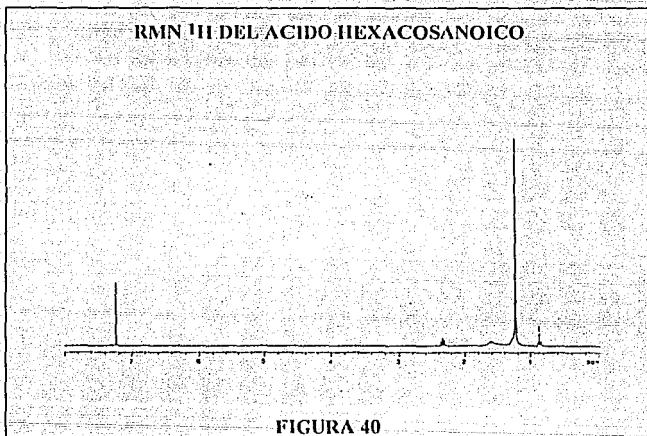
La interacción que se observa entre C-19 y C-20, provoca que C-19 se proteja y su desplazamiento en ^{13}C sea a campo más alto que C-18, lo que permite establecer que la fusión del anillo A y B es trans. Se observa además que este tipo de fusión es la misma para todos los diterpenos mencionados, ya que el desplazamiento químico en el espectro de ^{13}C de los metilos 18 y 19 se conserva.

ELUCIDACIÓN DEL ACIDO HEXACOSANOICO

De las últimas fracciones eluidas con hexano/acetato de etilo 95/5, se logró aislar un producto blanco (31 mg p.f. 86-88 °C), soluble en hexano caliente. En el espectro de IR de este producto (Figura 39) se observan los siguientes grupos funcionales: señal ancha del oxhidrilo de ácido, carbonilo de ácido (1710 cm^{-1}) y gran cantidad C-H saturado ($2926, 2853\text{ cm}^{-1}$).



El espectro de RMN ^1H (Figura 40) muestra sólo tres señales: se observa un metilo unido a metileno (δ 0.93) ya que tiene la forma de un triplete; sobresale la señal de una cadena lineal de metilenos en δ 1.25 y por último tenemos la señal en δ 2.8 de un metileno unido por un lado con otro metileno y por el otro con un carbonilo. Estas señales son atribuibles a un ácido graso de cadena lineal.

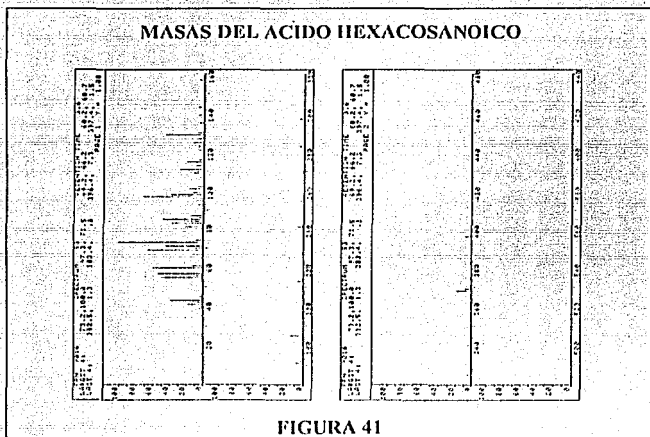


DATOS DE RMN ^1H DEL PRODUCTO P III.

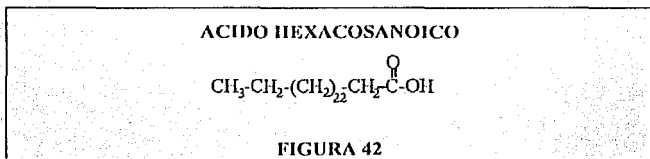
TABLA 7

δ PPM	SEÑAL	HIDROGENO
2.8	t	Metileno α carbonilo de ácido de cadena lineal
1.13	s	Cadena de metilenos
0.93	t	Metilo terminal de la cadena lineal

Con los datos anteriores se propone un ácido graso de cadena lineal, para saber cuantos metilenos tiene se recurrió a la espectrometría de masas (Figura 41).



La espectrometría de masas dió una masa molecular de 396 ua. Se observa una fragmentación donde las pérdidas son de 14 unidades es decir de metilenos. Con los datos espectroscópicos, se concluye que este producto aislado es un ácido graso saturado lineal de 26 carbonos con fórmula molecular $C_{26}H_{52}O_2$ y masa molecular de 396 ua (Figura 42). Este producto se conoce con los nombres de ácido hexacosanoico, cerínico o cerótico (35).



Los diterpenos abietánicos aislados, identificados y obtenidos como productos de reacción de la *Salvia cmlteri* fueron:

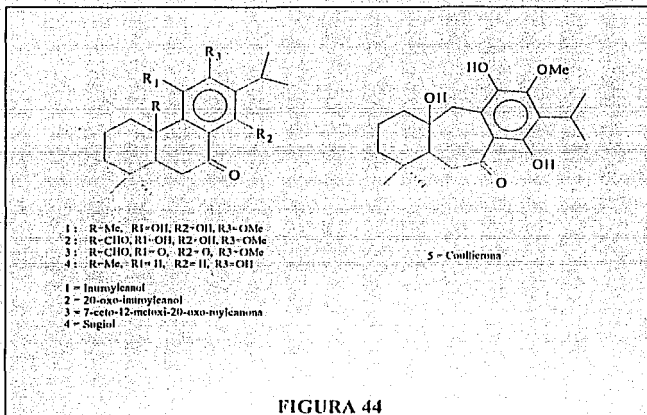


FIGURA 44

Como se mencionó en su momento, se aislaron dos nuevos productos (2 y 5), uno con esqueleto de abietano y otro con esqueleto de icetexano y se generó otro nuevo mediante una reacción química (3). Las asignaciones de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se realizaron con ayuda de los experimentos de HETCOR (Heteronuclear Correlation) y COLOC (Correlation Long Range Coupling), asignaciones de hidrógeno y carbono-13 de productos descritos (36, 37) similares a los que se identificaron y estudios empíricos de desplazamientos químicos para hidrógeno y carbono calculados de tablas (38).

