



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

ASIGNACION INEQUIVOCA DE LOS ESPECTROS DE RMN DE
 ^1H Y ^{13}C DE
MICANOCRIPTINA, ACIDO GRANDIFLORENICO Y TARAXASTEROL
MEDIANTE LA APLICACION Y DISEÑO DE TECNICAS DE PULSOS
UNI- Y BIDIMENSIONALES.

T E S I S

Que para obtener el Título de
Doctor en Ciencias Químicas
presenta el Químico

RAUL GUILLERMO ENRIQUEZ HABIB

División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.
México, D. F. 1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

2

DIRECCION DE TESIS:
Prof. William F. Reynolds
Asesor Externo.

Dr. Eduardo Diaz Torres
Asesor Interno.



JURADO:
Dr. Alfonso Romo de Vivar
Dra. Lidia Rodríguez Hahn
Dra. Elvira Santos de Flores
Dr. Gustavo García de la Mora
Dr. Eduardo Díaz Torres
Dr. Carlos Rius Alonso
Dr. Antonio Noguez Anaya

AGRADECIMIENTOS.

Las investigaciones que permitieron la elaboración de esta tesis, fueron posibles gracias a apoyo de las dependencias e instituciones que se mencionan a continuación:

División de Biología Molecular, Unidad de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social.

División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

Departamento de Química, Universidad de Toronto, Canadá.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.

National Science and Engineering Research Council, NSERC, Canadá.

RESUMEN

Se estudio la estructura de los compuestos terpenicos de origen natural Micanocriptina (I), acido Grandiflorenico (II) y acetato de Taraxasterol (III) empleando metodos uni- y bidimensionales de rmn y se logro asignar totalmente sus espectros de ^{13}C e ^1H . Las secuencias de pulsos utilizadas incluyen "Inversion Recovery" (empleada en I), DEPT (I, II y III), COSY (I y II), HETCOR (I y II), SFORD (III) e INADEQUATE (III) y en el caso de (II) y (III) se comparo la estructura en disolucion obtenida de las constantes de acoplamiento con la obtenida por difraccion de rayos X. Para la asignacion total del espectro de ^{13}C de (II) se diseño una secuencia de correlacion heteronuclear indirecta usando como base una secuencia propuesta originalmente por R. Richarz et. al.

El experimento bidimensional "INADEQUATE" en combinacion con DEPT, permitio corregir la asignacion de diez de treinta señales de ^{13}C de (III), asignadas originalmente mediante SFORD, por lo que se sugiere el reemplazo de este ultimo. Se discuten las ventajas de utilizar las nuevas tecnicas de la rmn en el estudio de la estructura organica.

ABSTRACT

The structure of the diterpenic compounds from natural origin Mikanokryptin (I), Grandiflorenic acid (II) and Taraxasterol (III) was studied using one- and two-dimensional nmr methods and their ^{13}C and ^1H spectra were fully assigned. Pulse sequences used include Inversion Recovery (with I), DEPT (I, II and III), COSY (I and II), HETCOR (I and II), SFORD (III) and INADEQUATE (III).

For the total assignment of the ^{13}C nmr spectrum of (II), a indirect HETCOR experiment was designed based upon a sequence originally proposed by R. Richarz et. al.

The 2D-INADEQUATE ^{13}C - ^{13}C connectivity experiment in combination with DEPT, allowed the correction of ten out of 30 signals in the ^{13}C nmr spectrum of (III) previously assigned with SFORD and replacement of the latter is suggested. The advantages of introducing the new nmr methods in the study of organic structure is discussed.

C O N T E N I D O

Contenido

Introducción

Objetivos

Capitulo I. La Estructura de la Micanocriptina.

Generalidades Sobre Mikania micrantha.

Definición del Problema Estructural.

Resultados y Discusión

- Asignación de los Desplazamientos Químicos de ^1H .
- Asignación del Espectro de ^{13}C de la Micanocriptina.
- Comparación de la Conformación de la Micanocriptina en Disolución y en Estado Sólido
- Espectro de Correlación Heteronuclear (HETCOR)
- Correlación de Datos de la Estructura Cristalina con J Obtenida del Espectro de RMN de Alta resolución.

Parte Experimental.

Capitulo II. La Estructura del Acido Grandiflorénico.

Generalidades Sobre Montanoa tomentosa.

Estudios Estructurales Previos Sobre el Acido Grandiflorénico.

Resultados y Discusión.

- Experimentos COSY y HETCOR.
- Secuencia de Pulsos.
- Análisis del Espectro de 400 MHz en Cloroformo- d_1 .
- Análisis del Espectro de 400 MHz en Benceno- d_6 .
- Análisis del Espectro COSY de 400 MHz en Cloroformo- d_1 .
- Análisis del Espectro COSY de 400 MHz en Benceno- d_6 .
- Espectros de Correlación Heteronuclear ^{13}C - ^1H Indirecta.
- Descripción del Espectro de Correlación Indirecta en Cloroformo- d_1 .
- Descripción del Espectro de Correlación Indirecta en Benceno- d_6 .

Parte Experimental.

Capitulo III. La Estructura del Taraxasterol.

Generalidades

Resultados y Discusión

- Reasignación del Espectro de ^{13}C del Taraxasterol
- Determinación de la Configuración Relativa y de la Conformación del Fragmento Taraxasterilo por Difracción de Rayos X.
- Discusión.

Parte Experimental.

Conclusiones.

Bibliografía.

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

La resonancia magnética nuclear (rmn) es sin duda la espectroscopía que mayor desarrollo ha alcanzado tanto desde el punto de vista de su aplicabilidad en diferentes campos de la ciencia como por los importantes avances tecnológicos involucrados en la construcción de los espectrometros modernos. Desde las primeras observaciones del fenómeno de rmn en 1945 realizadas independientemente por los grupos encabezados por Edouard Purcell (Harvard) y Felix Bloch (Stanford) hasta la fecha, ambos aspectos del desarrollo de esta espectroscopía, han experimentado avances paralelos y puede preverse que esto seguirá ocurriendo en los próximos años.

En la evolución de la rmn, el paso de los métodos de onda continua a los de pulsos marcó el inicio de una etapa de gran desarrollo. También, la disponibilidad de campos magnéticos poderosos (>3 Tesla) ha contribuido al avance de la rmn con dos importantes mejoras: el aumento de la sensibilidad y de la dispersión espectral. Sin embargo, los espectros de ^1H frecuentemente son complicados como se observa en los tres casos que serán tratados, que muestran diferentes grados de sobreposición de señales aún en 9.3 Tesla (400 MHz para ^1H).

En la rmn de ^{13}C la sobreposición de señales es menos probable gracias a su mayor ventana espectral, pero subsiste el problema de asignarlas inequivocamente. Esto significa que para llevar a cabo una asignación espectral correcta no basta con disponer de campos magnéticos mas intensos. Simultáneamente se necesita disponer de una metodología experimental que permita obtener la información espectral con sensibilidad y selectividad.

Con este fin, se han diseñado secuencias de pulsos para controlar la forma de excitación y evolución del sistema de espines y obtener información espectral selectiva. Como consecuencia, se han perfeccionado los métodos unidimensionales y han aparecido los bidimensionales. El aspecto que hace atractivos a estos últimos es que permiten obtener simultáneamente un espectro de correlación de uno o dos parámetros del sistema de espines.

Las dimensiones estan descritas por un sistema de ejes perpendiculares cuyas escalas contienen un parámetro espectral igual o distinto (desplazamiento químico o acoplamiento). A su vez, las dimensiones pueden contener datos de especies isotópicas iguales o diferentes.

Otro aspecto que debe mencionarse es la constante reducción del tiempo necesario para obtener información espectral selectiva. Al determinar las condiciones óptimas para la realización de un experimento, puede requerirse de algunos ensayos para optimizar la adquisición automática de datos. Estas, una vez establecidas, reducen sustancialmente el tiempo empleado para las determinaciones subsecuentes.

En el estudio original sobre la estructura de Micanocriptina se recurrió a la técnica de difracción de rayos-X para corroborar su estructura química, postulada inicialmente con los datos del espectro de rmn de ^1H en 270 MHz. Sin embargo, se pudo demostrar en este trabajo la posibilidad de llevar a cabo la elucidación estructural completa con técnicas modernas uni- y bidimensionales de rmn.

La técnica de "recuperación de la inversión" se aplicó en el estudio de la Micanocriptina para diferenciar las señales de hidrógenos con desplazamientos químicos muy similares o idénticos. Esta secuencia unidimensional normalmente se emplea para determinar el tiempo de relajación (T_1), pero en este trabajo fue utilizada para separar totalmente señales de ^1H con el mismo desplazamiento químico. Otros métodos como este, escapan a la obsolescencia y forman parte del acopio de los procedimientos de la rmn moderna.

Entre los experimentos unidimensionales que han iniciado su consolidación como un requisito previo en el estudio de una estructura orgánica se encuentran APT ("Attached Proton Test") y DEPT ("Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer"). Mediante ellos se puede conocer con rapidez y precisión el número y tipo de átomos de carbono (C, CH, CH_2 y CH_3).

En los experimentos "clásicos", para hacer este tipo de asignación comúnmente se procede a desacoplar parcialmente los hidrógenos, reduciendo la constante de acoplamiento $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ i.e. SFORD ("Single Frequency Off-Resonance Decoupling"). El resultado es un espectro de ^{13}C cuyo acoplamiento con el ^1H disminuye, pero que contiene todavía todas las líneas del espectro acoplado. Como consecuencia, cuando se aplica este procedimiento en una región espectral muy congestionada, la probabilidad de error es grande. Tal fue el caso del espectro de ^{13}C de taraxasterol, que contenía diez señales asignadas incorrectamente mediante la técnica SFORD y que fueron corregidas en este estudio con el uso combinado de DEPT e INADEQUATE ("Incredible Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment").

La conectividad $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ directa (un enlace) o indirecta (dos o tres enlaces) en moléculas orgánicas se puede conocer recurriendo a experimentos de correlación heteroescalar ("HETCOR", HETeroscalar CORrelated spectroscopy). El espectro bidimensional de correlación directa contiene los desplazamientos químicos de ^{13}C e ^1H en cada una de las dimensiones y proporciona una forma segura de asignación de los desplazamientos químicos de los hidrógenos que se encuentran unidos a cada carbono. HETCOR permite conocer el desplazamiento químico de los hidrógenos que se encuentran a dos y tres enlaces de distancia de un carbono. Esta secuencia se aplicó en el estudio de Micanocriptina y del Acido Grandiflorénico. Para este último, se diseñó una secuencia de correlación novedosa para observar la conectividad $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ a dos y tres enlaces de distancia, mediante la transferencia de magnetización acumulada en los hidrógenos de los grupos metilo a los carbonos correspondientes.

La secuencia de correlación homonuclear $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ("COSY", CORrelated Spectroscopy) fue utilizada en el estudio de la estructura de Micanocriptina y del ácido Grandiflorénico permitiendo la observación de conectividades de tipo gemelo, vecinal y de larga distancia. COSY es un experimento cuyo nombre en inglés significa "cómodo, acogedor, cálido". Su advenimiento ha sido de gran utilidad por su potencial para conocer en una sola determinación, todos los acoplamientos homonucleares. En la forma "clásica", esta determinación requiere de desacoplamientos sucesivos en una frecuencia particular del espectro y la observación de la parte espectral restante. Ello implica un gran consumo de tiempo y puede mantener incertidumbres si la modificación espectral resultante no es clara. Como contraparte, el experimento COSY es eficiente para determinar simultáneamente y con buena sensibilidad todos los acoplamientos homonucleares. Sin embargo, cuando existen señales con desplazamientos químicos muy similares, el espectro COSY puede tener incertidumbres aún cuando se utilicen campos magnéticos grandes. Para atenuar este problema, se puede recurrir al cambio de disolvente para aprovechar efectos anisotrópicos y modificar los desplazamientos químicos de algunos hidrógenos. Este criterio se aplicó en el

estudio del ácido Grandiflorénico al cambiar el disolvente pasando de cloroformo a benceno.

En la práctica "tradicional" siempre que se analiza independientemente el espectro de ^{13}C o ^1H , se hace uso de correlaciones semi-empíricas. Así, para predecir el desplazamiento del ^{13}C e ^1H se dispone de parámetros de aditividad de desplazamientos que tienen cierto margen de error. Además, su uso requiere de cierto grado de familiaridad y especialización. El uso combinado de DEPT, HETCOR y COSY, proporciona una herramienta poderosa de análisis estructural químico, ya que se reduce la necesidad de poseer información sistemática especializada de rmn y se facilita la postulación de una estructura química consistente con los datos espectrales.

Dentro de los métodos modernos de la rmn INADEQUATE tiene un valor inigualable en el proceso de elucidación estructural. El experimento ha recibido su nombre porque en principio, se fundamenta en el aprovechamiento del peor parámetro en que, intuitivamente, podría pensarse atendiendo a su sensibilidad i.e. el acoplamiento directo ^{13}C - ^{13}C en abundancia natural. INADEQUATE tiene severas demandas experimentales (se requieren 250-300 mg de sustancia y entre 12 y 20 h de adquisición), pero permite reconstruir un esqueleto carbonado mediante un mapa de conectividad cuya interpretación es muy simple.

Sin embargo, se continúa incorporando mejoras a este experimento para hacerlo mas sensible reduciendo la cantidad necesaria de muestra y el tiempo de adquisición de datos. A esto se suma la ventaja de que sin excepción, los espectrómetros modernos de rmn estan controlados por una computadora, lo cual permite realizar estudios espectroscópicos diversos, programados, para su ejecución automática durante la noche.

Finalmente, es importante que una asignación espectral sea inequívoca no solo en la postulación de una estructura química correcta sino también para tener información precisa sobre regiones moleculares involucradas en diferentes procesos como: el intercambio químico, reacciones de síntesis, la biosíntesis o el metabolismo in vivo, equilibrios conformacionales y dinámica molecular, etc.

En la rmn moderna, los químicos tienen un verdadero arsenal de recursos para el estudio estructural y fisicoquímico orgánico. La adopción oportuna de estos nuevos métodos contribuirá al desarrollo de la química orgánica mejorando nuestra capacidad para estudiar la estructura y propiedades de moléculas más complejas.

OBJETIVOS

- 1.- Llevar a cabo un estudio estructural por rmn de pulsos de los metabolitos secundarios aislados de Mikania micrantha (Micanocriptina) y Montanoa tomentosa (acido Grandiflorénico y Taraxasterol).
- 2.- Llevar a cabo la asignación total, inequívoca, de los espectros de ^{13}C e ^1H de las tres sustancias aisladas, y en particular de los espectros de ^1H en donde existe gran sobreposición de señales, recurriendo tanto a métodos unidimensionales como bidimensionales.
- 3.- Diseñar una secuencia de pulsos de correlación heteronuclear para obtener información sobre la conectividad entre los hidrógenos de los grupos metilo y los carbonos a dos y tres enlaces de distancia mediante la transferencia de magnetización acumulada en los hidrógenos de los metilos.
- 4.- Analizar comparativamente la conformación de estas sustancias determinada por difracción de rayos X, con la conformación promedio que se observa en disolución por rmn a través de las constantes de acoplamiento
- 5.- Evaluar la utilidad de algunos de los mas importantes experimentos uni- y bidimensionales de rmn para la determinación estructural orgánica de las sustancias obtenidas en este trabajo.

CAPITULO I

La Estructura de la Micanocriptina.

Generalidades sobre Mikania micrantha

Existe en México una variedad de plantas de uso popular medicinal conocidas como "guaco" que son empleadas para el tratamiento de padecimientos cutáneos e intestinales (1). En particular, existen dos plantas en esta situación que pertenecen a género y especie diferentes v. gr. Aristolochia taliscana y Mikania micrantha HBK, que tienen uso popular como cicatrizantes y antidiarreicos (2). Sobre esta base, se llevó a cabo un estudio fitoquímico de M. micrantha para conocer su relación con los metabolitos de A. taliscana descritos en la literatura y posiblemente comprender la razón de su sinonimia. En este trabajo se describe el resultado del estudio espectroscópico del metabolito secundario Micanocriptina obtenido de M. micrantha.

La lactona sesquiterpénica Micanocriptina (I) fue aislada originalmente por Herz *et. al.* de una especie de Mikania recolectada en Panama (3). Se observó que su estructura poseía modificaciones interesantes respecto a las de la micanólida (II) y de la dihidromicanólida (III) (figura I.1), también obtenidas de M. micrantha así como de otras especies del mismo género v.gr. M. panamensis. El aislamiento de (I) se hizo de uno de tres lotes de esta planta, lo cual indujo inicialmente a los investigadores a dudar de la clasificación botánica de dicho lote.

La Micanocriptina obtenida en el presente trabajo fue aislada de los especiménes conseguidos en una recolección única. Sin embargo, en una segunda ocasión, un año después, no fue posible obtener el compuesto, aún cuando el mes de recolecta fue el mismo. Este tipo de hallazgo es relativamente común en fitoquímica y podría explicar también lo ocurrido a los investigadores que aislaron por primera vez esta sustancia.

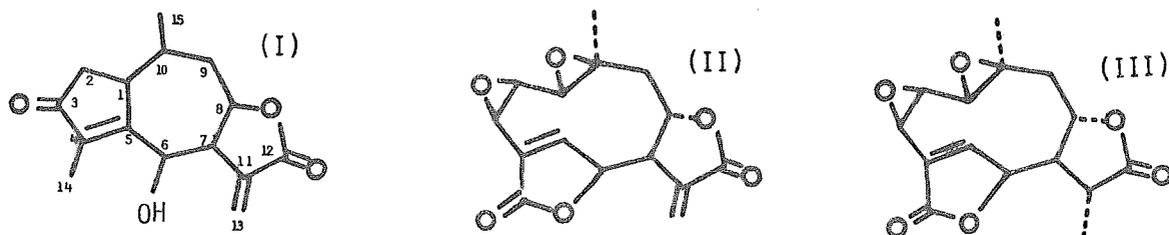


Figura I.1

Definición del Problema Estructural

El trabajo original de asignación estructural de la Micanocriptina (I) fue correcto y apoyado principalmente por el análisis del espectro de ^1H y datos de UV e IR. Sin embargo en el espectro de ^1H de 270 MHz descrito en el

trabajo original (3), se observaron algunas sobreposiciones que dificultaron la asignación.

Las configuraciones relativas de C-1 y C-10 fueron asignadas sobre la base de los acoplamientos entre H_1 y H_{10} , y la fusión del anillo lactónico, sobre la base de los acoplamientos entre H_7 y H_8 . Las señales de H_1 y H_7 aparecieron sobrepuestas en una señal múltiple en ca. 3.16 ppm, mostrando uno de ellos acoplamiento con el metilo vinílico C-14. En el espectro de rmn de 270 MHz, el metileno de la posición 2 se observó como la parte AB de un sistema ABX, siendo la parte X uno de los dos protones que aparecen en 3.16 ppm (H-1). El experimento INDOOR (3) revelo el sistema AB del metileno en C-9, con $J_{gem} = 13$ Hz (2.46 y 1.95 ppm), ambos acoplados vecinalmente con H-10 (2.34 ppm) base del grupo metilo, y adicionalmente con H-8 (4.66 ppm). De la observación de un modelo Drieding, se considero consistente una estructura con H-1 alfa y el metilo en C-10 beta; también el acoplamiento homoplático entre H-6 $_{\alpha}$ y H-1 puede ser explicado con este modelo. Finalmente, se obtuvo la configuración molecular absoluta mediante el estudio de difracción de rayos-X (4).

Considerando el procedimiento que se siguió originalmente para proponer la estructura de la Micanocriptina sobre la base de su espectro de rmn de ^{13}C y de 1H , se pensó adecuado realizar el estudio de esta sustancia aplicando técnicas diferentes de rmn que permitieran la eliminación de ambigüedades derivadas de la sobreposición de señales. Se decidió también utilizar los datos de la estructura cristalina (4) para conocer las posibles diferencias entre ésta y la observada en disolución, lo cual generalmente se desconoce. Para ello, se obtuvieron los valores de los ángulos diedros y se compararon con los correspondientes derivados de la medición del acoplamiento escalar J. Asimismo, se utilizó la secuencia de pulsos propuesta originalmente por Hall para medir T_1 , y se logró diferenciar señales por sus diferentes tiempos de relajación, a pesar de tener iguales desplazamientos químicos.

Resultados y Discusión.

Asignación de los Desplazamientos Químicos de 1H .

Originalmente el espectro de rmn de 1H fue determinado en 90 y 270 MHz en DMSO- d_6 (3) encontrándose varias señales de 1H sobrepuestas. En el presente trabajo los espectros se determinaron en una mezcla de $CDCl_3$:DMSO- d_6 (7:3) en 200 MHz y solamente las señales de H-9 $_{\alpha}$ y (3)H-14 mostraron sobreposición (figura 1.2). Se aplicó la técnica de Hall y Preston (5), consistente en la utilización de una secuencia de pulsos que permite observar la recuperación de la magnetización a partir de la inversión completa del vector M_0 sobre el eje z' ("Inversion Recovery", IR). Así, se determinó que el tiempo en el cual la magnetización del grupo metilo se encuentra exactamente en el punto cero sobre el eje z es $t=0.88$ s, mientras que para H-9 este valor es $t=1.74$ s. La señal de H-9 pudo separarse totalmente de la señal sobrepuesta del metilo de C-14. Al tratar de documentar la aplicación de esta técnica en la resolución de problemas estructurales resultó sorprendente observar el poco uso que ha tenido desde que fue descrita. Su aplicación sigue siendo una excelente alternativa para la resolución de señales que aún técnicas como la rmn bidimensional resuelta en J (6) no puede diferenciar cuando éstas tienen desplazamientos químicos muy similares o aún idénticos. Esto es posible con la técnica IR, siempre y cuando los núcleos tengan alguna diferencia en sus tiempos de relajación T_1 . Adicionalmente, la información global sobre el relajamiento del sistema de spines proporciona información que ayuda en la contrastación de la

hipótesis estructural. Esto puede apreciarse al comparar las velocidades de relajación de los protones H-13 cis, $t=6.40$ y H-13 trans, $t=5.72$ siendo menor la de este último, porque tiene interacciones dipolo-dipolo con H-7 que aceleran su relajación. El resto de las señales de ^1H se confirma usando experimentos simples de desacoplamiento con lo que se determinan las conectividades $^1\text{H} - ^1\text{H}$ y los valores de los acoplamientos restantes. Los resultados son acordes con los obtenidos inicialmente salvo algunas pequeñas diferencias atribuibles al cambio de disolvente.

En la Tabla I.1 se presentan las asignaciones y acoplamientos de los protones de la Micanocriptina obtenidos en esta investigación.

TABLA I.1

Desplazamiento Químico Protónico y Valores de J de la Micanocriptina.

Protón ^a	Desplazamiento ^b	Acoplamientos ^c
H-1	3.12 ^d	6.8(2), 2.2(10), 2.0(2), 2.0(14), 1.0(6)
H-2	2.65	19.1(2), 6.8(1), 1.1(6)
H-2	2.17	19.1(2), 2.0(1)
H-6	5.13	5.6(OH), 3.5(7), 1.1(2), 1.0(1), 0.8(14)
H-7	3.01 ^e	9.6(8), 3.5(6), 3.4(13c), 3.0(13t)
H-8	4.84	12.1(9), 9.6(7), 3.5(9)
H-9	1.92	12.6(9), 12.1(8), 3.9(10)
H-9	2.42	12.6(9), 3.5(8), 3.5(10)
H-10	2.29	7.3(15), 3.9(9), 3.5(9), 2.2(1)
H-13c	6.40 ^d	3.4(7)
H-13t	5.72 ^d	3.0(7)
H-14(3)	1.90	2.0(1), 0.8(6)
H-15(3)	0.86	7.3(10)
OH	4.54	5.6(6)

a) la numeración de los protones se dá de acuerdo a la estructura I;

b) los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm) referidas al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna en 0 ppm;

c) las constantes de acoplamiento están dadas en Hertz y en paréntesis el protón con el que interactúan;

d) la denominación H-13 cis y trans se considera con respecto a la función lactónica;

e) H-1 y H-7 muestran ligeras diferencias en los desplazamientos con las del espectro mostrado debido a variaciones en la proporción de los disolventes.

Asignación del Espectro de ^{13}C de la Micanocriptina.

Las asignaciones iniciales del espectro de ^{13}C fueron hechas empleando el espectro normal con desacoplamientos de ^1H y el análisis de los sub-espectros de los grupos $-\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$ mediante la técnica de edición espectral DEPT (7) (figuras I.3a y I.3b). De esta manera se logra una asignación inicial de los átomos de carbono en términos del número de hidrógenos unidos a ellos.

Para eliminar ambigüedades en la asignación estructural se obtuvieron dos espectros bidimensionales de correlación heteronuclear utilizando tiempos de retardo optimizados para detectar el acoplamiento $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ directo y el indirecto (8). En el resultado de este primer espectro solamente aquellos átomos de ^{13}C e ^1H directamente unidos muestran una correlación de desplazamientos químicos en

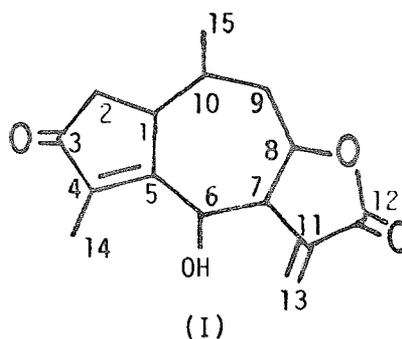
el espectro bidimensional (figura I.4). Este tipo de correlación permite la determinación de todas las señales que corresponden a carbonos que contienen hidrógenos y por ello sabemos que la molécula posee cinco señales correspondientes a átomos de carbono cuaternarios. El intervalo de desplazamientos químicos en que se encuentran estas señales va de 136 a 208 ppm y no es difícil hacer una asignación preliminar sobre la base de los desplazamientos conocidos de otros compuestos que sirven de modelo o haciendo uso de parámetros aditivos del desplazamiento químico para carbono-13 (9). Por ejemplo, la señal en 208.0 puede ser asignada con gran margen de seguridad al carbonilo insaturado alfa,beta C-3, y las señales en 143.5 y 136.3 pueden asignarse en forma tentativa como C-4 y C-11 respectivamente. Por otra parte, no es fácil asignar con seguridad las señales en 170.9 y 169.9 que corresponden a los carbonos 5 y 12. Para resolver esta incertidumbre se empleó el experimento de correlación heteronuclear de desplazamientos optimizado para la observación de acoplamientos carbono - hidrogeno gemelos y vecinales (indirectos), algunas veces denominados de "larga distancia" (10). Esto es posible ya que existe una apreciable diferencia entre el valor del acoplamiento directo C-H ($^1J = 125$ Hz) y el del gemelo o el vecinal ($^2J, ^3J = 5-10$ Hz). La secuencia de pulsos es similar a la que se emplea en el experimento de correlación directa pero optimizada para la medición $^2J_{CH}$ y $^3J_{CH}$. Los protones y carbonos que tienen la interacción del tipo seleccionado muestran una señal característica en la intersección de las perpendiculares a los dos ejes que contienen las escalas de desplazamiento de ambos núcleos (figura I.5).

Se observó que la señal del carbono en 170.9 ppm tiene acoplamientos de larga distancia con los hidrógenos (3)H-14 y que la señal en 169.9 está acoplada con los hidrógenos cis y trans de C-13. Igualmente, la señal en 143.5 muestra acoplamientos con (3)H-14 y la señal en 136.3 tiene acoplamientos con los hidrógenos H-13 cis y H-7. La señal del carbonilo en 208.0 ppm muestra acoplamientos con (3)H-14, H-2_{alfa} y H-2_{beta} y H-1, lo cual es consistente con los acoplamientos deducibles de la estructura I. De los cinco átomos de carbono cuaternarios, el experimento heteronuclear permite una subdivisión en dos grupos: C-3, C-4 y C-5 acoplados a (3)H-14 pero no a H-13 cis, y C-11 y C-12, el primero acoplado solo a H-13_{cis} y no a H-14 mientras que C-12 esta acoplado con H-13 cis y H-13 trans (figura I.5). Dentro de cada grupo, hay diferencias de por lo menos 25 ppm con lo cual el margen de seguridad para una asignación correcta es muy razonable. En la Tabla I.2 se presenta la lista de átomos de carbono y su desplazamiento químico respectivo.

TABLA I.2

Desplazamientos Químicos de ^{13}C de la Micanocriptina

Carbono ^a	Desplazamiento ^b
C(1) ^c	45.17
C(2) ^c	41.34
C(3) ^d	208.03
C(4) ^d	143.52
C(5) ^d	170.90
C(6) ^c	63.52
C(7) ^c	50.68
C(8) ^c	75.18
C(9) ^c	40.45
C(10) ^c	33.05
C(11) ^d	136.28
C(12) ^d	189.91
C(13) ^c	120.94
C(14) ^c	18.96
C(15) ^c	12.76



- a) numeración de acuerdo a la estructura I;
 b) desplazamientos químicos en ppm relativos al TMS como referencia interna;
 c) desplazamientos químicos asignados con la ayuda del espectro de correlación heteronuclear bidimensional;
 d) desplazamientos químicos asignados con la ayuda del espectro de correlación heteronuclear optimizado para acoplamiento vecinales y gemelos.

Comparación de la Conformación de la Micanocriptina en Disolución y en Estado Sólido.

Aún cuando en el reporte original sobre la estructura cristalina de la Micanocriptina se encuentran descritos los ángulos diedros para las secuencias C-C-C-C, no se describen los ángulos involucrando a los hidrógenos para las secuencias H-C-C-H. Los valores correspondientes fueron calculados a partir de las coordenadas atómicas descritas por Bovell *et al.* (4) (Tabla I.3) y fueron agrupados para compararlos con las constantes de acoplamiento cuyas magnitudes pudieron ser obtenidas con precisión directamente del espectro de rmn (figura I.6). Es interesante comparar el valor de los ángulos diedros de la molécula en solución estimados a partir de la conocida relación de Karplus, con los valores de dichos ángulos en el estado sólido obtenidos por difracción de rayos-X. Con ello, se detectan los cambios conformacionales que pueden ocurrir en la molécula al pasar del estado cristalino a una disolución, para lo cual la rmn es particularmente sensible.

TABLA I.3

Constantes de Acoplamiento ^1H - ^1H Vecinas, Alílicas y Homopalílicas de la Micanocriptina en Disolución y Comparación con los Angulos Diedros en el Estado Cristalino.

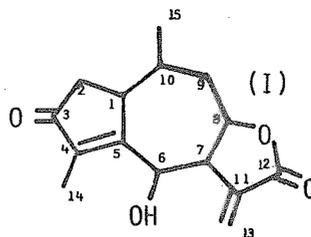
ANGULO	^a	ACOPLAMIENTO	J(HZ) ^b
H(1)-C(1)-C(2)-H(2) _a	1	$^3J_{\text{H}(1)\text{H}(2)_a}$	6.8
H(1)-C(1)-C(2)-H(2) _b	117	$^3J_{\text{H}(1)\text{H}(2)_b}$	2.0
C(1)-C(10)-C(10)-H(10)	71	$^3J_{\text{H}(1)\text{H}(10)}$	2.2
H(6)-C(6)-C(7)-H(7)	65	$^3J_{\text{H}(6)\text{H}(7)}$	3.5
H(7)-C(7)-C(8)-H(8)	156	$^3J_{\text{H}(7)\text{H}(8)}$	9.6
H(8)-C(8)-C(9)-H(9) _a	177	$^3J_{\text{H}(8)\text{H}(9)_a}$	12.1
H(9) _a -C(9)-C(10)-H(10)	50	$^3J_{\text{H}(9)_a\text{H}(10)}$	3.9
H(9) _b -C(9)-C(10)-H(10)	65	$^3J_{\text{H}(9)_b\text{H}(10)}$	3.5
H(6)-C(6)-O-H	43	$^3J_{\text{H}(6)\text{OH}}$	5.6
H(7)-C(7)-C(11)-C(13)	81	$^4J_{\text{H}(7)\text{H}(13)_c t}$	3.4
		$^4J_{\text{H}(7)\text{H}(13)_t c}$	3.0
H(1)-C(1)-C(5)-C(4)	121	$^5J_{\text{H}(1)\text{H}(14)}$	2.0
H(6)-C(6)-C(5)-C(4)	54	$^5J_{\text{H}(6)\text{H}(14)}$	0.8

(^a): angulo diedro en grados en el estado sólido

(^b): constante de acoplamiento (en Hertz) (en disolución)

(_a): letra griega alfa;

(_b): letra griega beta



Espectros de Correlación Heteronuclear "HETCOR".

La figura I.4 muestra el espectro HETCOR directo de la Micanocriptina y las intersecciones entre ambas escalas revelan los desplazamientos químicos de cada ^{13}C y de los hidrógenos unidos a él. La figura I.5 es el espectro HETCOR indirecto y los contornos se deben a la interacción de ^{13}C con hidrógenos a dos y tres enlaces de distancia. En la figura I.8 se presenta al espectro COSY de I. Este último solo se utilizó para confirmar asignaciones ya obtenidas de espectros anteriores.

Correlación de Datos de la Estructura Cristalina con J Obtenida del Espectro de RMN de Alta Resolución.

Las constantes de acoplamiento de larga distancia son particularmente interesantes en la comparación de la estructura cristalina determinada por difracción de rayos-X y la determinada en disolución por rmn. Este es el caso de los protones del metileno exocíclico sobre el ^{13}C que están acoplados con H-7 mostrando constantes de acoplamiento ligeramente mayores que 3 Hz. En el acoplamiento alílico, los valores máximos del acoplamiento son cercanos a este valor, lo cual es consistente con una orientación ortogonal entre H(7) - C(7) y C(11) - C(13). De acuerdo a la gráfica de acoplamientos alílicos mostrada (figura I.7), los valores máximos para este tipo de acoplamiento ocurren cuando los ángulos diedros en el sistema H-C-C=C-H son de 90° , donde la sobreposición de los orbitales de los enlaces es máxima y la transmisión de información sobre

el estado de espín es más eficiente. Por otra parte, H-1 y H-6 muestran también acoplamientos de larga distancia de tipo homoalílico con C-14 (H-C-C=C-C-H) de tipo transoide y cisoido respecto al grupo carbonilo. De ellos, el acoplamiento mayor, usualmente es el transoide aunque la medición de las constantes de acoplamiento alílico y homoalílico tiene un valor restringido para propósitos de asignación estereoquímica en compuestos aislados. Sin embargo, la medición puede ser útil cuando se trata de comparaciones entre pares de estereoisómeros (en este caso, isómeros geométricos). La razón de esta relación de magnitudes puede explicarse sobre la siguiente base: en el caso de un compuesto donde existe rotación libre como es el caso del 2-buteno cis y trans, los acoplamientos homoalílicos tienen valores de 1.20 y 1.29 Hz respectivamente (13). Adicionalmente, la magnitud del acoplamiento homoalílico se ve aumentada cuando se tienen los enlaces C-H perpendiculares al plano del doble enlace. Al comparar los ángulos diedros involucrados en los sistemas H(1)-C(1)-C(5)-C(4) y H(6)-C(6)-C(5)-C(4), se observa que el primero posee los enlaces C-H más cercanos a 90° con respecto al plano del doble enlace central y ello explica que su constante de acoplamiento sea también mayor. Otros acoplamientos de larga distancia observados son entre H-1 y H-6 a través de cuatro enlaces y entre H-2_{alfa} y H-6 a través de cinco enlaces. Por otra parte, H-2_{beta} y H-6 no muestran acoplamiento apreciable lo cual indica que el acoplamiento, si existe, debe ser $^2J_{H-2\beta H-6} < 0.1$ Hz. La diferencia de acoplamientos observada para los protones H-2 alfa y beta con H-6 es notable ya que el fragmento C(2)-C(1)-C(5)-C(6) es prácticamente plano ($\approx 174^\circ$) y los fragmentos H-2_{alfa} - C-2 y H-2_{beta} - C-2 forman ángulos diedros (116° y 126° respectivamente) muy parecidos respecto al enlace C(1)-C(5). Como se mencionó anteriormente, las dependencias angulares de J en el caso de acoplamientos de larga distancia (cinco enlaces), no son conocidas suficientemente por lo que debe tomarse precaución en la formulación de conjeturas estructurales sobre la base de estos acoplamientos.

Finalmente, el acoplamiento gemelo de gran magnitud entre los protones H-2_{alfa} y H-2_{beta} de 19.1 Hz, es consistente con una conformación en la que uno de los enlaces C-H es paralelo al orbital π del grupo carbonilo vecino (14). Estas deducciones pudieron ser corroboradas con los datos de la estructura cristalina obtenida por rayos-X.

Parte Experimental.

El material vegetal fue recolectado en Xanquitlalpan, Puebla y fue identificado botánicamente por el Dr. Miguel A. Martínez del Instituto de Biología de la UNAM. Se guardaron ejemplares botánicos en el Herbario IMSSM con los números 3290, 3320 y 3452. Se extrajeron 450 g de la parte aérea de planta seca y molida por maceración repetida con porciones de 3 L de CH₂Cl₂. Una vez eliminado el disolvente en la forma usual, se obtuvieron 16 g de residuo. En este residuo se observó la formación de cristales que fueron separados por filtración y lavados con una pequeña cantidad de CH₂Cl₂ enfriado en un baño de hielo. Se recrystalizó el producto obtenido de una mezcla de acetona-metanol, cloroformo-metanol y THF-cloroformo. Una vez crystalizada la sustancia la solubilización es difícil y requiere de calentamiento o reposo prolongado en el disolvente. El residuo se cromatografió en una columna de gel de sílice, utilizando como eluyente un gradiente aproximadamente lineal de cloroformo:metanol comenzando desde la proporción 100:0 hasta 75:25 respectivamente. Así, se obtuvieron 180 mg adicionales de sustancia.