El espectro HETCOR permitió establecer a que señal del espectro de RMN ^{13}C pertenecen las señales que se observan en el espectro de RMN ^1H con lo que se pueden identificar las señales que genera cada uno de los carbonos al correlacionarlos con los hidrógenos que se encuentran sobre él. Las correlaciones observadas en el espectro HETCOR del 20-oxo-inuyleanol (2) (Figura 47) se dan en la tabla 8:

TABLA 8

CARBONO DE, A 8 DE:	CORRELACIONA CON H ^s A 8 DE:
Metileno, 18.92	No es posible asignar la señal
2 Metilos, 20.24	(d) 1.385 y (d) 1.381
Metilo, 21.68	(s) 0.88
Metino, 25.99	(7tc) 3.35
Metileno, 30.94	(dt) 3.71 y (td) 1.31
Metilo, 31.44	(s) 1.01
Metileno, 34.82	(dd) 3.12 y (dd) 2.71
Metileno, 40.77	(dt) 1.85 y otra no asignable
Metino, 50.82	(dd) 2.15
Metilo, 62.05	(s) 3.80

HETCOR DEL 20-OXO-INUROYLEANOL

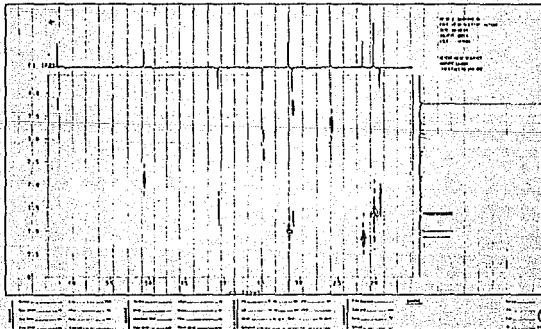


FIGURA 45

El espectro COLOC permitió observar las correlaciones que se dan entre un carbono e hidrógenos alejados hasta tres ligaduras de distancia, lo que permite asignar las señales de carbonos que no tienen hidrógeno sobre él, además de corroborar las propuestas hechas. Esta técnica fue de gran importancia para asignar a los carbonos aromáticos del anillo C dado que estos no poseen hidrógenos, por lo que fueron importantes los acoplamientos que tienen a larga distancia con otros grupos funcionales de la molécula. Las correlaciones a larga distancia observadas en el espectro COLOC para los carbonos sp^2 del 20-oxo-inuroyleanol (2) (Figura 46) se encuentran en la tabla 9:

TABLA 9

CARBONO DE, A δ DE:	CORRELACIONA CON H^s A δ DE:
sp^2 sin H, 112.88	(s) 13.25
sp^2 sin H, 124.02	(s) 5.88
sp^2 sin H, 152.88	(s) 5.88 y (s) 3.80
sp^2 sin H, 128.94	(d) 1.39 y (d) 1.38
sp^2 sin H, 140.15	(s) 5.88
Cetona, 204.28	(dd) 3.12 y (dd) 2.71
Aldhído, 200.57	(td) 1.31

Para el producto de oxidación del 20-oxo-inuroyleanol (3) se tienen las siguientes correlaciones en el espectro de HETCOR (Figura 47, Tabla 10):

TABLA 10

CARBONO DE, A δ DE:	CORRELACIONA CON H ¹ S A δ DE:
Metileno, 18.92	(m) 1.85 y (m) 2.05
2 Metilos, 20.35 y 20.14	(d) 1.18 y (d) 1.14
Metilo, 22.54	(s) 0.77
Metino, 24.93	(7te) 3.15
Metilo, 30.80	(s) 0.99
Metileno, 31.78	(dt) 2.92 y (td) 1.32
Metileno, 35.73	(dd) 2.83 y (dd) 2.51
Metileno, 40.13	(dt) 1.6 y (m) 1.32
Metino, 51.60	(dd) 2.04
Metilo, 62.50	(s) 3.86
Aldehido, 200.28	(s) 10.13

HETCOR DEL PRODUCTO DE OXIDACION

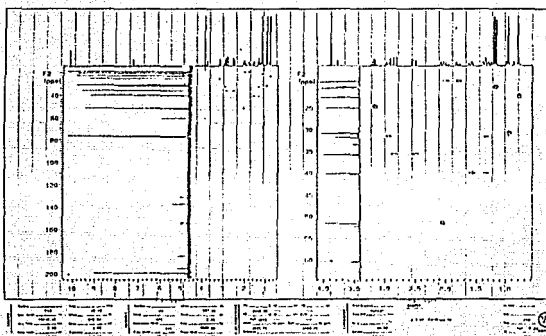


FIGURA 47

Las correlaciones a larga distancia observadas en el espectro de COLOC del producto de oxidación del 20-oxo-inuroyleanol (3) (Figura 48) se dan en la tabla 11:

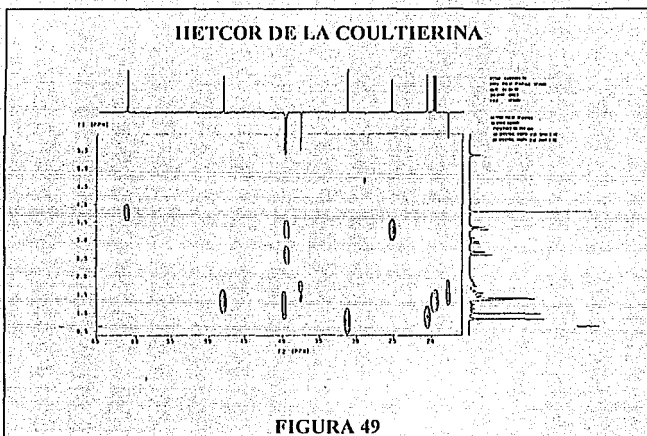
TABLA 11

CARBONO DE, A δ DE:	CORRELACIONA CON H'S A δ DE:
sp2 sin H, 137.58	(d) 1.18 y (d) 1.14
sp2 sin H, 155.44	(s) 3.86
Quinona, 184.32	(7'e) 3.15
Cetona, 195.82	(dd) 2.51

Finalmente para la coultierina (5) se observaron las siguientes correlaciones en el espectro de HETCOR (Figura 49) que se muestran en la tabla 12:

TABLA 12

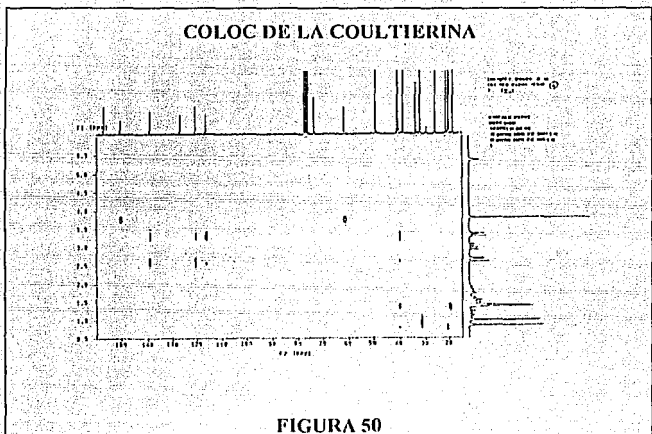
CARBONO DE, A δ DE:	CORRELACIONA CON H'S A δ DE:
Metileno, 18.68 2 Metilos, 20.59 y 20.36	No es posible asignar la señal (d) 1.41 y (d) 1.38
Metilo, 21.47	(s) 0.82
Metino, 26.06	(7te) 3.35
Metilo, 31.09	(s) 0.97
Metileno, 38.44	(dt) 1.87 y (td) 1.19
Metileno, 40.37	(d) 3.36 y (d) 2.62
Metileno, 40.50	No observado
Metileno, 40.65	No es posible asignar la señal
Metino, 48.88	(dd) 1.55
Metilo, 61.96	(s) 3.79