Constantes físicas y espectroscópicas.

punto de fusión: 246-248°,

UV e IR: iguales a los obtenidos en la literatura.

RMN: Se determinaron los espectros de rmn en 90 y 200 MHz. Se utilizó como disolvente una mezcla de acetona y dimetilsulfóxido o cloroformo y dimetilsulfoxido. Todos los espectros de rmn de 200 MHz fueron obtenidos en un equipo Varian XL-200 funcionando en el modo de pulsos y transformada de Fourier y temperatura del "probe" de 20°. Para los espectros de ^1H se disolvieron ca. 5 mg de Micanocriptina en 0.6 mL de 70% CDCl_3 - 30% $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ conteniendo aproximadamente 0.1% de TMS como referencia interna en tubos de 5 mm de diámetro.

Se empleó una anchura de ventana espectral de 1600 Hz y 16 K de resolución con 5 s de tiempo de adquisición, ajustando con ceros ("zero-filled") a 32K con lo cual se logró 0.1 Hz de resolución. La calibración del pulso de 90° resultó con una duración de B_1 de 7.5 μs y 5 s de tiempo de reciclamiento. Para cada espectro se acumularon 32 barridos (espectros). Para los espectros de ^{13}C se disolvieron ca. 80 mg de Micanocriptina en 2 mL de la misma mezcla de disolventes empleando un tubo de 10 mm de diámetro. Para los espectros DEPT se utilizó una anchura espectral de 12,000 Hz y tiempo de adquisición de 1.33 s con un total de 32K puntos de datos. Para los espectros normales se emplearon pulsos de 45° (con duración de 7.5 μs), un tiempo de reciclado de 2 s y una acumulación total de 10, 000 barridos. Se obtuvieron cuatro espectros DEPT empleando pulsos θ de 45°, 90°, 90° and 135° (7) con 2500 barridos para cada espectro. La edición de los subespectros se efectuó con un programa de edición denominado ADEPT (A=automatic) incorporado en la programación normal del equipo. Los espectros de correlación heteronuclear normal y de "larga distancia" se obtuvieron empleando una anchura espectral de 11, 000 Hz en el dominio del ^{13}C y de 1500 Hz en el dominio del ^1H empleando respectivamente 2048 y 512 puntos de adquisición de datos. Por cada incremento de tiempo se acumularon 320 barridos con un total de 128 incrementos de tiempo. Adicionalmente se aplicó una función de ensanchamiento de señal de 2 Hz a lo largo de cada eje. En el espectro normal, se escogieron los siguientes tiempos de retardo $\Delta_1 = 3.6$ ms y $\Delta_2 = 2.4$ ms que corresponden a los valores óptimos para un acoplamiento promedio de ^{13}C - ^1H de 140 Hz (6). Los valores óptimos de estos parámetros para los experimentos de correlación heteronuclear de larga distancia se encontraron respectivamente en 0.075 s y 0.033 s. Estos valores representan un promedio de valores del acoplamiento ^{13}C - ^1H vecino y gemelo donde están involucrados hidrógenos de los metilos (ca. 5 Hz, (15)), así como el acoplamiento vecinal anti ^{13}C - ^1H de metilenos y metinos (ca. 10 Hz., (16)) (6).

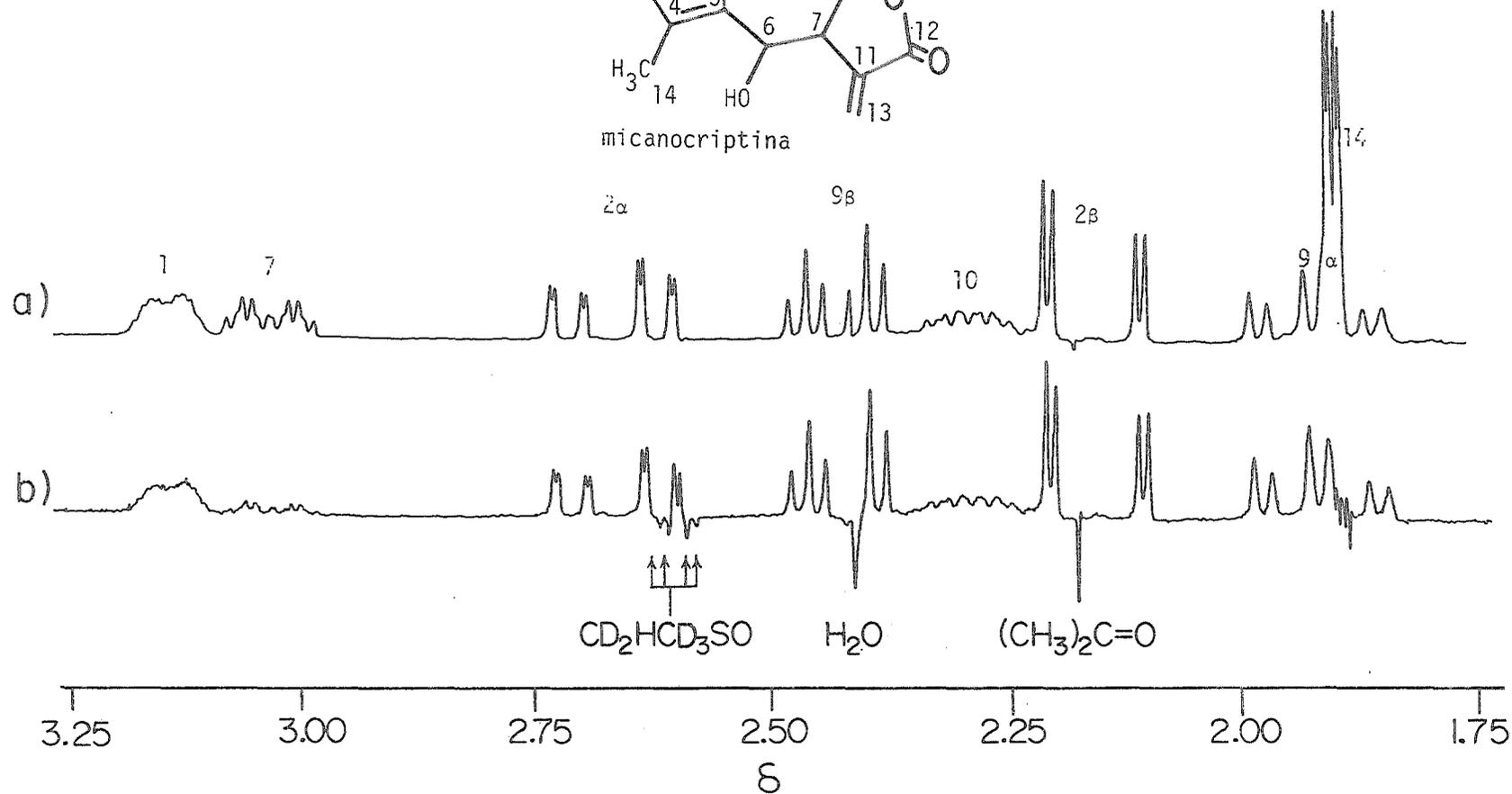
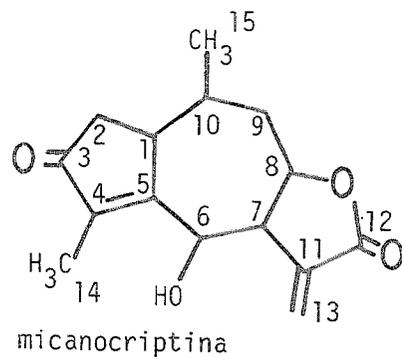


Figura I.2.- Espectro de ^1H de "Recuperación de Inversión" empleando los tiempos de retardo siguientes: (a) 2.25 s y (b) 0.88 s. La señal de CH_3 -14 se elimina totalmente con el primer tiempo de retardo. Las señales de los disolventes residuales, prácticamente desaparecen en el segundo retardo permitiendo la observación clara de H-2 alfa y de H-9 beta.

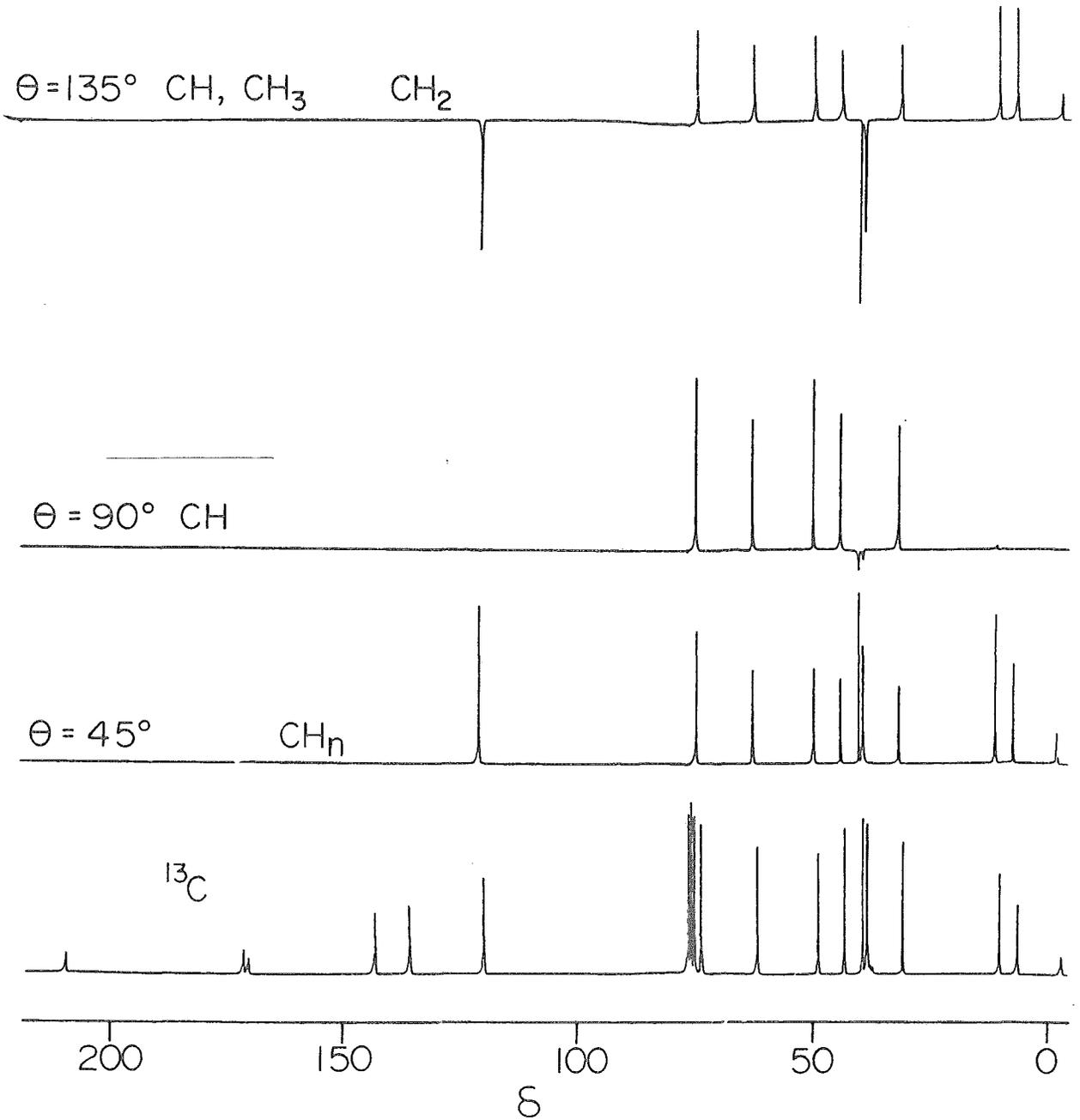
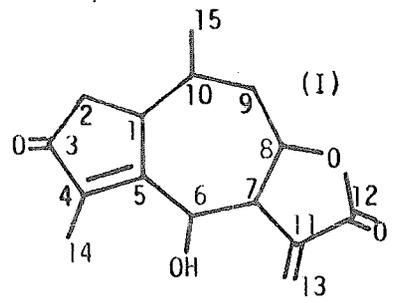


Figura I.3a.- Espectro DEPT sin editar de la Micanocriptina.

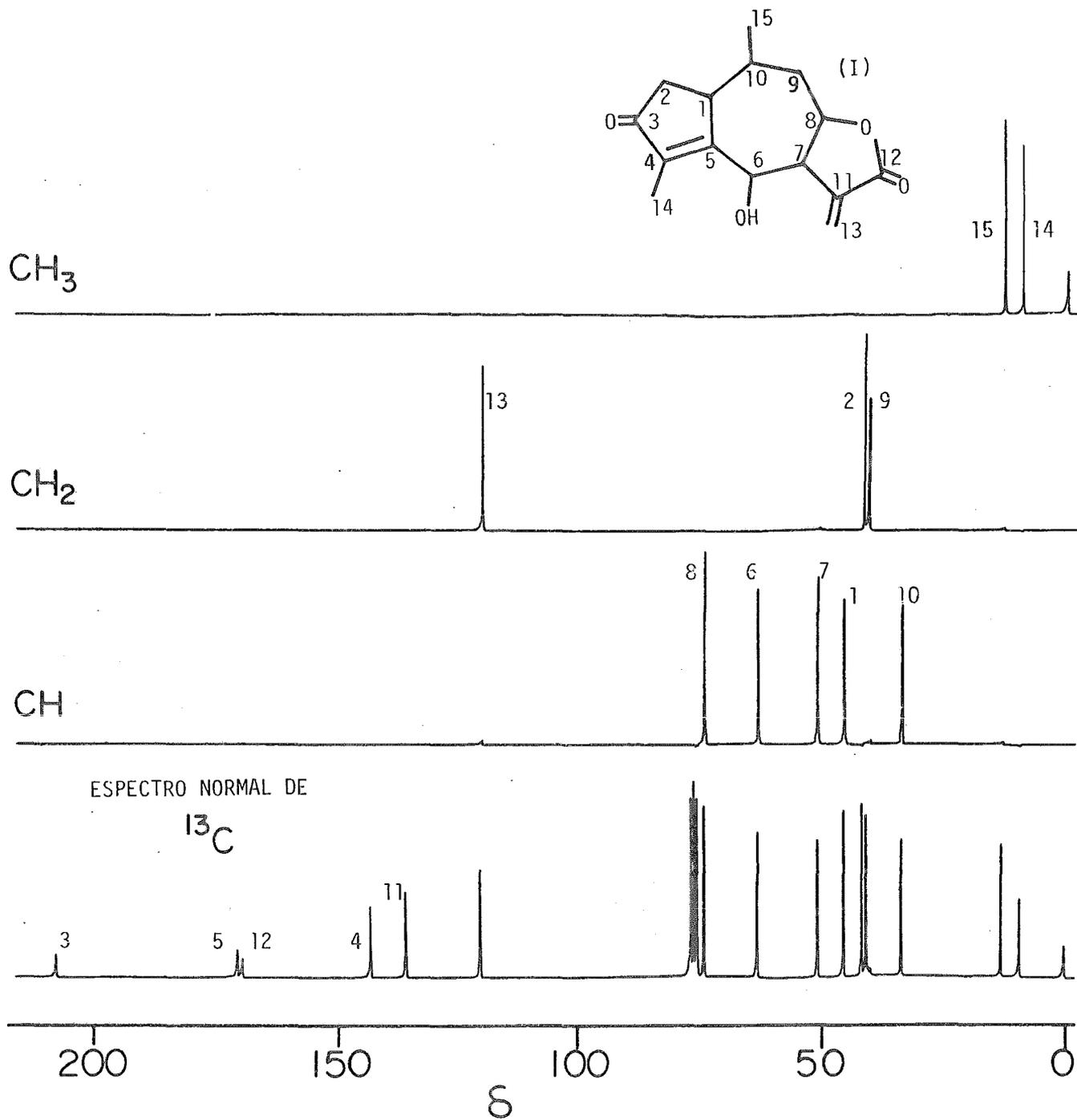


Figura I.3b.- Espectros DEPT editados de la Micanocriptina.

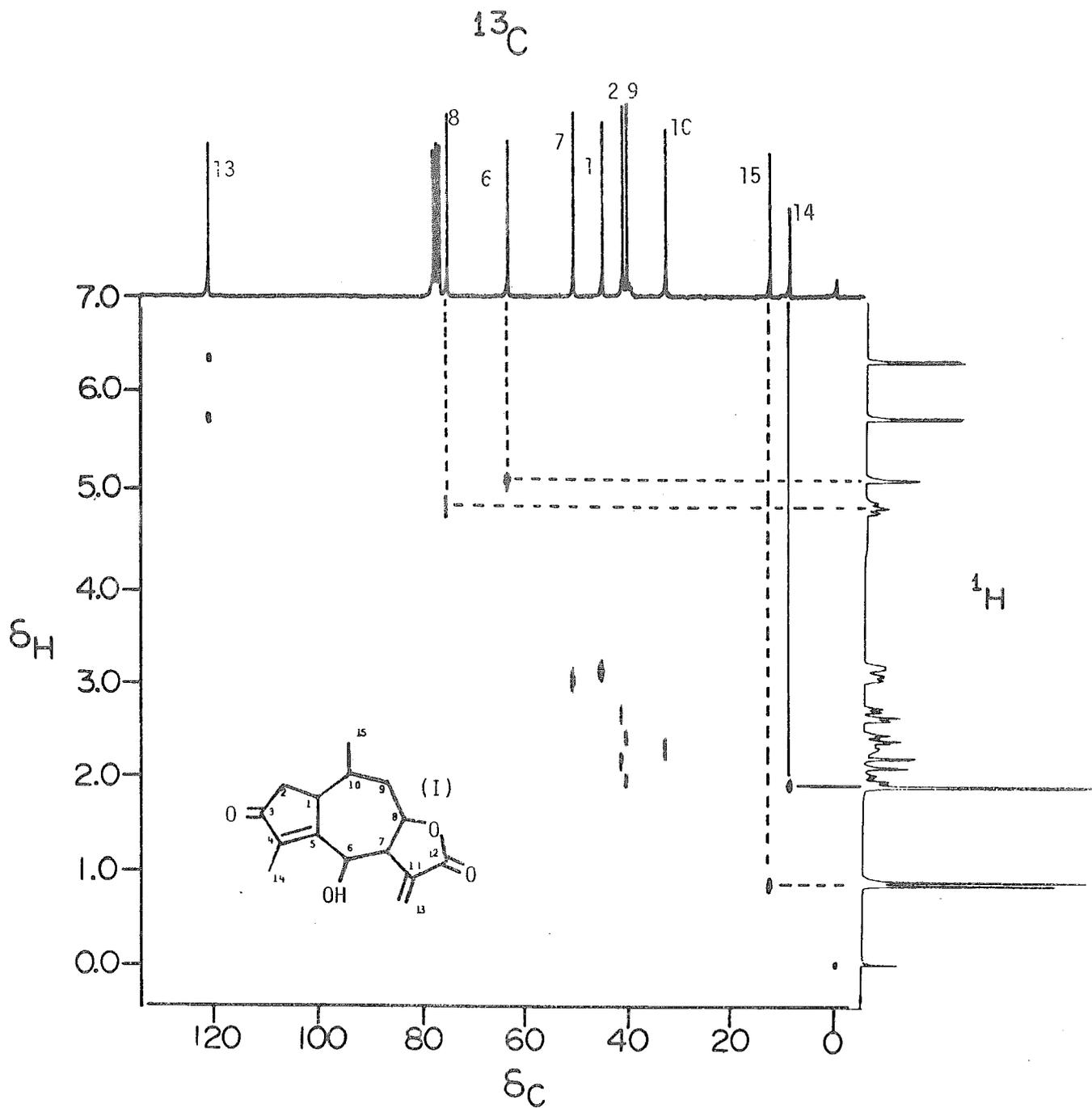


Figura I.4.- Espectro normal de Correlación Heteronuclear (HETCOR) de la Micanocriptina. La escala horizontal contiene los desplazamientos químicos de ^{13}C y la vertical, de ^1H .

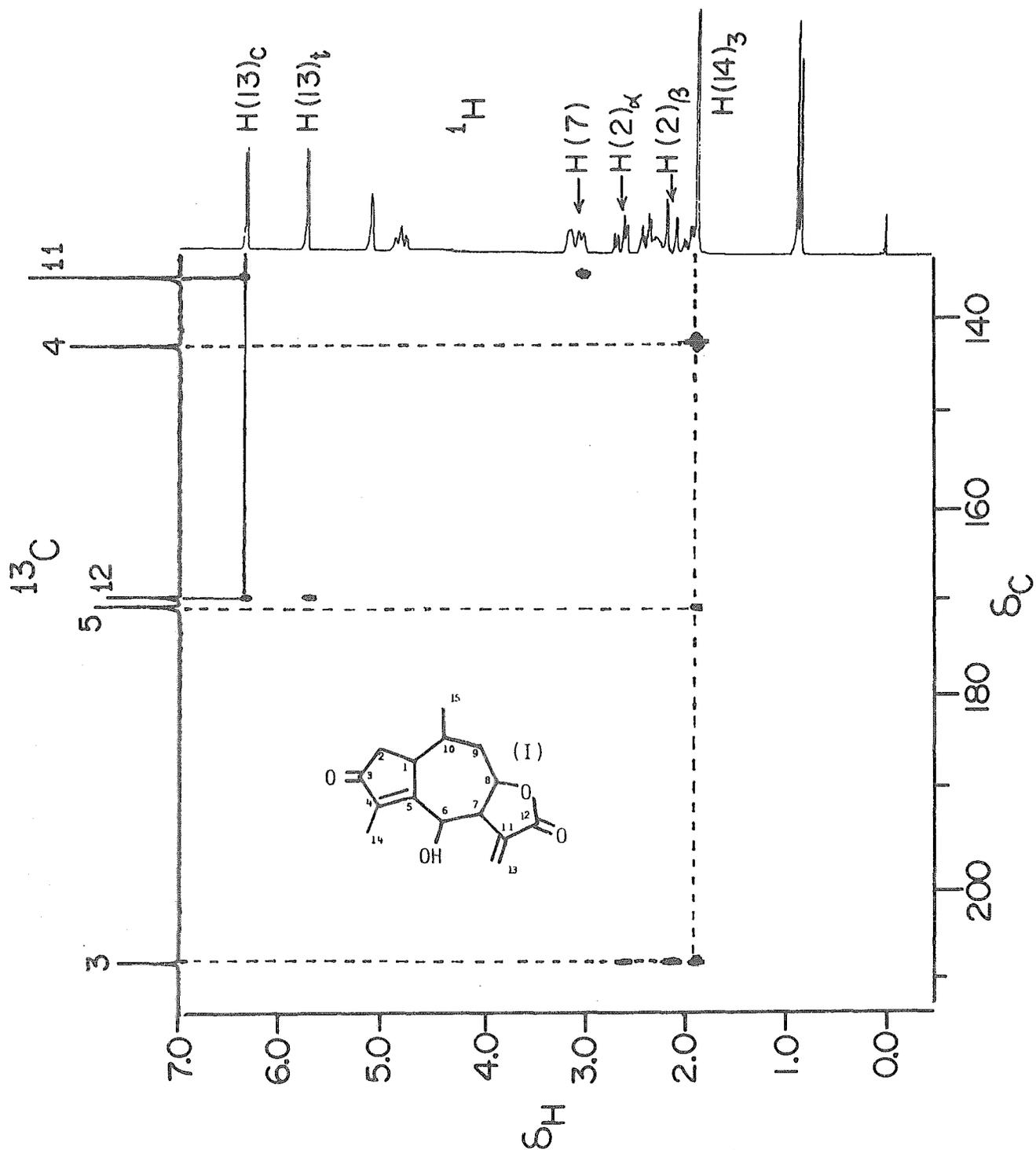


Figura I.5.- Espectro HETCOR de (I) de correlación de "larga distancia" mostrando las conectividades de ^{13}C con el metilo C-14 y con H-13 cis.

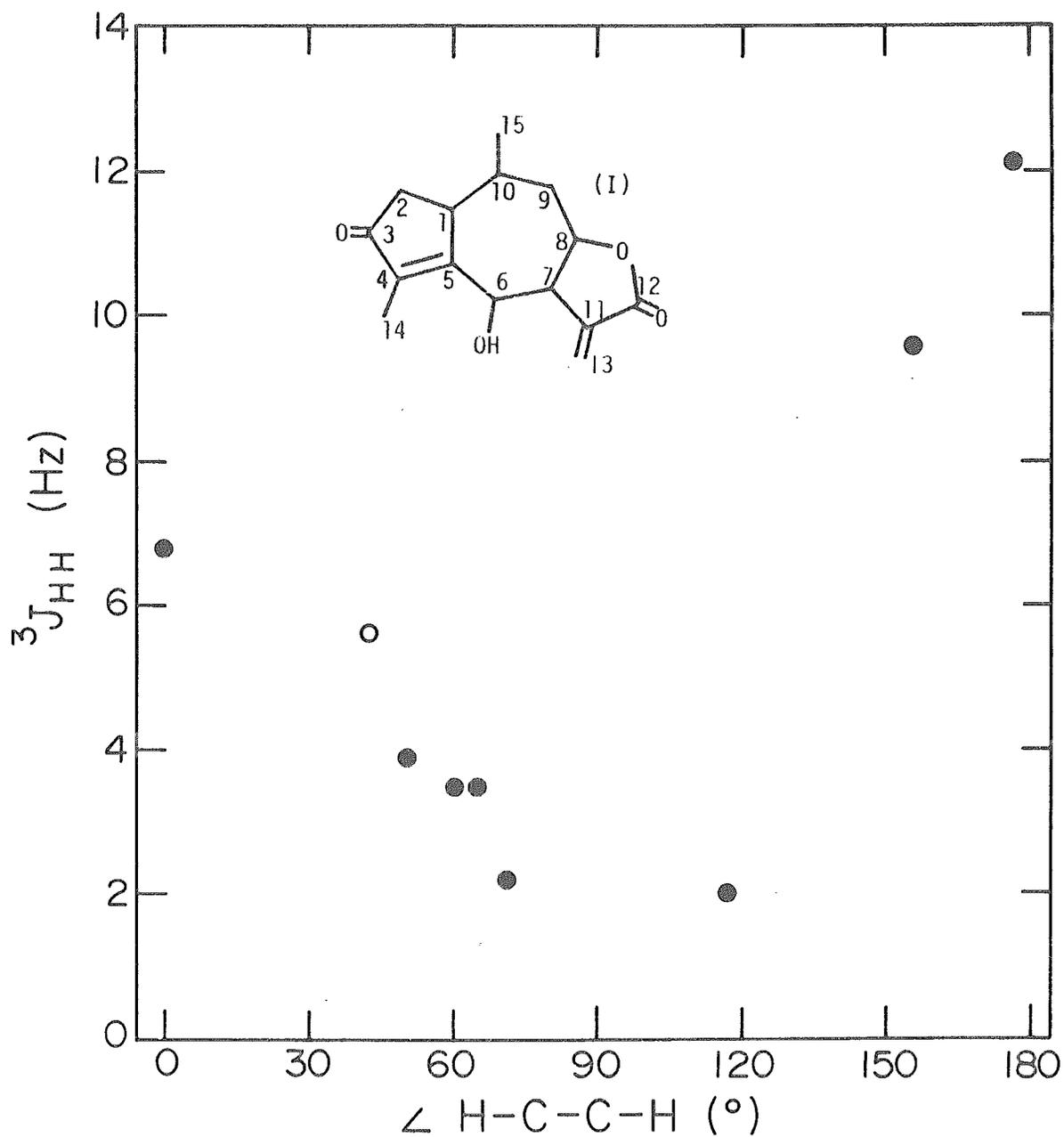


Figura I.6.- Gráfica de los acoplamiento vecinales $^1H-^1H$ contra los valores de ángulo diedro para los enlaces H-C-C-H. El círculo blanco corresponde al acoplamiento con el hidrógeno del OH.

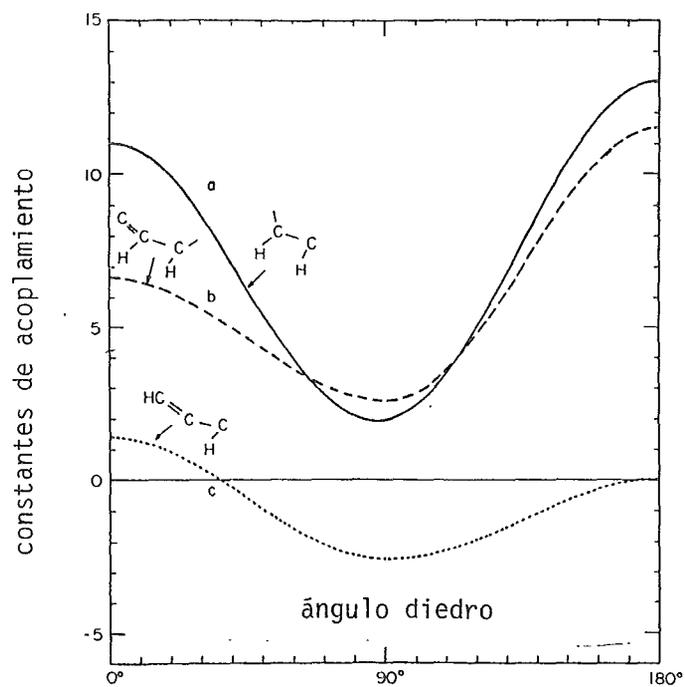


Figura I.7.- Correlación de los ángulos diedros y constantes de acoplamiento.

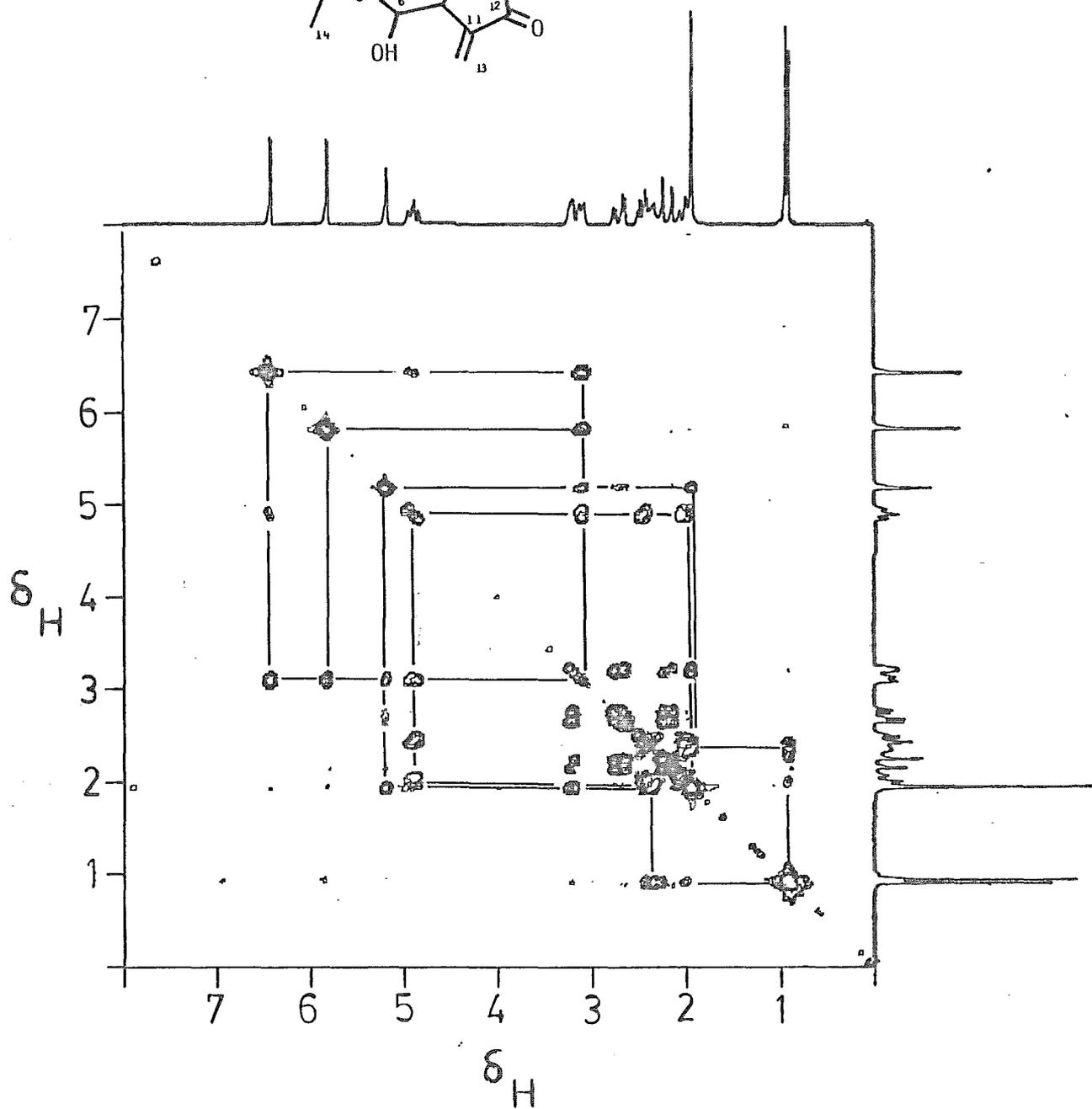
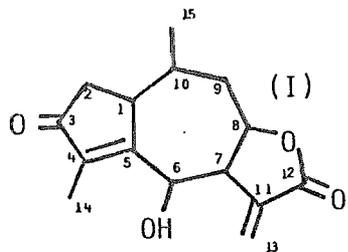


Figura I.8.- Espectro COSY de la Micanocriptina en 200 MHz.

HETCOR y COSY. Con el primero se asignaron simultáneamente los hidrógenos y carbonos protonados de la molécula (22, 8) y después se llevó a cabo la determinación del espectro de correlación homonuclear (23, 24) con el segundo. Alternativamente se podría aplicar la técnica de retransmisión coherente ("relayed coherence spectroscopy") (25), con la cual también se obtiene información sobre la relación vecinal entre hidrógenos.

También podría recurrirse a la determinación del espectro unidimensional (26) o bidimensional (27) de conectividad ^{13}C - ^{13}C que evidencia la secuencia completa de átomos de carbono de una molécula. Sin embargo, estas técnicas a pesar de ser muy poderosas son de baja sensibilidad y se requiere de gran cantidad de sustancia (ca. 300 mg) para la determinación, lo que limita su aplicación en la elucidación estructural. Ello puede ser crítico en el campo de investigación de productos naturales y de síntesis orgánica, porque frecuentemente se dispone de cantidades reducidas de sustancia. Por esta razón, existe interés en desarrollar técnicas de rmn que proporcionen mejor información estructural con cantidades de sustancia cada vez menores.

Finalmente, la elección del compuesto empleado en esta investigación se debió a los siguientes factores: a) la sustancia demostró poseer cierta actividad biológica *in vitro*, b) la inexistencia de información espectroscópica en la literatura respecto a la rmn de ^{13}C así como de una asignación del espectro de ^1H y c) era interesante buscar alternativas experimentales que demandaran cantidades pequeñas de sustancia (inferiores a 50 mg), permitiendo a la vez asignaciones no ambiguas de los espectros de rmn.

Resultados y Discusión

Experimentos COSY y HETCOR

Se determinaron inicialmente los espectros de rmn de ^1H en 200 MHz en CDCl_3 y Bz-d_6 (figuras II.1a y II.1b respectivamente) y ambos mostraron gran sobreposición de señales en la región correspondiente a los protones alifáticos (campo alto). Por otra parte, el espectro de ^{13}C totalmente desacoplado no mostró ninguna sobreposición de señales. Se procedió a obtener el espectro HETCOR para determinar las señales de ^1H asociadas a las de ^{13}C mediante enlaces directos (figuras II.2 <200 MHz, CDCl_3 >, II.3a <400 MHz, CDCl_3 > y II.3b <400 MHz, benceno- d_6 >).

Posteriormente, se obtuvo el espectro de correlación homonuclear COSY para establecer relaciones de conectividad ^1H - ^1H (figura II.4). Este mismo espectro se obtuvo también en 400 MHz y se discute más adelante. En particular, en el espectro COSY de 200 MHz en CDCl_3 se observó gran sobreposición de señales y fue difícil establecer relaciones de vecindad entre los hidrógenos con buen margen de seguridad. Debido a esto, se determinó el espectro COSY en benceno- d_6 tanto en 200 como en 400 MHz, con lo cual se logró modificar el desplazamiento químico de muchos hidrógenos por efecto anisotrópico del disolvente ("Aromatic Solvent Induced Shifts", ASIS). Ello permitió deducir conectividades adicionales a las del espectro COSY en CDCl_3 .

Para iniciar la búsqueda de conectividades, los hidrógenos no equivalentes de los metilenos proporcionan un buen punto de partida.

De los experimentos de correlación homonuclear ^1H - ^1H (COSY) realizados en los dos disolventes en 200 MHz, se obtuvieron las siguientes relaciones de conectividad y se logró la asignación no ambigua de varias señales de hidrógenos y carbonos. En particular, se pudo establecer la conectividad de los

fragmentos $-C(5)H-C(6)H_2-C(7)H_2$ y $-C(11)H-C(12)H_2-C(13)H-C(14)H_2-$ donde el hidrógeno inicial elegido para establecer la correlación se muestra subrayado. En el experimento de correlación homonuclear (COSY), los protones de uno de los metilenos sp^3 mostraron acoplamiento alílico con los protones olefínicos de un metileno terminal asignándose las señales a $C(15)H_2$ y $C(17)H_2$ respectivamente. La asignación del carbono del grupo $-^{13}COOH$ es simple dado el desplazamiento químico tan característico que tiene en ca. 185 ppm.

Después de haber establecido las asignaciones anteriores, quedan tres incertidumbres por resolver: a) la primera es la asignación no ambigua de las uniones de la secuencia de los metilenos $-C(1)H_2-C(2)H_2-C(3)H_2-$ observada mediante en el experimento COSY, donde sólo se puede asignar claramente la señal de los hidrógenos de C-2 sin poder hacerse la distinción entre los de C-1 y de C-3, b) la segunda, debida a la dificultad para asignar de los grupos metilo C-18 y C-20 y c) la asignación de tres carbonos cuaternarios sp^3 : C-4, C-8 y C-10 y de dos sp^2 : C-9 y C-16. En el segundo caso, la asignación se dificulta porque los grupos metilo se encuentran unidos a átomos de carbono cuaternarios, mientras que en el último, la similitud de acoplamientos y desplazamientos de los carbonos cuaternarios, dificulta su asignación inequívoca.

Una forma de asignar señales de estructuras desconocidas cuando aquellas poseen desplazamientos químicos muy similares, es correlacionándolas con los desplazamientos de otras sustancias con las que poseen una relación estructural estrecha (28) aunque al hacer esto se corre el riesgo de asignar señales erróneamente. El interés por utilizar técnicas bidimensionales de correlación homonuclear y heteronuclear se debe a que se reduce en forma sustancial la necesidad de consideraciones a priori para hacer la correlación estructural con los desplazamientos químicos observados.

Se exploró la posibilidad de realizar una transferencia de magnetización desde los hidrógenos de los grupos metilo hasta los núcleos de ^{13}C a dos y tres enlaces de distancia.

La proposición inicial de este tipo de experimento de correlación heteronuclear empleando una modificación de los tiempos de retardo, fue realizada por Richarz et al. (29) y Hull (30). Mediante este cambio, se buscó observar la transferencia de magnetización en el acoplamiento gemelo $^1H-C-^{13}C$ (dos enlaces) o en el vecinal (tres enlaces), en lugar de detectar las interacciones entre 1H y ^{13}C unidos directamente.

En este caso, se buscó transferir la magnetización acumulada en los hidrógenos de los grupos metilo, para aprovecharla de dos maneras: a) las señales de los metilos son particularmente intensas y por tanto claramente identificables en el espectro bidimensional de correlación heteronuclear y b) los núcleos de ^{13}C que pueden recibir parte de esta magnetización con esta secuencia de pulsos, son aquellos que tienen una relación vecinal o gemela con los hidrógenos de los metilos, dado que ambos acoplamientos $^1H-^{13}C$ con el grupo $-CH_3$ son muy similares. Como consecuencia, la conectividad de los hidrogenos del $-CH_3$ con los carbonos gemelos y vecinos se puede establecer simultáneamente.

De acuerdo a lo anterior, al analizar la estructura del ácido kauradienoico se puede anticipar que el metilo C-18 puede transferir magnetización a C-3, C-4, C-5 y C-19 mientras que el grupo metilo C-20 debería afectar de manera similar a los carbonos C-1, C-5, C-9 y C-10. En las Figuras II.5a y II.5b, se presentan los espectros de correlación heteroescalar indirecta de 200 MHz en $CDCl_3$.

La figura II.A muestra a la estructura química del ácido grandiflorénico con los valores de desplazamientos químicos de 1H y ^{13}C contenidos en la Tabla II.1.

tiempo de retardo con el fin de observar el acoplamiento J_{CH} deseado. Finalmente, se encontró más adecuado el valor de $J_{CH} = 10$ Hz, que corresponde a $\Delta_1 = 0.05$ s y $\Delta_2 = 0.033$ s, aún cuando los acoplamientos de ^{13}C ($^2J_{CH}$ y $^3J_{CH}$) con hidrógenos de metilos, es usualmente del orden de 5 Hz (16). Las explicaciones de ello son las siguientes:

a) el valor de $\Delta_2 = 1/3J$ es un compromiso entre varios valores posibles de acoplamiento de ^{13}C con diferentes grupos CH_n . Cuando CH_n es un grupo metilo, se requiere que $\Delta_2 = 1/5J$ (21), i.e., $\Delta_2 = 0.2/5 = 0.04$ s. Como contraste aparente, el valor teórico óptimo para Δ_1 es independiente del tipo de grupo metileno, i.e. $\Delta_1 = 0.10$ s.

b) Debe considerarse también el efecto de la disminución de la magnetización durante los tiempos de retardo. Por ejemplo, en las moléculas de gran tamaño el relajamiento de 1H es demasiado rápido y por ello puede ser preferible utilizar un tiempo Δ_1 ligeramente menor que el del valor teórico con el propósito de aprovechar al máximo la magnetización residual que queda disponible para transferirse al ^{13}C durante el periodo de adquisición al final de la secuencia de pulsos.

En los dos espectros bidimensionales de las figuras II.5a y II.5b se muestra la región de campo bajo del espectro. Uno de los hechos más evidentes es la transferencia de magnetización de los hidrógenos del metilo de campo más bajo hacia el carbono C(19) O_2H , con lo cual se revela la interacción de corta distancia entre grupo metilo que ahora puede señalarse como C(18) H_3 y el carbono del grupo carboxílico. De manera similar, la señal del $-CH_3$ en campo alto muestra una transferencia de magnetización intensa hacia la señal del carbono cuaternario sp^2 estableciendo simultáneamente la asignación del primero como C-20 y del último como C-9. La asignación de los carbonos de los metilos puede ser llevada a cabo acudiendo al espectro normal de correlación heteronuclear directa (figura II.2) y por eliminación, se deduce que la señal remanente sp^2 corresponde a C(16).

La región alifática del espectro de ^{13}C se analiza de manera semejante. En la figura II.4 se aprecia la transferencia de magnetización del metilo de campo bajo (C-18) a tres sitios que se encuentran en valores menores de campo y que corresponden a C-3, C-4, y C-5. La asignación se ve facilitada ya que del espectro de correlación directa sabemos que estos carbonos poseen 2, 0 y 1 protones respectivamente. Igualmente, el metilo C-20 efectúa la transferencia de magnetización a C-1, C-5 y C-9 de los cuales también se conoce el número de protones unidos: 2, 1 y 0 respectivamente. Esto significa que la asignación de C-5 se puede lograr por dos rutas diferentes aprovechando la información obtenida de la conectividad $^1H - ^1H$ derivada del espectro de correlación heteronuclear de "larga distancia", que demuestra su potencial informativo proporcionando redundancias que refuerzan la asignación espectral.

Finalmente, C-8 puede ser asignado como el único carbono cuaternario de tipo sp^3 que no tiene una conexión a través de dos o tres enlaces con C-18 o C-20, lo cual implica que no recibe magnetización de ninguno de los dos grupos metilo. En los espectros bidimensionales, las señales de las intersecciones entre los carbonos C-18 y C-20 y los hidrógenos unidos a ellos, se observan muy intensas a pesar de que los valores escogidos como tiempos de retardo están muy alejados del óptimo para detectar la transferencia de magnetización a través del enlace directo $^{13}C-^1H$. La información sobre esta correlación es redundante dado que dichas conectividades ya habían sido deducidas de antemano.

Las señales restantes que se observan en los espectros de las figuras II.5a y II.5b reflejan las conectividades entre hidrógenos de metinos y metilenos con carbonos adyacentes. Se puede prever que la mayoría de estas señales corresponden a acoplamientos vecinales anti $^{13}C-^1H$ dado que los tiempos de retardo escogidos se acercan al valor de retardo óptimo (21) para la detección

del acoplamiento anti $^3J_{CH} \sim 9$ Hz (16), y excluyen los acoplamientos gauche de mucho menor magnitud.

Por ejemplo, en la figura II.5a se observan dos intersecciones correspondientes a $^{13}C_{CO_2H}$ y los protones H-3_{beta} y H-5, los cuales guardan entre sí, una relación vecinal anti con respecto al grupo -COOH. Siguiendo el mismo procedimiento, se observa la señal intersección entre C-16, uno de los protones en C-15 y otro de C-14, siendo este último probablemente el que tiene relación anti con C-16. En la figura II.5b se observan señales (intersecciones) entre C-8 y el hidrógeno con relación vecinal anti H-13, dato que viene a apoyar la asignación del primero como un carbono cuaternario. También se observa la conectividad a través de tres enlaces entre C-14 y uno de los protones en C-7; además, se observa la señal intersección entre C-20 y H-5 pero no la que correspondería a C-18 y H-5, lo cual es consistente con la orientación anti entre los primeros y la orientación gauche entre los últimos.

De aquí se deduce que el experimento heteronuclear modificado implementado en esta investigación no solamente es adecuado para establecer conectividades vecinas y gemelas entre $^{13}C-^1H$ sino que proporciona también información sobre la conformación en los acoplamientos vecinos. Cuando se determinó el espectro del ácido grandiflorénico con la ganancia vertical incrementada se hacen evidentes muchas otras señales correspondientes a acoplamientos $^{13}C-^1H$ vecinos o gemelos que concuerdan con las asignaciones hechas previamente. Para los espectros 2.5a y 2.5b se escogieron ganancias relativamente bajas para mantener "limpio" el espectro y enfatizar solo los acoplamientos $^{13}C-^1H$ grandes como los que ocurren en la configuración anti. En el caso de los hidrógenos de metilenos, la asignación se realizó a partir de la esteoquímica propuesta para el compuesto IV, buscando confirmarla mediante la presencia o ausencia de acoplamientos vecinales anti que son los de mayor magnitud y revelan la presencia de las interacciones $^1H-^1H$ axiales.

En tres casos especiales fue imposible asignar de manera no ambigua los dos hidrógenos sobre un solo átomo de carbono, si bien el resto de la molécula queda totalmente asignada de manera inequívoca. Este fue el caso de los hidrógenos cis y trans de C-17 y los alfa o beta de C-12 y C-15.

Por otra parte, el ^{13}C del grupo -COOH pudo ser distinguido muy claramente del resto de carbonos cuaternarios (los mas cercanos en desplazamiento químico) por la diferencia de su desplazamiento por más de 25 ppm.

Se pueden mencionar otras alternativas para llevar a cabo esta asignación como por ejemplo, el utilizar el espectro de correlación homonuclear por retransmisión de coherencia (relayed coherence) (25) en lugar del espectro normal de correlación homonuclear (COSY) (24). En el primer experimento, también es posible establecer las conectividades $^1H-^1H$ entre hidrógenos vecinales pero a través de la señal intersección observada a lo largo del desplazamiento químico de la señal correspondiente de ^{13}C , con lo cual se hace buen uso de la mucho mayor escala de desplazamientos químicos del ^{13}C (25, 29). Sin embargo, el experimento de retransmisión coherente es de menor sensibilidad que COSY y requiere de mayor tiempo de acumulación con lo cual las ventajas de una resolución mayor pueden llegar a verse canceladas.

La ventaja que tiene la modificación utilizada en el presente trabajo sobre el experimento de conectividad $^{13}C-^{13}C$ (INADEQUATE) es su mayor sensibilidad. Por ejemplo, los espectros HETCOR y COSY de ácido grandiflorénico se obtuvieron con 200 mg de muestra empleando aproximadamente 3 horas de tiempo de acumulación en 200 MHz y menos de dos horas en 400 MHz. En contraste, al intentar utilizar la misma preparación para determinar el espectro INADEQUATE en 200 MHz, se observó que aún después de 36 h, la relación señal/ruido no era adecuada para llevar a cabo ninguna interpretación. Adicionalmente, el experimento de correlación heteronuclear de "larga distancia" permite establecer relaciones de conectividad aún cuando en la ruta conectiva se encuentren presentes

heteroátomos. Esto se observa claramente en la transmisión de magnetización que sigue la ruta $^1\text{H}-\text{O}-\text{O}-^{13}\text{C}$ mostrada en la señal intersección correspondiente. Una limitación de esta técnica es que se requiere de por lo menos algunas señales bien resueltas en el espectro de hidrógeno para poder establecer las primeras relaciones de conectividad $^{13}\text{C}-^1\text{H}$. Al aumentar la complejidad estructural, el espectro de hidrógeno puede aparecer más complejo y de difícil asignación parcial. Cuando esto ocurre, se puede minimizar el problema aumentando la cantidad de puntos de adquisición del espectro de ^1H , aumentando con ello la resolución espectral. También pueden darse problemas de optimización de la sensibilidad cuando se trabaja con moléculas grandes, donde el tiempo de relajación puede ser muy corto. En estos casos, la magnetización residual después de cada tiempo de retardo Δ , disminuye rápidamente y solo se logra transferir una pequeña cantidad de ella al carbono correspondiente. Sin embargo, existen formas de evitar estos problemas como se demuestra en el trabajo de Kessler *et. al.* (31) que introduce una modificación al experimento de correlación heteronuclear cuya secuencia de pulsos se denomina COLOC ("COrrrelation spectroscopy via Long range Couplings"), la cual también es una alternativa posible al espectro de conectividad $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$.

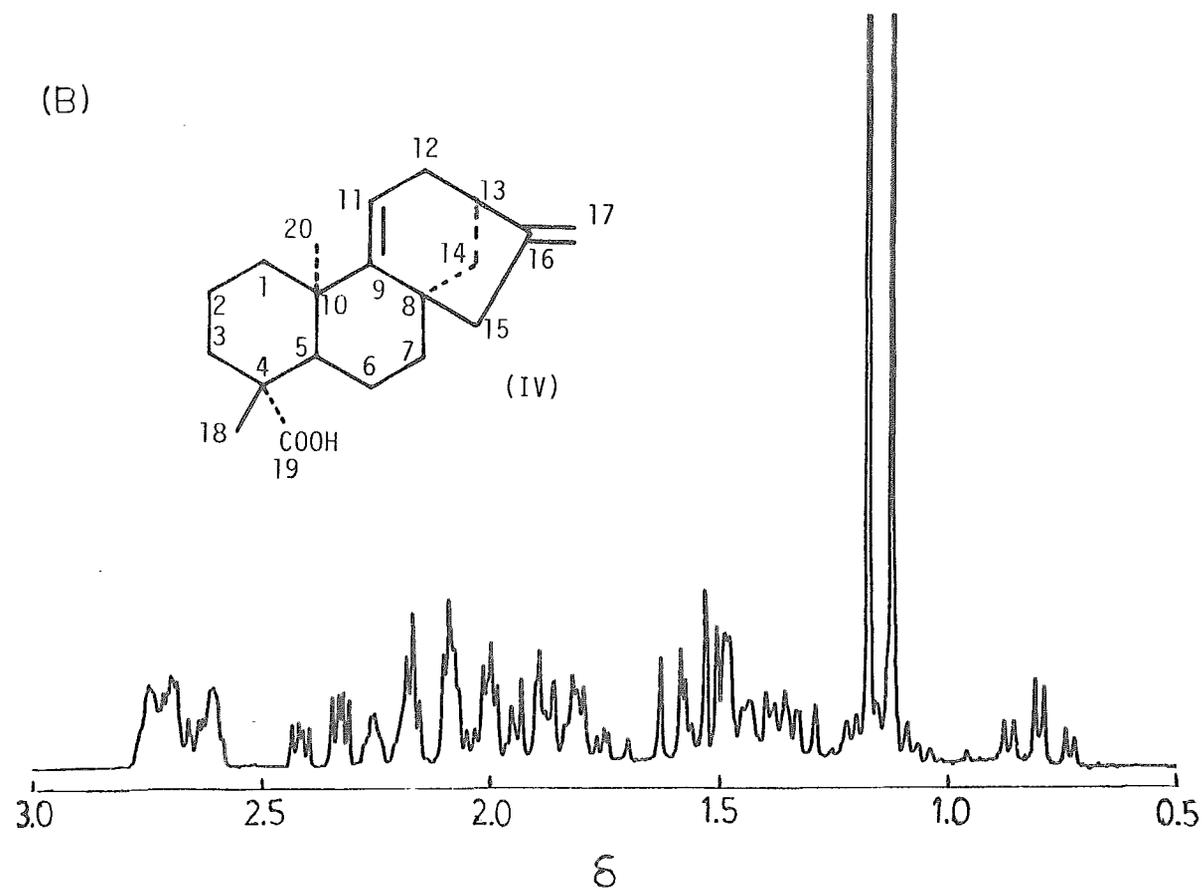
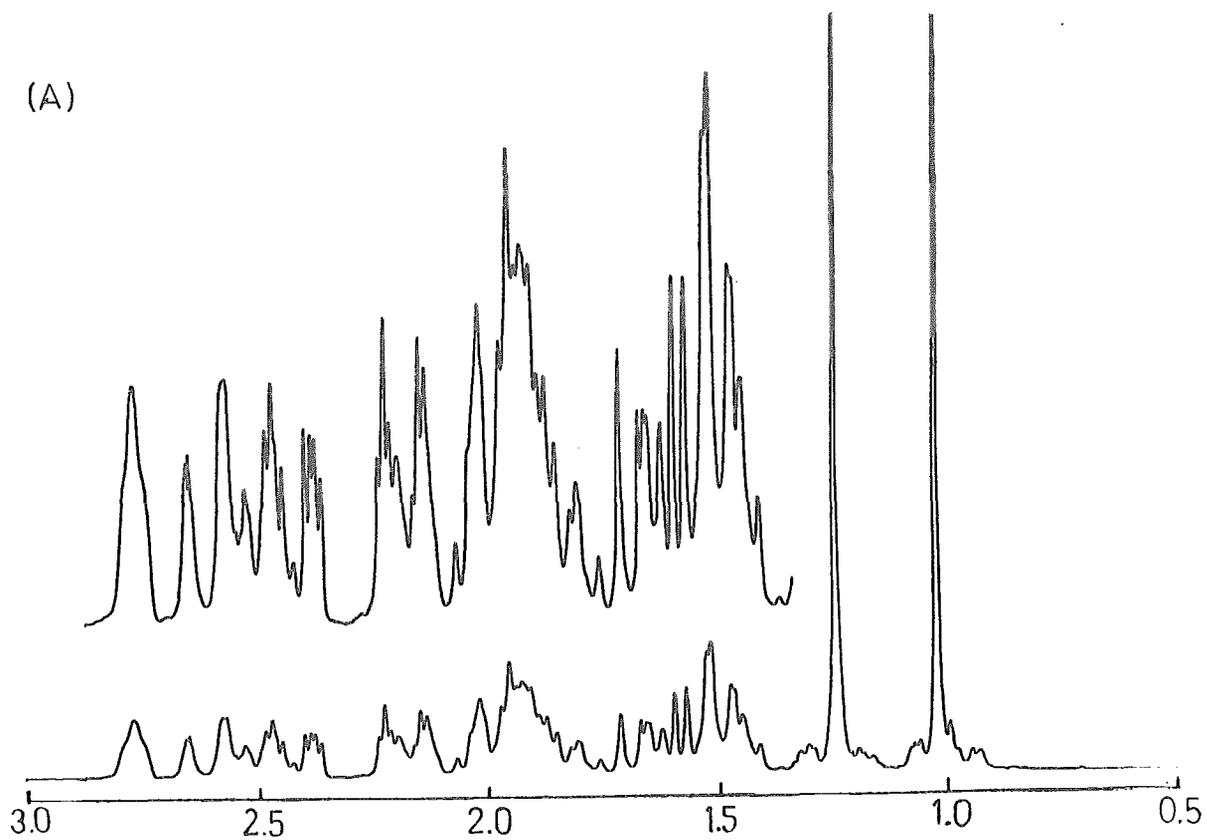


Figura II.1.- Espectros de RMN de ^1H de ácido Grandiflorénico en 200 MHz. (a): cloroformo- d_1 ; (b): benceno- d_6 .

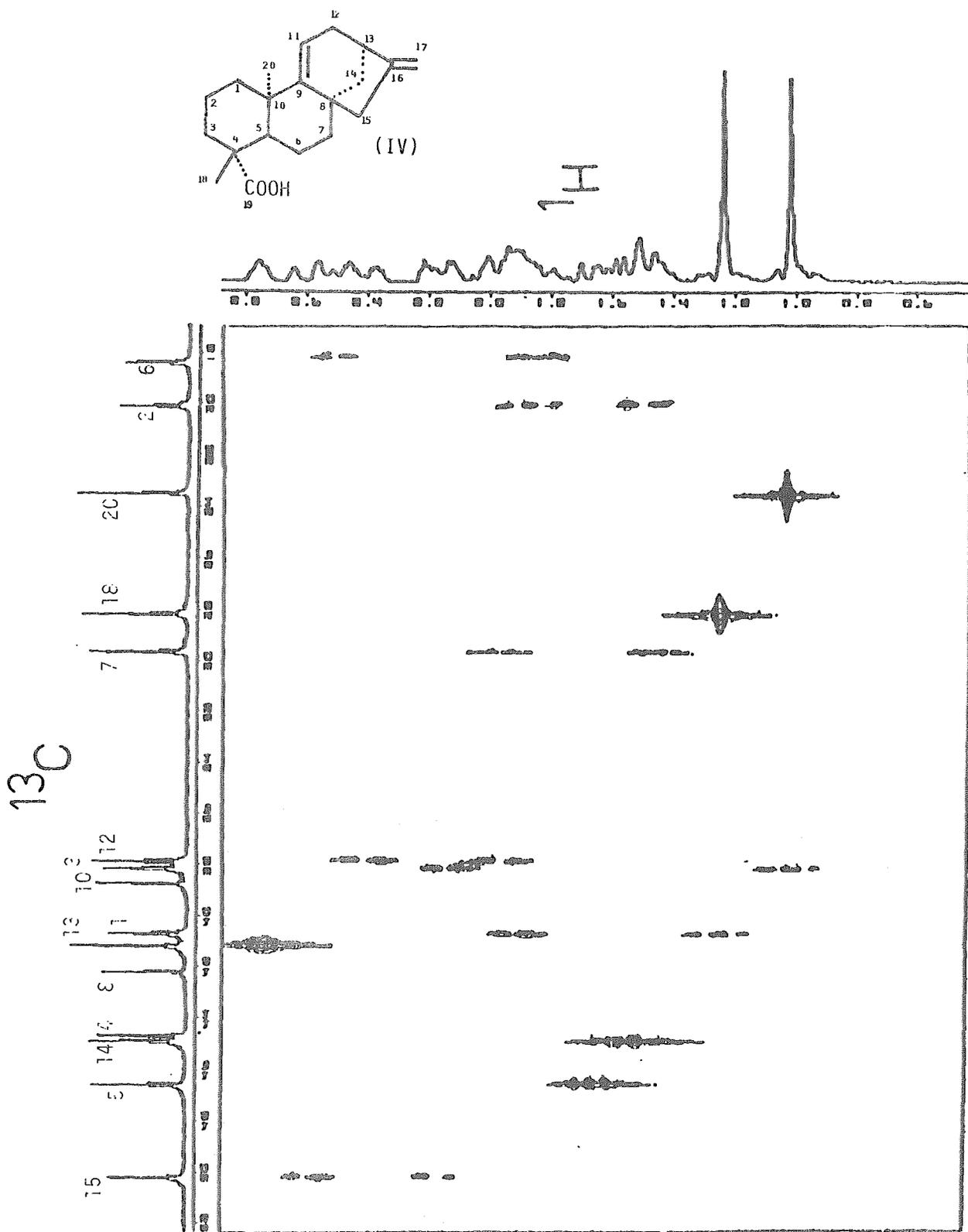


Figura II.2.- Espectro de Correlación Heteronuclear directa (HETCOR) de ácido Grandiflorénico en 200 MHz y CDCl_3 .

ESPECTRO DE CORRELACION PETERONUCLEAR DIRECTA
 DE ACIDO KAURADIENOICO. CDCl_3 , 400 MHz.
 Región de campo alto.

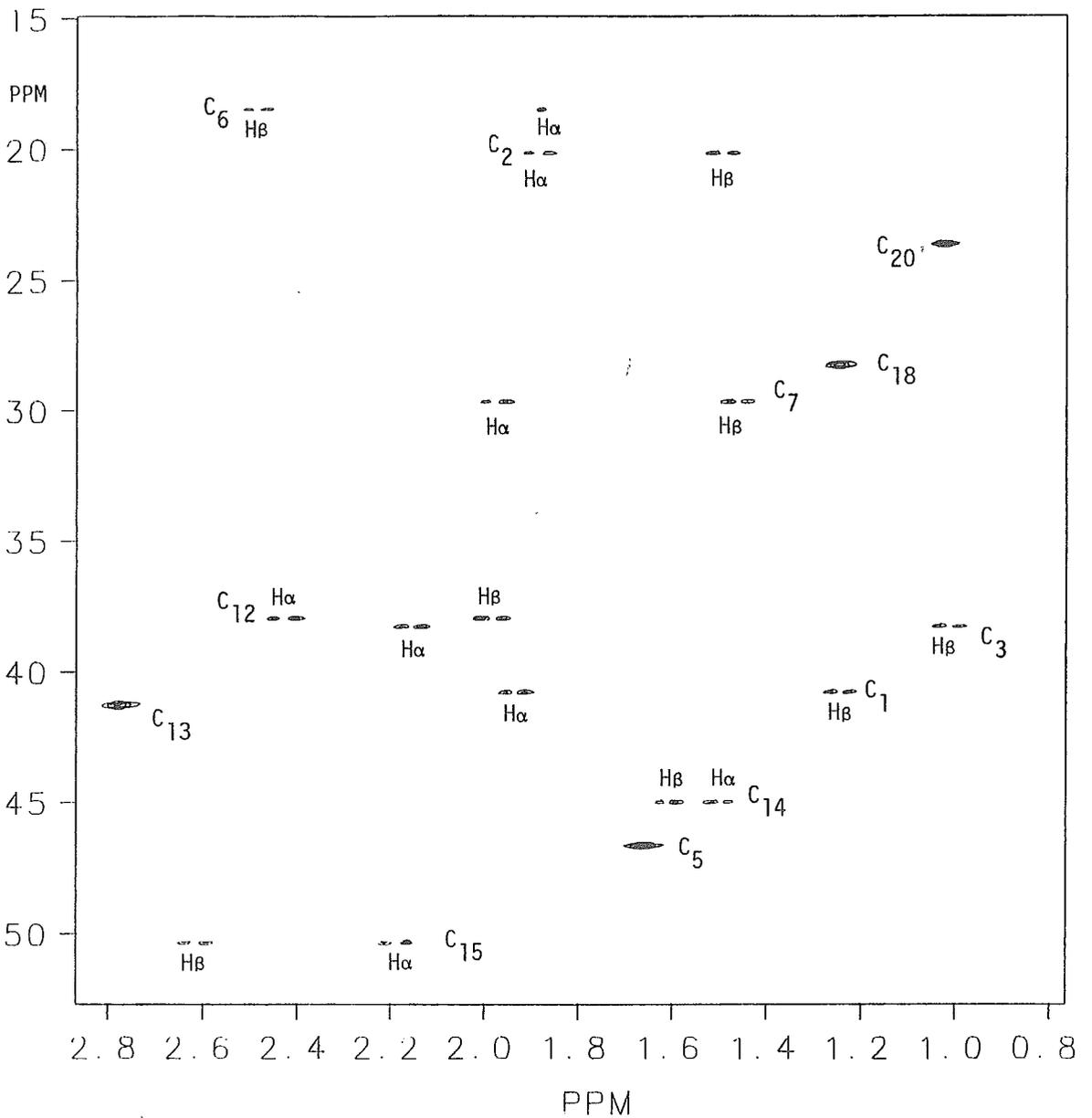
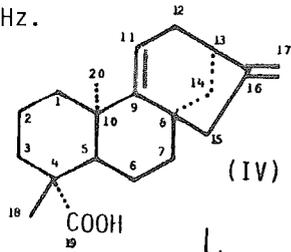
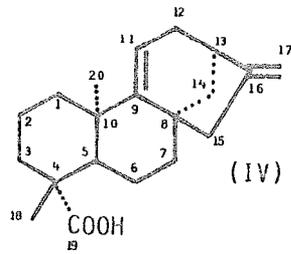


Figura II.3a.- Espectro de Correlación Directa (HETCOR) de ácido Grandiflorénico en 400 MHz y CDCl_3 . Se omite la región de campo alto.

ESPECTRO DE CORRELACION HETERONUCLEAR DIRECTA
 DE ACIDO KAURADIENOICO. C_6D_6 , 400 MHz.
 Región de campo alto.



PPM

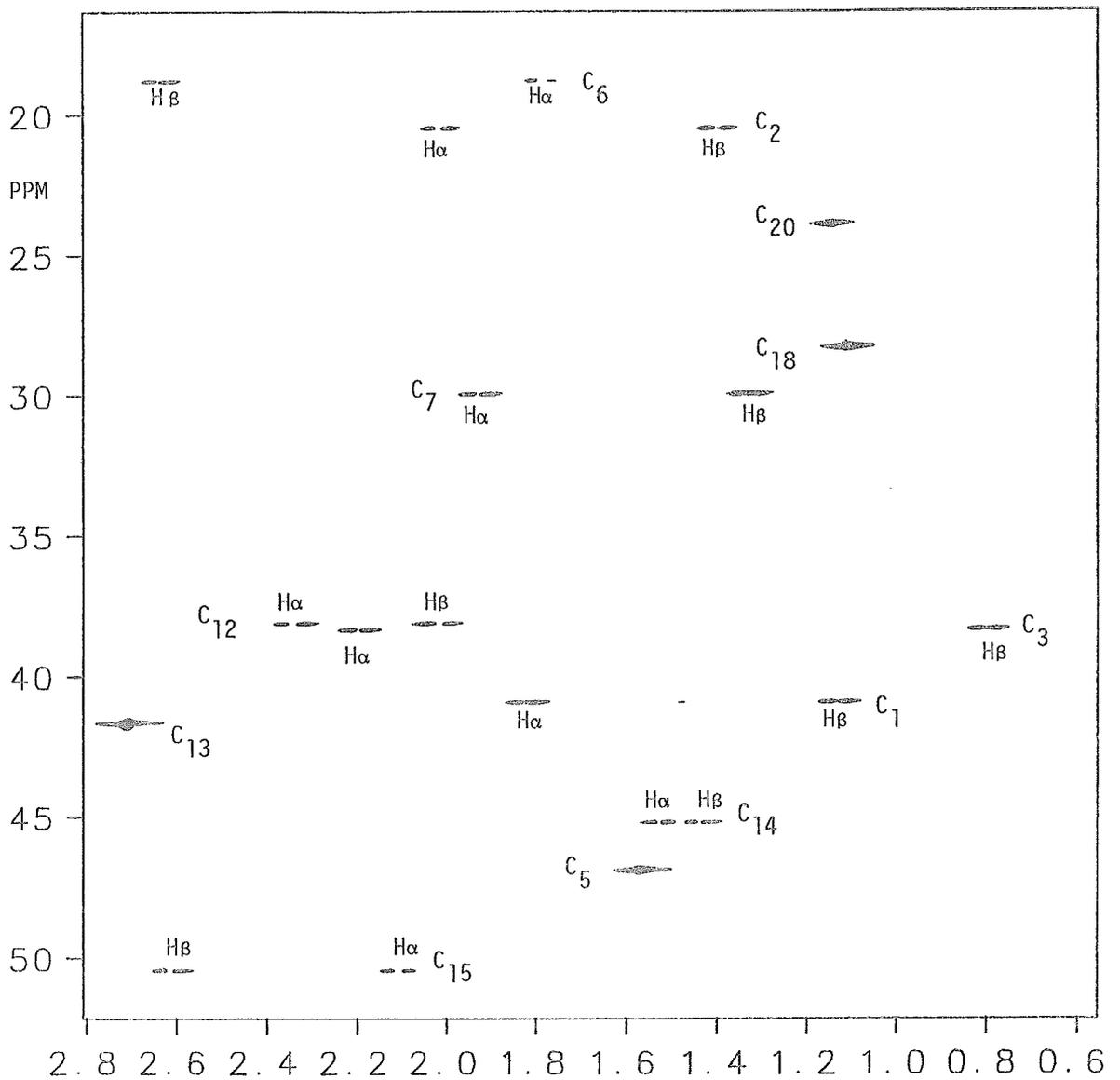


Figura II.3b.- Espectro de Correlación Directa (HETCOR) de ácido Grandiflorénico en 400 MHz y benceno- d_6 . Se muestra solamente la región de campo alto.

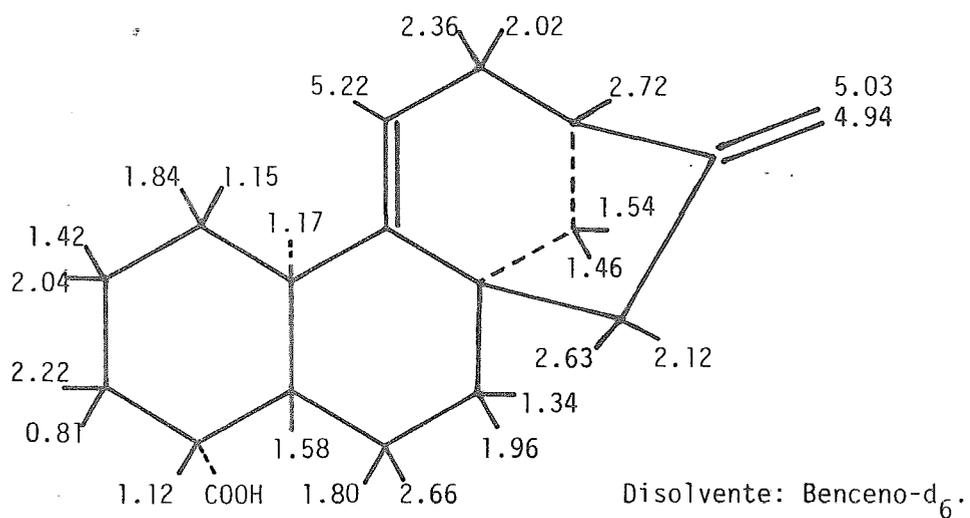
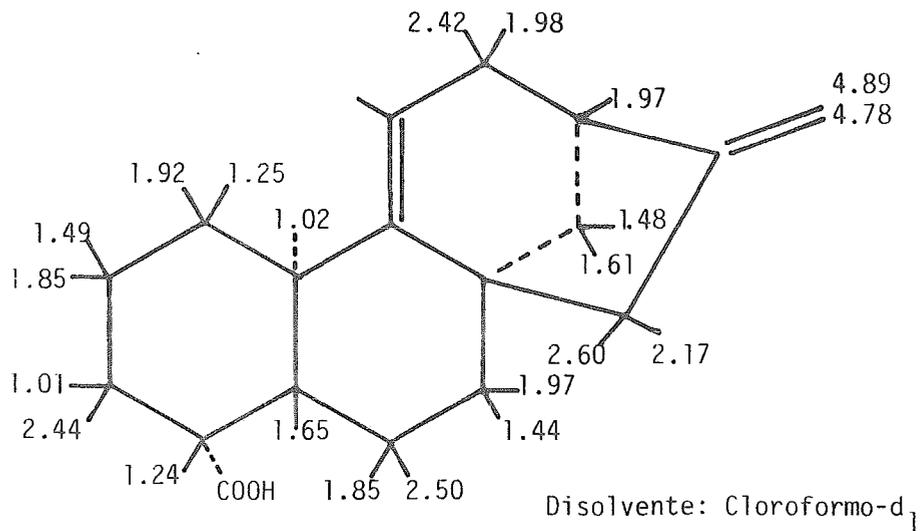


Figura II.A.- Valores de desplazamiento químico del ácido Grandiflorénico observados en 200 MHz en los disolventes señalados.

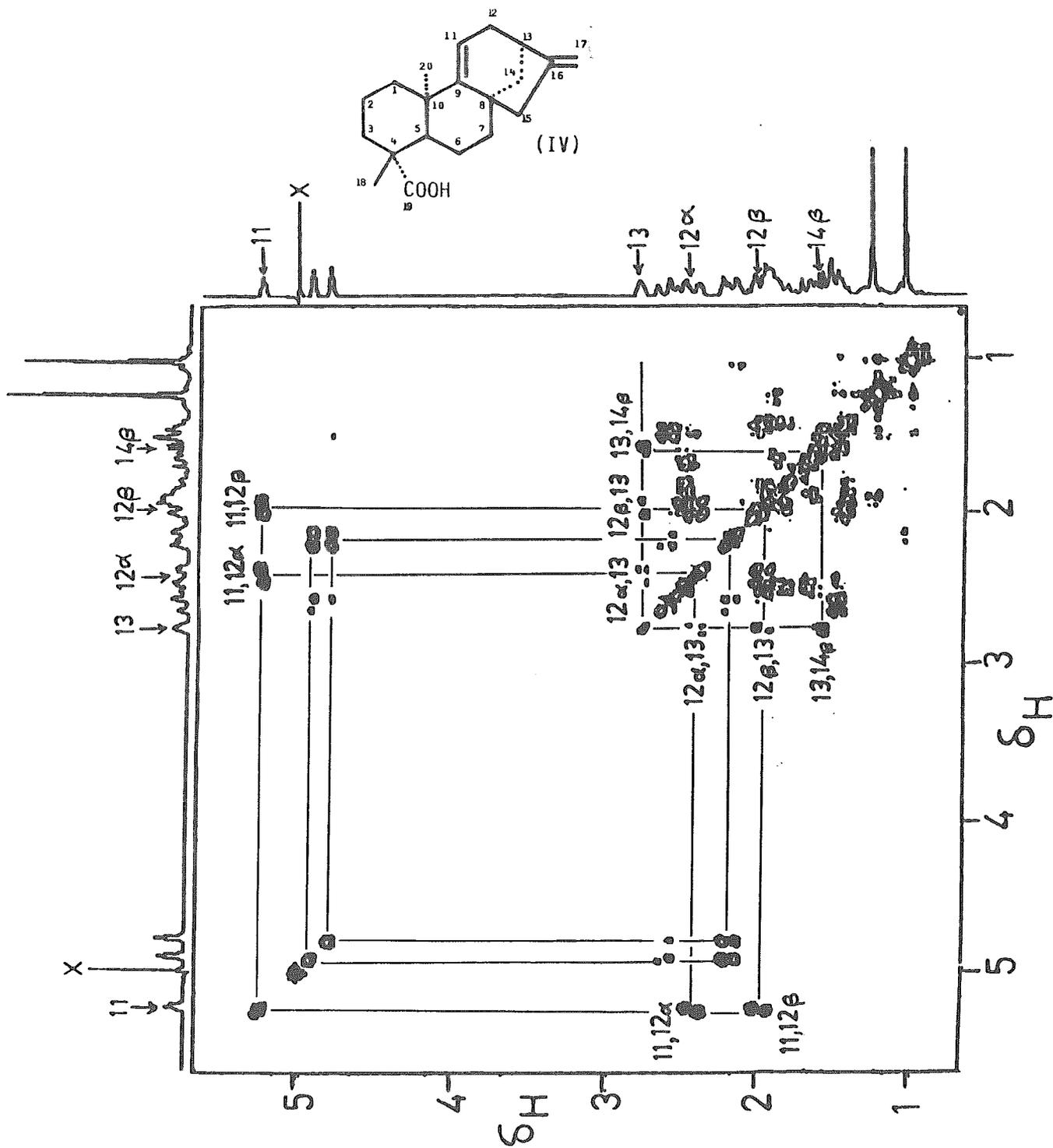


Figura II.4.- Espectro de Correlación Homoescalar (COSY) del ácido Grandiflorénico en 200 MHz y $CDCl_3$.