En el espectro de COLOC de la coultierina (5) (Figura 50) se observan las siguientes correlaciones a larga distancia (Tabla 13):

TABLA 13

CARBONO DE, A δ DE:	CORRELACIONA CON H'S A δ DE:
sp2 sin H, 116.74	(d) 3.36, (d) 2.62 (s) 12.27
sp2 sin H, 121.10	(d) 3.36 y (d) 2.62
sp2 sin H, 139.54	(d) 3.36 y (d) 2.62
sp2 sin H, 150.10	(s) 3.79
sp2 sin H, 157.09	(s) 12.27
Cetona, 204.28	(dd) 3.01 y (dd) 1.55



Con los datos proporcionados por estas técnicas espectroscópicas de RMN y tomando en cuenta los trabajos mencionados sobre datos espectroscópicos de los productos con esqueletos de abietanos e icetexanos y cálculos de tablas, también se proponen las asignaciones para los otros dos productos aislados ya descritos, las cuales se resumen en las siguientes tablas (Tabla 14 y 15).

ASIGNACIONES DE LOS CARBONOS DE LOS DITERPENOS
ABIETANICOS AISLADOS DE *SALVIA COULTERI* (Fig. 44)

TABLA 14

Carbón/Comp	1	2	3	4	5
1	36.45	30.94	31.78	37.74	38.44
2	19.04	19.42	18.92	18.81	18.68
3	41.14	40.77	40.13	41.28	40.65
4	33.40	33.79	33.29	33.16	33.86
5	49.64	50.82	51.60	49.42	48.88
6	35.88	34.82	35.73	35.96	40.50
7	206.12	204.28	195.82	198.58	210.63
8	118.38	112.88	137.58	123.88	116.74
9	135.86	124.02	154.16	156.25	121.10
10	40.33	53.61	52.26	37.73	73.74
11	138.58	140.15	184.32	109.66	139.53
12	152.17	152.88	155.44	159.23	150.10
13	126.10	128.94	131.20	133.02	127.43
14	158.24	158.84	184.32	126.29	157.10
15	26.04	25.99	24.93	26.59	26.06
16*	20.37	20.24	20.35	22.37	20.59
17*	20.31	20.24	20.14	22.23	20.36
18	33.11	31.44	30.80	32.48	32.09
19	21.55	21.68	22.54	21.27	21.47
20	17.90	200.57	200.28	23.10	40.37
-OMe	62.02	60.05	60.50	-	61.96

* = valores intercambiables

- = no existente

**ASIGNACIONES DE LOS HIDROGENOS DE LOS DITERPENOS
ABIETANICOS AISLADOS DE *SALVIA COULTERI* (Fig 44)**

TABLA 15

H ¹³ C _{Com}	1	2	3	4	5
1 ec	3.27 (dt) J1=J2=3 J3=14	3.71 (dt) J1=J2=3.2 J3=14	2.92 (dt) J1=J2=3.1 J3=13.5	2.22 (dt) J1=J2=3.1 J3=13.56	1.87 (dt) J1=J2=4.2 J3=14.78
1 ax	1.291 (td) J1=3 J2=J3=14	1.31 (td) J1=3.2 J2=J3=14	1.32 (td) J1=3.1 J2=J3=13.5	+	1.19 (td) J1=4.2 J2=J3=14.7
2	+	+	1.85 (m) ec 2.05 (m) ax	+	+
3 ec	+	1.85 (dt) J1=J2=3.2 J3=14	1.5 (dt) J1=J2=3.1 J3=14	1.8 (dt) J1=J2=3.1 J3=13.56	+
5 ax	2.6 (dd) J1=4 J2=13.2	2.15 (dd) J1=3.0 J2=13.2	2.04 (dd) J1=3.1 J2=14.5	1.84 (dd) J1=4.8 J2=11.2	1.55 (d) J1=0 J2=10.2
6 ec	2.66 (dd) J1=4 J2=19.2	2.71 (dd) J1=3.0 J2=16.9	2.51 (dd) J1=3.1 J2=16.5	2.73 (dd) J1=4.8 J2=17.6	2.63 (d) J1=0 J2=18.4
6 ax	1.79 (dd) J1=13.2 J2=19.2	3.12 (dd) J1=13.2 J2=16.9	2.83 (dd) J1=14.5 J2=16.5	2.57 (dd) J1=11.2 J2=17.6	3.01 (dd) J1=10.2 J2=18.4
15	3.29 (7'ic) J=7.2	3.35 (7'ic) J=7.1	3.15 (7'ic) J=7.1	3.14 (7'ic) J=6.8	3.35 (7'ic) J=6.8
16 *	1.38 (d) J=7.2	1.38 (d) J=7.1	1.18 (d) J=7.1	1.28 (d) J=6.8	1.41 (d) J=6.8
17 *	1.383 (d) J=7.2	1.381 (d) J=7.1	1.14 (d) J=7.1	1.26 (d) J=6.8	1.38 (d) J=6.8
18	0.95 (s)	1.01 (s)	0.99 (s)	0.92 (s)	0.97 (s)
19	0.93 (s)	0.88 (s)	0.77 (s)	0.85 (s)	0.82 (s)
20	1.37 (s)	10.09 (s)	10.13 (d) J=1	1.25 (s)	ax (d) 2.62 J=14; ec (d) 3.36 J=14
-R1	5.67 (s)	5.88 (s)	-	6.69 (s)	5.35 (s)
-R2	13.36 (s)	13.25 (s)	-	7.89 (s)	12.27 (s)
-R3	3.78 (s)	3.80 (s)	3.86 (s)	5.47 (s)	3.79 (s)
-C10-OH	-	-	-	-	1.73 (s)

+ = no observable * = valores intercambiables - = no existente

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Los experimentos de polarografía clásica que se realizaron con la metilconacytona, permitieron obtener las curvas I/E en las cuales se observan dos ondas de reducción, tanto en DMSO (-110 mv, -550 mv) como en EtOH. En este experimento se adicionaron cantidades crecientes de metilconacytona con lo que se obtuvo la relación $I=f(\text{conc})$, lo que permite demostrar que el proceso electroquímico está controlado por la difusión de la metilconacytona al electrodo (Figura 51).