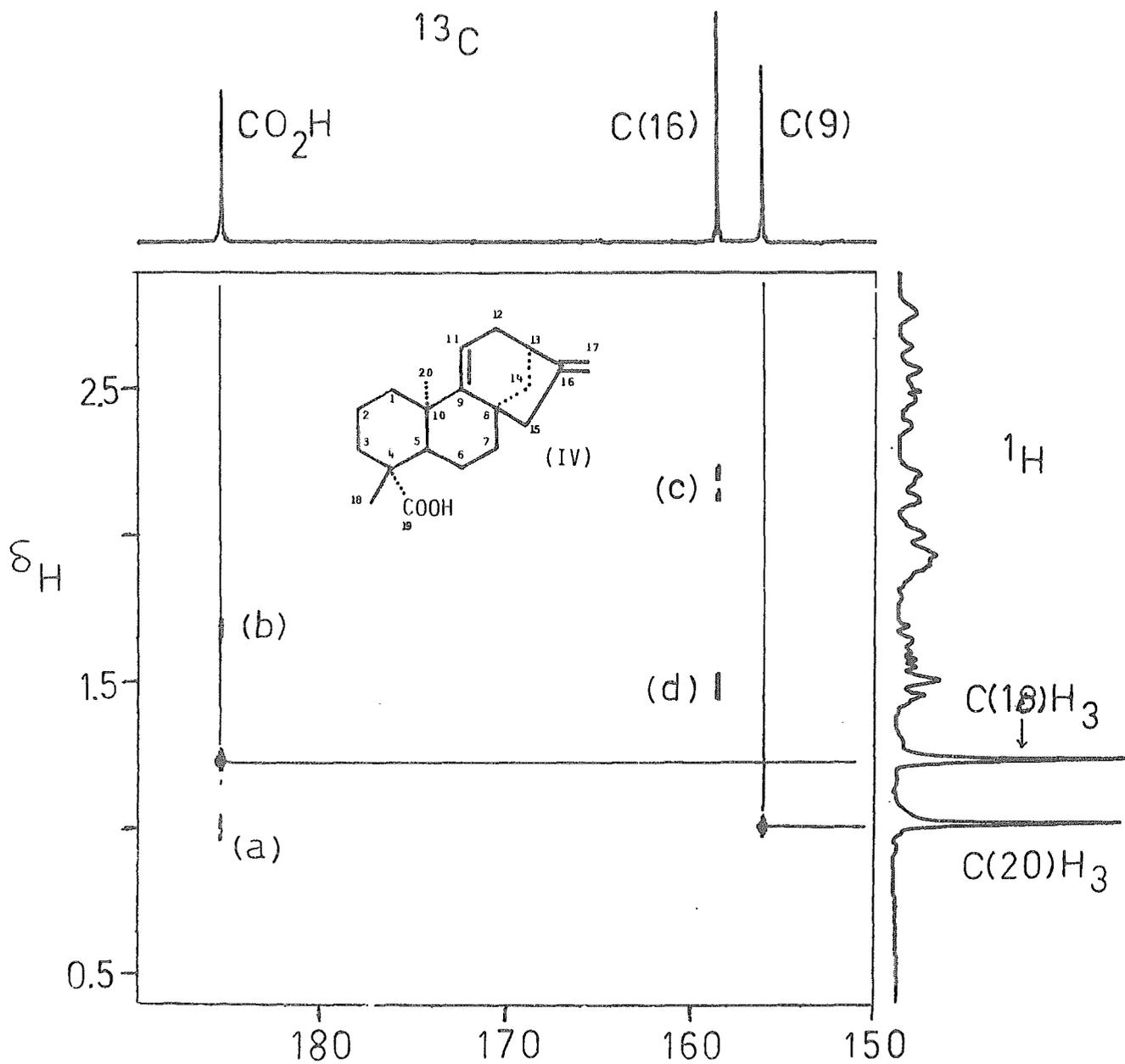


Figura II.5a.- Espectro de Correlación Heteronuclear Indirecta de ácido Grandiflorénico mostrando la región de bajo campo de ^{13}C y su interacción con la región alifática de ^1H . La línea indicada corresponde a las asignaciones de los grupos metilo. Las interacciones a, b, c y d corresponden a: (a) $\text{CO}_2\text{H}-\text{H}(5)$, (b) $\text{CO}_2-\text{H}(3)$ beta, (c) $\text{C}(16)-\text{H}(15)$ y (d) $\text{C}(16)-\text{H}(14)$ alfa.

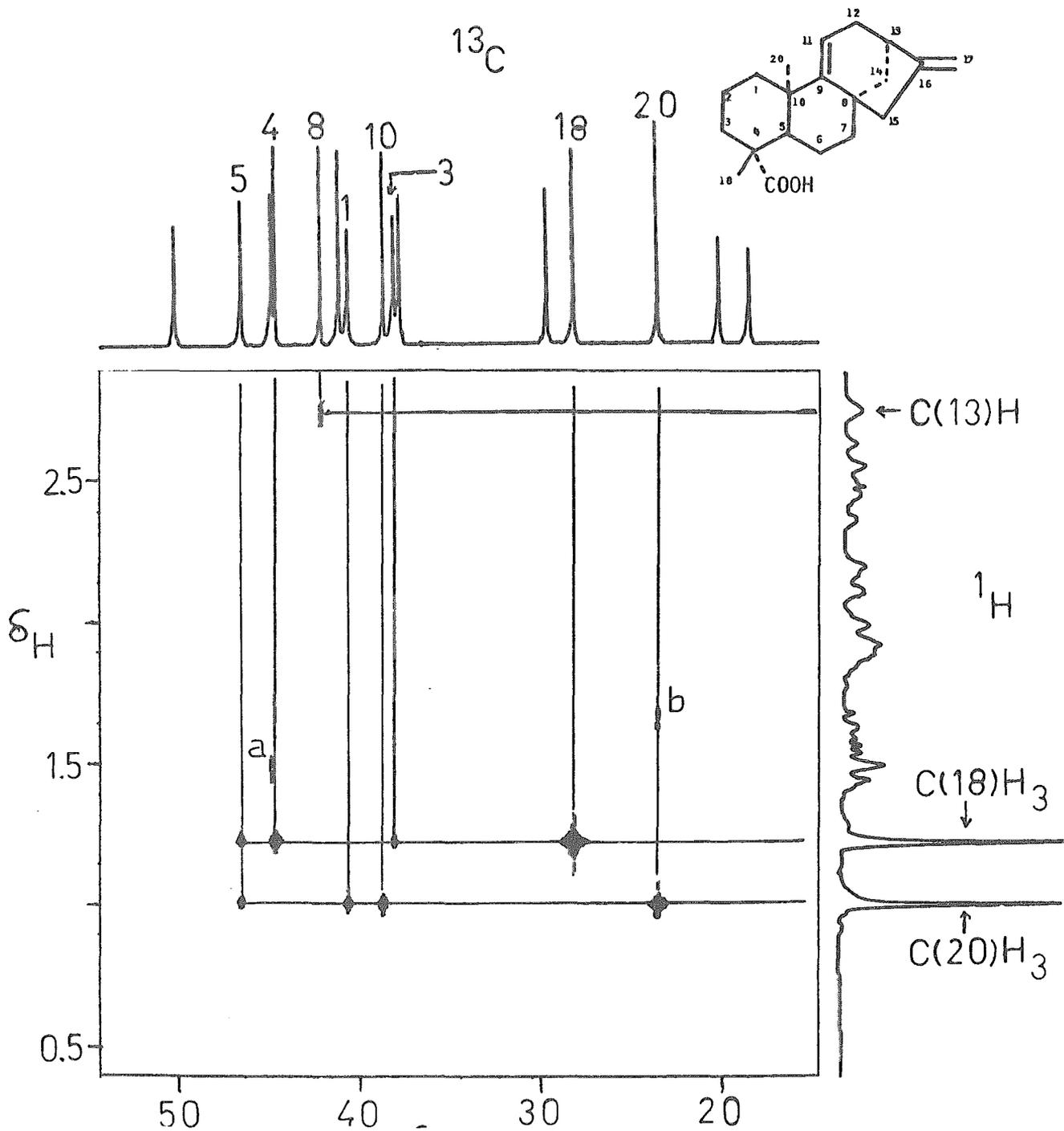


Figura II.5b.- Espectro de Correlación Heteronuclear Indirecta de ácido Grandiflorénico mostrando las interacciones de la región alifática de ^{13}C y ^1H . Las líneas llenas corresponden a las asignaciones y las interacciones (a) y (b) a señales ya conocidas y discutidas en el texto. (a): C(14)-H(7) β ; (b): C(20)-H(5).

Análisis del Espectro de 400 MHz en Cloroformo-d, (Figura II.6).

Las señales de campo bajo corresponden a H-11 y (2)H-17 (cis y trans) con desplazamientos 5.23, 4.91 y 4.79 ppm respectivamente.

H-13 (2.765 ppm) también produce una señal triple por tener un acoplamiento vecinal similar con los hidrógenos del metileno C-12. H-15 (2.60 ppm, d) tiene menor resolución que en el espectro en benceno-d₆ y solamente se observa su acoplamiento (16 Hz).

H-6 (ecuatorial, 2.50 ppm) es una señal múltiple y uno de los protones H-12 (2.42 ppm, ddd, J=17, 5, 3 Hz) muestra todos los acoplamientos gemelos y vecinales posibles siguiendo la regla de multiplicidad de primer orden n+1 con tres protones, produciendo un total de ocho señales. H-15 (2.17, dt, J=16, 3 Hz) y H-3 (2.14, dm, J=14, 4 Hz) aparecen parcialmente sobrepuestos.

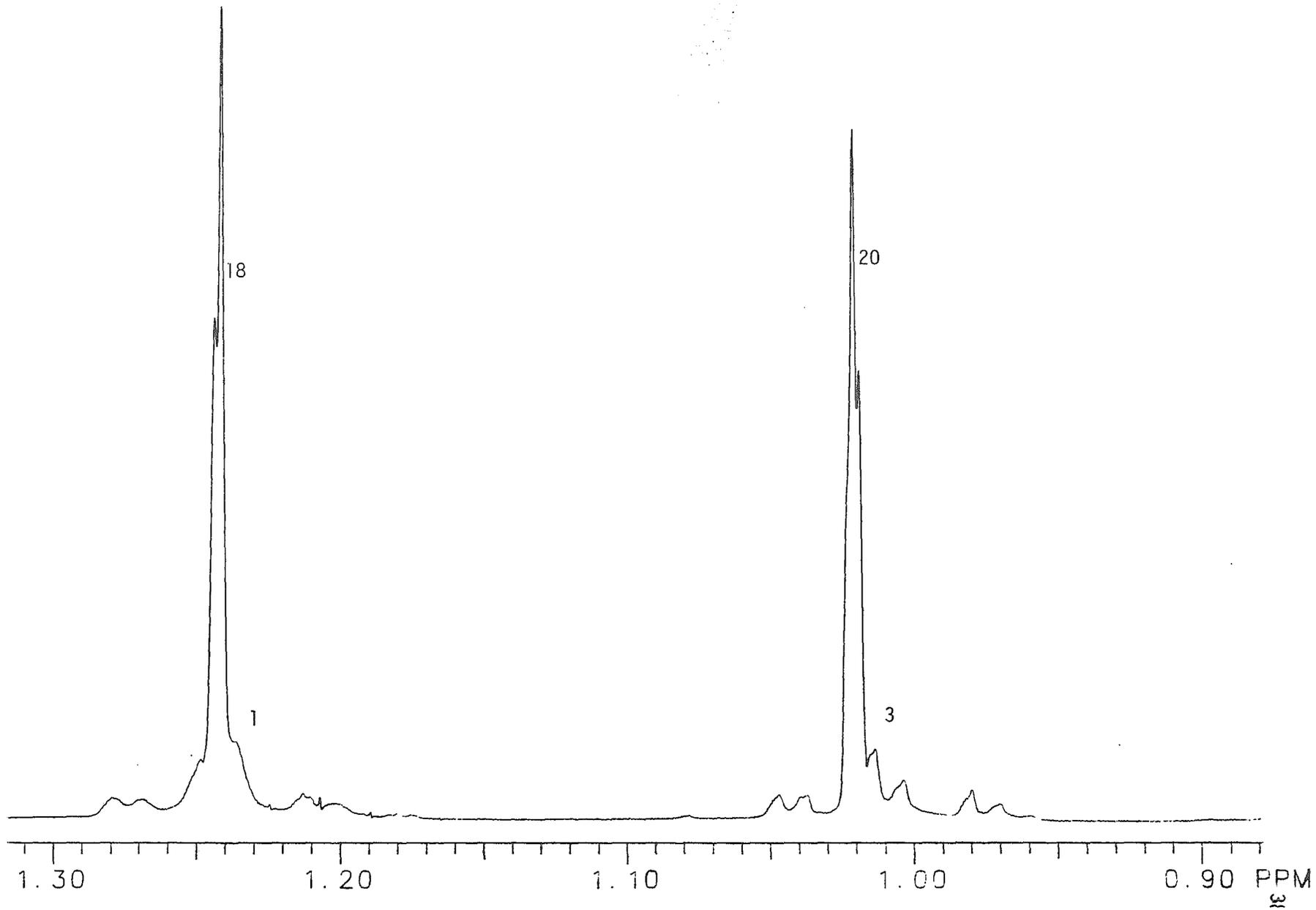
Entre 2.2 y 1.80 ppm se observa una señal múltiple correspondiente a cinco protones cuyos desplazamientos no son discernibles de este espectro. Estos sin embargo, fueron obtenidos del espectro HETCOR y son respectivamente 1.98, 1.97, 1.92, 1.89 y 1.85 ppm.

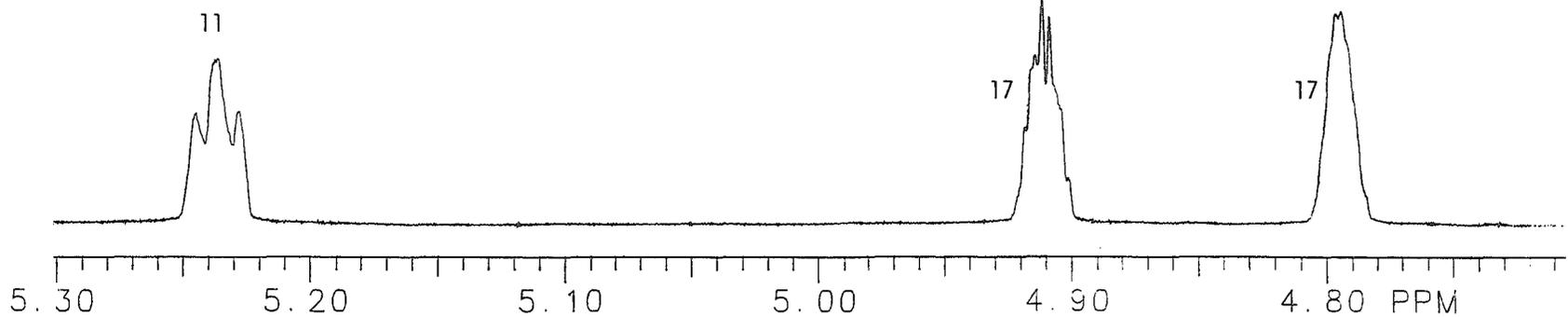
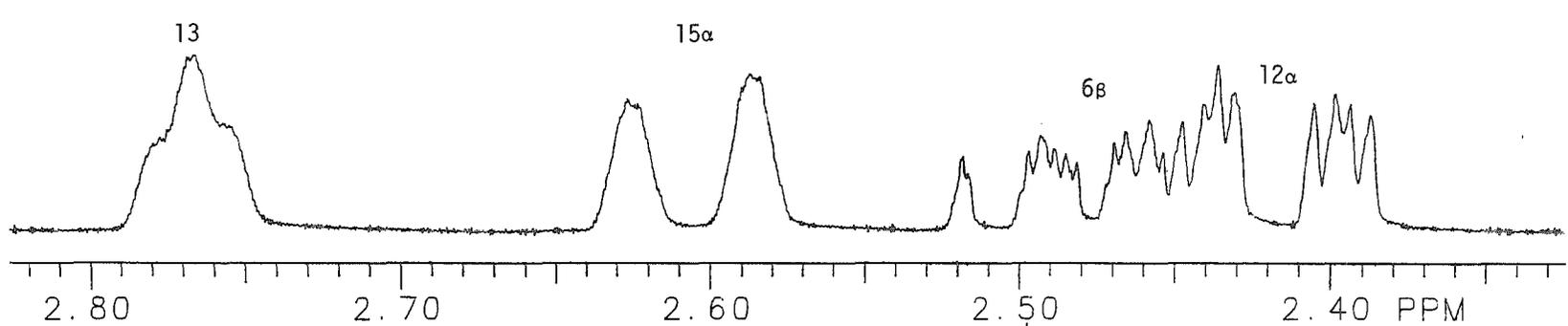
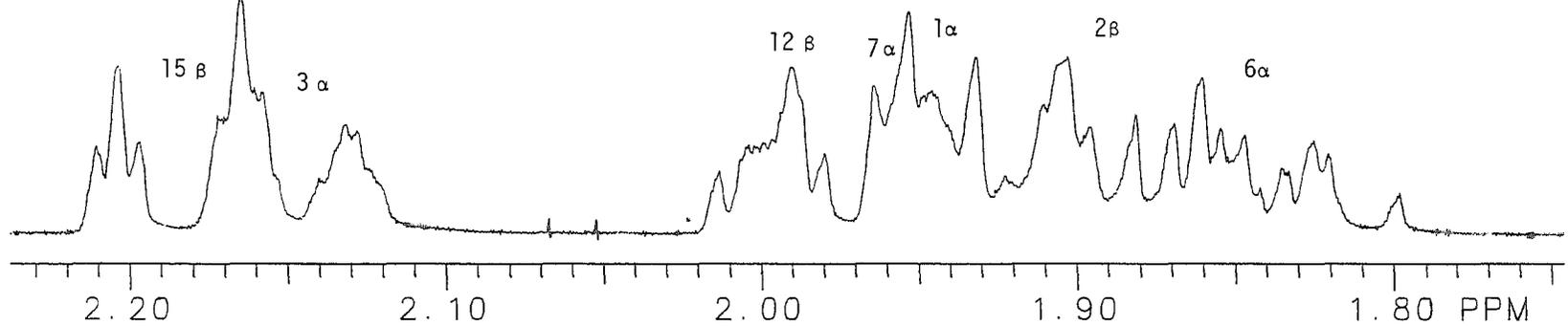
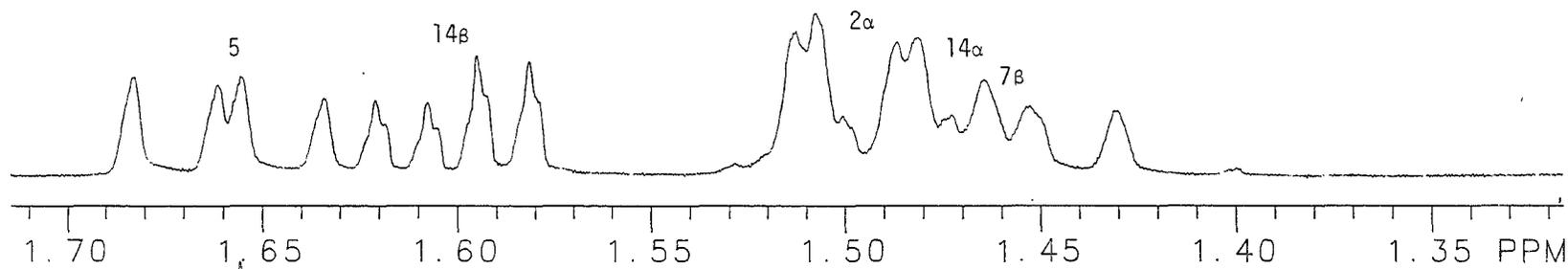
H-5 (1.65, dd, J=11, 9 Hz), H-14 alfa (1.61, ddd, J=11, 6, 1 Hz) y H-14 beta (1.48, dd, J=11, 2.5 Hz) son discernibles en la región de baja frecuencia, mientras que H-2 (1.49 ppm) y H-8 (1.44 ppm) no pueden ser distinguidos claramente en el espectro.

Finalmente, H-1 (1.25 ppm, dt) y H-3 (1.01, dt, J=14, 4 Hz) tienen sobrepuestas las señales de los grupos metilo C-18 y C-20 respectivamente.

s=señal sencilla o singulete, d=doble o doblete, t=triple o triplete, dd=doble de dobles, dt=doble de triples, m=múltiple o multiplete.

Figura II.6.- Espectro de ^1H de ácido Grandiflorênico.
400 MHz, CDCl_3 .





Análisis del Espectro de 400 MHz en Benceno- d_6 (Figura II.7).

Las señales del espectro de RMN de 400 se analizan a continuación en el sentido de mayor a menor frecuencia.

En 5.195 ppm se encuentra la señal de H-11. Su forma es aproximadamente de un triple porque sus acoplamientos vecinales con los dos hidrógenos de C-12 son muy similares.

En 5.01 y 4.93 aparecen los dos hidrógenos del metileno terminal, anchas, debido a los acoplamientos alílicos.

En 2.72, H-13 produce una señal triple. En 2.66 y 2.63 aparecen como un múltiple sobrepuesto, las señales de H-15 y H-6 cuyo acoplamiento no es discernible directamente del espectro.

Los hidrógenos H-12 ($J=16, 5$ y 3 Hz), H-3 ($J=13.5$ Hz) y H-15 ($J=16, 3$ Hz) se observan como ddd, dm y dt respectivamente. H-12 (2.02 ppm) y H-2 (2.04 ppm) se encuentran sobrepuestos. H-7 (1.96 ppm), H-1 (1.84 ppm) y H-6 (1.8 ppm) (desplazamientos establecidos mediante HETCOR) conforman un grupo de señales complejo.

H-5 (1.58 ppm, $J=11, 9$ Hz), H-14 alfa (1.54 ppm, $J=11, 6, 1$ Hz) y H-14 beta (1.46, dd, $J=11, 3$ Hz) son ambos dd.

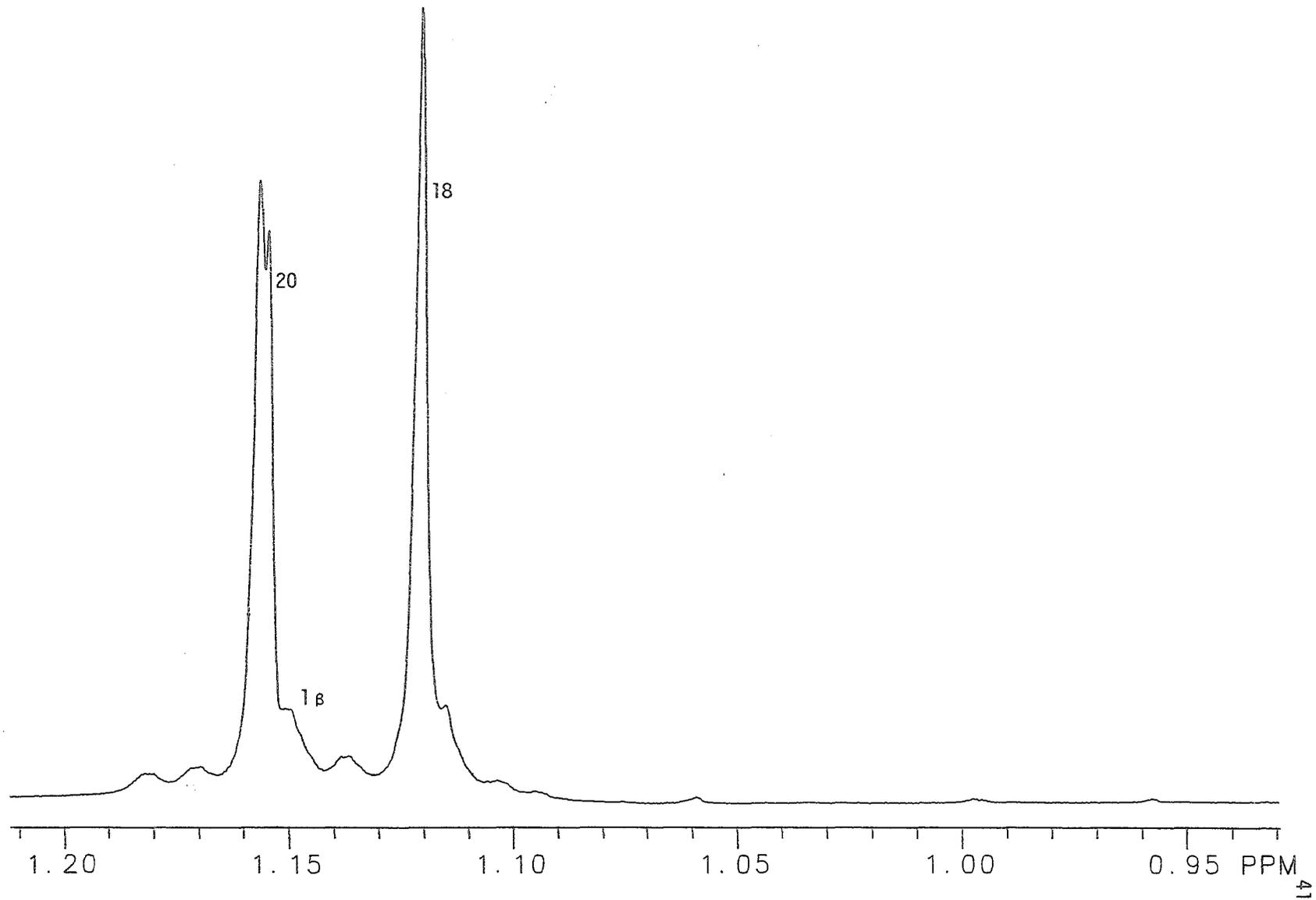
H-2 (1.405 ppm, $J=11, 3$ Hz) y H-7 (1.34 ppm, dd, $J=13, 9$ y 1.8 Hz) producen señales anchas pero discernibles.

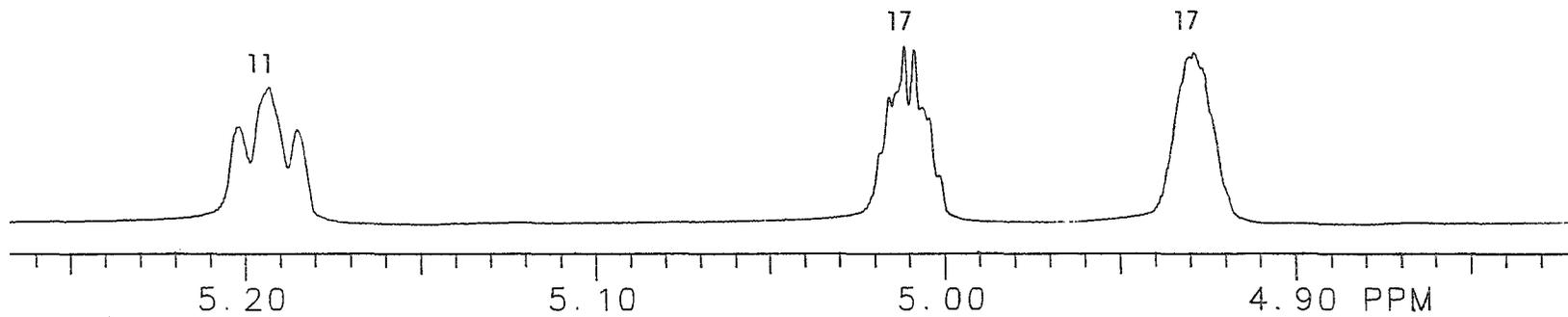
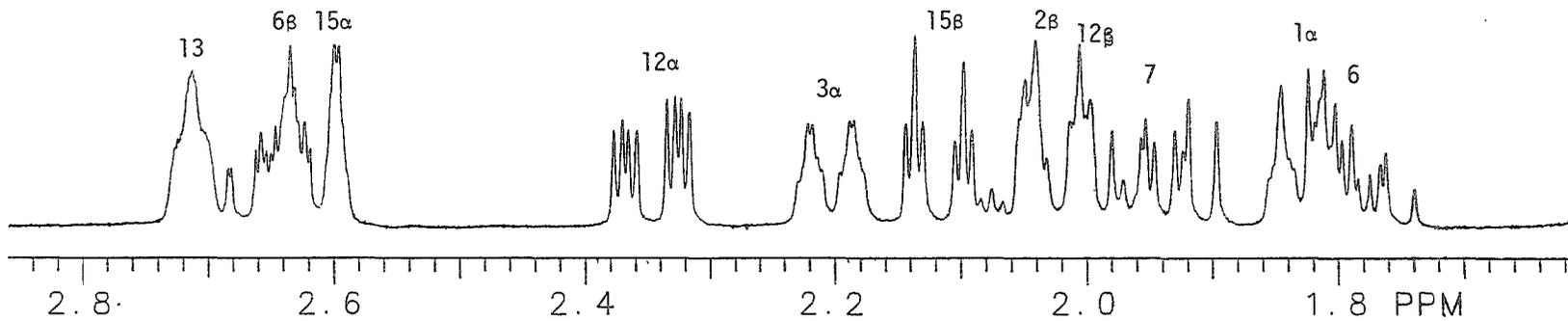
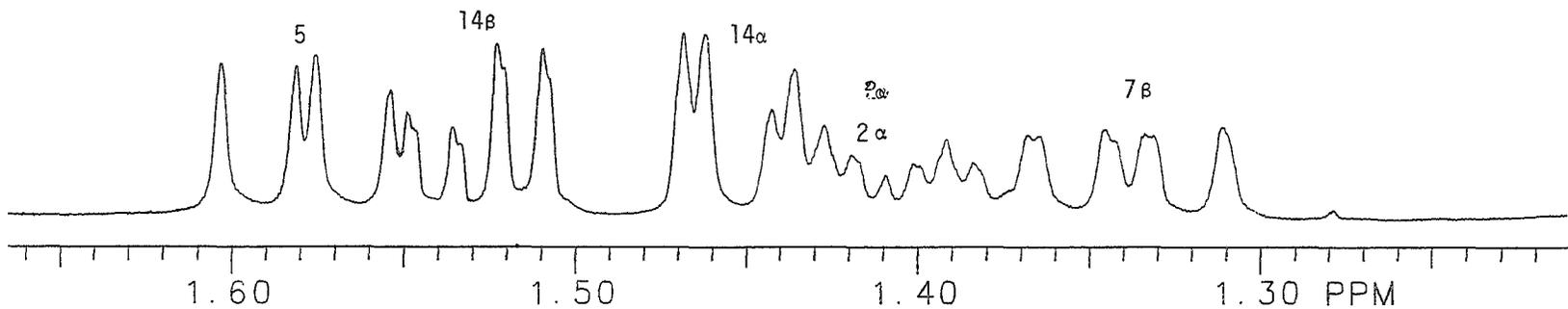
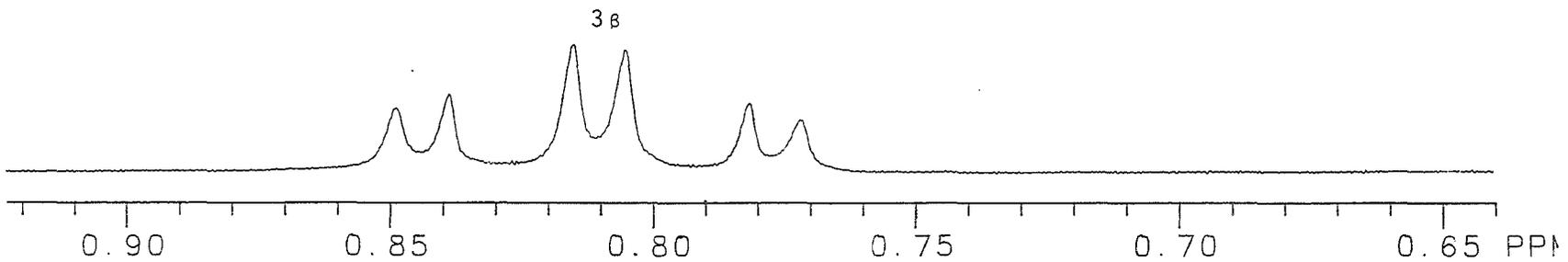
En 1.155 aparece H-1 con una señal de CH_3 (C-20) sobrepuesta y finalmente se observa C-18 en 1.12 ppm. Debe hacerse notar que la posición relativa de los metilos se revierte al pasar de benceno a cloroformo, siendo más afectado C-18. Esto se debe a que los más drásticos efectos anisotrópicos causados por el disolvente, ocurren cerca del sitio de asociación más fuerte entre éste y el soluto, en este caso, el grupo carboxilo.

H-3 (0.81 ppm, dt, $J=13.5, 4$ Hz) se observa en un valor de frecuencia particularmente bajo (alto campo), también como resultado de efectos anisotrópicos muy eficientes de la molécula de benceno que se asocia con el protón ácido del grupo carboxilo.

En la figura II.7 se ilustra con sus respectivos valores numéricos de desplazamiento químico a los hidrógenos de cada posición en la molécula.

Figura II.7.- Espectro de ácido Grandiflorênico.
400 MHz, bençeno-d₆





Análisis del espectro COSY de 400 MHz en cloroformo-d₁. (Figuras II.8 a,b,c,d)

Conectividad de los hidrógenos 11, 12 y 13 (Figura II.8a).

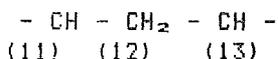
La señal de campo más bajo, en 5.5 ppm corresponde al protón vinílico H-11. Sobre la diagonal se encuentra un contorno con ese desplazamiento. Tanto en el sentido vertical como en el horizontal, a partir de éste, se encuentran otros contornos que revelan las conectividades de dicho núcleo con sus vecinos. Asimismo, la posición de los otros contornos corresponde al desplazamiento químico de los núcleos que participan en la interacción.

Las interacciones se confirman al unir los contornos simétricos sobre la vertical y la horizontal, definiendo "cuadros de conectividad". Así, de la Tabla II.1, se puede deducir lo siguiente:

a) se sabe que existe un grupo =CH, cuyo hidrógeno tiene su señal en 5.5 ppm.

b) existe un CH₂ (¹³C = 37.91 ppm) cuyos hidrógenos se encuentran en 1.98 y 2.42 ppm. La horizontal trazada a partir del contorno sobre la diagonal en 5.5, muestra los contornos de interacción precisamente sobre estos dos desplazamientos reflejando de esta manera la interacción del C-H con los dos hidrógenos alfa y beta del metileno vecino. Con ello se define un cuadro de correlación inicial.

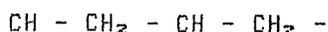
c) este metileno tiene a su vez otras interacciones con un grupo vecino protonado como puede observarse a lo largo de las verticales en 1.9 y 2.42 ppm. Ambos contornos, también simétricos, forman parte de un segundo cuadro de correlación que involucra la señal sobre la diagonal en 2.77 ppm. En la Tabla II.1, se encuentra un C-H cuyo ¹H tiene precisamente ése desplazamiento. Con ello, se identifica el tercer grupo CH_n, y se define el fragmento:



A partir de estos datos se pueden buscar conectividades adicionales:

Conectividad H-12, H-13, H-14 y H-15. (Figura II.8b):

d) Al prolongar la vertical y horizontal a partir del contorno en la diagonal en 2.77, se genera un nuevo cuadro de correlación involucrando dos nuevos contornos en 1.48 ppm y en 1.61 (este último se observa al aumentar la ganancia del espectro y solo se indica en el espectro). Estos dos a su vez, tienen una interacción clara y definen otro cuadro de correlación. Al revisar la Tabla II.1 se corrobora que existe un metileno cuyos hidrógenos tienen ésos desplazamientos. Con ello se establece la cuarta conectividad que permite la postulación del fragmento:



faltando asignar el otro grupo que está unido al penúltimo metino sp³. Dado que no se observa otra correlación de este, aun empleando ganancias mayores, puede asumirse que se encuentra unido a un carbono cuaternario.

Cabe recordar que los carbonos cuaternarios no producirán ningún contorno en el espectro de correlación heteronuclear directa (HETCOR) mientras que en el de correlación indirecta si pueden mostrar su interacción a dos y tres enlaces con hidrógenos más lejanos.

Conectividad de los metilenos H-14 y H-15. (Figura II.8c)

Siguiendo la misma línea de razonamiento, el contorno en 1.48 define un cuadro de correlación con el contorno sobre la diagonal en 2.60 ppm y a su vez, se observa la siguiente correlación de este último con el contorno en 2.17. Ambas, corresponden a los desplazamientos químicos de los hidrógenos del metileno C-15 como se ve en la Tabla II.1, solo se aprecia el acoplamiento del CH₂-15 con uno de los hidrógenos de C-14 ya que el experimento está optimizado para la detección de constantes de acoplamiento mayores a 5-6 Hz. En consecuencia, uno de los hidrógenos de C-14 tiene acoplamientos muy pequeños o nulos con los hidrógenos de C-15.

Conectividad H-15 - H-17 (Figura II.8d).

Como puede apreciarse la Tabla II.1, los dos protones en 4.78 y 4.89 ppm forman parte de un grupo metileno (C-17) de tipo sp². Ambos protones forman entre sí el cuadro de correlación correspondiente. Además, ambos muestran una conexión común adicional con otros dos protones en 2.60 y 2.17 ppm, que corresponden a los desplazamientos de los protones de C-15.

La conectividad de H-1, H-2 y H-3 es mejor observada en el espectro COSY determinado en benceno y se discute mas adelante.

Figura II.8.-
 ESPECTRO COSY DE
 ACIDO GRANDIFLORENICO
 400 MHz, CDCl_3 .
 CONECTIVIDAD ^1H : 11,12 y 13

PPM

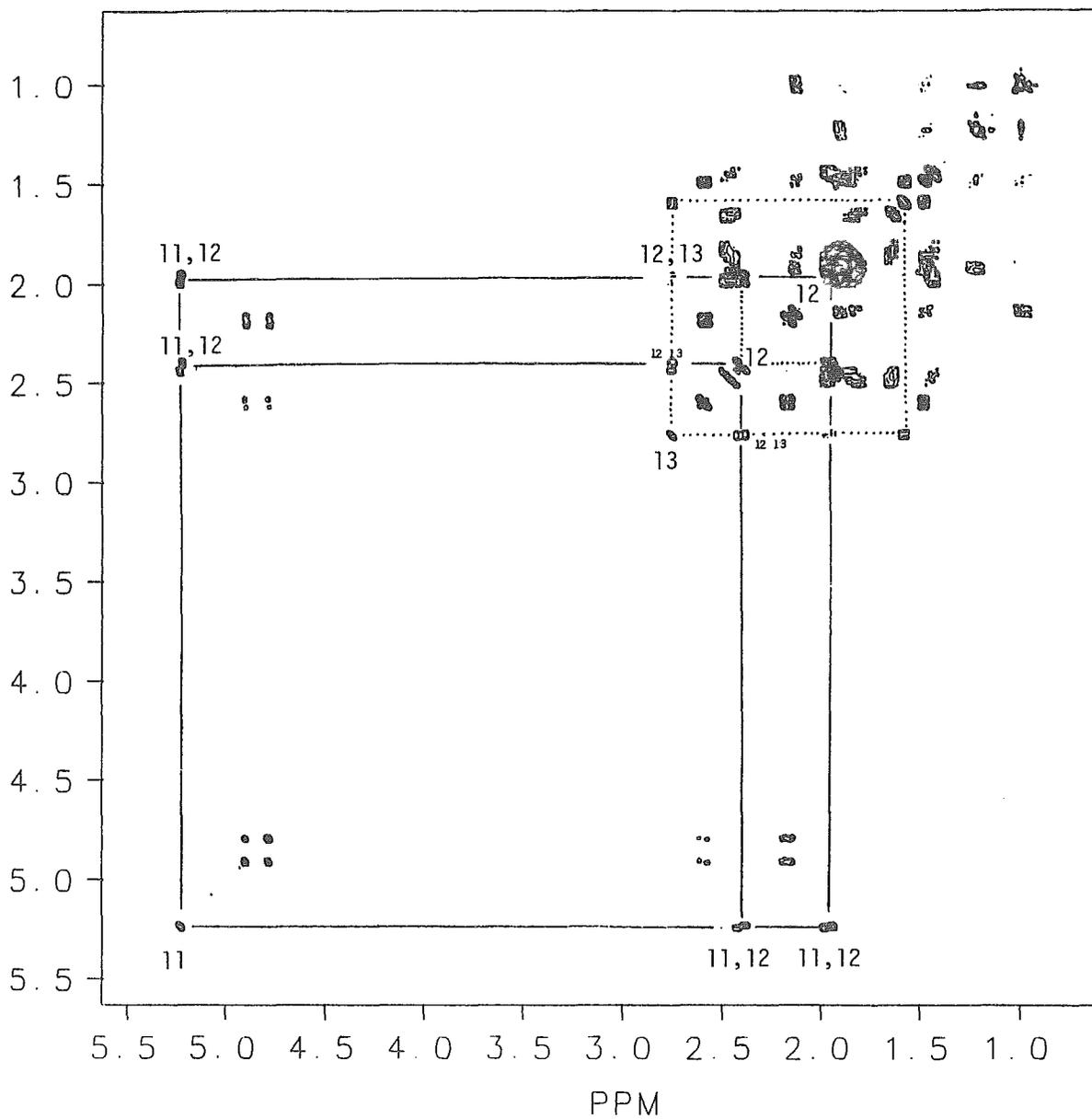
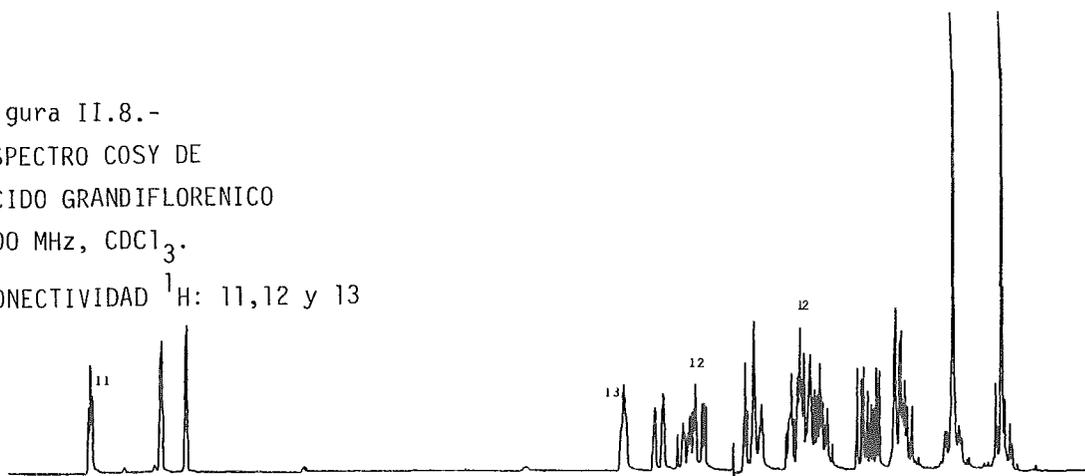


Figura II.8 (c)
 ESPECTRO COSY DE
 ACIDO GRANDIFLORENICO
 400 MHz, CDCl_3
 CONECTIVIDAD ^1H :
 14,15

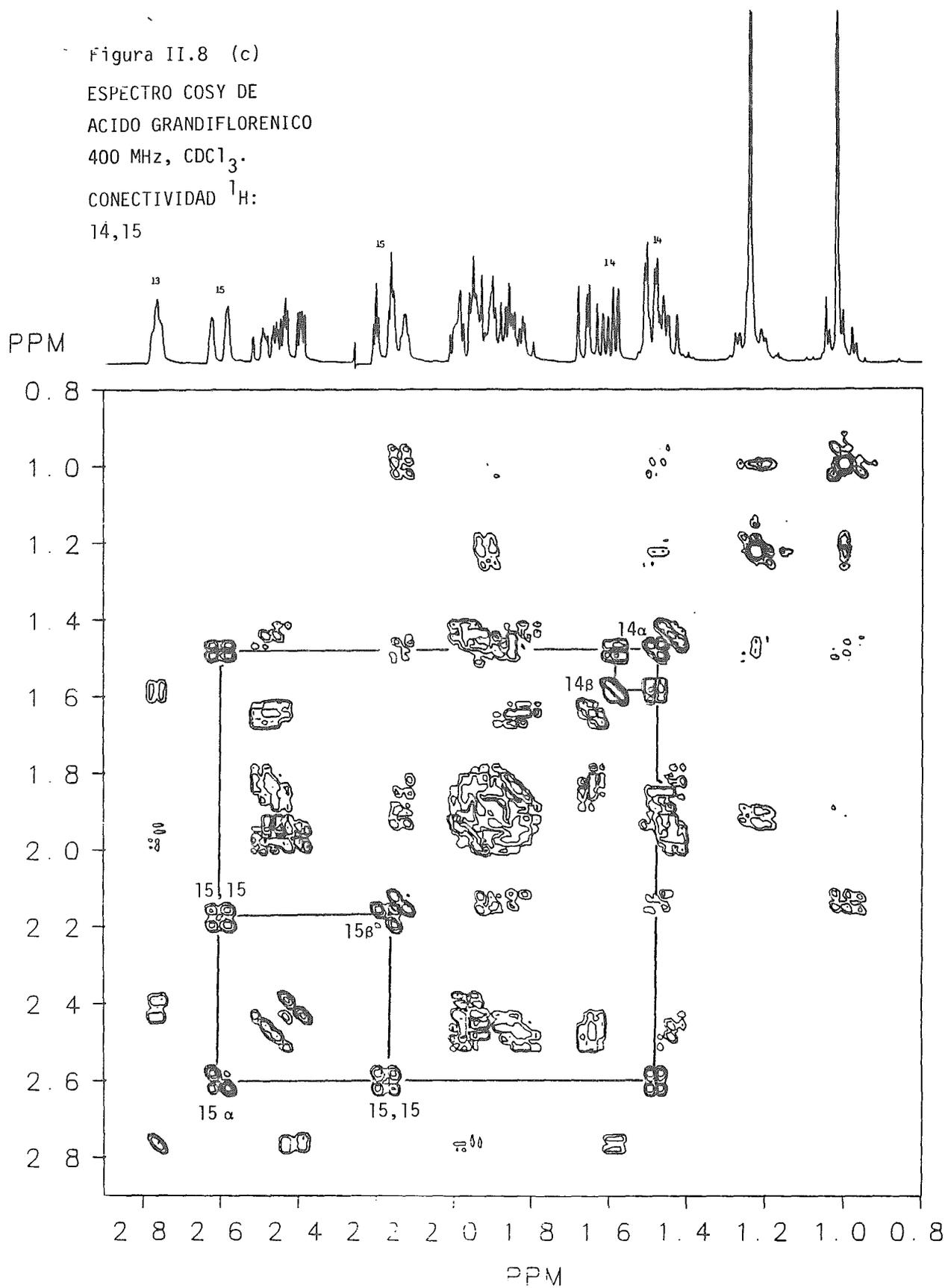
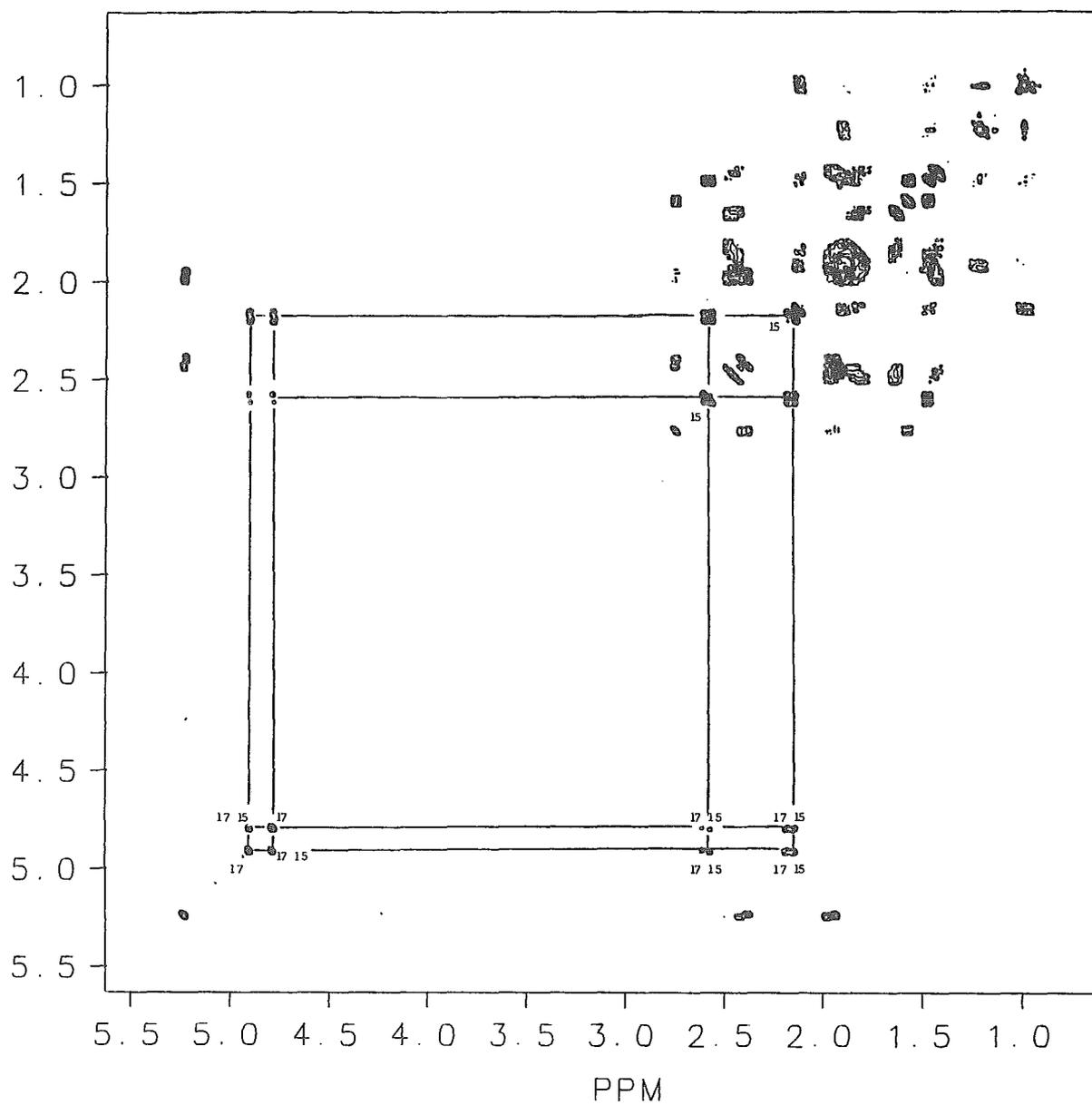
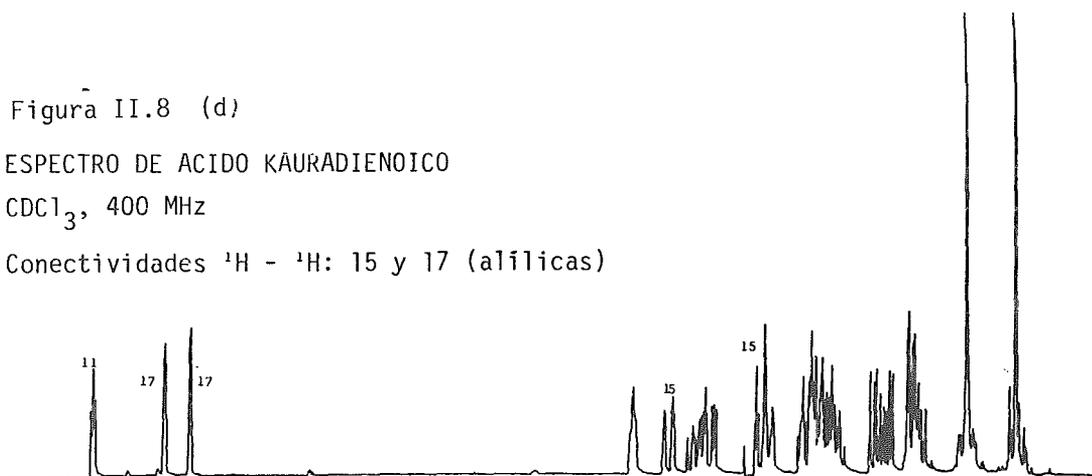


Figura II.8 (d)

ESPECTRO DE ACIDO KAURADIENOICO

CDCl₃, 400 MHzConectividades ¹H - ¹H: 15 y 17 (alilicas)

PPM.



Análisis del espectro COSY de 400 MHz en benceno-d₆. (Figuras II.9 a,b,c,d)

La información sobre la cantidad y tipo de núcleos de carbono y de hidrógeno se obtiene con relativa facilidad del espectro de carbono totalmente desacoplado, del espectro DEPT y del experimento HETCOR directo. Estos datos se muestran en la Tabla II.2 a continuación:

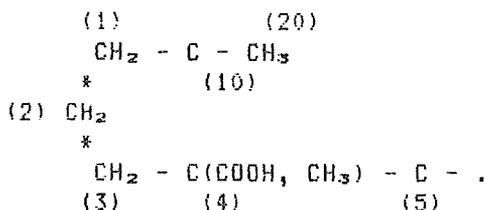
TABLA II.2

GRUPOS	NUMERO	HIBRIDACION
CH ₃	2	2 sp ³
CH ₂	9	8 sp ³ y 1 sp ²
CH	3	2 sp ² y 1 sp ²
C	6	3 sp ³ , 2 sp ² y 1 COOH

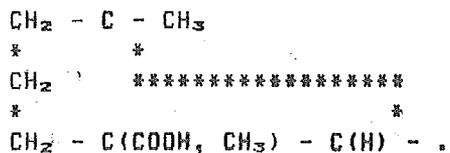
Conectividad de los metilenos 1, 2 y 3 (Figuras II.9a y II.9b).

La búsqueda de conectividades puede iniciarse a partir de la señal en 0.81 ppm. Esta corresponde a uno de los hidrógenos de un metileno cuyo carbono se encuentra en 38.36 ppm y muestra un cuadro de correlación bien definido con otra señal sobre la diagonal en 2.22 ppm (el del otro hidrógeno). Esas dos señales corresponden a la posición de los hidrógenos del metileno en la posición 3 (Tabla II.1. y fueron asignadas como 3-beta y 3-alfa respectivamente. El último muestra conexiones ulteriores a través de sus contornos sobre la horizontal con los siguientes desplazamientos : 2.04, 1.84 y 1.42 ppm. Los contornos en 2.04 y 1.42 corresponden a los desplazamientos de los dos hidrógenos de otro metileno (C-3) unido al primero (C-2), uno beta y otro alfa. En el cuadro de correlación que une a ambos, se encuentran otros dos contornos en 1.84 y 1.15, y que corresponden a los desplazamientos de los hidrógenos de un tercer metileno (C-1) unido al anterior (C-2).

Sin embargo, en el análisis de la secuencia es necesario conocer la relación de conectividad de los metilenos respecto a C-18 y C-20. Para ello se acude al experimento de correlación heteronuclear indirecta y se puede postular ahora la relación conectiva siguiente:



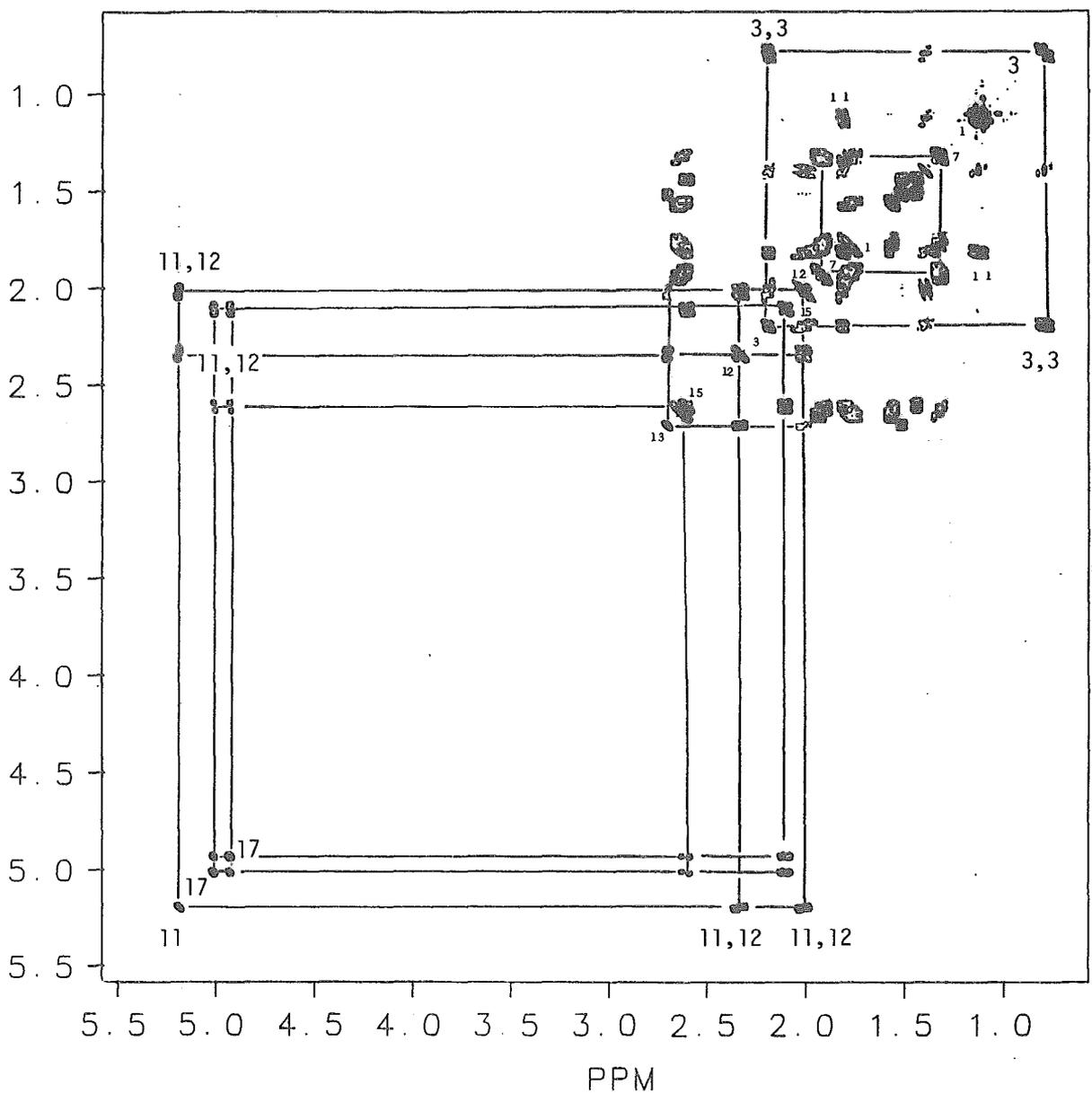
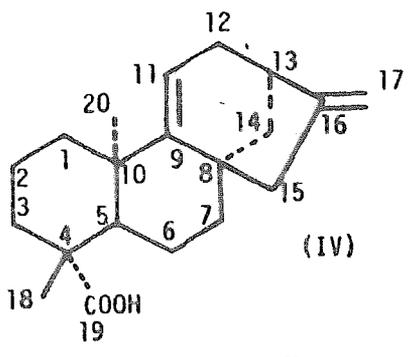
Dada la relación común de los grupos metilo hacia C-5 deducida del experimento de correlación heteronuclear indirecta, también se puede establecer el primer fragmento anular:



Conectividad H-5, H-6 y H-7. (Figuras II.9c y II.9d).

El metino C-5 tiene su señal en 1.58 ppm. En el espectro COSY se observan sus relaciones con dos contornos en 1.80 y 2.66 que corresponden a los dos hidrógenos de un metileno vecino (C(6), Tabla II.1). Respectivamente, estos hidrógenos son el 6-beta y 6-alfa. A partir de la horizontal de 6-beta, se pueden observar las correlaciones con los contornos en 1.96 y 1.34 que corresponden a los dos hidrógenos del metileno C-7 en la secuencia. El espectro 2.9c muestra las conectividades de toda la región alifática. Las conectividades $^1\text{H} - ^1\text{H}$ que son evidentes en este espectro son: 13-14_{alfa}, 14_{alfa} - 14_{beta}, 15_{alfa} - 15_{beta}, 15_{alfa} - 14_{beta}, 12_{alfa} - 12_{beta} y 12_{alfa} - 13_{beta}. En la figura II.9d se señalan conectividades adicionales ya conocidas.

Figura, II.9.-
 ESPECTRO COSY DE
 ACIDO GRANDIFLORENICO
 400 MHz, benceno-d₆.
 CONECTIVIDAD ¹H: 11,12,13;
 15,17; 3,3; 7,7; 1,1.



Espectros de Correlación Heteronuclear ^{13}C - ^1H Indirecta.

Para el análisis de conectividades indirectas entre núcleos de carbono e hidrógeno, la programación ("software") del espectrómetro permite la edición de espectros unidimensionales en la escala del hidrógeno, cuyas señales muestran el desplazamiento de aquellos núcleos que se encuentran a dos y tres enlaces de distancia del átomo de carbono seleccionado.

Para ello, se emplea un cursor gráfico que se posiciona sobre la escala de desplazamientos químicos de ^{13}C exactamente sobre cada una de las señales cuya interacción indirecta se desea investigar. La segunda escala solamente muestra las señales de aquellos núcleos de ^1H que tienen la relación de distancia para la cual fue optimizado el experimento.

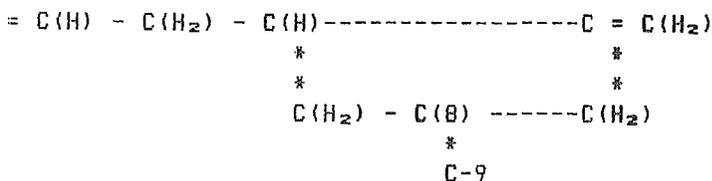
Así, cada señal en la escala de desplazamientos de ^{13}C tiene interacciones que se observan como contornos en la escala de ^1H . Estas interacciones del espectro bidimensional pueden ser editadas unidimensionalmente en la forma usual de los espectros de rnm, de manera que cada señal de ^{13}C tiene un espectro de ^1H asociado.

La realización de este experimento en dos disolventes aprovecha la ventaja de que algunos desplazamientos químicos del ^1H varían sustancialmente por efecto de la anisotropía del disolvente mientras que los correspondientes de ^{13}C se mantienen prácticamente sin cambio. En algunos casos, se observan las interacciones de los hidrógenos directamente unidos al carbono de interés, pero estas señales pueden ser diferenciadas con relativa facilidad. Ello es un defecto que puede ser eventualmente resuelto con la optimización de los tiempos de retardo y ese trabajo es objeto de otras investigaciones.

El espectro de correlación indirecta de cada átomo de carbono del ácido Grandiflorénico, tanto en benceno como en cloroformo deuterados, se discute a continuación en orden decreciente de frecuencias (o en aumento del campo magnético) omitiendo, cuando se observa, la interacción directa:

Espectro de Correlación Indirecta en Cloroformo- d_1 . Figura II.10 a-e.

En el espectro de correlación indirecta (figuras II.10 a-e), se observa fácilmente la interacción C(8) - H(11). De manera similar, se observan señales en las posiciones correspondientes a los hidrógenos H-13, H-15_{beta}, H-7_{alfa} y beta, H-14_{alfa} y beta. Siendo C-8 un carbono cuaternario y conociendo las conectividades previas, la unión al otro carbono cuaternario C-9 conduce a la postulación del siguiente fragmento estructural:



Por ejemplo, conociendo el número total de carbonos tetrasustituídos, metinos, metilenos y metilos, junto con las evidencias de unión previas, es posible establecer la conectividad entre C-8 y C-9 (son los únicos carbonos cuaternarios restantes). De estos dos, solo la señal correspondiente a C-9 recibe la magnetización del metilo C-20 (junto con C-10, C-1 y C-5). En cambio,

C-8 recibe eficientemente la magnetización de H(11) ya que se encuentran casi en un plano. El fragmento se puede construir de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r}
 = C(H) - C(H_2) - C(H) \text{-----} C = C(H_2) \\
 * \qquad \qquad \qquad * \qquad \qquad \qquad * \\
 * \qquad \qquad \qquad * \qquad \qquad \qquad * \\
 * \qquad \qquad \qquad C(H_2) - C(8) \text{-----} C(H_2) \\
 * \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad * \\
 \text{*****C-9}
 \end{array}$$

En los siguientes párrafos, se especifica la información contenida en cada uno de los trazos obtenidos para cada señal de ¹³C. Los espectros de correlación indirecta fueron obtenidos tratando de minimizar sus tiempos de acumulación y sin optimizar los tiempos de retardo Δ₁ y Δ₂. Los espectros normales unidimensionales obtenidos en 400 MHz muestran por una parte que el uso de un campo magnético de mayor intensidad ayuda en la separación e identificación de algunas señales, pero por otra, que aún en esas condiciones, existen señales que continúan sobrepuestas y que con los enfoques usuales sería imposible asignar con seguridad. Entre los desplazamientos químicos de los espectros en 200 y 400 MHz existen diferencias que fueron atribuidas a efectos de concentración de las muestras pero el orden de aparición de señales no se ve alterado.

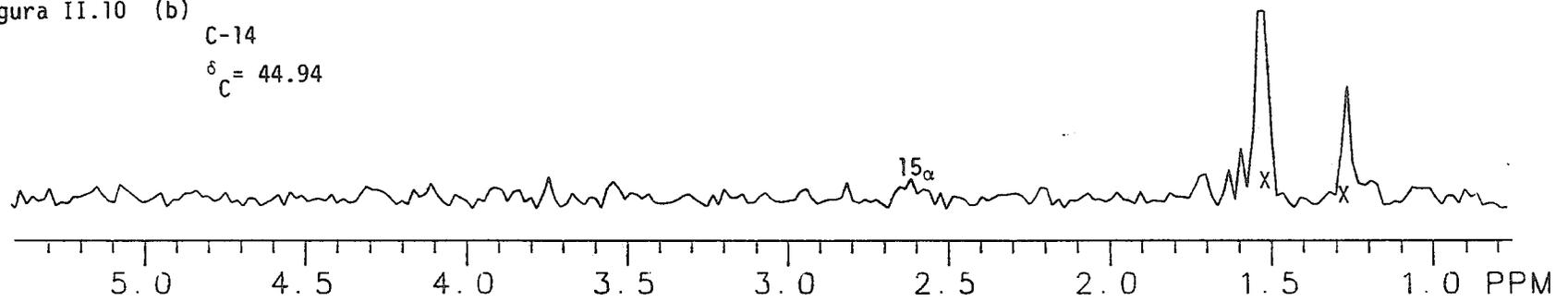
Los parámetros experimentales utilizados para este experimento son los mismos que se aplicaron utilizando benceno-d₆ como disolvente. El orden de aparición de señales en el espectro de ¹³C no se altera y el análisis se hace enfatizando aquellas señales que son claramente discernibles de acuerdo a la relación señal/ruido de cada trazo.

Descripción del Espectro de Correlación Indirecta en Cloroformo-d.₁. (Figuras II.10 a-e)

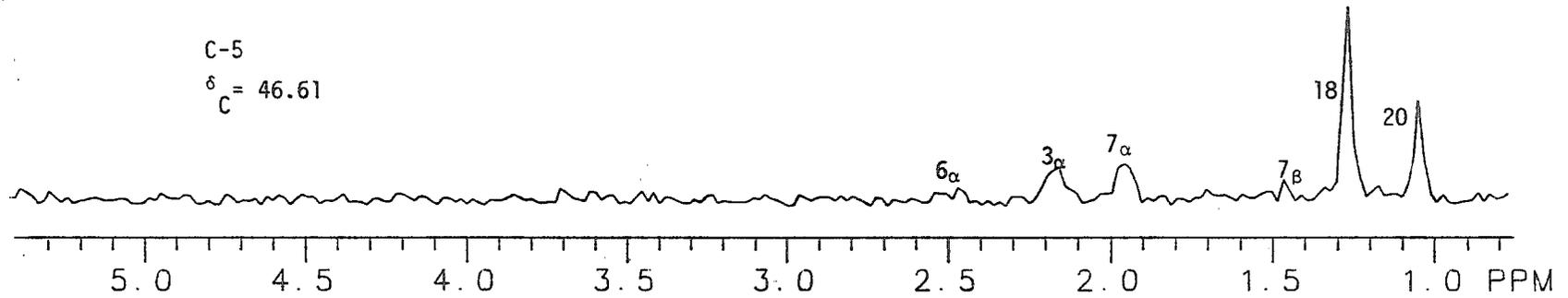
- C-19 carbono carboxílico, interacciones con H-5, metilo H-18 y H-3 beta.
- C-9 carbono cuaternario sp^2 , interacciones con H-15 alfa, H-8 y H-12 (señal sobrepuesta), H-14 y metilo H-20
- C-11 carbono cuaternario, interacciones con H-13, H-12 alfa y H-12 beta.
- C-17 carbono del metileno terminal, sp^2 , interacciones con H-15 alfa y H-15 beta.
- C-15 carbono secundario, interacción con un protón H-17.
- C-5 metino, interacciones con H-3 (ecuatorial), H-7 y H-1 sobrepuestos, H-7 beta, metilo H-18 y metilo H-20.
- C-14 la conectividad indirecta de este núcleo no se manifiesta con buena relación señal ruido y no es aprovechable.
- C-4 carbono cuaternario sp^3 , interacciones con H-5, H-2 y metilo H-18.
- C-8 carbono cuaternario, interacción con H-11, H-15 alfa, H-6 beta, H-15 alfa, H-7 alfa, H-6 alfa y H-14 alfa y beta parcialmente sobrepuestos.
- C-13 metino, interacción con protón H-17 de campo bajo. No se aprecian otras interacciones de importancia.
- C-1 carbono secundario, interacciones con H-3 alfa y el metilo H-20.
- C-10 carbono cuaternario sp^3 , interacciones con H-5, H-1 y H-2 parcialmente sobrepuestos y metilo H-20.
- C-3 carbono secundario, interacciones con H-1 y metilo H-18.
- C-12 no se aprecian interacciones con buena relación señal/ruido.
- C-7 carbono secundario, interacciones H-6 y H-15 alfa parcialmente sobrepuestos, H-15 beta y H-6.
- C-18 metilo, solo se aprecia su propia interacción suficientemente fuerte como para aparecer en el espectro.
- C-20 carbono del metilo H-20, interacción con H-5 y H-1.
- C-2 carbono secundario, interacciones débiles con H-1 y H-3.
- C-6 carbono secundario, interacciones débiles con H-5 y H-7 alfa y beta.