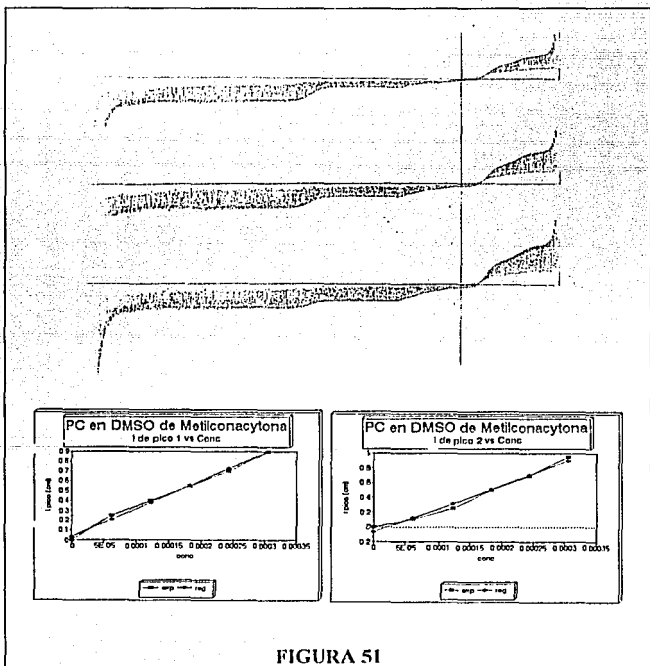
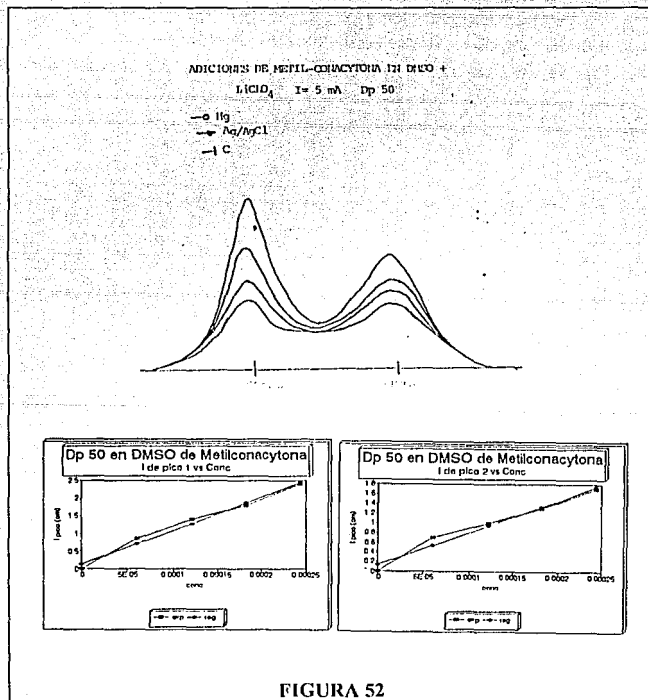


FIGURA 51

El otro experimento de polarografía fue el que se llevó a cabo con la técnica de polarografía diferencial de pulsos. La resolución de esta técnica permite observar con más claridad las fases del proceso de reducción, las cuales se presentan como picos. Se observan dos picos catódicos a un potencial de -110 mv y -550 mv en DMSO y en EtOH cuya altura es función lineal de la cantidad de materia electroactiva en solución (Figura 52).



Con la voltamperometría cíclica se obtuvieron las curvas I/E a diferentes velocidades de barrido. De estos registros (Figura 53) se obtuvo información sobre la reversibilidad del sistema en estudio, así como de las posibles reacciones químicas acopladas. Se observan las dos etapas de reducción de la metilconacytona así como sus respectivas señales de oxidación. El mismo patrón de las señales se observa en electrodo de oro como en el de mercurio. El sistema es reversible pero la segunda etapa de reducción es más rápida que la primera ya que se observa una menor sobretensión entre el pico de reducción y el de oxidación.

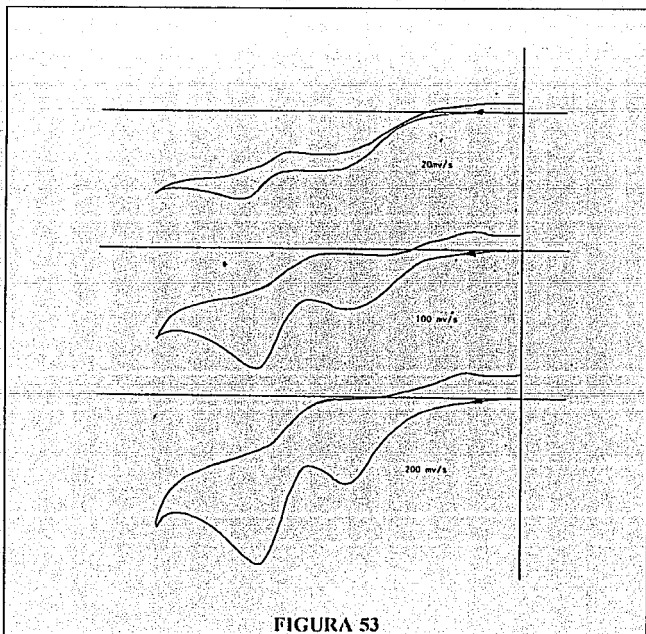


FIGURA 53

Al aplicar los parámetros de Nicholson y Shain (25) para determinar si existe una reacción química acoplada al proceso electroquímico (Figura 9), se observa (Figura 54) el patrón característico de una reacción ErCi (reacc. quím. acop. #VI). La reacción química acoplada puede estar dada por la protonación del producto de reducción de la quinona con otra metilconacytona no reducida como se propone en un trabajo donde se trabajó con la perezona, producto natural aislado de ciertas variedades de *Perezia* (40) que posee el mismo sistema electroquímico de la metilconacytona.

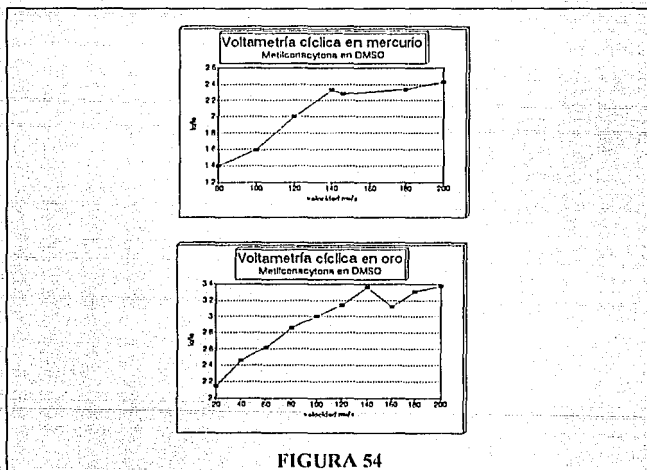


FIGURA 54

En la coulombimetría a corriente impuesta, se observó la desaparición de la señal voltamperométrica (Figura 55) de la metilconacytona. Con la gráfica $Q=f(\text{mol}$ electrolizada) se pudo obtener la cantidad de electrones intercambiados por el sistema, la cual fué de aproximadamente dos. La coloración de la solución pasó de amarillo brillante a un tono morado. La coloración morada de la solución se propone que es dada por la generación de un fenóxido de una metilconacytona no reducida (Figura 67), que pierde el protón al protonar una metilconacytona reducida, y está estabilizado por los iones Li^+ presentes.

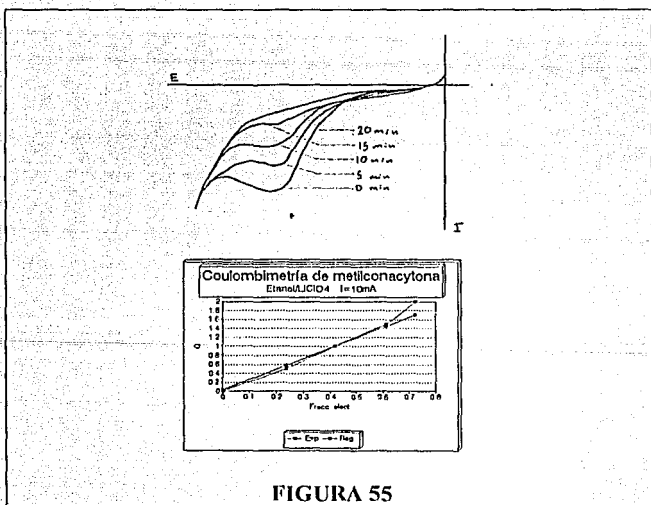
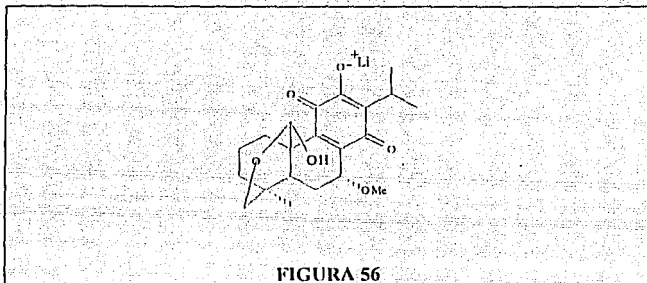
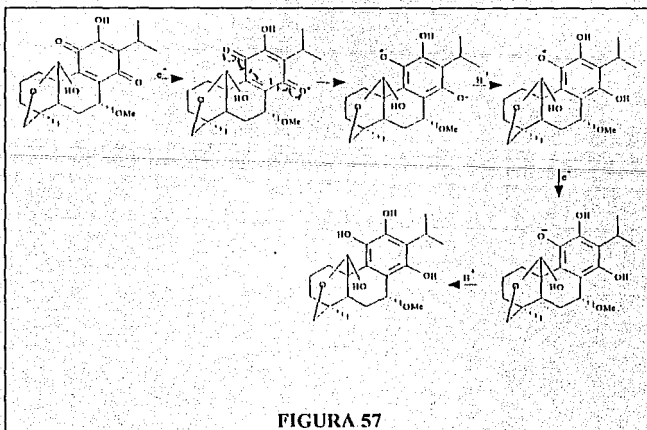


FIGURA 55



Con los datos obtenidos se propone que el grupo funcional que se está reduciendo reversiblemente en la metilconacytona es la para-quinona del anillo C mediante el siguiente mecanismo ErCi (Figura 57).



De los experimentos realizados con la metilconacytona en DMSO y EtOH en electrodo de oro y mercurio se obtuvo la siguiente información:

a) Se observan dos ondas o dos picos de reducción, los cuales son atribuibles a la reducción del sistema para-quinona.

b) El proceso de reducción es reversible, pero la segunda etapa de reducción es un proceso rápido mientras que la primera es un proceso lento.

c) Se demostró con los parámetros de Nicholson y Shain que existe una reacción química acoplada al proceso de reducción, que puede ser la autoprotonación con otra metilconacytona.

d) La metilconacytona se comportó de igual manera en DMSO y EtOH así como en electrodo de oro y mercurio.

e) De los experimentos de coulombimetría a corriente impuesta se mostró que es posible seguir el proceso de macroelectrólisis mediante un sistema voltamperométrico acoplado a la celda.

f) La metilconacytona sufre cambios al realizar una coulombimetría, pero es necesario estabilizar el producto generado para poder aislarlo, ya que al trabajar el producto de la electrólisis, se vuelve a generar la metilconacytona.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El estudio fitoquímico de la *Salvia coulteri* tuvo como resultado el aislamiento de: un ácido graso de cadena lineal C₂₆, β sitosterol y los triterpenos característicos en *Salvias*, ácidos triterpénicos (oleanólico y ursólico), tres diterpenos con esqueleto de abietano uno de los cuales no está descrito en la literatura y un diterpeno con esqueleto de icetexano también nuevo.

Los productos aislados de *Salvia* estudiadas anteriormente de la sección *Tomentellae* tienen en el anillo C un sistema de *orto*-hidroxi-*para*-quinona, en este caso los productos aislados son los primeros de la sección que tienen en el anillo C un sistema de *orto*-metoxi-*para*-hidroquinona los cuales son potencialmente electroactivos.

Como ya se mencionó, dos de los cuatro diterpenos aislados son productos no descritos en la literatura y por lo tanto novedosos. Para el producto 2 se propone el nombre de 20-oxo-inuroyleanol, para el producto de la oxidación de este último 3, se propone el nombre de 7-ceto-12-metoxi-20-oxo-royleanona y para el producto con esqueleto de icetexano 5, se propone llamarlo coultierona.

En base a los metabolitos secundarios aislados, se corrobora la inclusión de la *Salvia coulteri* dentro de la sección *Tomentellae* del subgénero *Caloxphace* del género *Salvia* de la familia *Labiatae*, propuesta por Epling (9).

Este trabajo ayuda al estudio sistemático del género *Salvia* que se está realizando en el Instituto de Química de la UNAM.

En este trabajo se logró establecer la metodología con la que se llevará a cabo el estudio electroquímico de estos y otros productos naturales potencialmente electroactivos.

Se lograron obtener las características electroquímicas principales de la metilconacytona, esta se reduce reversiblemente en dos etapas, con una reacción química acoplada al proceso electroquímico. Para poder aislar el producto de la reducción de la metilconacytona generado por coulombimetría, es necesario trabajar con un agente que pueda estabilizar la *orto*-hidroxi-*para*-hidroquinona que se genera como son MeI o Me₂SO₄.