Figura II.10 (b)

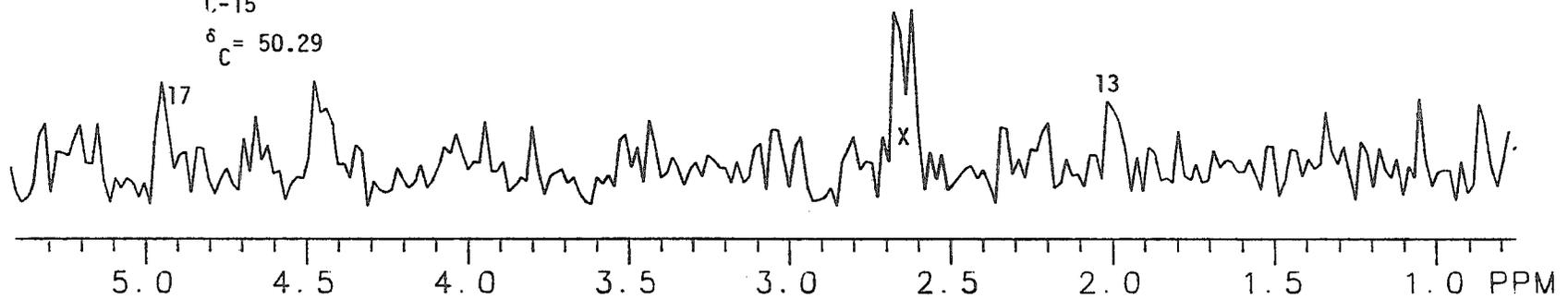
C-14
 $\delta_C = 44.94$



C-5
 $\delta_C = 46.61$



C-15
 $\delta_C = 50.29$



C-17
 $\delta_C = 105.49$

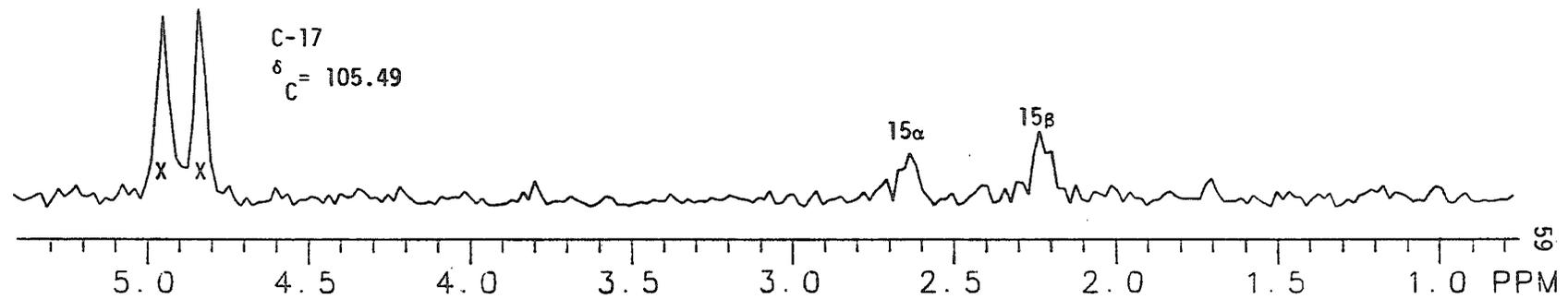


Figura II.10 (c)

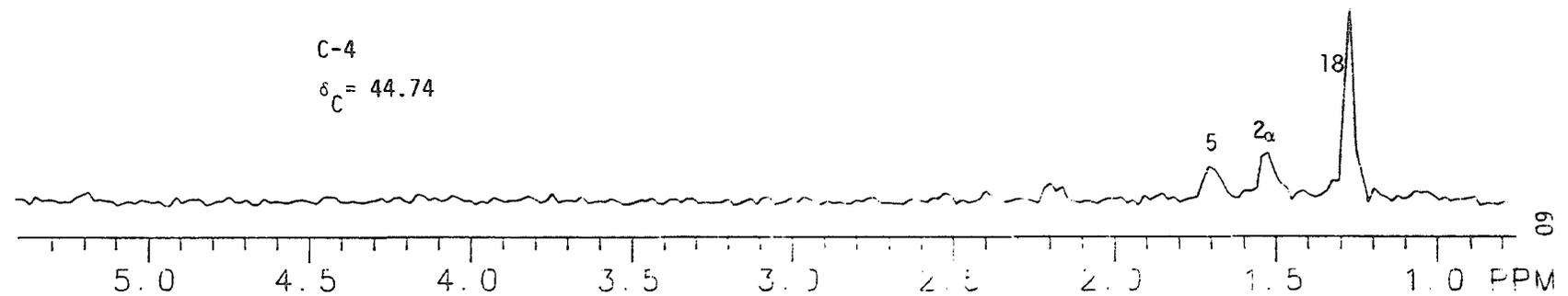
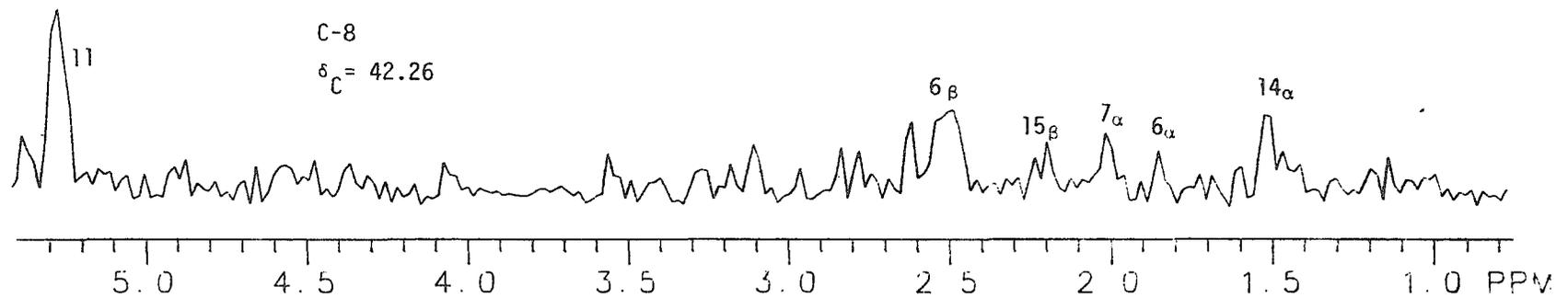
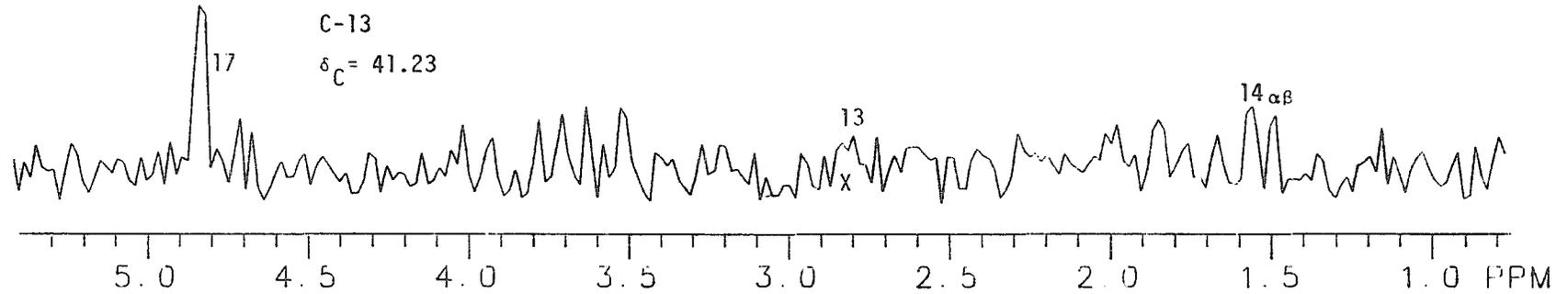
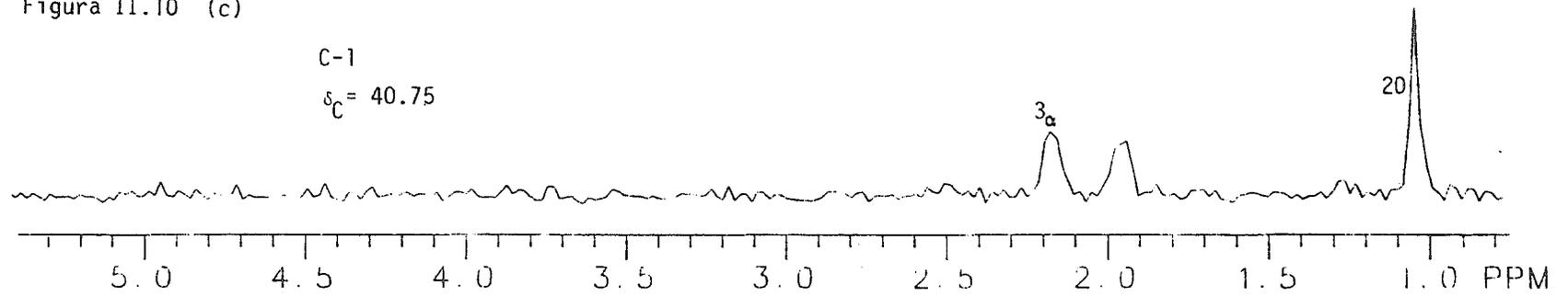


Figura II.10 (d)

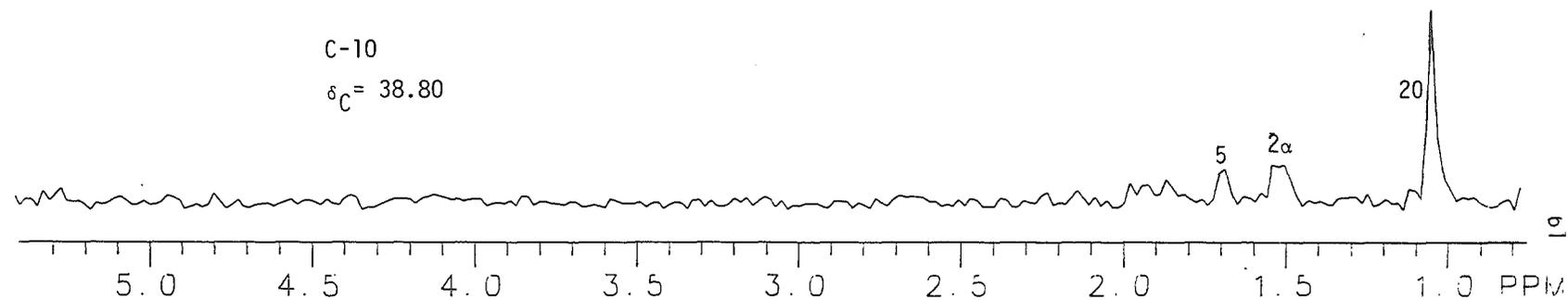
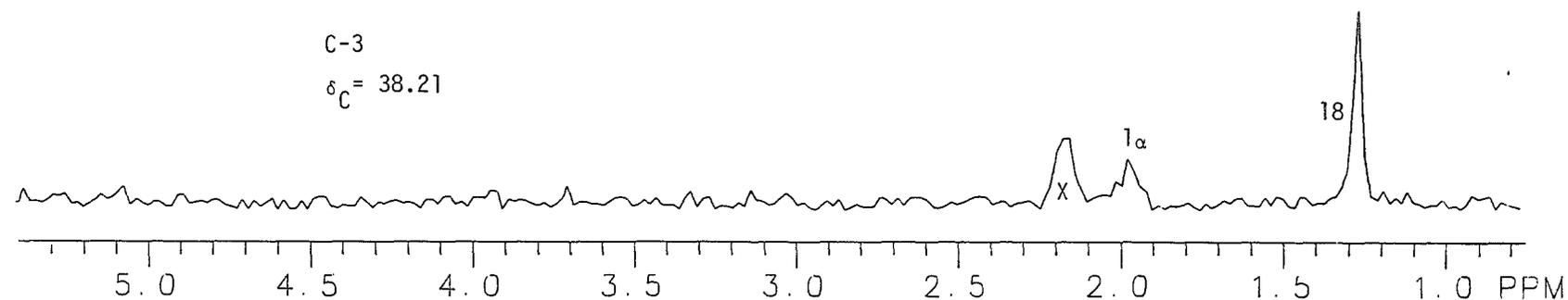
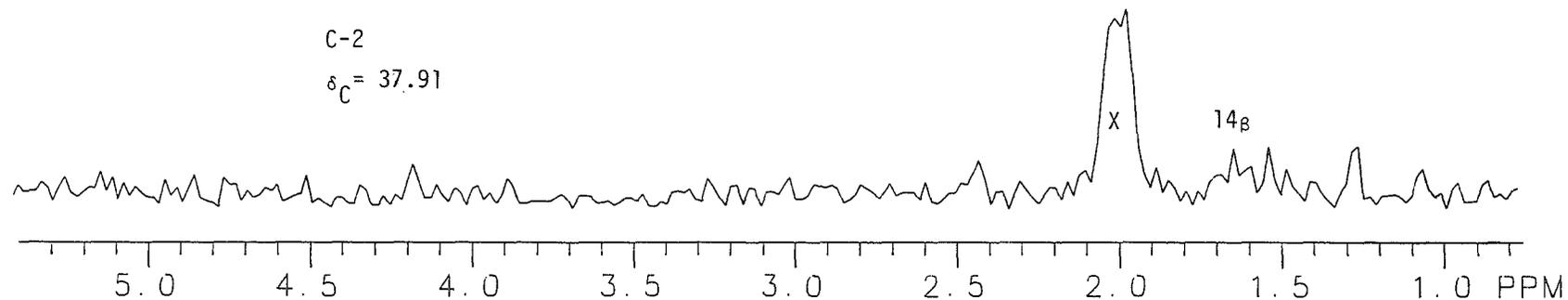
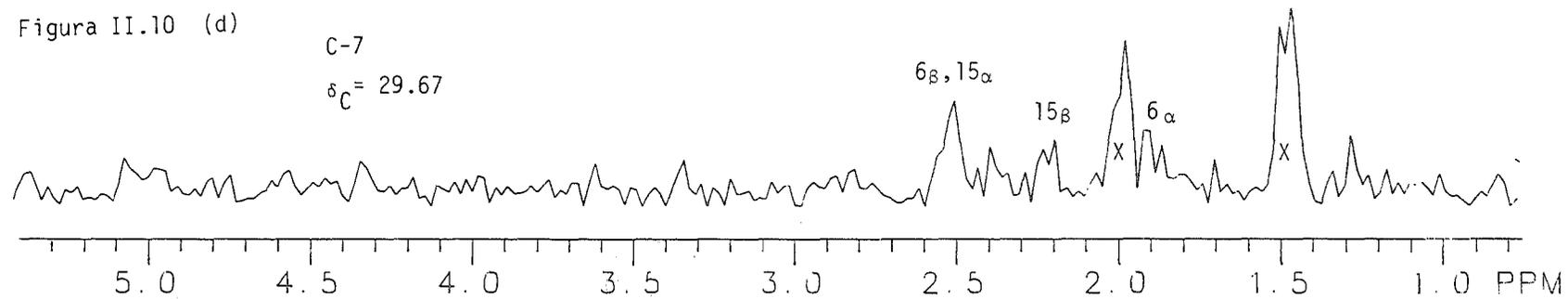
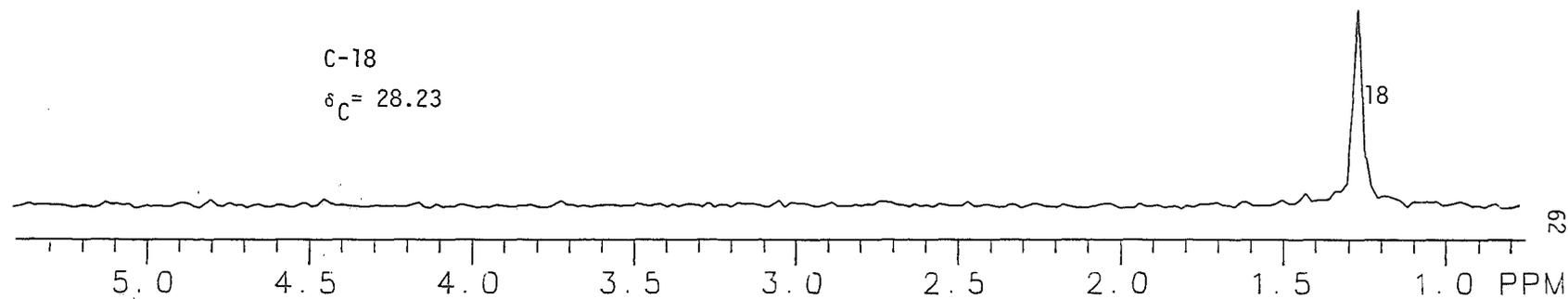
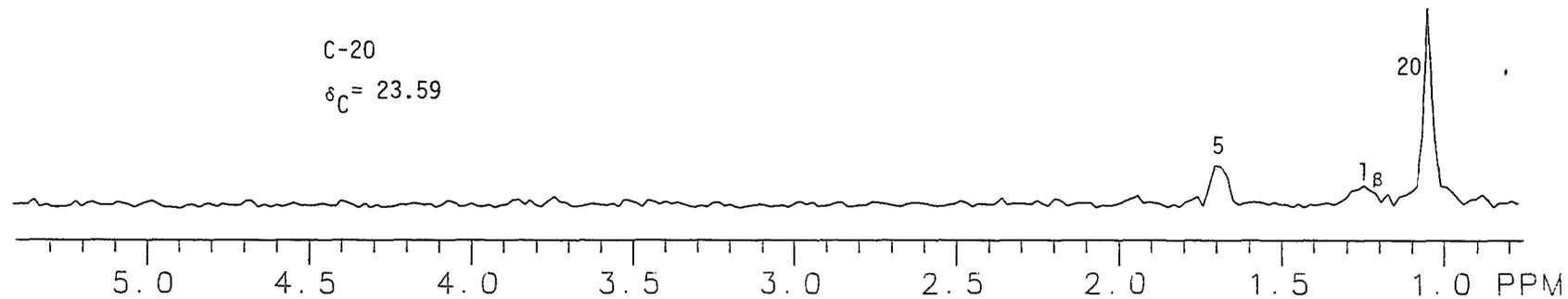
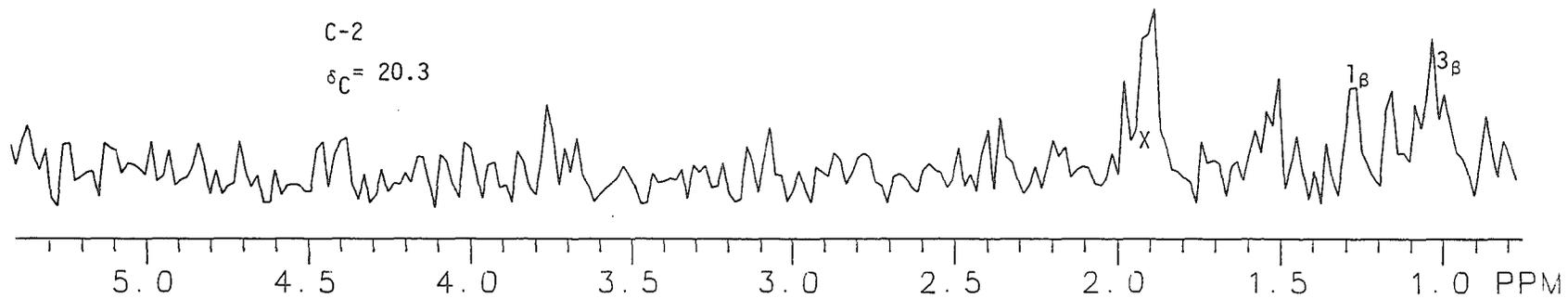
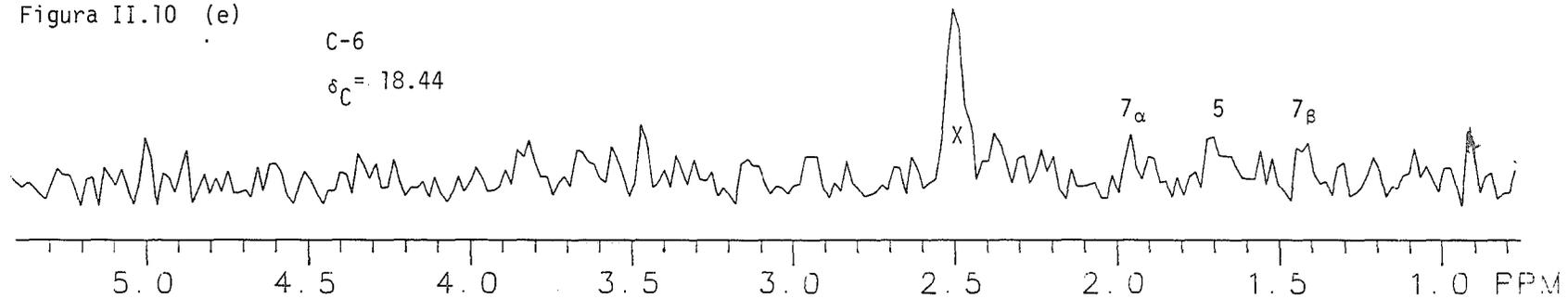


Figura II.10 (e)



Descripción del Espectro de Correlación Indirecta en Benceno-d₆. (Figuras II.11 a-e).

- C-19 carbono carboxílico, interacciones con H-5, H-18 y H-3 beta.
- C-16 carbono cuaternario, interacciones con H-15 alfa, H-12 alfa, H-15 beta y H-14 alfa.
- C-9 carbono cuaternario con interacciones múltiples hacia H-15 alfa, H-12 alfa, H-15 beta, H-14 beta, H-7 beta y una muy intensa con C-20.
- C-11 las interacciones más importantes de este carbono ocurren con H-13, H-12 alfa y H-12 beta.
- C-17 carbono cuaternario, interacciones con H-15 alfa y H-15 beta.
- C-15 carbono secundario, interacciones con H-17, H-7 alfa y H-14 beta.
- C-5 carbono terciario, interacciones H-6 beta, H-3 alfa, H-1 alfa, H-7 beta y una interacción común hacia los metilos H-18 y H-20.
- C-14 carbono secundario, interacción H-15 alfa, H-12 beta (dudosa).
- C-4 carbono secundario, interacción con H-6 beta, H-3 alfa, H-5, H-2 alfa y metilo H-18.
- C-8 carbono cuaternario, interacciones con H-11, H-13, H-15 beta, H-7 alfa, H-14 alfa y beta y H-7 beta
- C-13 metino, interacciones con H-11, H-17.
- C-1 carbono secundario, interacciones con H-3 alfa, H-2 (dudosa) y una muy intensa con el metilo H-20.
- C-10 carbono cuaternario, interacciones con H-11, H-1 alfa, H-6 alfa. H-5, H-2 alfa y una muy intensa con el metilo H-20.
- C-3 carbono secundario, interacciones con H-2 beta, H-1 alfa y una muy intensa con el metilo H-18.
- C-12 carbono secundario, interacciones con H-14 alfa y beta.
- C-7 carbono secundario, interacciones con H-15 alfa y/o H-6, H-15 beta y H-14 beta.
- C-18 metilo, solo se observa su propia señal ya que su interacción directa es tan fuerte que domina sobre todas las demás.
- C-20 metilo, interacciones con H-5 y probablemente H-1 beta.
- C-2 carbono secundario, interacciones con H-3 alfa, H-1 alfa H-1 beta y H-3 beta.
- C-6 carbono secundario, interacciones con H-7 beta (?), H-5 (?) y H-7 beta (?).

Espectros de Correlación Heteronuclear ^{13}C - ^1H Indirecta.
Condiciones: 400 MHz, benzene-d_6

Figura II.11 (a)

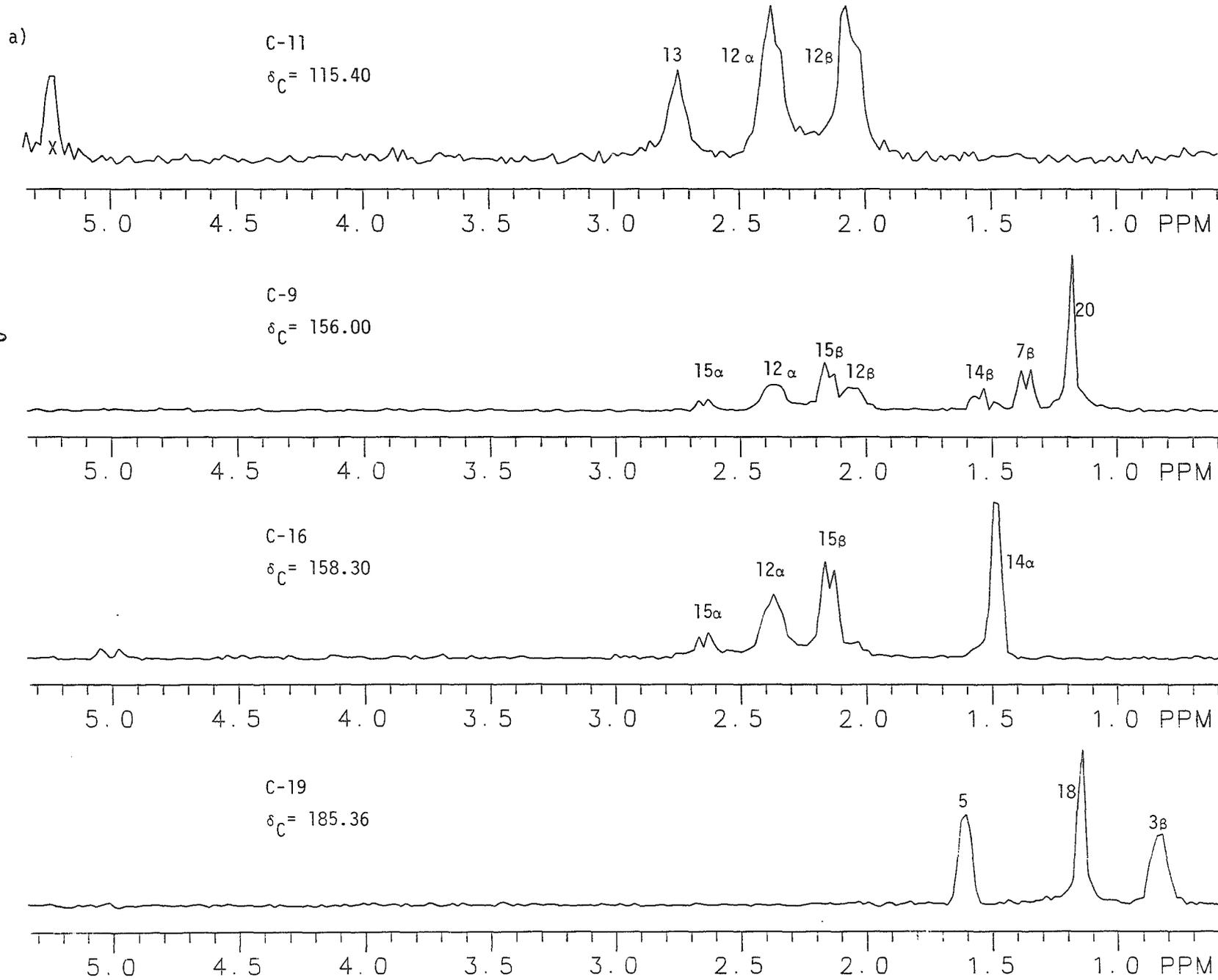
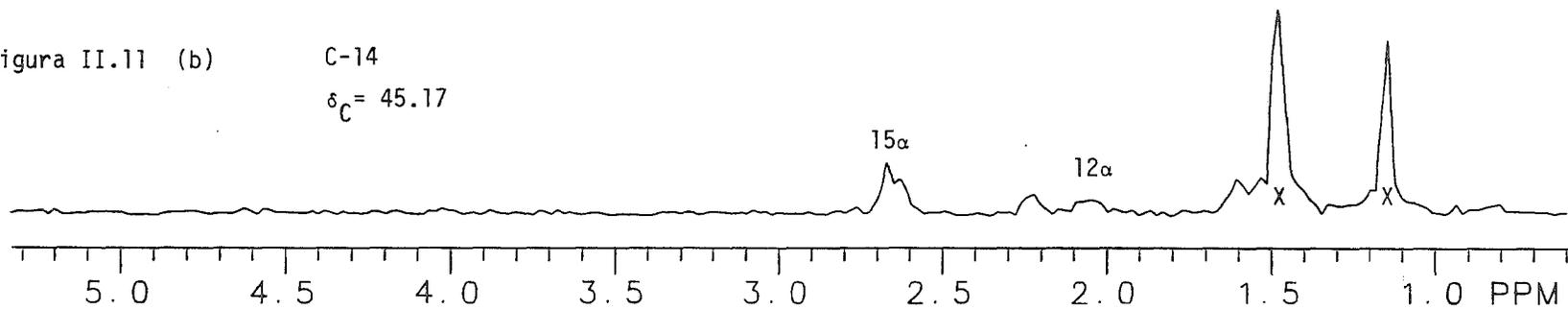
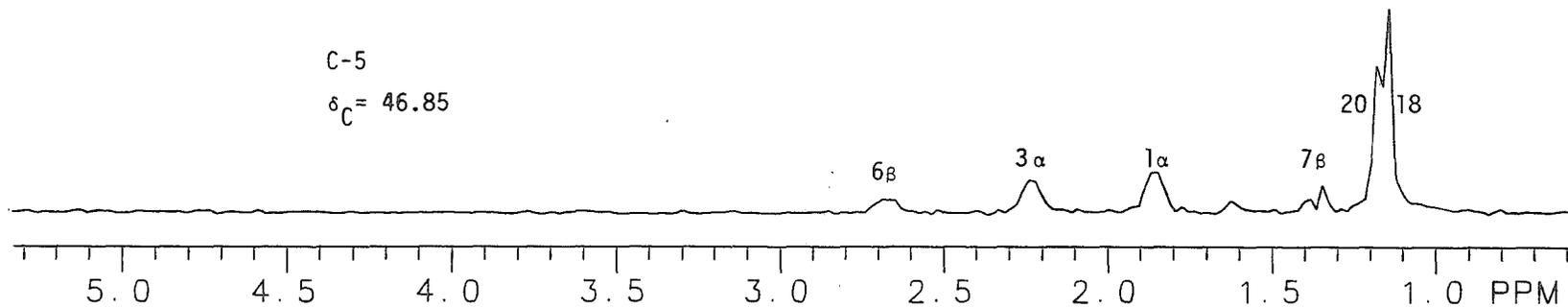


Figura II.11 (b)

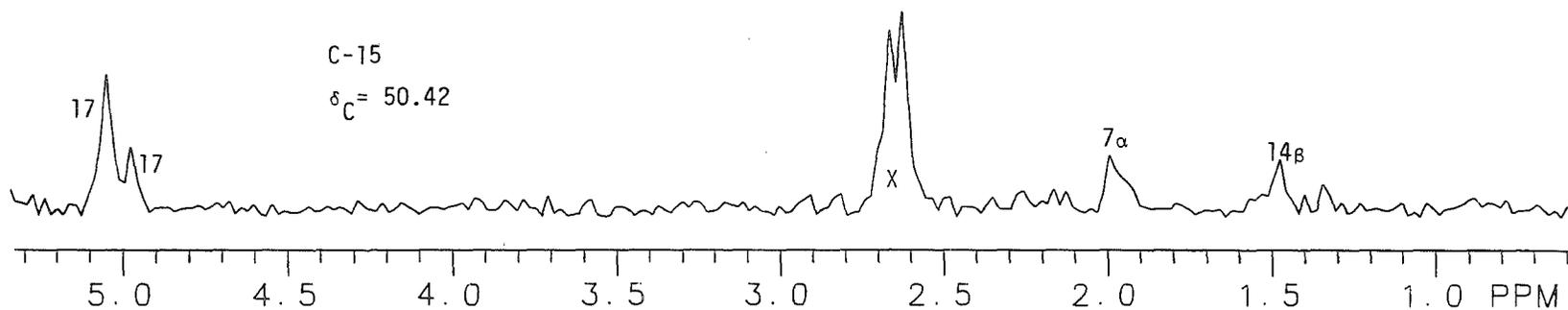
C-14

 $\delta_C = 45.17$ 

C-5

 $\delta_C = 46.85$ 

C-15

 $\delta_C = 50.42$ 

C-17

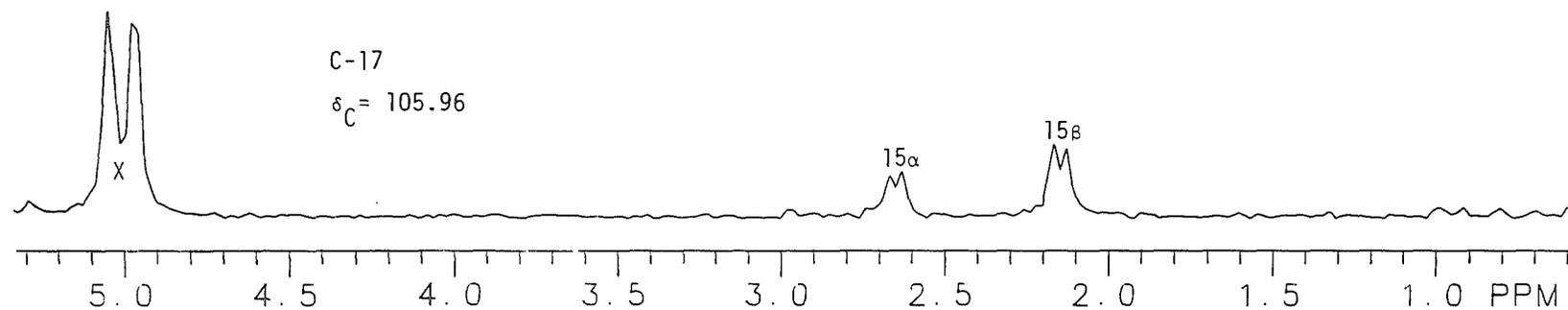
 $\delta_C = 105.96$ 

Figura II.11 (c)

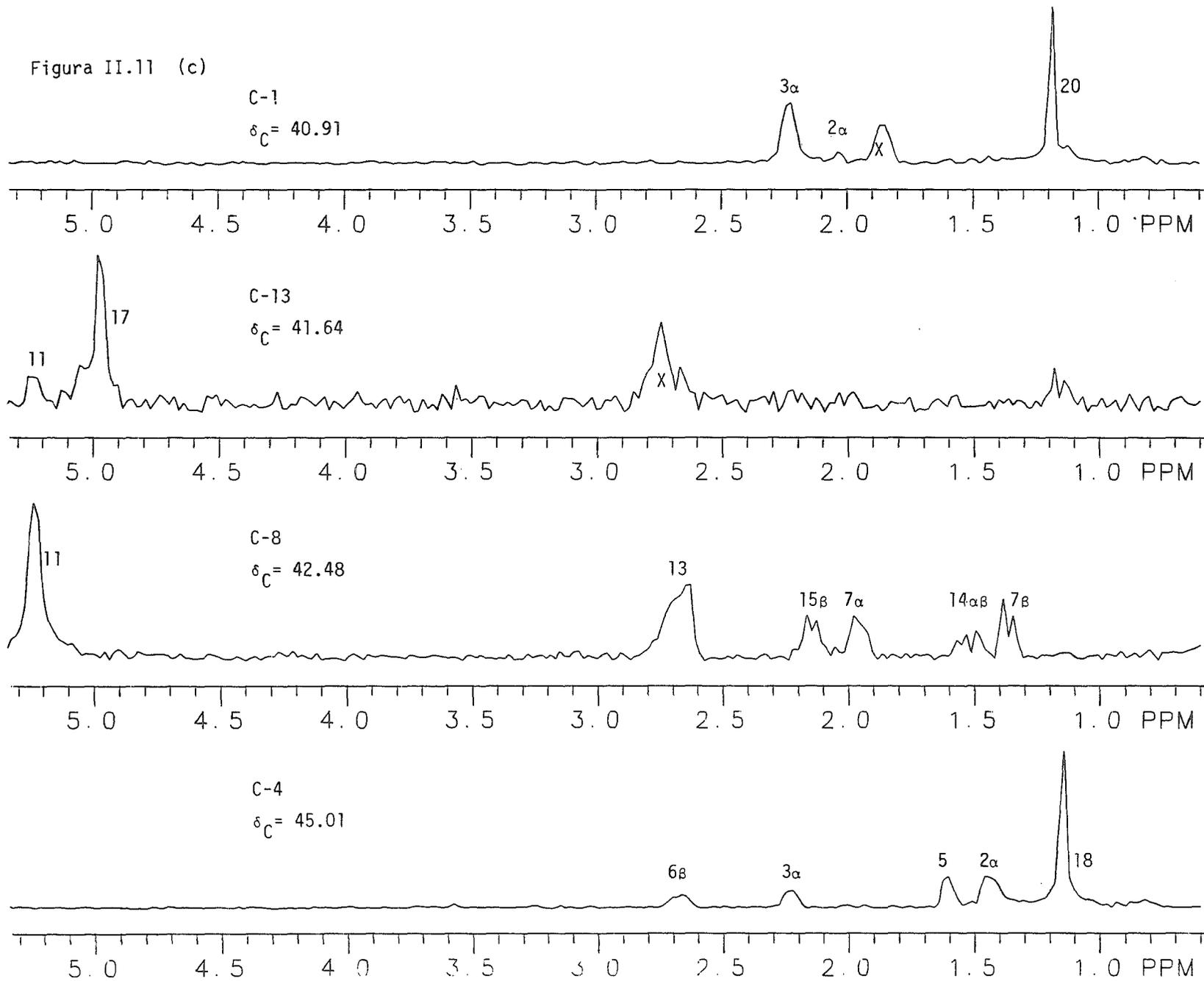


Figura II.11 (d)