PERSPECTIVAS

Ya que se conocen las propiedades electroquímicas de la metilconcytona es posible abocarse a aislar el producto de reducción intentando la macroelectrólisis en presencia de distintos agentes metilantes.

Con esta técnica electroquímica, es posible realizar estudios de productos naturales potencialmente electroactivos y con ello proponer y probar rutas alternas de transformación.

PARTE
EXPERIMENTAL

Los equipos empleados para los diversos estudios fueron: para los estudios de Espectroscopía de Infrarrojo (IR) un equipo Nicolet FT-IR 55X; Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ^1H) y Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C) equipos Varian, Gemini 200 y VRX-300S. Los desplazamientos químicos descritos están referidos al TMS para espectros de RMN ^1H y a la línea central del CDCl_3 en 77 ppm para espectros de RMN ^{13}C ; Espectrometría de Masas (EM) un espectrómetro de masas HP Mod. 5985-B CG/MS mediante la técnica de impacto electrónico; Espectrofotometría de Ultravioleta (UV) un equipo Perkin Elmer 552 y Rotación específica (Rotación) un polarímetro Jasco DIP-360; los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher-Johns y no están corregidos.

Para el estudio electroquímico se empleó un sistema electroquímico polarecord 626 Metrohm con el electrodo de mercurio VA stand 663, un electrodo giratorio marca Metrohm 628-10 y un polarógrafo de barrido lineal de fabricación nacional, acoplado a un registrador X-Y Baush & Lomb Spectronic 2000. La coulombimetría a corriente impuesta se llevó a cabo en un coulombímetro Metrohm E-211 con un macroelectrodo de oro de fabricación nacional. Se utilizaron como disolventes DMSO y EtOH marca Baker calidad R.A., los cuales fueron sometidos a un proceso de eliminación de agua (43) y fueron guardados sobre malla molecular 4 Å. Como electrolito soporte se empleó LiClO_4 el cual fué colocado en la estufa a 100°C para eliminar el agua de cristalización.

La muestra de *Salvia coulteri* fué recolectada en noviembre de 1991 de la barranca de Tolantongo, que se encuentra ubicada a 15 minutos de Ixmiquilpan en el estado de Hidalgo (44). Esta muestra se dejó secar al aire y se separaron las partes aéreas de las raíces. Se partió de 360 g de raíces que fueron molidas y colocadas dentro de un matraz erlenmeyer de 3 litros donde se llevaron a cabo las extracciones. Se llevaron a cabo 3 extracciones de la siguiente manera: se vertieron al matraz 1.5 litros de acetona y se dejó macerar por 3 días, posteriormente se filtró y concentró el extracto en un rotavapor. Los extractos de acetona se juntaron, se llevaron a sequedad y se registró el peso del extracto, el cual fué de 6.06 g.

La primera separación se realizó por una cromatografía en columna al vacío (45) en una columna de vidrio de 10 cm de diámetro, empacada con sílica gel Merck 60 G para cromatografía en capa fina. La columna se eluyó con hexano, mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo y de acetato de etilo-metanol. Se tomaron fracciones de 500 ml las cuales se concentraron en un rotavapor.

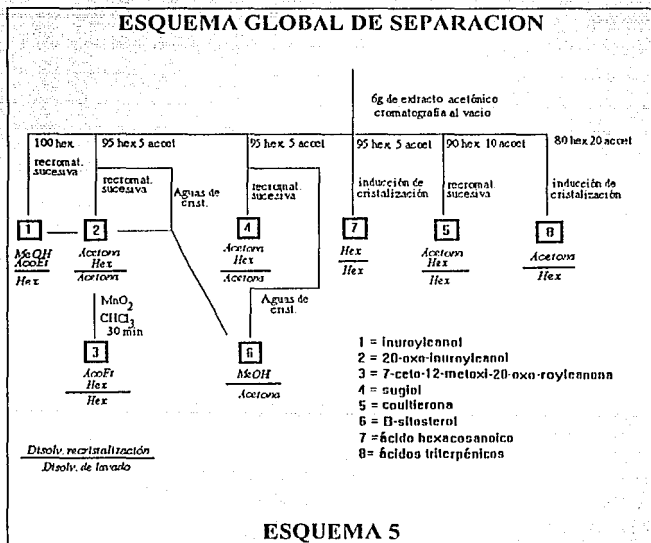
Las separaciones, pureza de los productos y el curso de las reacciones se siguieron mediante placas de cromatografía en capa fina con cromatofolios de sílica gel Macherey-Nagel Alugram Sil G/UV₂₅₄ con un espesor de cama de 0.2 mm. El revelado de estas placas se realizó con luz ultravioleta y una solución de sulfato cérico al 1% en H₂SO₄ 2N.

Las cromatografías relampago y recromatografías sucesivas, se desarrollaron en sílica gel Macherey-Nagel para cromatografía en columna de de malla 230-400, en columnas de vidrio de 1.5 o 1 cm de diámetro (46).

Las cromatografías en capa fina preparativas se desarrollaron en placas preparativas de cromatografía en capa fina Macherey-Nagel Sil-25.

A continuación se muestra el esquema global de la separación de los productos (Esquema 5). En el se muestra la polaridad de que fueron obtenidos, la técnica empleada para purificarlos, la mezcla de disolventes empleados para recrystalizar y lavar, y reacciones químicas para comprobar la estructura de productos aislados.

ESQUEMA GLOBAL DE SEPARACION



INUROYLEANOL:

Este producto fué separado de las fracciones eluidas con hexano 100%, mediante su recromatografía sucesiva, también se obtuvo este producto de la purificación de las primeras fracciones eluidas con una mezcla 95/5 de hexano/acet. El producto es amarillo, es soluble en acetato de etilo, hexano; insoluble en metanol, hexano frío. Punto de fusión 180-182 °C. Se separaron 20 mg que corresponde a 5.55×10^{-3} % del peso seco de la planta.

20-OXO-INUROYLEANOL:

Se obtuvo de las primeras fracciones eluidas con una mezcla hexano/acet 95/5, mediante su recromatografía sucesiva. Presenta las siguientes propiedades: cristales amarillos, soluble en acetona caliente, acetato de etilo, hexano; insoluble en acetona fría, metanol. Punto de fusión 202-205 °C. Rotación $[\alpha]_D^{25} = 65.5$. UV $\lambda_{max}(\epsilon)$: 215 nm (19000), 273 nm (9680), 365 nm (5568). Se separaron 55 mg que corresponden a un 0.0153 % del peso seco de la planta.

PRODUCTO DE OXIDACION DEL 20-OXO-INUROYLEANOL:

La oxidación se llevó a cabo con MnO_2 activo el cual antes de llevar a cabo la oxidación del 20-oxo-inuroyleanol, se sometió a un proceso de eliminación de agua mediante la formación de un azeótropo con benceno en una trampa Dean-Starks para aumentar su actividad (47), se secó durante 30 min en la estufa a 110°C. La actividad del MnO_2 se probó con alcohol bencílico.

20 mg del 20-formil-inuroyleanol se disolvieron en de cloroformo destilado (15 ml), se agregó MnO_2 previamente activado (120 mg) y se agitó magnéticamente. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina hasta la desaparición de la materia prima, lo que ocurrió a los 20 minutos de iniciada la reacción. Se dejó la mezcla de reacción 10 minutos más para permitir que la reacción se completara. Se separó el producto de reacción del MnO_2 por filtración en una columna de celita, lavando con cloroformo destilado. Se obtuvieron 17 mg de producto de reacción (7-ceto-12-metil-20-oxo-royleanona), lo que da un rendimiento del 85 %. El producto obtenido se recrystalizó

de acetato de etilo-hexano. Presenta las siguientes propiedades: Cristales naranjas, soluble en acetona, acetato de etilo, metanol; insoluble en hexano, cloruro de metileno. Punto de fusión 87-90 °C. Rotación $[\alpha]_D^{25} = 4.5$. UV $\lambda_{max}(e)$: 230 nm (19819), 265 nm (7387), 375 nm (2522).

SUGIOL:

Este producto se obtuvo de las fracciones intermedias eluidas con una mezcla hexano/acoet 95/5. Se separó este producto mediante la filtración de los cristales formados en las paredes del frasco que lo contenía y recromatografías sucesivas de las aguas de cristalización. Este producto es amarillo claro, soluble en acetona, acetato de etilo; insoluble en acetona fría, hexano. Punto de fusión 270-272 °C. Se separaron 5 mg que corresponde a un 1.38×10^{-3} % del peso seco de la planta.

β -SITOSTEROL

De las aguas madres del producto anterior y por recromatografías sucesivas se separó este producto. También se obtuvo de la purificación del 20-formil-inuroyleanol. Es un producto blanco brillante, soluble en acetona, hexano; insoluble en metanol. Punto de fusión 120-122 °C. Se separaron 23 mg que corresponden a un 6.38×10^{-3} % del peso seco de la planta.

ACIDO HEXACOSANOICO

Se purificó de las últimas fracciones eluidas con una mezcla hexano/acoet 95/5 mediante la inducción de la cristalización. Posee las siguientes propiedades: agujas blancas, soluble en acetona, hexano caliente; insoluble en hexano frío. Punto de fusión 86-88 °C. Se separaron 31 mg que corresponden a un 8.61×10^{-3} % del peso seco de la planta.

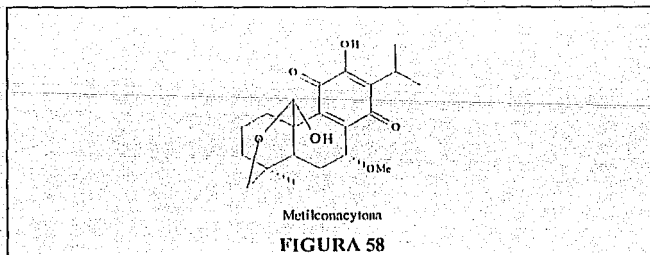
COULTIERONA

Fue obtenido de las fracciones eluidas con una mezcla hexano/acet 90/10 y purificado recromatografias sucesivas. Este producto es amarillo, soluble en acetona, metanol; insoluble en hexano, cloruro de metileno. Punto de fusión 185-188 °C. Rotación $[\alpha]_D^{20} = -16$. UV $\lambda_{max}(\epsilon)$: 203 nm (8259.1), 275 nm (4534.4), 365 nm (1619.5). Se separaron 47 mg que corresponden a un 0.013 % del peso seco de la planta.

ACIDOS TRITERPENICOS (OLEANOLICO Y URSOLICO)

Este producto se separó por inducción de la cristalización de las fracciones eluidas con una mezcla hexano/AcOEt 80/20. Tiene las siguientes propiedades: sólido blanco amorfo, soluble en acetona, metanol; insoluble en hexano. Se separaron 42 mg lo que corresponde a un 0.011% del peso seco de la planta.

La otra parte del trabajo consistió en el desarrollo de la técnica experimental con la que se llevará a cabo el estudio electroquímico de diversos productos naturales potencialmente electroactivos. El producto empleado para montar esta técnica fue la metilconacytona (Figura 69), que se aisló en gran cantidad de *Salvia anastomasans* (30).



La metilconacytona fue recristalizada de acetona antes de comenzar el estudio electroquímico. Con ella se realizaron los siguientes experimentos:

- Polarografía clásica y de pulsos en DMSO y EtOH utilizando como electrolito soporte LiClO_4 con adiciones estandar de metilconacytona para generar las curvas $I=f(\text{conc})$.

- Voltamperometría cíclica en electrodo de oro y mercurio en DMSO y EtOH utilizando como electrolito soporte LiClO_4 a diferentes velocidades de barrido para evidenciar posibles reacciones químicas acopladas a el sistema. Los estudios electroquímicos de polarografía y voltamperometría se llevaron a cabo en una celda como la mostrada en la figura 59.

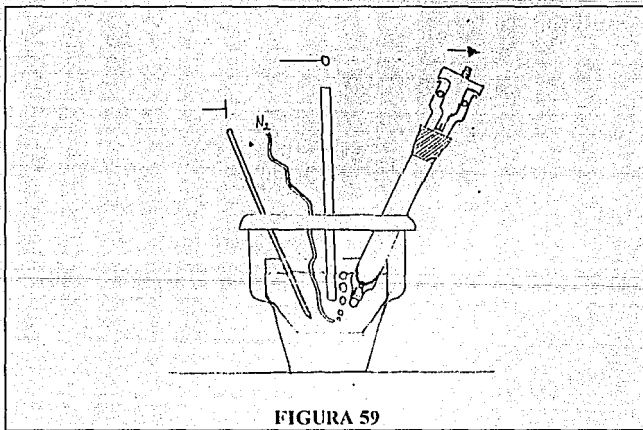
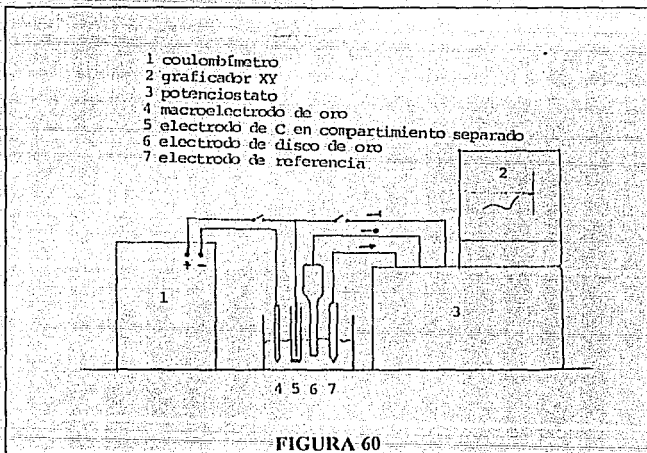


FIGURA 59

- Coulombimetría a corriente impuesta (10 mA) de metilconacytona en concentración 1×10^{-3} M en EtOH-LiClO₄ 0.1M. Este experimento fué monitoreado con un sistema de voltamperometría en regimen de difusión pura acoplado a la celda de coulombimetría (Figura 60).