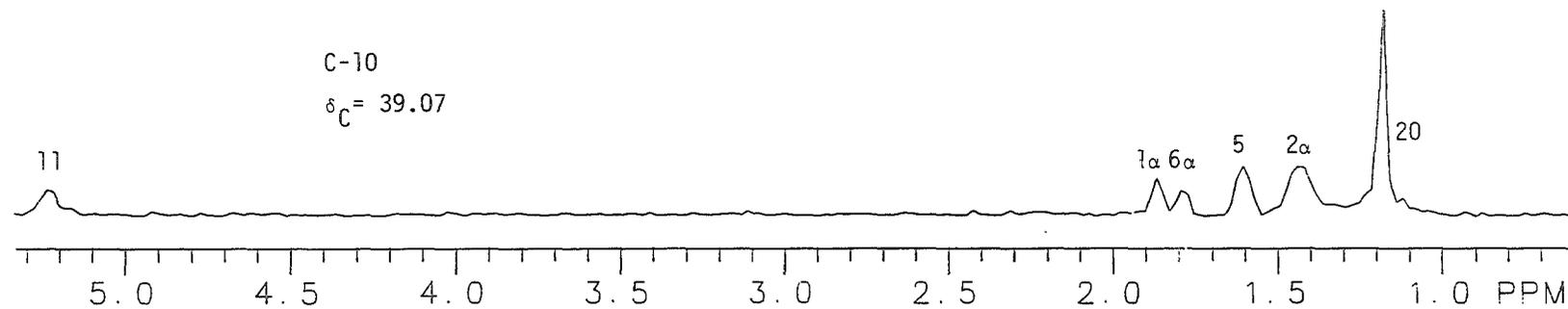
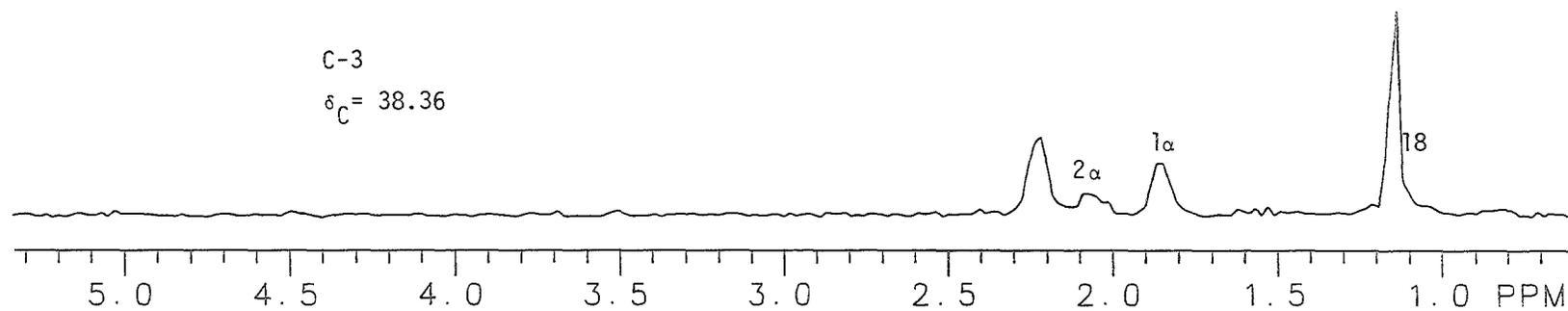
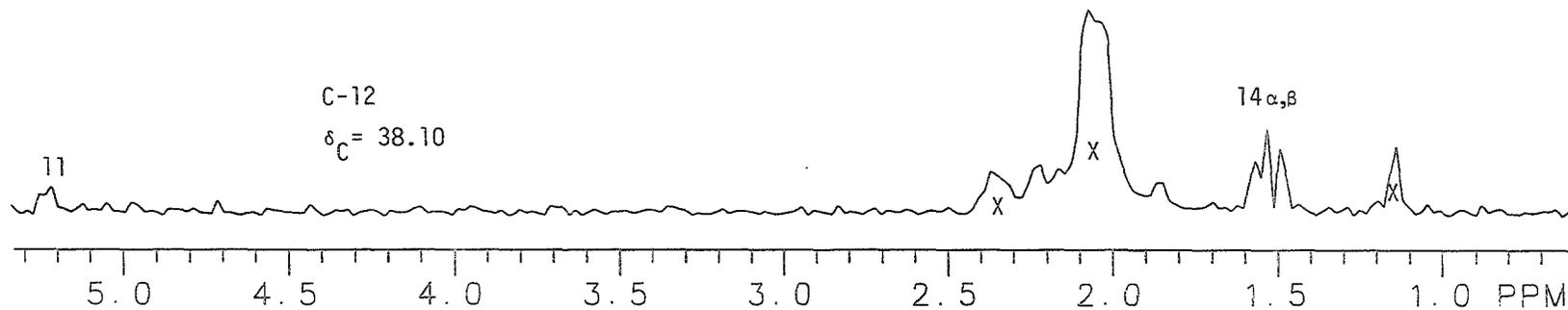
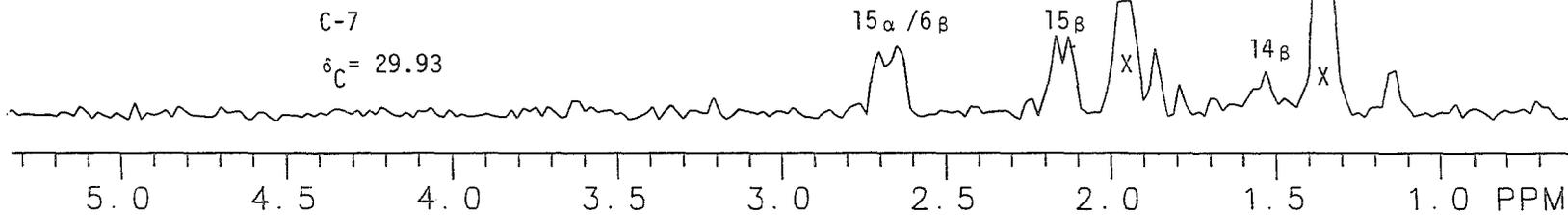
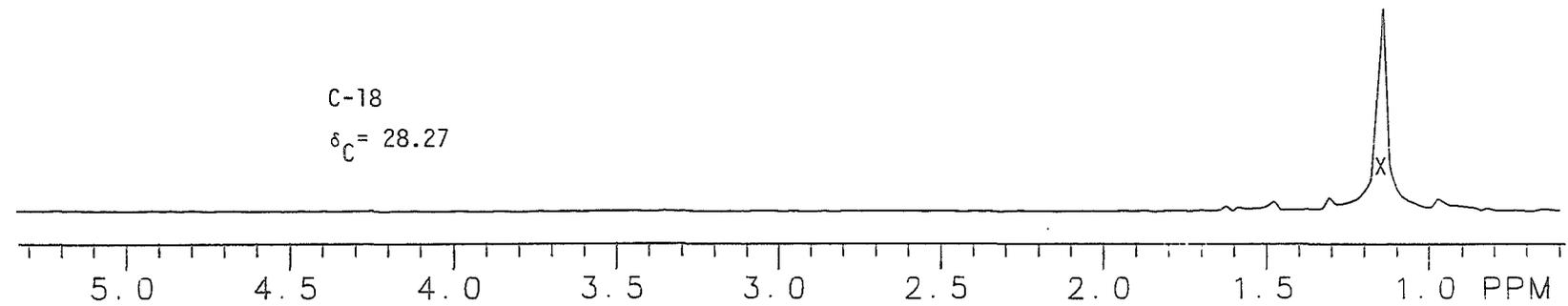
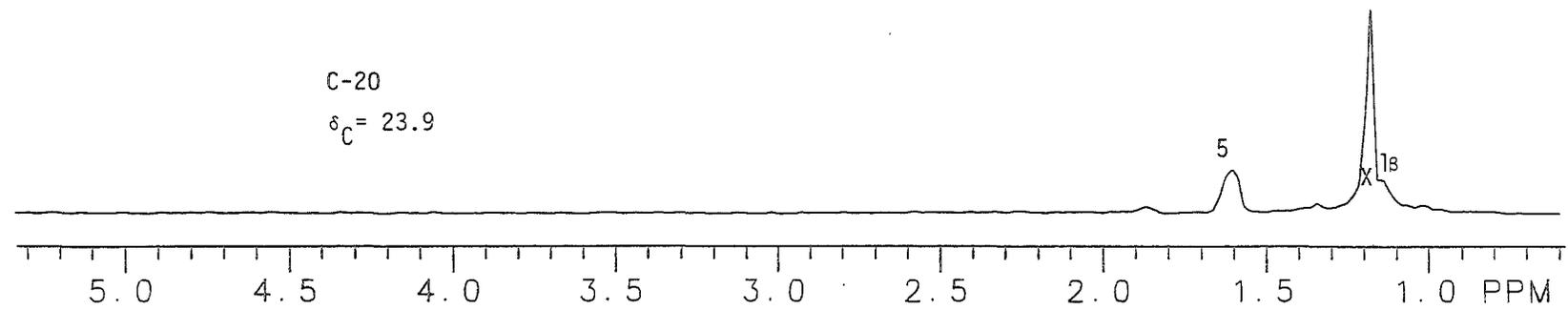
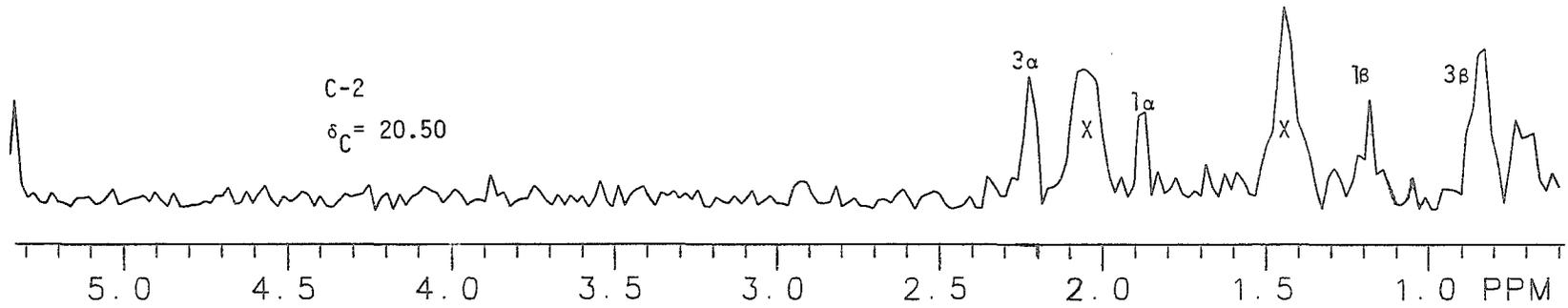
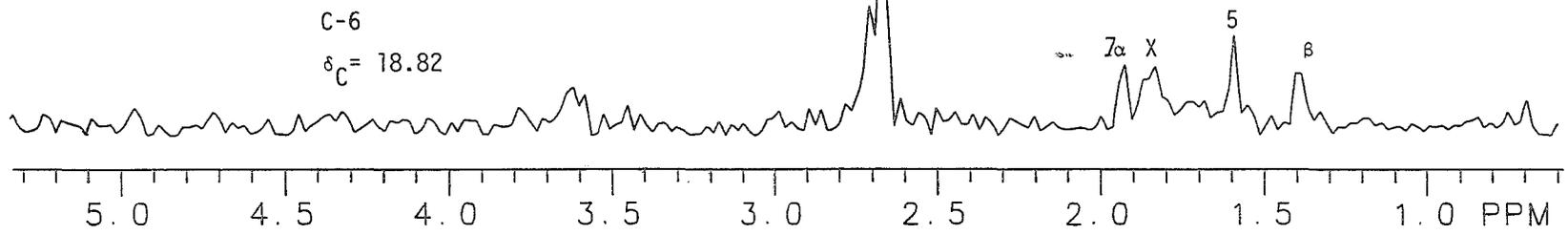


Figura II.11 (e)



Parte Experimental

Se recolectó el material vegetal en el campus de Ciudad Universitaria y se identificó botánicamente guardándose especímenes de muestra en el herbario IMSSM. 1100 g de hojas secas, molidas, fueron maceradas en porciones de 4l de éter de petróleo a temperatura ambiente por periodos de 4 días. Se separó el sólido por filtración y se evaporó el disolvente a presión reducida en la forma usual.

El residuo obtenido al cabo de tres extracciones fue de 97 g. (8.8%). La extracción fue intentada también utilizando n-hexano pero se observó que al emplear este disolvente se extraen simultáneamente gran cantidad de clorofilas, cosa que no ocurre con el éter de petróleo ligero (p. eb. 40-60°). Posteriormente se disolvió el extracto en acetona para precipitar las ceras, las cuales se eliminaron por filtración. Esta operación se repitió usando metanol con el mismo propósito. Con el segundo disolvente la precipitación fue mucho menos abundante pero su composición resultó ser prácticamente la misma como se observó al comparar los espectros de rnm de los precipitados crudos. Después de cada precipitación, los disolventes fueron eliminados en rotavapor. El residuo presentó consistencia viscosa y color pardo oscuro.

Cromatografía en columna.- Se pesaron 600 g de sílice anhidra de malla 70-230 (Merck) y se colocaron en un matraz erlenmeyer de 2 L. En otro recipiente se pusieron 2 L de acetona anhidra a la cual se añadió una cantidad de agua correspondiente al 5% en peso de la sílice utilizada. Se añadió en una sola vez el disolvente a los 600 g de sílice agitando esporádicamente, y se dejó reposar la suspensión durante una hora con agitación eventual. Se filtró la sílice y se eliminó el exceso de acetona en rotavapor. Se suspendió la sílice desactivada en hexano destilado y se procedió a empacar una columna cromatográfica de vidrio de aproximadamente 5 cm de diámetro y 1 m de longitud. Para la separación se utilizó una alícuota de 10 g del extracto disuelta en una pequeña cantidad de hexano. Se eluyó inicialmente con hexano y después con un gradiente de hexano:acetato de etilo hasta la proporción 85:15. Se obtuvieron de esta manera cerca de 40 fracciones (100 mL) habiéndose iniciado el gradiente a partir de la fracción 9. Se obtuvo acetato de taraxasterol en las fracciones 9-13 y ácido Grandiflorénico en las fracciones 19-25. El procedimiento seguido con las primeras fracciones se detalla en la parte experimental correspondiente al acetato de taraxasterol. Las fracciones 19-25 fueron agrupadas después de comprobar su similitud cromatográfica por cromatografía en placa delgada de sílice, eluyendo con el sistema hexano:acetato de etilo:85:10. En las fracciones agrupadas, cristalizó espontáneamente una parte de ácido Grandiflorénico. Se agregó una pequeña cantidad éter de petróleo al recipiente y se dejó reposar 24 h a -10° con lo cual se logró una mejor separación de los cristales. Se recristalizó de mezcla de éter de petróleo y éter etílico 70:30. El compuesto IV pudo ser cuantificado también por cromatografía líquida de alta eficiencia (32). Se determinaron sus constantes espectroscópicas de ultravioleta, infrarrojo, rnm y espectrometría de masas, y resultaron prácticamente idénticas a las descritas en la literatura.

Los espectros de rnm en 90 MHz se determinaron en el Departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM, en un equipo Varian EM-390, a temperatura del "probe" de 32° usando CDCl_3 o Bz-d_6 como disolventes y tetrametilsilano como referencia interna. Los espectros de rnm de 200 y 400 MHz se determinaron en equipos Varian XL-200 y XL-400 del Departamento de Química de la Universidad de Toronto. La temperatura del "probe" fue 20° empleando la programación estándar incluida del equipo. Los espectros de correlación heteronuclear se obtuvieron empleando una anchura espectral de 1000 Hz en cada dominio (ca. & 0.5-5.5), una matriz constituida de

512 por 512 puntos, la modificación de 256 incrementos en el tiempo, y 16 acumulaciones por cada DIL (FID= Disminución Libre de la Inducción). El segundo pulso de mezcla para la secuencia homonuclear (de Jeener) (24) se fijó en 60° que corresponde a una duración de $5.2 \mu\text{s}$, como recomiendan Bax y Freeman (33). Los espectros de correlación heteronuclear normal se determinaron empleando una anchura espectral de 5500 Hz en el primer dominio (^{13}C , ca. 10-120 ppm) y 1000 Hz en el segundo (^1H , ca. 0.5-5.5 ppm), una matriz de datos de 2048 x 512 puntos, con 128 incrementos de tiempo, 128 transientes por FID y una función exponencial de ensanchamiento de 2.5 Hz en cada caso. Los experimentos de correlación heteronuclear se llevaron a cabo en CDCl_3 utilizando $\Delta_1=0.05$ s y $\Delta_2=0.033$ s. El primer experimento requirió una anchura espectral para ^{13}C 2500 Hz (ca. 10-60 ppm) y 500 Hz en el dominio de ^1H (ca. 0.5-3.0) y una matriz de datos de 2048 x 512 puntos mientras que el siguiente experimento difiere solamente en el uso de la anchura espectral de ^{13}C de 9000 Hz (ca. 10-190 ppm) para poder incluir el grupo $-\text{COOH}$ y los carbonos cuaternarios $\text{C}(\text{sp}^2)$. Debe hacerse notar que el primero de los dos espectros modificados no es estrictamente necesario y se llevó a cabo principalmente con propósitos de presentar un espectro de ^{13}C con muy buena resolución digital en la región alifática así como para una mejor presentación gráfica. Todos los experimentos heteronucleares fueron llevados a cabo en tubos de 10 mm de diámetro, con 200 mg de sustancia en ca. 2 mL de CDCl_3 o C_6D_6 . Los experimentos de correlación homonuclear se llevaron a cabo en tubos de 5 mm empleando alícuotas de la disolución preparada para los experimentos anteriores.

CAPITULO III La Estructura del Taraxasterol.

Generalidades.

El acetato de taraxasterol es un compuesto ubicuo dentro del reino vegetal. Su estudio obedece a que se obtuvo en cantidad abundante de *M. tomentosa* (20) y mostró espectros complejos de rmn de ¹H y de ¹³C. Por ello se consideró de interés aplicar las técnicas modernas de la rmn para corroborar las asignaciones espectrales que para algunos átomos de carbono parecieron dudosas o para los cuales la asignación previa tenía la posibilidad de una asignación ambigua. Al comparar los espectros ir y de rmn de ¹H (34) y de ¹³C (35), así como los puntos de fusión (34, 36) descritos para esta sustancia con los obtenidos en este trabajo, se observó la prácticamente total coincidencia de ellos. Sin embargo, resultó evidente que seis de las asignaciones previas del espectro de ¹³C mostraron ser erróneas y en el espectro obtenido en 400 MHz las constantes de acoplamiento observadas para el anillo E mostraron falta de consistencia con la estereoquímica propuesta para esta sustancia. Por otra parte la fórmula empírica determinada por espectrometría de masas (C₃₂H₅₂O₂) mostró corresponder adecuadamente a acetato de taraxasterol V.

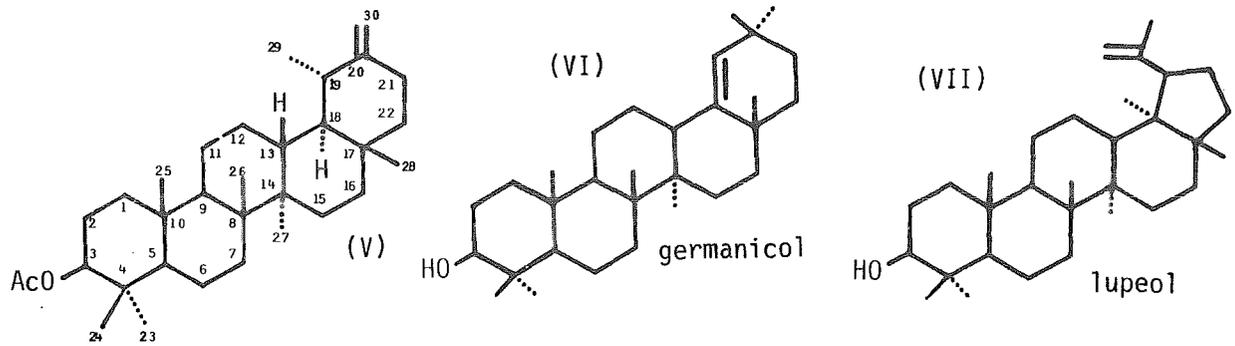


Figura III.A

Adicionalmente, se recurrió al estudio del compuesto por cristalografía de rayos-X para corroborar la estructura derivada de los datos de rmn, así como para postular una corrección definitiva a la estructura descrita en la literatura (37). En este caso se pudo demostrar la utilidad de la secuencia bidimensional INADEQUATE, con la cual fue posible llevar a cabo una asignación completa y no ambigua del espectro de ¹³C. Sobre esta base, se decidió llevar a cabo el estudio detallado de esta estructura que se describe a continuación.

Resultados y Discusión.

Reasignación del espectro de ¹³C del Taraxasterol.

Se aplicó inicialmente la técnica de edición espectral DEPT (7) para obtener el espectro de ¹³C mostrando selectivamente los grupos CH, CH₂ y -CH₃. Así se pudo identificar rápidamente el tipo de átomos de carbono en términos del número de hidrógenos unidos a ellos (figura III.1). De esta medición fue evidente que seis asignaciones previas del el espectro de ¹³C del acetato de taraxasterol se

encontraban asignadas incorrectamente (ver Tabla III.1). La ambigüedad en principio podría deberse a la asignación incorrecta entre tres pares de carbonos aunque no era posible distinguir si esas señales eran las únicas con la asignación equivocada y tampoco si había una asignación intercambiada entre dos grupos $-CH_3$. Por ello, se consideró necesario llevar a cabo un estudio bidimensional de conectividad $^{13}C-^{13}C$ (INADEQUATE) (27) cuyo espectro se muestra en las figuras III.2a, III.2b y III.2c que muestran cada par de $^{13}C-^{13}C$ conectados directamente como sistemas AB o AX con igual frecuencia cuántica doble en el sentido horizontal. Cada señal doble se encuentra centrada respecto al desplazamiento químico de cada ^{13}C totalmente desacoplado de 1H , con la partición del doble $^1J_{CH}$ del orden de 35 - 70 Hz. Cada sub-espectro AX o AB aparece simétricamente a ambos lados de la línea de pendiente=2, que pasa por un origen determinado por la frecuencia del transmisor de Rf ("carrier") (27). Las conectividades se establecen de una manera muy simple, relacionado cada par de señales en sentido horizontal y vertical teniendo presentes las condiciones mencionadas arriba.

Por ejemplo, cada señal de ^{13}C en el espectro totalmente desacoplado puede mostrar de una a cuatro señales dobles a lo largo de la vertical que representa el desplazamiento químico de dicha señal. Cada una de las señales dobles a su vez, tiene una conexión en el sentido horizontal observada como otra señal doble, ubicada sobre la vertical correspondiente al desplazamiento químico del ^{13}C con el que existe la interacción.

De este análisis hubo una característica que resultó poco usual en la relación de conectividades *i.e.* C(20) - C(19) y C(21). La señal del primer carbono no aparece normalmente debido a que queda fuera de la ventana espectral elegida inicialmente para la determinación y el filtro digital evita su incorporación dentro del espectro. Sin embargo, C-20 mantiene su interacción con C-19 y C-21. Sobre la base de los desplazamientos químicos de dichos núcleos, se espera que las frecuencias cuánticas dobles sean del orden de 7300 Hz y 6150 Hz (que se observa como el doble señalado con a en la Fig. III.2a) para C-19 y C-21 respectivamente. Dado que estos picos se encuentran fuera de la ventana espectral cuántica doble, las señales se ven reincorporadas ("folded in") en la región espectral normal con frecuencias cuánticas dobles de -4700 Hz (doble a) y -5850 (doble b) señalados en la figura III.2a. A la dimensión cuántica doble (sobre el eje de ordenadas) no se aplica filtro digital.

El resto de las asignaciones puede llevarse a cabo de manera sencilla como se muestra en los espectros de las figuras III.2 a, b y c. Al hacer la comparación de las señales obtenidas del espectro bidimensional se observó que un total de 10 señales del espectro de ^{13}C fueron asignadas incorrectamente, lo cual representa un error del 40% de las asignaciones de un total de 24 carbonos alifáticos. Una posible razón para explicar el número tan grande de asignaciones erróneas puede hallarse en el método de asignación basado en la técnica SFORD ("single frequency off-resonance decoupling") (35), además de que este fue obtenido en 20 MHz con la consecuente reducción de la dispersión espectral. Sin embargo al obtener el espectro "SFORD" en 50.1 MHz en este trabajo (figura III.1b), el espectro aún resulta demasiado complejo en la región alifática como para confiar en las asignaciones. En la figura III.1 se muestran los espectros editados "DEPT" y el espectro SFORD para enfatizar este hecho. Cualquiera de las técnicas de edición espectral como DEPT (7), INEPT (38) o APT (39) puede aplicarse con mayor ventaja. De todas ellas, la de más fácil implementación es APT ya que no requiere de programadores de pulsos o correctores de fase.

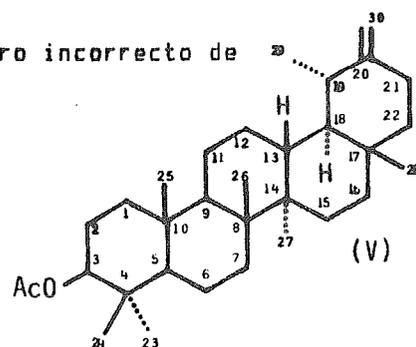
La otra fuente de posible de error es el uso de compuestos modelo como ayuda para la asignación espectral ya que se asume a priori que el compuesto modelo tiene una estereoquímica correcta y por otra parte se requiere que los compuestos tengan una relación estructural bastante cercana para que sean válidas las conjeturas basadas en esta similitud. En la asignación estructural

del acetato de taraxasterol se emplearon como compuestos modelo germanicol (VI) (40), y lupeol (VII) (41), pero ambos poseen una notable diferencia en cuanto a la conformación que tiene el anillo E. Ello sin duda tiene relación con el hecho de que siete de las diez asignaciones incorrectas se encuentran en los anillos D o E. (ver Tabla III.2). Similarmente, C-12 también fue asignado incorrectamente probablemente debido a la perturbación que produce la cercanía de C(29)H₃. Más adelante se discuten las posibles consecuencias de ello.

TABLA III.1

Señales de ¹³C de Acetato de Taraxasterilo con el número incorrecto de hidrógenos asignado originalmente

Desplazamiento ^a	n _H ^b	asignación previa
25.49 (25.4)	3	(2)
26.15 (26.1)	2	(3)
38.29 (38.3)	2	(1)
38.85 (38.8)	2	(1)
39.15 (39.1)	1	(2)
39.38 (39.3)	1	(2)



^a Desplazamientos químicos de ¹³C relativos al TMS. Los valores señalados primero corresponden a los obtenidos en este trabajo y los segundos a la asignación previa de desplazamientos como aparecen en la referencia 35.

^b Número de protones unido al ¹³C correspondiente en el espectro DEPT editado. Los valores de la asignación previa provienen de la referencia 3 y fueron obtenidos del experimento SFORD.

TABLA III.2

ASIGNACION FINAL TABULADA DE LAS SEÑALES DEL ESPECTRO DE CONECTIVIDAD
 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$.

CARBONO ^a	DESPLAZAMIENTO ^b	CARBONO	DESPLAZAMIENTO ^b
C(1)	38.44 (38.4)	C(17)	34.53 (34.4)
C(2)	23.70 (23.6)	C(18)	48.63 (48.6)
C(3)	80.96 (80.8)	C(19)	39.28 (39.3, C(22))
C(4)	37.79 (37.7)	C(20)	154.64 (154.4)
C(5)	55.40 (55.4)	C(21)	25.61 (25.5, C(12))
C(6)	18.18 (18.1)	C(22)	38.85 (38.8, C(13))
C(7)	33.99 (33.9)	C(23)	27.94 (27.8)
C(8)	40.91 (40.8)	C(24)	16.51 (16.4)
C(9)	50.39 (50.3)	C(25)	16.34 (16.2, C(26))
C(10)	37.04 (37.0)	C(26)	15.89 (15.8, C(25))
C(11)	21.46 (21.4)	C(27)	14.72 (14.6)
C(12)	26.15 (26.1, C(28))	C(28)	19.49 (19.4, C(29))
C(13)	39.15 (39.1, C(16))	C(29)	25.49 (25.4, C(21))
C(14)	42.03 (41.9)	C(30)	107.12 (107.1)
C(15)	26.64 (26.6)	*CH ₃ COO	21.33 (21.1)
C(16)	38.29 (38.3, C(19))	CH ₃ *COOH	171.01 (170.8)

^a Numeración como se indica en la figura III.A

^b Desplazamiento químico de las señales de ^{13}C en CDCl_3 relativo al TMS como referencia interna. Los valores iniciales corresponden a los obtenidos en este trabajo y los valores en paréntesis provienen de la referencia 35. Las señales con asignación incorrecta se señalan entre paréntesis. Por ejemplo: <26.1, C(28)> significa que C(12) se asignó previamente como C(28).

Determinación de la configuración relativa y la conformación del fragmento taraxasterilo por el método de difracción de rayos-X.

La estructura aceptada para el taraxasterol es 3-beta, 18-alfa, 19-alfa, urs-20(30)-en-3-ol donde se asigna al grupo metilo de C-29 la orientación ecuatorial y se asume que el anillo E tiene la conformación de silla (37 y 42). Por otra parte, el espectro de rnm de ^1H del taraxasterol tiene características que están en desacuerdo con la estructura mencionada. Así, el espectro en C_6D_6 muestra los protones alílicos claramente diferenciados del resto de las señales de ^1H (figura III.3). Al desacoplar selectivamente (con irradiación de baja potencia) el doble correspondiente al metilo de C-29, uno de los múltiples se redujo a un doble con $J_{\text{H}-\text{H}}=6.5$ Hz. Dicha señal debería corresponder a H-19 que muestra el acoplamiento vecinal con H-18 y de ahí, se concluiría que se trata de un acoplamiento anti (diaxial) de acuerdo a la estructura originalmente postulada. Sin embargo, la magnitud de $J_{\text{H}(18),\text{H}(19)}$ parece estar más de acuerdo con un acoplamiento gauche (axial-ecuatorial), como se observa en el caso del metilenciclohexano, donde $J_{\text{H}(a),-\text{H}(e)}=13.5$ y $J_{\text{H}(a),\text{H}(e)}=4-5$ Hz (43). Aún mas, en el taraxasterol el desacoplamiento selectivo de los hidrógenos del metileno C-30 revela que el acoplamiento de dichos protones con H-19 es prácticamente igual a cero. Si H-19 tiene una orientación axial, debe esperarse un acoplamiento alílico máximo i.e. 2-3 Hz, mientras que si la orientación de H-19 es ecuatorial debiera esperarse un acoplamiento cercano a cero (14). Adicionalmente, se observa que el acoplamiento alílico de los hidrógenos vinílicos en C-30 con los hidrógenos en C-21, ocurre solamente con el hidrógeno

que se encuentra en 2.46 ppm. Estas observaciones sugieren que el grupo metilo C(29)H₃ posee una orientación axial o pseudo-axial.

Por tanto, se puede pensar que la estructura del taraxasterol es incorrecta y proponer que realmente es 3-beta, 18-alfa, 19-beta-urs-20(30)-en-3-ol donde C(29)H₃ es axial y H-19 es ecuatorial, teniendo el anillo E la conformación de silla. La estructura del taraxasterol fue propuesta sobre la base de una serie de epimerizaciones e interconversiones complejas (37) lo que pudo conducir a conjeturas incorrectas en la asignación de su espectro de ¹³C. Dado que se contaba con una forma cristalina adecuada del Taraxasterol, se decidió llevar a cabo una determinación no ambigua de la estructura por difracción de rayos-X.

Se encontró que la configuración propuesta inicialmente para el taraxasterol es correcta mientras que al analizar la conformación del sistema de anillos A-D, la forma de las "sillas" se encontró ligeramente aplanada. En circunstancias ideales, deberían esperarse ángulos de +60° y -60° y también que el anillo E poseyera una conformación de bote torcido. Nótese que los ángulos diedros formados con los enlaces C(17) - C(18) - C(19) - C(20) y C(17) - C(22) - C(21) - C(20) tienen valores cercanos a cero mientras que C(29)H₃ tiene una orientación pseudo-axial (figura III.4).

Es importante tratar de entender porque el anillo E adquiere la conformación de bote usualmente menos estable. En principio no se puede invocar la presencia del metileno exocíclico y sus posibles interacciones con C(29)H₃ ya que el metilenciclohexano prefiere una conformación de silla distorsionada, pero no de bote (44). Por otra parte, el grupo metilo del 1-metil-2-metilén-ciclohexano prefiere la orientación ecuatorial sobre la axial por una diferencia de 1.0 Kcal/mol (45). Parece razonable suponer que la interacción entre C-12 y C(29)H₃ fuerza al anillo E a adquirir una conformación de bote dada la relativa cercanía de estos grupos como se aprecia en la estructura tridimensional aunque aún en esta conformación, la distancia entre los hidrógenos de C(12)H₂ y C(29)H₃ es de 2.46 Å lo cual no representa una interacción espacial fuerte. Esta interacción llegaría a ser aún menor al adquirir el anillo D la conformación de silla.

Otra posibilidad que puede descartarse es la influencia del arreglo cristalino sobre la base de los datos espectroscópicos de rayos-X y de rmn. En la figura III.5 se puede apreciar el enlace de hidrógeno O(1) - H(1)... O(2) - O(1) - H(1)=1.18 Å; O(2) - H(1)=1.60 Å, ∠O(1) - H(1)... O(2) =147.7° que involucra al disolvente. El resto de los contactos moleculares por otra parte es débil y los datos de rmn sugieren que en solución, la molécula del taraxasterol posee una conformación muy similar a la que tiene en el estado cristalino (ver APENDICE de Datos de la Estructura Cristalina).

El ángulo diedro ∠H(18) - C(18) - C(19) - H(19) de 142° tiene consistencia con el valor de ³J_{H(18)H(19)}} =6.5 Hz observado mientras que el ángulo diedro ∠H(19) - C(19) - C(20) - C(30) es de 30°, y también es consistente con un acoplamiento alílico cercano a cero entre el hidrogeno H(19) y los hidrógenos del metileno exocíclico. Finalmente, todas las características estructurales del taraxasterol, aparentemente inconsistentes con el espectro de rmn pueden ser explicadas considerando que el anillo E posee una conformación de bote, lo cual también explicaría la razón de tantas asignaciones erróneas del espectro de ¹³C. Como ejemplo, de la secuencia de cinco átomos de carbono C(12) - C(13) - C(18) - C(19) - C(29) hay cuatro asignaciones incorrectas que puede atribuirse a la interacción estérica entre C(12)H₂ - C(29)H₃ que introduce perturbaciones en el desplazamiento químico de dicha secuencia. Esto indica que el uso de compuestos modelo para propósitos de asignación espectral, cuya estereoquímica no ha sido claramente establecida debe eliminarse siempre que sea posible. Asimismo, estos hechos muestran que el empleo de correlaciones semi-empíricas para diferenciar señales de ¹³C no constituye una herramienta segura cuando los desplazamientos químicos son muy semejantes.

Discusión

El espectro INADEQUATE permitió la asignación total, no ambigua, del espectro de rma de ^{13}C del taraxasterol haciendo uso del patrón de conectividad ^{13}C - ^{13}C . De un total de 30 átomos de carbono, 24 de ellos son de tipo alifático y de estos últimos, 10 estaban asignados incorrectamente (35). Esto puede atribuirse principalmente al empleo del método SFORD que en estos casos demuestra ser poco confiable, junto con el empleo de modelos moleculares inapropiados. Se puede ver fácilmente que SFORD puede (y debe) ser sustituido por métodos más ventajosos como son los espectros editados APT y DEPT e INADEQUATE. Además, un compuesto modelo debiera ser utilizado confiablemente para asignar un espectro solo cuando las esteroquímicas del modelo y el problema se encuentran claramente discernidas. Cuando es posible, debe recurrirse al experimento de conectividad como el que se presenta aquí (27) y cuando ello no es posible, la alternativa más viable consiste en determinar los espectros bidimensionales de correlación heteronuclear optimizados para la detección de acoplamiento ^{13}C - ^1H vecinal y gemelo (incorrectamente denominadas de "larga distancia") (10). Se atribuye a la interacción $\text{C}(12)\text{H}_2$ - $\text{C}(29)\text{H}_3$ el hecho de que el anillo E del Taraxasterol adquiera la conformación de bote distorsionado. Esta conformación queda confirmada por la determinación de la estructura cristalina y explica las características peculiares del espectro de ^1H , tanto para I como para su derivado acetilado.

Parte Experimental.

El acetato de Taraxasterol se obtuvo del mismo extracto de donde se aisló el ácido Grandiflorénico (ver parte experimental del capítulo II). Las fracciones en donde se detectó el compuesto por CCF fueron agrupadas y recristalizadas varias veces de una mezcla de acetato de etilo y etanol (70:30 respectivamente). También se llevó a cabo la purificación mediante la hidrólisis básica del acetato de Taraxasterol con 0.1N NaOH en medio etánolico-acuoso, llevando a cabo una nueva cromatografía en gel de sílice. Para obtener una mayor cantidad del compuesto, se tomó una alícuota de 25 g del extracto original y se cromatografió en una columna de gel de sílice desactivada con el 4% de su peso H_2O . Se eluyó con un gradiente de hexano:acetato de etilo desde la proporción 100:0 hasta 94:6 respectivamente. Se recolectó un total de 25 fracciones (100 mL) obteniéndose el taraxasterol entre las fracciones 8-15. Estas se agruparon y después de varias recristalizaciones de etanol:acetato de etilo (aproximadamente en relación 7:3) se obtuvo aproximadamente 1 g de compuesto puro, p.f. 230-232°. Los espectros de ir y uv resultaron iguales a los descritos en la literatura.

Los espectros de ^{13}C y de ^1H se obtuvieron en equipo Varian XL-200 operando en el modo pulsátil con transformadas de Fourier y con una temperatura del probe de 20°. Los espectros obtenidos en C_6D_6 se obtuvieron disolviendo 5 mg de muestra en 0.5 mL de disolvente conteniendo aproximadamente 0.1% de TMS como referencia interna en un tubo de 5 mm de diámetro. La anchura espectral fue de 2000 Hz con 32 K puntos de adquisición; se emplearon pulsos de 90° (de una duración de 7 μs) con tiempo de repetición de 8 s. Se recolectaron en total 32 adquisiciones. Los espectros de ^{13}C en CDCl_3 se determinaron empleando 150 mg de muestra disueltos en 2 mL de disolvente en tubo de 10 mm de diámetro. La anchura espectral utilizada fue de 10, 000 Hz con 32 K puntos de datos y anchura de pulsos de 7.5 μs para lograr 45°. Se recolectaron 4000 adquisiciones con un tiempo de repetición=1.6 s. Se obtuvieron cuatro espectros DEPT empleando pulsos delta de 45°, 90°, 90°, y 135° con 1200 adquisiciones por cada

espectro (16 K y 1.6 s de tiempo de repetición) La anchura del pulso para ^1H fue de 3.7 μs . La edición de sub-espectros se logró empleando la sub-rutina ADEPT (A=automatic) que forma parte de la programación del espectrómetro. El espectro bidimensional de conectividad ^{13}C - ^{13}C se llevó a cabo en un espectrómetro Varian XL-300 empleando 300 mg de acetato de taraxasterilo disuelto en 2 mL de CDCl_3 en un tubo de 10 mm de diámetro operando en 75 MHz para ^{13}C . La secuencia de pulsos INADEQUATE (27) fue preparada para detección con un pulso final de 135° , aplicando una irradiación continua de banda ancha para desacoplar el ^1H .

Se empleó una anchura espectral de 6000 Hz (80 ppm) y un tiempo de adquisición de 0.170 s con un número total de puntos de adquisición en la dimensión del desplazamiento químico de 2048 (2K). El número de incrementos en el tiempo de evolución (retardo entre la creación de la coherencia cuántica doble y la observación de la señal) fue 128 y en la segunda transformación de Fourier se empleó "llenado de ceros" ("zero-filling") sobre la dimensión de la doble frecuencia cuántica y 256 puntos de datos. Los interferogramas de la primera dimensión fueron multiplicados por una función exponencial de ensanchamiento de 5 Hz, mientras que la segunda se multiplicó por una de 20 Hz.

Cada incremento fue aplicado después de acumular 320 adquisiciones permitiendo 3.0 s de espera entre las secuencias para permitir una recuperación casi completa de la magnetización de los carbonos cuaternarios. La programación de tiempos de la secuencia INADEQUATE fue calculada y aplicada mediante el programa CCC2D (Carbon-Carbon-Connectivity) considerando un valor de 37 Hz como promedio de la constante de acoplamiento ^{13}C - ^{13}C . Este régimen de adquisición requirió de un tiempo total de 36 h.