BIBLIOGRAFIA

- (1) de la Cruz M. Libellus de medicinabus indonum herbis. (Codice Badiano)
Ed. FCE México 1991
- (2) Martínez M. Las plantas medicinales en México
3ª ed. Ed. Batas México (1944)
- (3) Korolkovas A. Compendio Esencial de Química Farmacéutica
1ª ed. Ed. Reverté España (1979)
- (4) Rodríguez-Hahn L. et-al "Diterpenos abietánicos de Salvias mexicanas"
Rev. Latinoamer. Quím. 20, 3 105 (1989)
- (5) Goodman L. S. The Pharmacological Bases of the Therapeutics
6ª ed. Ed. MacMillan Pub. Co. USA (1968)
- (6) Rzedowski J. Vegetación de México
1ª ed. Ed. Limusa México (1983)
- (7) Ramamoorthy T.P. and Lorence D.H.
Adasonia 9, 167 (1987)
- (8) Esquivel B. Estudio químico taxonómico de la sección *Fulgentes*...
Tesis de Maestría UNAM México (1986)
- (9) Epling C.A. Revision of *Salvia* Subgenus *Catosphace*
1ª ed. Ed. Dahlem Vol 110 Verlag Des Repertorium Deutchland (1939)
- (10) Bentham. G.A. *P. de Candolle, Prodr.* 12,27 (1848)
- (11) Geissman T.A. Organic chemistry of secondary plant metabolism
1ª ed. Ed. Freeman Cooper & Co USA (1969)
- (12) Escamilla E. & Rodríguez B. "Two new diterpenoids acetates from *Sideritis Serrata*" *Phytochemistry* 19, 463 (1980)
- (13) Piozzi F. "The diterpenoids of *Teucrium* species"
Heterocycles 15, 2 1489 (1981)
- (14) Camps F. & Cortel A. "Alleochemicals on insects isolated from *Ajuga* plants"
Rev. Latinoamer. Quím. 12, 81 (1981)
- (15) Tallec A. Electrochemie Organique
1ª ed. Ed. Masson France (1985)
- (16) Ruzicka L. " The isoprene rule and biogenesis of terpenic compounds"
Experientia 9, 357 (1953)

- (17) Morrison R.T.& Boyd R.N. Química orgánica
2ª ed Ed Addison-Wesley Iberoamer. México 1986
- (18) Newman A. Chemistry of terpenes and terpenoids
1ª ed. Ed. Academia Press USA (1972)
- (19) Goodwin T.W. & Mercer E.J. Introduction to plant biochemistry
1ª ed. Ed. Pergamon press England (1972)
- (20) Benfold P. Biogenesis of natural products
1ª ed Ed. Pergamon Press England (1963)
- (21) Bard A.J. Encyclopedia of electrochemistry
Ed John Wiley & Sons USA (1980)
- (22) Baeza J.A. Manual de trabajos prácticos de métodos electrométricos
Ed. Facultad de Química UNAM México (1989)
- (23) Charlot G. Tremillon B. Las reacciones electroquímicas
1ª ed Ed. Masson España (1969)
- (24) Bard A.J. Faulkner L.R. Electrochemical Methods: Fundamentals &...
1ª ed. Ed. John Wiley & Sons USA (1980)
- (25) Nicholson R.S. Shain I. "Theory of stationary electrode polarography"
Anal. Chem. 36, 706 (1964)
- (26) Galus Z. Fundamentals of electrochemical analysis
1ª ed. Ed. John Wiley & Sons USA (1976)
- (27) Browing D.R. Métodos electrométricos
1ª ed. Ed. Toray-Masson España (1971)
- (28) Bhat S.V. et-al "Inuroyleanol and 7 Kctoroyleanone two novel diterpenoids"
Tetrahedron, 31, 1001, (1975)
- (29) Silverstein R.M. et-al Spectrometric identification of organic compounds
4ª ed. Ed. John Wiley & Sons USA 1981
- (30) Cárdenas Pérez J. Estudio fitoquímico de Salvia candicans...
Tesis de Maestría U.A.E de Morelos. 1992
- (31) Romanova A. S. et-al "A diterpenoid quinone from Salvia nemorosa"
Khim. Prir. Soedin, 7, 199 (1971)

- (32) Simonsen J. The terpenes
2ª ed Ed. Cambridge University Press Vol III, U.K. 1952
- (33) Fraga B.M. et-al "Diterpenes from the roots of *Salvia canariensis*"
Phytochemistry 25, 269-271, (1986)
- (34) González A. et-al "Diterpenes and diterpene quinones from..."
Phytochemistry 31, 1691, (1992)
- (35) Devon S. Handbook of Naturally Occurring Compounds
Ed. Academic Press N.Y. (1972)
- (36) Atta-Ur-Rahman and Vigar Uddin ¹³C NMR of natural products
Ed. Plenum Press USA (1992)
- (37) Nishida T. Wahlberg I. Enzell C. "Carbon-13 NMR spectra of some..."
Organic Magnetic Resonance 9, No. 4, 1977
- (38) Prestch E. L. et-al Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos Ed. Alhambra España 1980
- (39) Dictionary of organic compounds
5ª ed. Ed. Chapman and Hall N.Y. 1982
- (40) Terpenoids and Steroids, specialist periodic reports
Ed. Royal Society of Chemistry U.K. Vol 1-12
- (41) Natural Products Reports
Ed. Royal Society of Chemistry U.K. Vol 1-9
- (42) González F.J. et-al "The electrochemical reduction of perezone..."
J. Electroanal. Chem. 310 293-303 (1991)
- (43) Perrin D.D. Amarego W.L. Purification of laboratory chemicals
2ª ed. Ed. Pergamon Press (1980)
- (44) Hiriart V. & González M. "Vegetación de la barranca de Tolantongo"
An. Inst. Biolog UNAM 54 Ser. Botánica 1983
- (45) Coll. R. M. *Journal. Natural. Products.* 49, 934 (1986)
- (46) Still, S. H. *Journal of Organic Chemistry* 43, 2923 (1978)
- (47) Goldman I.M. "Activation of manganese dioxide by azeotropic removal..."
Journal of Organic Chemistry 34, 1979 (1969)