Para la obtención de un monocristal del taraxasterol se hidrolizaron 250 mg de V con 25 cc de una solución 0.1N NaOH y 25 cc de EtOH, a 60° durante 30 min. La solución se neutralizó con HCl diluido, se filtró y recristalizó varias veces de EtOH anhidro. La recristalización final se hizo reposando una solución etanólica de taraxasterol por varios días, con lo cual se formaron cristales en forma de pequeñas barras de tamaño adecuado para la determinación. Se obtuvieron fotografías preliminares de precesión sobre la celda unitaria y datos sobre el grupo espacial. Los datos iniciales fueron obtenidos en un difractómetro Enraf-Nonius CAD-4 empleando la radiación monocromática K alfa de Molibdeno con longitud de onda = 0.71069 \AA . Posteriormente los datos complementarios se obtuvieron usando la radiación de Cu de longitud de onda = 1.54184 \AA y un cristal con forma de bloque de dimensiones $0.35 \times 0.1875 \times 0.1125 \text{ mm}$ en las direcciones $\langle 1,0,0 \rangle$, $\langle 0,1,1 \rangle$ y $\langle 0,1,1 \rangle$ respectivamente.

La determinación de la estructura cristalina fue llevada a cabo por el Dr. Jeffrey F. Sawyer del Departamento de Química de la Universidad de Toronto. Los parámetros posicionales xyz de cada átomo se encuentran tabulados en la referencia 46 y se utilizan las figuras III.4 y III.5 para apoyar la discusión del espectro de rmn en relación a la estructura definitiva obtenida por difracción de rayos X.

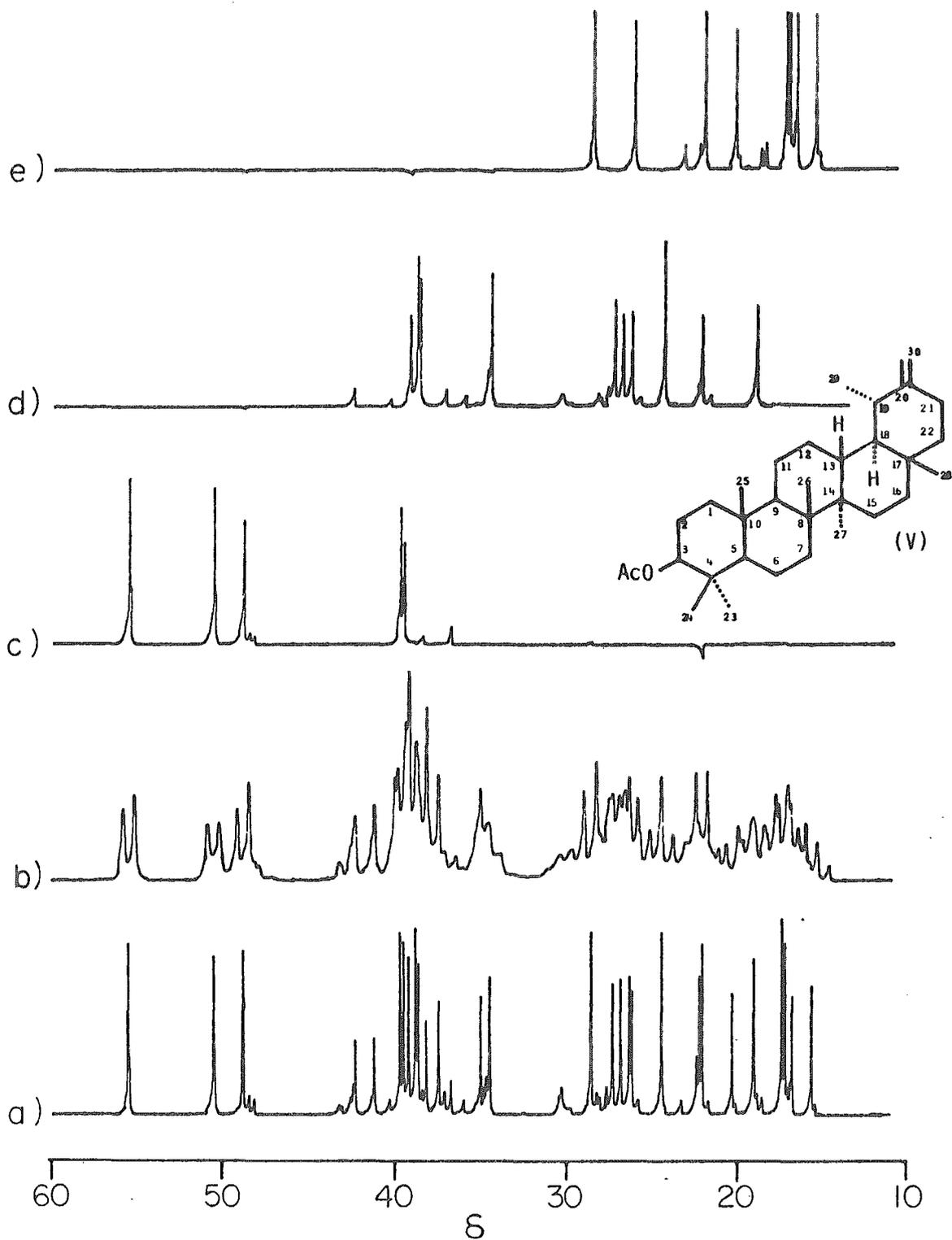


Figura III.1.- Espectros normal (a), SFORD (b) y DEPT (c, d y e) de Taraxasterol. (c): subespectro mostrando únicamente grupos CH; (d): subespectro de grupos CH₂; (e): subespectro de grupos CH₃.

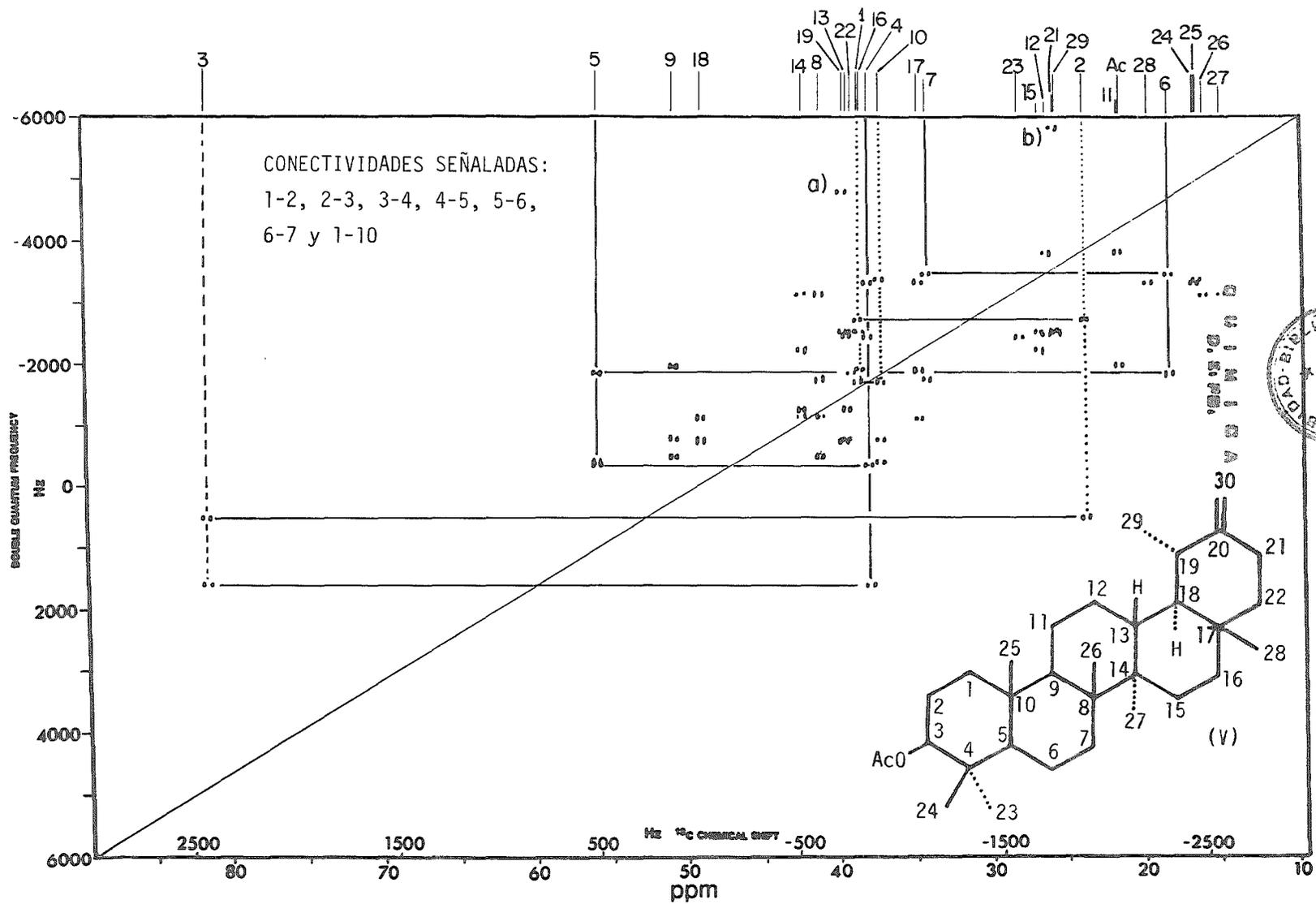


Figura III.2.- Espectro bidimensional de conectividad ^{13}C - ^{13}C . Sobre la horizontal está la escala normal de desplazamientos de ^{13}C . La frecuencia cuántica doble está en la escala vertical. Las señales de ^{13}C acoplados aparecen simétricas respecto a la diagonal y a lo largo de la horizontal correspondiente.

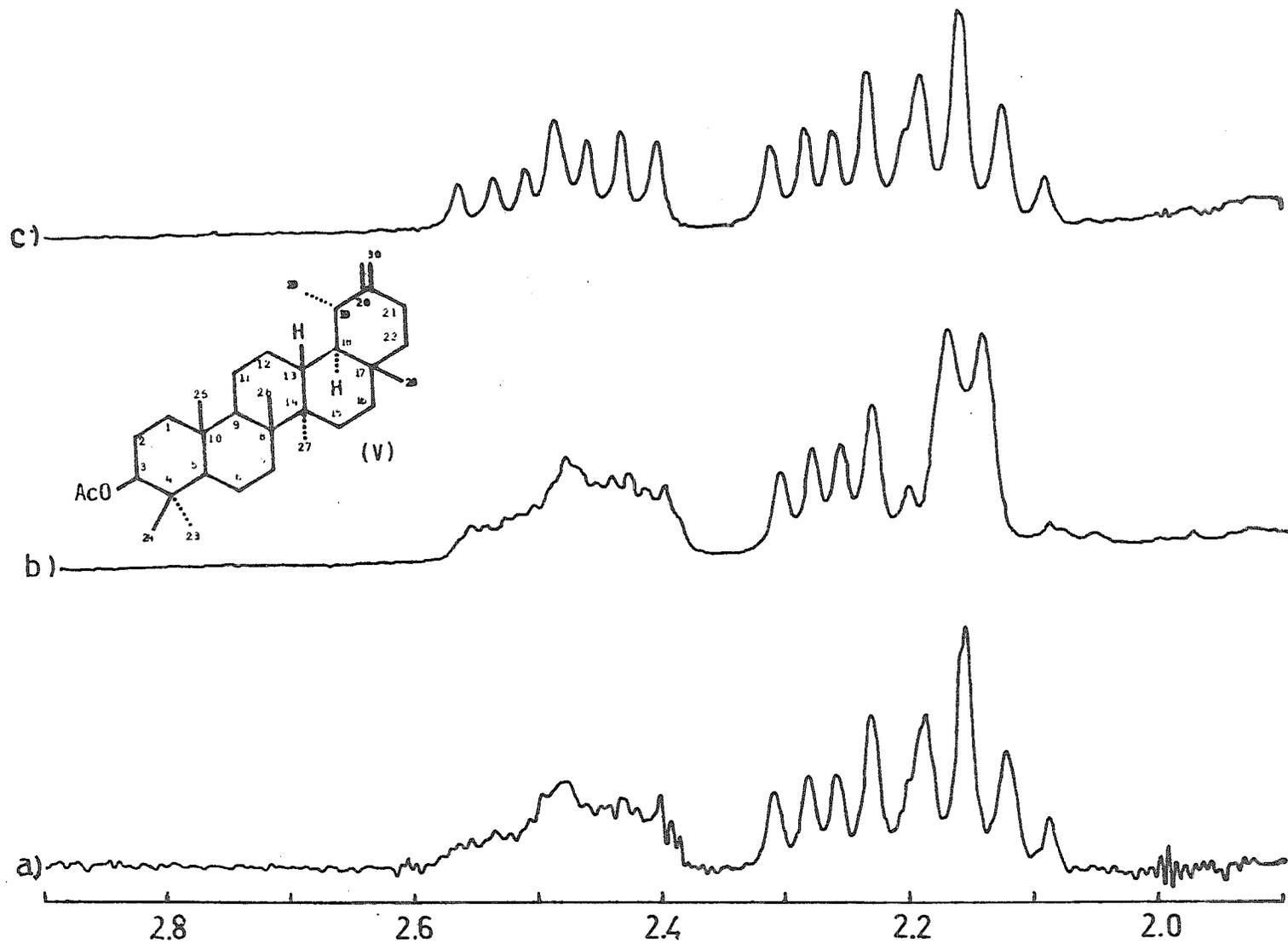


Figura III.3.- Espectro de RMN de ^1H de Taraxasterol de la región alílica. (a): espectro normal; (b): espectro con C-29 desacoplado (δ 1.0); (c): espectro con $=\text{CH}_2$ desacoplado (δ 4.92)

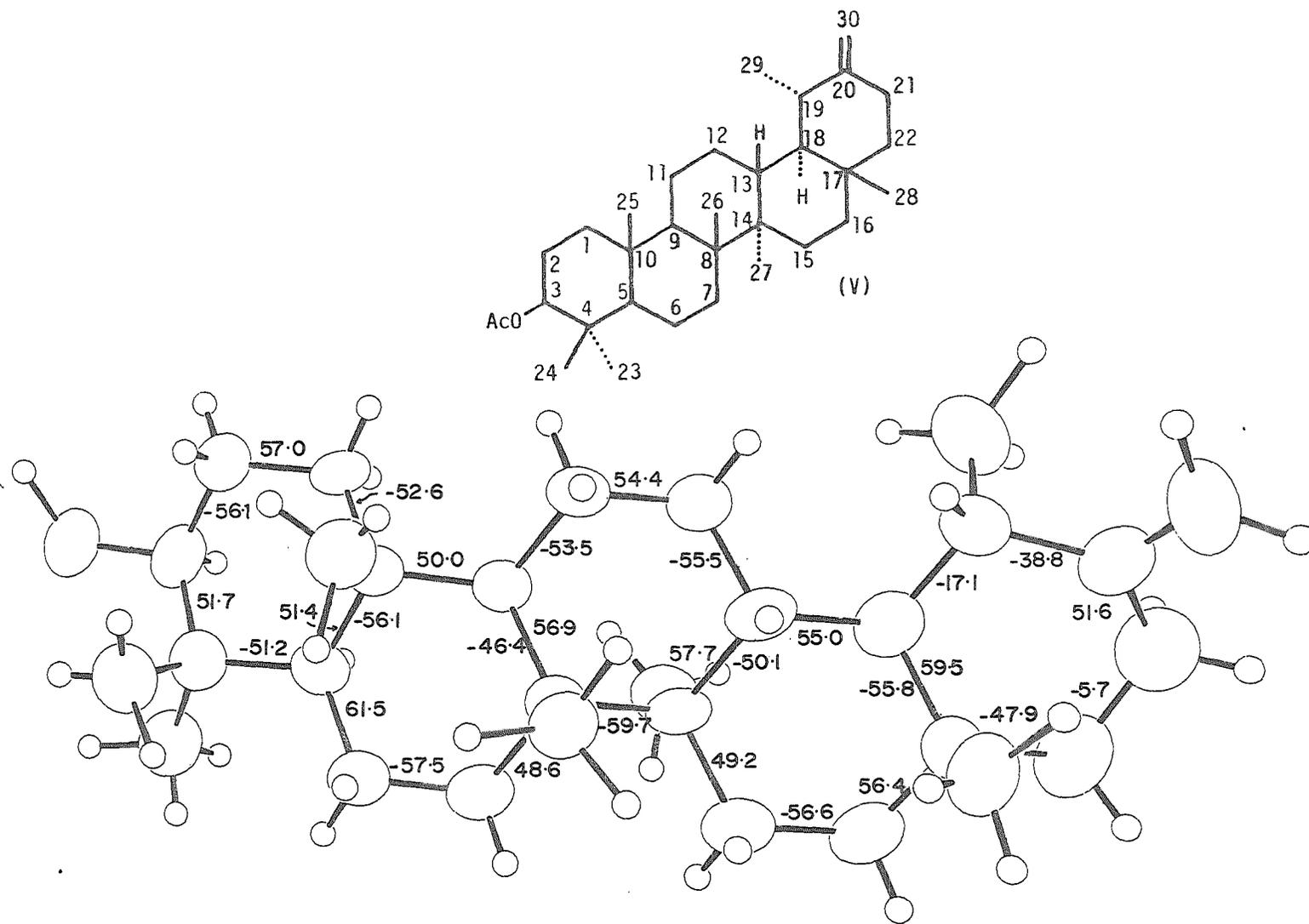


Figura III.4.- Visión en perspectiva de elipsoides representando las posiciones atómicas del Tarxasterol. Los ángulos diedros para los enlaces C-C-C-C se indican numéricamente. Obsérvese la cercanía entre C-12 y C-29.

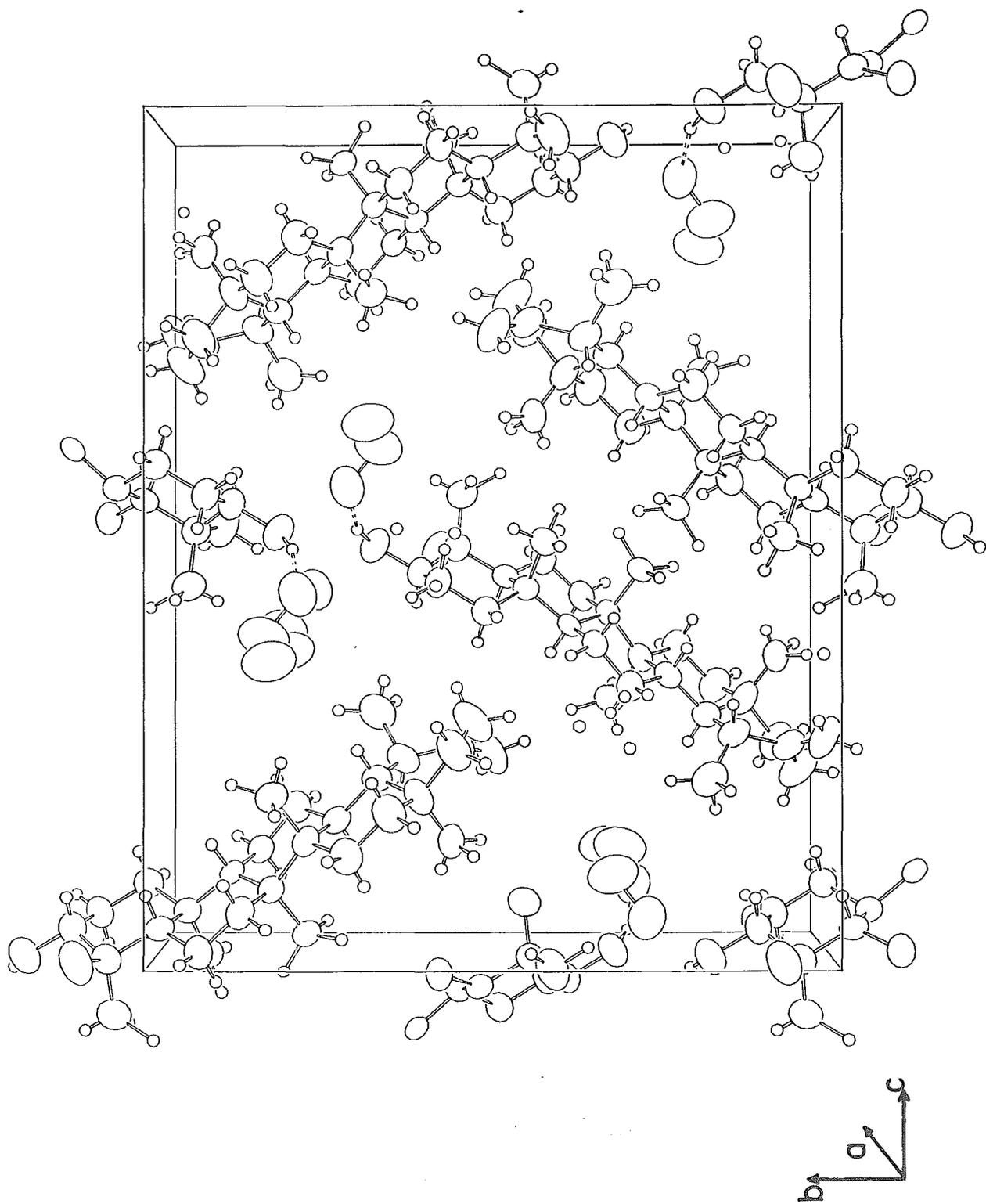


Figura III.5.- Diagrama del empaque cristalino del solvato Taraxasterol-etanol.

CONCLUSIONES

1.- Se llevó a cabo el estudio fitoquímico propuesto para obtener metabolitos secundarios de Montanoa tomentosa y Mikania micrantha, obteniéndose tres sustancias que se emplearon para el estudio estructural en este trabajo. De M. micrantha se obtuvo Micanocriptina y de M. tomentosa, ácido Grandiflorénico y Taraxasterol.

2.- Se identificaron las tres sustancias por sus constantes físicas y la información espectroscópica preliminar. Sin embargo, se encontró que la información espectroscópica de rnm de ellas quedaba dentro de tres categorías: no se encontraba descrita, era incompleta o estaba asignada incorrectamente. Respectivamente, estos fueron los casos del ácido grandiflorénico, de Micanocriptina y de Taraxasterol.

3.- Se asignó totalmente y de manera no ambigua el espectro de rnm de Micanocriptina. La técnica de recuperación de la magnetización invertida permitió la asignación definitiva entre las señales del metilo C-14 y H-9 que se encontraron sobrepuestas aún en 270 MHz, aprovechando las diferencias entre sus tiempos de relajación T_1 . Al aplicar esta técnica se superó la capacidad del experimento de correlación de desplazamientos y constantes de acoplamiento con el que no se puede diferenciar la J de señales que tienen igual desplazamiento químico.

4.- Se asignó totalmente el espectro de ^1H y de ^{13}C de Micanocriptina utilizando experimentos de pulsos unidimensionales y bidimensionales. De los primeros, se obtuvo el espectro DEPT editado que permitió la asignación de metilos, metilenos, metinos y carbonos cuaternarios en un solo experimento. En el segundo caso, se obtuvieron los espectros de correlación heteronuclear directa e indirecta que permitieron la asignación total e inequívoca de hidrógenos y carbonos de la molécula.

5.- Los valores de las constantes de acoplamiento de Micanocriptina en disolución, fueron graficadas contra los valores de los ángulos diedros predichos de la ecuación de Karplus, y se compararon con los ángulos diedros obtenidos de los datos de la estructura cristalina obtenida por difracción de rayos X. Se demostró la similitud de la conformación de la Micanocriptina en disolución y en estado cristalino.

6.- Se correlacionaron totalmente los desplazamientos químicos de los hidrógenos del ácido grandiflorénico con las señales de los carbonos empleando el experimento de correlación heteronuclear directa a pesar de la gran sobreposición de señales en la región de alto campo.

7.- Se determinaron las relaciones de vecindad entre los hidrógenos del ácido grandiflorénico mediante el experimento de correlación homonuclear de desplazamientos COSY. Se determinaron las secuencias (2)H-1, (2)H-2 y (2)H-3 sin poder conocerse con precisión la unión de los extremos de este fragmento con los carbonos cuaternarios C-10 y C-4. También se obtuvieron las conectividades H-5, (2)H-6 y (2)H-7; H-11, (2)H-12 y H-13; (2)H-14, (2)H-15 y H-17 (estos dos últimos, conectados alílicamente).

8.- Se diseñó una secuencia novedosa de pulsos con base en el trabajo de Richarz et. al. para la determinación de correlaciones indirectas entre ^1H y

^{13}C , que permitió observar la transferencia de magnetización de los hidrógenos de los grupos metilo C-18 y C-20 del ácido grandiflorénico, hacia todos los carbonos a dos y tres enlaces de distancia. Esta secuencia de pulsos permitió la asignación inequívoca de los carbonos C-19, C-3, C-4 y C-5 cercanos a C-18, y de C-1, C-10, C-5 y C-9 cercanos a C-20. Este experimento determinó que señal de la secuencia de metilenos (2)H-1 - (2)H-2 - (2)H-3 correspondía a (2)H-1 por su cercanía a C-20 y cuál a (2)H-3 por su relación con C-18.

9.- Se determinaron las relaciones de conectividad ^1H - ^1H anti del ácido grandiflorénico, optimizando el experimento "COSY" para la observación constantes de acoplamiento similares o mayores que 5 Hz. Adicionalmente, se aumentó el potencial de este experimento modificando los efectos anisotrópicos del disolvente al pasar de cloroformo a benceno.

10.- Se identificaron totalmente en el espectro de ^{13}C de Taraxasterol las señales de metilos, metilenos, metinos y carbonos cuaternarios con el experimento DEPT y se observó que la asignación previa contenía varios errores de asignación. Se corrigieron 10 señales del espectro de ^{13}C del acetato de Taraxasterol asignadas incorrectamente en trabajos previos, mediante la aplicación del experimento unidimensional de edición espectral "DEPT" y el experimento bidimensional INADEQUATE. Se demostró que la técnica de asignación utilizando el experimento SFORD debe ser sustituida cuando se desea realizar asignaciones inequívocas en regiones espectrales congestionadas de señales.

11.- Se demostró la utilidad del experimento bidimensional INADEQUATE para determinar de manera no ambigua la conectividad ^{13}C - ^{13}C de una molécula compleja y construir su esqueleto carbonado. Para corroborar la asignación espectral en rmn, se determinó la estructura en estado cristalino de Taraxasterol obtenido por hidrólisis de su acetato natural.

12.- Se correlacionó la conformación del anillo E obtenida por rmn, con la observada en el estado cristalino encontrándose que son muy similares. Con ello se explicaron las características del espectro de rmn de ^1H en la región alílica en términos de la distorsión del anillo E que resultó ser de bote. Se mostró que la conformación es un factor que puede modificar sustancialmente los desplazamientos y por tanto las asignaciones basadas en parámetros de aditividad deben ser abandonadas cuando sea posible recurriendo a técnicas mas avanzadas.

13.- Se demostró que el empleo de las técnicas de pulsos modernas, uni- y bidimensionales, mejora sustancialmente el proceso de asignación espectral y como consecuencia permite que la elucidación estructural orgánica se lleve a cabo de manera mas rápida, sencilla y segura.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- J.L. Diaz, Ed., *Indice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México*, Monografías Científicas de México, IMEPLAM, A.C., México, 1976 y J. L. Diaz, Ed., *Usos de las Plantas Medicinales de México*, Monografías Científicas II, IMEPLAM, A.C., Mexico, 1977.
- 2.- R. G. Enríquez, M. A. Chávez and W.F. Reynolds, *J. Nat. Prod.*, 47, 896 (1984).
- 3.- W. Herz, A. Srinivasan and D.S. Kalyanamaran, *Phytochem.*, 14, 233, (1975).
- 4.- M.J. Bovill, M.H.P. Gay, G.A. Sim, D.N.J. White and W. Herz, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, 53, (1979).
- 5.- (a) L.D. Hall and C.M. Preston, *Carbohydr. Res.*, 27, 286 (1973); (b) L.D. Hall, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 29, 11, (1974).
- 6.- A. Bax, "Two Dimensional NMR in Liquids", D. Reidel, Holland, 1982.
- 7.- D.M. Doddrell, D.T. Pegg and M.R. Bendall, *J. Magn. Reson.*, 48, 323, (1982).
- 8.- (a) A.A. Maudsley, L. Muller and R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 28, 463, (1977); (b) A. Bax and G.A. Morris, *J. Magn. Reson.*, 42, 501, (1981).
- 9.- (a) J.B. Stothers, "Carbon 13 NMR Spectroscopy", Academic Press, New York, 1972; (b) E. Breitmaier and W. Voelter, "¹³C NMR Spectroscopy", Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
10. (a) C. Wynants, K. Hallinga, G. van Binst, A. Michel and J. Zanen, *J. Magn. Reson.*, 57, 93, (1984); (b) J.C. Beloeil, M.A. Delsuc, J.Y. Lallemand, G. Dauphin and G. Jeminet, *J. Org. Chem.*, 49, 1797, (1984); (c) W.F. Reynolds, R.G. Enriquez, L.I. Escobar and X. Lozoya, *Can. J. Chem.*, 62, 2421, (1984).
- 11.- (a) A. Bax, R. Freeman and G.A. Morris, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 4849, (1980); (b) T.H. Mareci and R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, 48, 158, (1982).
- 12.- M. Barfield, A.M. Dean, C.J. Fallick, R.J. Spear, S. Sternhell and P.W. Westernman, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1482, (1975)
- 13.- M. Barfield and S. Sternhell, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1905, (1972).
- 14.- M. Barfield and B. Shkrabarti, *Chem. Rev.*, 69, 757, (1969).
- 15.- R.R. Fraser and B.F. Raby, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 3458, (1972).
- 16.- P.E. Hansen, *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 14, 175, (1981).
- 17.- A.J. Gallegos, *Contraception* 27, 211, (1983).
- 18.- C. H. Brieskorn and E. Pohlman, *Chem. Ber.*, 102, 2621, (1969).

- 19.- F. Piozzi, S. Passannanti, M.L. Marino and V. Spiro, *Can. J. Chem.*, 50, 109, (1972).
- 20.- Y. Caballero y F. Walls, *Bol. Inst. Quim. UNAM*, 22, 79, (1970).
- 21.- A. Bax. Two-dimensional nuclear magnetic resonance in liquids. D. Reidel, Holland. (1982).
- 22.- R. Benn and H. Gunther. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 22, 350, (1983).
- 23.- (a) K. Nagayama, K. Wurthrich, and R. R. Ernst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 305. (1979); (b) K. Nagayama, A. Kuma, K. Wurthrich, and R. R. Ernst. *J. Magn. Reson.* 40, 321, (1980).
- 24.- A. Bax, R. Freeman, and G. A. Morris. *J. Magn. Reson.* 42, 169, (1981).
- 25.- P. D. Bolton. *J. Magn. Reson.* 48, 336, (1982).
- 26.- A. Bax, R. Freeman, and S. P. Kempell. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 4849, (1980).
- 27.- T. H. Mareci and R. Freeman. *J. Magn. Reson.* 48, 158, (1982).
- 28.- (a) K. Yamasaki, K. Kohda, T. Kobayashi, R. Kasai, and O. Tanaka. *Tetrahedron Lett.* 1005, (1976); (b) I. Yamaguchi, N. Takahashi, and K. Fujita. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 992, (1975). P.E. Hansen. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 14, 175, (1971).
- 29.- R. Richarz, W. Amman, and T. Wirthlin. *Varian Applications Note NMR-20*, (1982).
- 30.- W. E. Hull. Two-dimensional N.M.R. Bruker, Karlsruhe. 1982).
- 31.- H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock, and H. R. Loosi. *J. Magn. Reson.* 57, 331, (1984).
- 32.- R. G. Enriquez, L. I. Escobar, M. L. Romero, and M. A. Chavez. *J. Chromatogr.* 258, 297, (1981).
- 33.- A. Bax and R. Freeman. *J. Magn. Reson.* 44, 542, (1981).
- 34.- S. K. Talapatra, M. Bhattacharya, and M. P. Talapatra. *Indian J. Chem.* 11, 166, (1981).
- 35.- A. Patra, A. K. Mukhopadhyay, and A. K. Mitra. *Org. Magn. Reson.* 17, 166, (1981).
- 36.- (a) N. Ahmad and G. Hahn. *Pak. J. Sci. Med. Res.* 2, 55, 1959; (b) J.-H. Chu and P.-C. Yan. *Hsua Hsueh Hsue Pao*, 25, 175, (1959); (c) C. P. Nambouridysad, G. H. Kulkarni, and B. R. Kelkar. *Curr. Sci.* 37, 350, (1968); (d) W. H. Hui and W. K. Lee. *Phytochem.*, 10, 889, (1971); (e) C. P. Dutta, L. P. K. Ray, and D. N. Roy. *Phytochem.*, 11, 2267, (1972); (f) X. A. Dominguez, P. Rojas, M. del C. Dueños Wiarco, and S. Escavaria. *Phytochem.*, 13, 224, (1973); (g) X. A. Dominguez, D. Butruilla, and P. Pereyra. *Rev. Latinoam. Quim.* 7, 98, (1976); (h) H. Khoda, O. Tanaka, and K. Nishi. *Chem. Pharm. Bull.* 24, 1040, (1976); (i) L. Quijano, J. S. Calderon, F. Gomez, J. T. Garduño, and T. Rios. *Phytochem.*, 19, 175, (1980).

- 37.- T. G. Halsall, E. R. H. Jones, and R. E. H. Swayne. *J. Chem. Soc.* 1905, (1954).
- 38.- G. A. Morris. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 428, (1980).
- 39.- S. L. Patt and J. N. Shoolery. *J. Magn. Reson.* 46, 535, (1982).
- 40.- A. K. Patra, A. K. Mitra, T. K. Chatterjee, and A. K. Barua. *Org. Magn. Reson.* 17, 148, (1981).
- 41.- E. Wenkert, G. V. Borddelay, I. R. Burfelt, and L. N. Moreno. *Org. Magn. Reson.* 11, 337, (1978).
- 42.- P. de Mayo. *The higher terpenoids.* Interscience, New York. (1959). p. 180.
- 43.- J. T. Gerig and R. A. Rimermen. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 1219, (1970).
- 44.- (a) F. A. L. Anet and I. Yovari. *Tetrahedron*, 36, 2879, (1978); (b) R. J. Abraham, M. J. Bovill, D. J. Chadwick, L. Griffiths, and F. Sancassan. *Tetrahedron*, 36, 279, (1980).
- 45.- J. Lessard, P.V. M. Tan, R. Martino, and J. K. Saunders. *Can. J. Chem.* 55, 1015, (1977).
- 46.- W.F. Reynolds and J.F. Sawyer; R.G. Enriquez, L.I. Escobar, M.A. Chavez and J.N. Shoolery. *Can. J. Chem.* 63, 1048, (1985).

A P E N D I C E.

Datos Cristalográficos.

Formula peso: 472.8; fórmula mínima: $C_{30}H_{50}O.C_2H_6$.

Estructura cristalina ortorómbica, perteneciente al grupo espacial $F2_12_12_1$, con $a = 7.447(1) \text{ \AA}$, $b = 17.637(2) \text{ \AA}$, $c = 22.269(\text{ \AA})$, $U = 2995 \text{ \AA}^3$, y $D_c = 1.07 \text{ g cm}^{-3}$ para $Z = 4$. Longitud de onda de la radiación $K_{\alpha 1+\alpha}$ de Cu, $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$, $u(\text{Cu } K_{\alpha 1+\alpha}) = 4$.

Las constantes de la celda se obtuvieron por refinación de mínimos cuadrados de las 25 reflexiones escogidas dentro de los valores $9.6 < \theta < 20.4^\circ$. Los datos de intensidad fueron recogidos en temperatura ambiente en el modo omega: 2θ empleando márgenes de barrido angular de $0.85 + 0.147 \tan \theta^\circ$ con un tiempo máximo de barrido de 95 s. En cada reflexión se obtuvo el fondo extendiendo la reflexión 25% a cada lado del pico y fue medido empleando la mitad del tiempo usado en determinar en la recolección de datos del pico. Al final se obtuvieron 2986 reflexiones en el cuadrante h, k, l con ángulo $20 < \theta < 130^\circ$. No se detectaron variaciones significativas en las intensidades de 3 reflexiones estándar observadas después de 8500 s de exposición.

A todas las reflexiones se les aplicaron correcciones de Lorentz y de polarización. El rechazo de datos de ausencia sistemática y de F_{obs} de cero produjo un conjunto final de 2528 reflexiones. Para la resolución inicial de la estructura se recurrió al empleo de métodos directos (MULTAN II) (1) aplicados sobre el grupo de datos obtenidos con radiación de Mo. Los átomos faltantes así como la presencia de una molécula de etanol pudieron ser descritos en mapas de Fourier posteriores. Los átomos de hidrógeno fueron ubicados en las posiciones calculadas o bien en las indicadas por las diferencias de mapas de Fourier (caso de grupos CH_3) con parámetros térmicos fijos ($B = 7.5$ o 10 \AA^2) y sin refinamiento posterior.

El refinamiento de la estructura empleando los datos de reflexión de Cu e incluyendo la corrección de extinción g a los datos, convergió hacia los residuos finales con desplazamiento máximo/error = 0.07, con $R_1 = 0.0773$ ($R_w = 0.0902$) después de 1941 reflexiones (308 variables) con $I > 1.5$ sigma (I). El valor final de g fue de $1.4(2) \times 10^{-6}$ y los promedios (weights) fueron dados por $1/\sigma(F)^2$ donde $\sigma(F) = 4F^2 / \sigma(I)^2 + (0.07 F^2)^2$)^{1/2}. Al final la diferencia de espectros de Fourier mostró no contener picos mayores que 0.22 e \AA^{-3} . Los cálculos fueron realizados en una computadora PDP 11/23 empleando los programas del paquete de Enraf-Nonius para la determinación de estructuras (2). Las tablas de parámetros posicionales de los átomos de hidrógeno, los parámetros térmicos anisotrópicos, longitudes de enlaces, ángulos de enlaces y los factores de amplitud de la estructura final fueron depositados como material suplementario del que apareció en la publicación original.

1.- P. Main et. al. MULTAN 11/82 system of programs for the automatic solution of crystal structures from X-ray diffraction data. University of York, England. 1982.

2.- B. A. Frenz et. al. Enraf-Nonius structure determination package. College Station, Texas. 1981.